

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 994 375**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2015 E 21168364 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024 EP 3912641**

(54) Título: **Compuestos Fármaco-Enlazador hidrófilos**

(30) Prioridad:

**17.02.2014 US 201461940759 P
03.03.2014 US 201461947368 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2025

(73) Titular/es:

**SEAGEN INC. (100.00%)
21823 30th Drive S.E.
Bothell, WA 98021, US**

(72) Inventor/es:

**DORONINA, SVETLANA;
LYON, ROBERT y
SENTER, PETER**

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 994 375 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

Compuestos Fármaco-Enlazador hidrófilos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Se ha generado un gran interés en torno al uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) para la administración dirigida de agentes citotóxicos a células cancerosas. El diseño de conjugados anticuerpo-fármaco, mediante la unión de un agente citotóxico a un anticuerpo, típicamente a través de un enlazador, implica la consideración de una variedad de factores. Estos factores incluyen la identidad y la ubicación del grupo o grupos químicos para la conjugación del agente citotóxico, el mecanismo de liberación del agente citotóxico, el elemento o elementos estructurales (si los hay) que proporcionan la liberación del agente y la modificación estructural del agente libre liberado, si la hay. Además, si el agente citotóxico se va a liberar después de la internalización del anticuerpo, los elementos estructurales y el mecanismo de liberación del agente deben ser consonantes con el tráfico intracelular del conjugado.

[0003] Si bien se han evaluado varias clases de fármacos diferentes para su administración mediante anticuerpos, solo unas pocas clases de fármacos han demostrado ser lo suficientemente activas como conjugados anticuerpo-fármaco, al tiempo que tienen un perfil de toxicidad adecuado, para justificar el desarrollo clínico. Una de estas clases son las auristatinas, relacionadas con el producto natural dolastatina 10. Las auristatinas representativas incluyen MMAE (N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-norefedrina) y MMAF (N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina).

[0004] MMAE es un ejemplo de un agente citotóxico que es activo como fármaco libre y es muy potente después de la conjugación con un anticuerpo monoclonal (mAb) y la liberación después de la internalización en las células. El MMAE se ha conjugado con éxito con un mAb en el aminoácido N-terminal del MMAE a través de un enlace basado en péptido escindible por catepsina B que contiene maleimidocaproil valina-citrulina (mc-vc-) y un grupo autoinmolativo, *p*-aminobencil-carbamoiilo (PABC), para producir conjugados anticuerpo-fármaco de la siguiente estructura, mAb-(mc-vc-PABC-MMAE)_p. (En la fórmula anterior, se prefiere al número de unidades (mc-vc-PABC-MMAE) por mAb o anticuerpo). Tras la escisión del enlace entre el péptido vc y el grupo autoinmolativo PABC, el grupo PABC se libera del MMAE, liberando MMAE libre.

[0005] Otra auristatina, MMAF, es menos activa como fármaco libre (en comparación con MMAE), pero es muy potente después de la conjugación con un anticuerpo, la internalización y la liberación en las células. El MMAF se ha conjugado con éxito con un anticuerpo monoclonal (mAb) en su aminoácido N-terminal a través de un enlazador basado en péptido escindible por catepsina B que contiene maleimidocaproil-valina-citrulina (mc-vc-) y un grupo autoinmolativo *p*-aminobencil-carbamoiilo (PABC) para producir conjugados anticuerpo-fármaco de la estructura, mAb-(mc-vc-PABC-MMAF)_p. (prefiere el número de unidades (mc-vc-PABC-MMAF) por mAb o anticuerpo). Tras la escisión del enlace entre el péptido y la subunidad PABC, el grupo autoinmolativo PABC se libera del MMAF, liberando MMAF libre.

[0006] El MMAF también es activo como un conjugado no escindible, que contiene el enlazador fármaco-maleimidocaproil MMAF (mcMMAF). Cuando este conjugado, mAb-(mcMMAF)_p, se internaliza en las células, la especie activa liberada es cys-mcMMAF. Debido a que el enlace no es escindible, el maleimidocaproilo y un residuo de cisteína del anticuerpo permanecen unidos al extremo N del MMAF. También se informó que el MMAF es activo como un conjugado C-terminal, unido en su aminoácido C-terminal, fenilalanina, a un enlace maleimidocaproilo peptídico. Cuando este conjugado, (MMAF-péptido-mc)_p-mAb se internaliza en las células, la especie activa, MMAF, se libera después de la escisión del enlace MMAF(fenilalanina)-péptido.

[0007] En modelos animales, estos conjugados MMAE y MMAF generalmente exhibieron una disminución dependiente de la carga del fármaco en las propiedades farmacocinéticas. En particular, a medida que aumentaba el número de unidades de enlace de fármaco unidas a cada anticuerpo, disminuía la farmacocinética (PK) de los conjugados.

[0008] Por lo tanto, otro factor importante en el diseño de conjugados anticuerpo-fármaco es la cantidad de fármaco que se puede administrar por agente de selección (es decir, el número de agentes citotóxicos unidos a cada agente de selección (por ejemplo, un anticuerpo), denominado carga de fármaco o carga de fármaco). Históricamente, se suponía que las cargas de fármaco más altas eran superiores a las cargas de fármaco más bajas (por ejemplo, 8 cargas frente a 4 cargas). La justificación era que los conjugados con cargas más altas administrarían más fármaco (agentes citotóxicos) a las células diana. Esta justificación estaba respaldada por las observaciones de que los conjugados con cargas de fármaco más altas eran más activos contra las líneas celulares *in vitro*. Sin embargo, ciertos estudios posteriores revelaron que esta suposición no se confirmó en modelos animales. Se observó que los conjugados que tenían cargas de fármaco de 4 u 8 de ciertas auristatinas tenían actividades similares en modelos de ratón. Véase, por ejemplo, Hamblett et al., Clinical Cancer Res. 10:7063-70 (2004). Hamblett et al. informaron además que los ADC con mayor carga se eliminaron más rápidamente de la circulación en modelos animales. Esta eliminación más rápida sugirió una responsabilidad farmacocinética para las especies con mayor carga en comparación con las especies con menor carga. Véase Hamblett et al. Además, los conjugados con mayor carga tuvieron MTD más bajos

en ratones y, como resultado, tuvieron índices terapéuticos informados más estrechos. Id. Por el contrario, se informó que los ADC con una carga de fármaco de 2 en sitios diseñados en un anticuerpo monoclonal tenían las mismas o mejores propiedades farmacocinéticas e índices terapéuticos en comparación con ciertos ADC con carga de 4. Por ejemplo, véase Junutula et al., Clinical Cancer Res. 16:4769 (2010). Por lo tanto, las tendencias recientes son desarrollar ADC con cargas de fármaco bajas.

[0009] Los enfoques alternativos para superar la vulnerabilidad farmacocinética de los ADC con mayor carga han sido la de añadir grupos solubilizantes a los ADC. Por ejemplo, se han incluido polímeros de polietilenglicol u otros polímeros solubles en agua en los enlazadores (por ejemplo, entre el fármaco y el sitio de unión de un anticuerpo) en un intento de superar las vulnerabilidades farmacocinéticas. Otro enfoque ha sido la de añadir polímeros-fármaco a un anticuerpo, donde cada polímero contiene una gran cantidad de fármacos. Sin embargo, estas alternativas no han logrado necesariamente el resultado deseado. Además, la adición de grupos solubilizantes puede aumentar la complejidad de fabricación de dichos conjugados.

[0010] Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de formatos de conjugados anticuerpo-fármaco (y más generalmente de formatos para otros conjugados), que permitan una mayor carga de fármaco manteniendo al mismo tiempo otras características deseables de los conjugados con menor carga, como las propiedades farmacocinéticas favorables. Sorprendentemente, la presente invención aborda estas necesidades.

20 BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0011] La presente invención se refiere a un compuesto de fármaco-enlazador según se define en las reivindicaciones adjuntas 1 a 15. En el presente documento se describen, entre otros, conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco hidrófilos. Al diseñar los conjugados para que tengan una hidrofilicidad similar a la del agente de focalización no conjugado (por ejemplo, un ligando tal como un anticuerpo), los conjugados conservan la capacidad de proporcionar propiedades farmacocinéticas (PK) similares a las del agente de focalización no conjugado *in vivo*. Los conjugados también pueden tener cargas de fármaco más altas (es decir, mayor número de fármacos-enlazadores hidrófilos por agente de focalización), en comparación con conjugados de carga inferior, al tiempo que conservan dichas propiedades PK deseables y tienen la misma o mejor actividad *in vivo*. (Por ejemplo, los conjugados con carga 4 u 8 pueden tener las mismas o mejores propiedades farmacocinéticas que sus homólogos con carga 2 o 4, respectivamente; dichos conjugados con carga 4 u 8 pueden tener la misma o mejor actividad que sus homólogos con carga 2 o 4, respectivamente). Por lo tanto, los agentes de focalización seleccionados sobre la base de ciertas propiedades deseables se pueden conjugar con enlazadores de fármacos sin perjudicar sustancialmente dichas propiedades deseables como las propiedades farmacocinéticas del agente de focalización solo. También se describen en este documento métodos para preparar y usar dichos conjugados.

[0012] También se describen en este documento métodos para preparar y usar los compuestos de enlazador de fármaco de las reivindicaciones adjuntas.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0013] La **Figura 1** representa un esquema sintético ejemplar para el ensamblaje de los conjugados de fármaco de enlazador-ligando descritos en este documento.

[0014] La **Figura 2** muestra los resultados de un estudio en ratones que compara la estabilidad farmacocinética de un anticuerpo no conjugado, dos ADC hidrófilos y tres ADC de control. Los ADC se muestran en orden de arriba a abajo.

[0015] La **Figura 3** muestra los resultados de un estudio en ratones que compara la estabilidad farmacocinética de cinco ADC hidrófilos y un ADC de control.

[0016] La **Figura 4** muestra los resultados de la cromatografía HIC de conjugados anticuerpo-fármaco.

[0017] La **Figura 5** muestra los resultados de la cromatografía HIC de conjugados anticuerpo-fármaco.

[0018] La **Figura 6** muestra los resultados de estudios de xenoinjerto en ratones que comparan las actividades de ADC cargados con 4 y 8.

[0019] La **Figura 7** muestra los resultados de estudios de xenoinjerto en ratones que comparan las actividades de ADC cargados con 4 y 8.

[0020] La **Figura 8** muestra los resultados de estudios de xenoinjerto de ratón que comparan las actividades de ADC cargados con 4 y 8.

[0021] La **Figura 9** muestra los resultados de estudios de xenoinjerto de ratón que comparan las actividades de ADC cargados con 4 y 8.

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

[0022] A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases como se usan en este documento tienen la intención de tener los siguientes significados. Cuando se usan nombres comerciales en este documento, el nombre comercial incluye la formulación del producto, el fármaco genérico y el ingrediente(s) farmacéutico(s) activo(s) del producto de nombre comercial, a menos que el contexto indique lo contrario.

[0023] El término "índice de hidrofilicidad" se refiere a una medida de la hidrofilicidad de un conjugado en relación con la hidrofilicidad del agente de selección solo (es decir, un Ligando, típicamente un anticuerpo). El índice de hidrofilicidad se mide como el tiempo de retención de un conjugado con respecto al del agente de focalización no conjugado correspondiente (solo) en condiciones de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), como se describe con más detalle en el presente documento. Por ejemplo, se puede determinar el tiempo de retención de un conjugado de Ligando-Enlazador-Fármaco, en relación con el tiempo de retención del ligando no conjugado (normalmente un anticuerpo). En formas de realización seleccionadas, el tiempo de retención del conjugado no es más de dos minutos más lento que el tiempo de retención del ligando no conjugado, como se determina como se describe en los ejemplos (denominado índice de hidrofilicidad de 2). En ciertas formas de realización, el tiempo de retención del conjugado no es más de un minuto más lento que el tiempo de retención del ligando no conjugado, como se determina como se describe en los ejemplos (denominado índice de hidrofilicidad de 1). En ciertas formas de realización, el tiempo de retención del conjugado no es más de medio minuto más lento que el tiempo de retención del ligando no conjugado, según se determina como se describe en los ejemplos (denominado índice de hidrofilicidad de 0,5). Si se utiliza una columna y/o método de interacción hidrofóbica diferente, se puede calibrar utilizando conjugados de las Tablas 2 como referencias para determinar las movilidades de referencia del conjugado (tiempos de elución) en la columna y/o método seleccionado. Las movilidades de referencia determinadas en la columna y/o método de interacción hidrofóbica seleccionado se pueden utilizar entonces para calcular un índice de hidrofilicidad de un artículo de prueba (como se determinaría siguiendo el Ejemplo 3). Por ejemplo, se pueden utilizar enlaces farmacológicos auristatina T-Glu-Dpr-MA, mc-MMAF y mc-vc-PABC-MMAE para formar conjugados para utilizar como referencias. En otro ejemplo, se pueden utilizar como referencias un ADC de auristatina T-Glu-Dpr-MA-h1F6, un ADC de h1F6-mc-MMAF y un ADC de h1F6-mc-vc-PABC-MMAE.

[0024] El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada, que tiene el número de átomos de carbono designado (es decir, C₁₋₈ significa de uno a ocho carbonos). Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. El término "alquenilo" se refiere a un grupo alquilo insaturado que tiene uno o más enlaces dobles. De manera similar, el término "alquinilo" se refiere a un grupo alquilo insaturado que tiene uno o más enlaces triples. Entre los ejemplos de dichos grupos alquilo insaturados se incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos e isómeros superiores. El término "cicloalquilo" se refiere a anillos de hidrocarburo que tienen el número indicado de átomos en el anillo (por ejemplo, cicloalquilo C₃₋₆) y que están completamente saturados o que no tienen más de un doble enlace entre los vértices del anillo. El término "cicloalquilo" también hace referencia a anillos de hidrocarburos bicíclicos y policíclicos, como, por ejemplo, biciclo, biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano, etc. El término "heterocicloalcano" o "heterocicloalquilo" se refiere a un grupo cicloalquilo que contiene de uno a cinco heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y el (los) átomo(s) de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. El heterocicloalcano puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o policíclico. Ejemplos no limitativos de grupos heterocicloalcano incluyen pirrolidina, imidazolidina, pirazolidina, butirolactama, valerolactama, imidazolidinona, hidantoina, dioxolano, ftalimida, piperidina, 1,4-dioxano, morfolina, tiomorfolina, tiomorfolina-S-óxido, tiomorfolina-S,S óxido, piperazina, pirano, piridona, 3-pirrolina, tiopirano, pirona, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, quinuclidina y similares. Un grupo heterocicloalcano puede estar unido al resto de la molécula a través de un carbono del anillo o un heteroátomo.

[0025] El término "alquileno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, como se exemplifica por -CH₂CH₂CH₂CH₂- . Por lo general, un grupo alquilo (o alquileno) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, siendo los grupos que tienen 10 átomos de carbono o menos los preferidos en la presente invención. Un "alquilo inferior" o "alquileno inferior" es un grupo alquilo o alquileno de cadena más corta, que generalmente tiene cuatro átomos de carbono o menos. De manera similar, "alquenileno" y "alquinileno" se refieren a las formas insaturadas de "alquileno" que tienen enlaces dobles o triples, respectivamente.

[0026] Como se usa en el presente documento, una línea ondulada, "-----", que intersecta un enlace simple, doble o triple en cualquier estructura química representada en el presente documento, representa el punto de unión del enlace simple, doble o triple al resto de la molécula.

[0027] Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente. Además, para los grupos dialquilamino, las porciones alquilo pueden ser iguales o diferentes y también pueden combinarse para formar un anillo de 3 a 7 miembros con el átomo de nitrógeno al que

está unido cada uno. Por consiguiente, un grupo representado como dialquilamino o $-NR^aR^b$ pretende incluir piperidinilo, pirrolidinilo, morfolinilo, azetidinilo y similares.

[0028] Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Además, términos como "haloalquilo" pretenden incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo C₁₋₄" pretende incluir trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo y similares.

[0029] El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, un grupo hidrocarbonado poliinsaturado, típicamente aromático, que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (hasta tres anillos) que están fusionados entre sí o unidos covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cinco heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y el átomo o los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo y bifenilo, mientras que los ejemplos no limitantes de grupos heteroarilo incluyen piridilo, piridazinilo, pirazinilo, pirimidinilo, triazinilo, quinolinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, benzotriazinilo, purinilo, benzimidazolilo, benzopirazolilo, benzotriazolilo, benzisoxazolilo, isobenzofurilo, isoindolilo, indolizinilo, benzotriazinilo, tienopiridinilo, tienopirimidinilo, pirazolopirimidinilo, imidazopiridinas, benzotiazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, indolilo, quinolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, pirazolilo, indazolilo, pteridinilo, imidazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, pirrolilo, tiazolilo, furilo, tienilo y similares. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo arilo y heteroarilo indicados anteriormente, cuando se describen como "sustituidos", se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación.

[0030] El término "arilalquilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo y similares). De manera similar, el término "heteroaril-alquilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo heteroarilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, piridilmethyl, tiazoliletilo y similares).

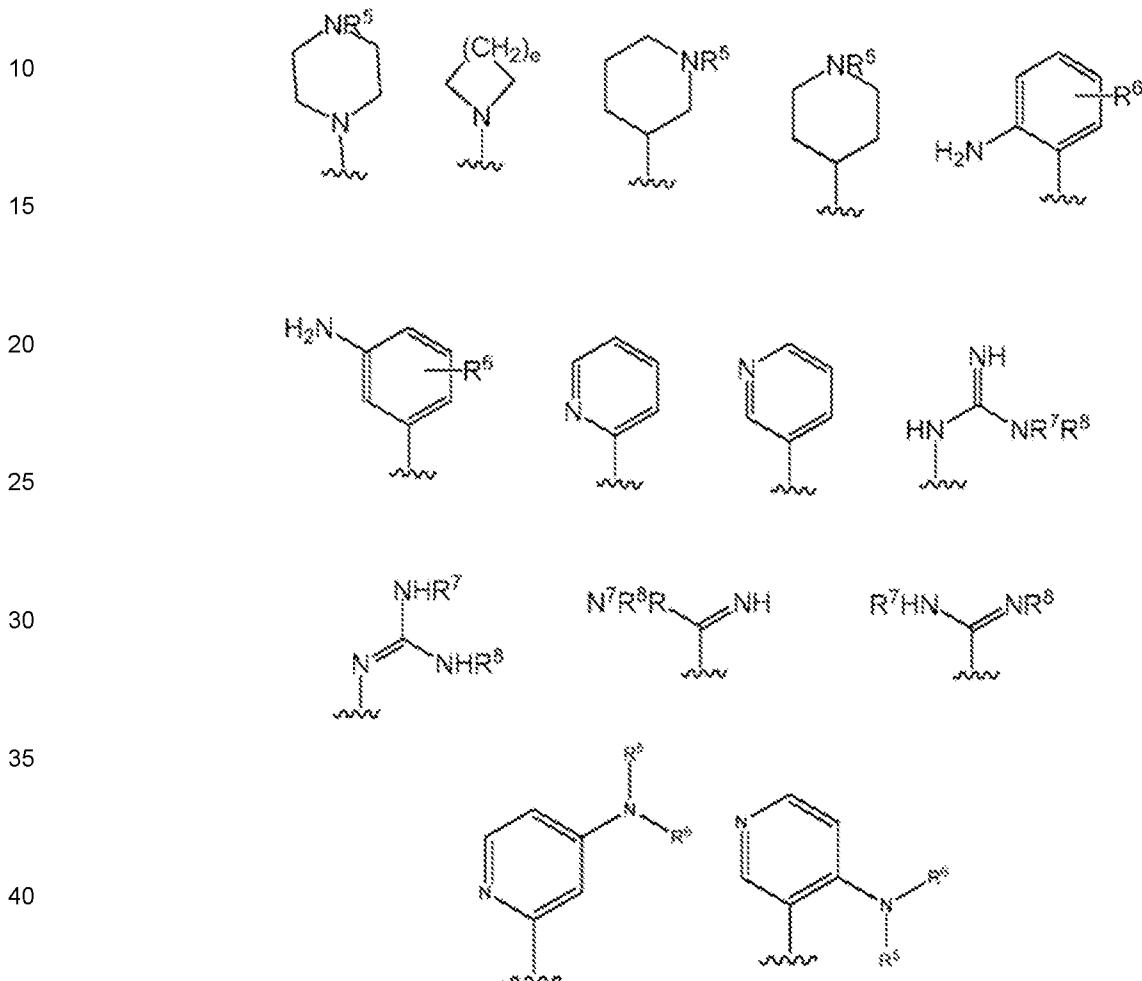
[0031] Los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "arilo" y "heteroarilo"), en algunas formas de realización, incluirán tanto formas sustituidas como no sustituidas del radical indicado. A continuación, se proporcionan los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical.

[0032] A menos que el contexto indique lo contrario, los sustituyentes para los radicales alquilo (incluidos aquellos grupos a los que a menudo se hace referencia como alquieno, alquenilo, alquinilo y cicloalquilo) pueden ser una variedad de grupos seleccionados entre -halógeno -OR' -NR'R" -SR' -SiR'R"R'" -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R', -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'C(O)NR'R", -NR"C(O)₂R', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R", -NR'S(O)₂R", -CN y -NO₂ en un número que varía de cero a (2 m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. R', R" y R'" se refieren cada uno independientemente a hidrógeno, alquilo C₁₋₅ no sustituido, arilo no sustituido, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo C₁₋₅ no sustituido, grupos alcoxi C₁₋₅ o tioalcoxi C₁₋₅, o grupos aril-alquilo C₁₋₄ no sustituidos. Cuando R' y R" están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3, 4, 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R" pretende incluir 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo.

[0033] De manera similar, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo son variados y generalmente se seleccionan de: -halógeno, -OR', -OC(O)R', -NR'R", -SR', -R', -CN, -NO₂, -CO₂R', -CONR'R", -C(O)R', -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR"C(O)₂R', -NR'C(O)NR'R", -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R", -NR'S(O)₂R", -N₃, perfluoro(C_{1-C₄})alcoxi y perfluoro(C_{1-C₄})alquilo, en un número que va desde cero hasta el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde R', R" y R"" se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁₋₈, haloalquilo C₁₋₈, cicloalquilo C₃₋₆, alquenilo C₂₋₈, alquinilo C₂₋₈, arilo y heteroarilo no sustituidos, (arilo no sustituido)-alquilo C₁₋₄ y ariloxi-alquilo C₁₋₄ no sustituido. Otros sustituyentes adecuados incluyen cada uno de los sustituyentes arilo anteriores unidos a un átomo de anillo por un enlace de alquieno de 1 a 4 átomos de carbono.

[0034] El término "base" se refiere a un grupo funcional que desprotona agua para producir un ion hidróxido. Las bases ejemplares son aminas y heterociclos que contienen nitrógeno. Las bases representativas incluyen $-N(R^3)(R^4)$ donde R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de H o alquilo C₁₋₆, preferiblemente H o metilo,

5



45 donde R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ se seleccionan, en cada aparición, independientemente de hidrógeno o alquilo C₁₋₆, preferiblemente H o metilo, y e es 0-4. En algunos aspectos, la base es una base nitrogenada.

50 [0035] El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos que exhiben la actividad biológica deseada (es decir, unión específica a un antígeno diana). Un anticuerpo intacto tiene principalmente dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable se une específicamente a un antígeno diana e interactúa con él. La región variable incluye regiones determinantes complementarias (CDR) que reconocen y se unen a un sitio de unión específico en un antígeno particular. La región constante puede ser reconocida por el sistema inmunitario e interactuar con él (véase, por ejemplo, Janeway et al., 2001, Immuno. Biology, 5.^a 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 derivarse de cualquier especie adecuada. En algunas formas de realización, el anticuerpo es de origen humano o murino. Un anticuerpo monoclonal puede ser, por ejemplo, humano, humanizado o químico.

60 [0036] El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigenico. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población

sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular.

[0037] Un "anticuerpo intacto" es uno que comprende una región variable de unión al antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de 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 secuencia nativa humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos.

[0038] Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, que comprende la región variable o de unión al antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, scFv, scFv-Fc, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos, un fragmento o fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab o fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores que se unen específicamente a un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de célula cancerosa, un antígeno viral o un antígeno microbiano).

[0039] Un "antígeno" es una entidad a la que se une específicamente un anticuerpo. Un antígeno puede ser, por ejemplo, proteínico (por ejemplo, una proteína, polipéptido o péptido), no proteínico (por ejemplo, un carbohidrato) o una combinación de los dos.

[0040] Los términos "unión específica" y "se une específicamente" significan que el agente de selección de diana o ligando, como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, se unirá de una manera altamente selectiva con su antígeno diana correspondiente y no con la multitud de otros antígenos. Para un anticuerpo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo típicamente se une con una afinidad de al menos aproximadamente 1×10^{-7} M, y preferiblemente 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 para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado que tenga el mismo epítopo.

[0041] Los términos "inhibir" o "inhibición de" significan reducir en una cantidad medible, o prevenir por completo.

[0042] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un conjugado (por ejemplo, un conjugado anticuerpo-fármaco) que es eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado puede reducir la cantidad de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir el crecimiento tumoral; y/o aliviar uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco pueda inhibir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia puede, por ejemplo, medirse evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR).

[0043] El término "sustancial" o "sustancialmente" se refiere a una mayoría, es decir, >50 % de una población, de una mezcla o una muestra, preferiblemente más del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de una población.

[0044] Los términos "escindido intracelularmente" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso o reacción metabólica dentro de una célula en un conjugado Ligando-Enlazador-Fármaco (por ejemplo, un Conjugado Anticuerpo-Fármaco (ADC), o similar), por el cual la unión covalente (la unidad Enlace), entre la porción D_E y la unidad Ligando (por ejemplo, un anticuerpo (Ab)) se rompe, lo que resulta en la liberación de la unidad D_E . Las fracciones escindidas del conjugado Ligando-Enlazador-Fármaco son, por lo tanto, metabolitos intracelulares.

[0045] El término "actividad citotóxica" se refiere a un efecto de muerte celular o citotóxico de un compuesto conjugado Ligando-Enlazador-Fármaco, típicamente a través de la unidad de Fármaco liberada, sobre la célula diana. La actividad citotóxica puede expresarse como el valor de IC_{50} (también denominado concentración inhibitoria máxima media), que es la concentración (molar o masa) por unidad de volumen a la que la mitad de las células sobreviven a la exposición al conjugado.

[0046] El término "agente citotóxico" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una sustancia que mata células o causa la destrucción de células de otro modo.

[0047] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición o trastorno fisiológico en mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular desregulado. Un "tumor" comprende células cancerosas.

[0048] Una "enfermedad autoinmune" es una enfermedad o trastorno que surge de y está dirigido contra los propios tejidos o proteínas de un individuo.

[0049] Los ejemplos de un "paciente" incluyen, pero no se limitan a, un ser humano, una rata, un ratón, un conejillo de indias, un mono, un cerdo, una cabra, una vaca, un caballo, un perro, un gato, un pájaro o una gallina. En una forma de realización ejemplar, el paciente es un ser humano.

- 5 **[0050]** Los términos "tratar" o "tratamiento", a menos que el contexto indique lo contrario, se refieren a un tratamiento terapéutico y a medidas profilácticas para prevenir una recaída, en donde el objetivo es inhibir o ralentizar (reducir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, como el desarrollo o la propagación del cáncer. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, el alivio de los síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, un estado estabilizado (es decir, que no empeore) de la enfermedad, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o completa), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Entre los que necesitan tratamiento se incluyen aquellos que ya padecen la afección o el trastorno.
- 10 **[0051]** En el contexto del cáncer, el término "tratar" incluye cualquiera o todos los siguientes: 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 general o disminución del número de células cancerosas y mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad.
- 15 **[0052]** En el contexto de una enfermedad autoinmune, el término "tratar" incluye cualquiera o todos los siguientes: inhibir la replicación de células asociadas con un estado de enfermedad autoinmune, incluyendo, pero sin limitarse a, células que producen un anticuerpo autoinmune, disminuir la carga de anticuerpos autoinmunes y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune.
- 20 **[0053]** La frase "sal farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto (por ejemplo, un fármaco, un enlazador de fármaco o un conjugado de Ligando-Enlazador-Fármaco). El compuesto puede contener al menos un grupo amino y, en consecuencia, se pueden formar sales de adición de ácido con el grupo amino. Las sales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, sales de sulfato, trifluoroacetato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (es decir, sales de 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula, como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabilice la carga del compuesto original. Además, 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/o uno o más contraiones.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA

General

[0054] La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que ciertas combinaciones de grupos de enlace y agentes citotóxicos se pueden utilizar para preparar conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco, tales como conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), que tienen una hidrofilicidad similar a la del Ligando no conjugado (es decir, un agente de direccionamiento, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno). Al mantener una hidrofilicidad conjugada similar a la del Ligando no conjugado, los conjugados resultantes pueden tener mayores cargas de fármaco (por ejemplo, al menos 4 u 8 enlaces de fármaco por Ligando), mientras que mantienen ciertas características deseables del Ligando solo, como una menor depuración *in vivo*, un mayor perfil farmacocinético *in vivo*, una mayor exposición de los conjugados a la(s) célula(s) diana, etc. Ventajosamente, dichos conjugados hidrófilos pueden diseñarse para que tengan una hidrofilicidad similar a la del Ligando sin la necesidad de incluir grupos solubilizantes adicionales, como polietilenenglicol u otros polímeros solubles en agua. (Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco también se denominan en este documento conjugados Fármaco-Ligando, conjugados Ligando-Fármaco o conjugados Ligando-Fármaco).

[0055] Los grupos de enlace hidrófilos (también denominados Enlaces o Unidades de Enlace) de los compuestos Fármaco-Enlazador de la invención están diseñados para una mayor hidrofilicidad. El grupo de enlace permite la liberación eficiente del agente citotóxico (también denominado fármaco o unidad de fármaco) en la célula diana, suficiente para inducir citotoxicidad o un efecto citostático en el caso de un agente citotóxico. Los enlaces hidrófilos están diseñados para la liberación eficiente de la unidad de fármaco una vez que un conjugado de Ligando-Enlazador-Fármaco que comprende el compuesto de fármaco-enlazador se ha internalizado en la célula diana. Los sitios de reconocimiento adecuados para la liberación de la unidad de fármaco por escisión son aquellos que permiten la separación eficiente de la unidad del grupo de enlace hidrófilo. En este caso, el sitio de reconocimiento es un sitio de escisión de péptidos. Los ejemplos de sitios de escisión de péptidos incluyen aquellos reconocidos por proteasas

intracelulares, tales como las presentes en los lisosomas. El enlace peptídico escindible es susceptible de escisión por proteasas cuando el conjugado alcanza su sitio objetivo.

[0056] Las unidades de fármaco son auristatinas que están diseñadas para tener una hidrofilicidad aumentada en combinación con una unidad de enlace hidrófila. Las unidades de fármaco pueden diseñarse ventajosamente para tener sustituyentes hidrófilos, mientras que retienen una potente actividad citotóxica. Las unidades de fármaco de auristatina están unidas en su extremo C-terminal a una unidad de enlace, como se describe con más detalle en este documento.

[0057] L^H es un enlace hidrófilo que contiene uno, dos o tres aminoácidos hidrófilos, en donde el primer aminoácido forma un sitio de escisión con la porción de la unidad de fármaco a la que está unido. En algunas formas de realización, L^H es un enlace hidrófilo que comprende uno o dos aminoácidos hidrófilos, en donde el primer aminoácido forma un sitio de escisión con la porción de la unidad de fármaco a la que está unido.

[0058] La hidrofilicidad del conjugado para conjugados de ligando-fármaco que comprenden un compuesto de fármaco-enlazador según las reivindicaciones adjuntas se puede determinar comparando la hidrofilicidad del conjugado con la del agente de orientación no conjugado (es decir, ligando o unidad de ligando), denominada índice de hidrofilicidad. Con referencia a los Ejemplos, el Ejemplo 3 describe un método preferido para determinar el índice de hidrofilicidad de un conjugado. Alternativamente, se puede calibrar una columna y/o método de interacción hidrófoba diferente utilizando conjugados de las Tablas 2 como referencias para determinar las movilidades de referencia del conjugado (tiempos de elución) de las referencias en la columna y/o método seleccionados. Las movilidades de referencia determinadas en la columna y/o método de interacción hidrófoba seleccionados se pueden utilizar entonces para calcular un índice de hidrofilicidad de un artículo de prueba (como se determinaría siguiendo el Ejemplo 3). Por ejemplo, se pueden utilizar enlaces farmacológicos de auristatina T-Glu-Dpr-MA, mc-MMAF y mc-vc-PABC-MMAE para formar conjugados que se utilizarán como referencias. En otro ejemplo, se pueden utilizar como referencias un ADC de auristatina T-Glu-Dpr-MA-h1F6, un h1F6-mc-MMAF y un h1F6-mc-vc-PABC-MMAE.

[0059] En el presente documento se describe un conjugado de Ligando-Enlazador-Fármaco que comprende una unidad de ligando y múltiples compuestos de fármaco-enlazador unidos a la unidad de ligando. La unidad de enlazador comprende un conjunto de enlazador hidrófilo (L^H), que incluye un componente de unión de ligando, como, por ejemplo a través de un enlace tioéter. La unidad de fármaco comprende un agente citotóxico que tiene un componente de unión para la conexión a la unidad de enlazador.

[0060]

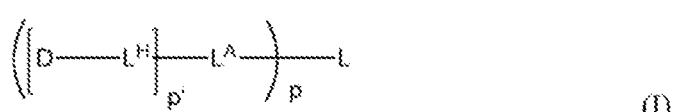
[0061] Se proporcionan compuestos de fármaco-enlazador en los que la porción de enlace comprende un conjunto de enlace hidrófilo (L^H) que tiene un componente de unión de ligando (una fracción maleimida unida), adecuado para reaccionar con un ligando.

[0062]

Conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco

Los conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco no entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Sin embargo, se pueden formar conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco que comprenden compuestos de fármaco-enlazador de las reivindicaciones adjuntas.

[0063] En el presente documento se divultan conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco que tienen la siguiente fórmula:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,
en la que:

L es un ligando que se une específicamente a un objetivo;

L^A es un componente de unión de ligando;

L^H es un enlazador hidrófilo opcionalmente ramificado, cada rama de L^H tiene la fórmula:

$-AA_1-R^{L1}-R^{L2}-R^{L3}-$

donde:

AA_1 es un aminoácido hidrófilo que forma un enlace peptídico escindible con el extremo C-terminal de la unidad de fármaco al que está unido;

R^{L1} es opcional y se selecciona de un aminoácido hidrófilo y un alquíleno opcionalmente sustituido que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L1} está presente y R^{L2} y R^{L3} están ausentes;

R^{L2} es opcional y se selecciona de un aminoácido hidrófilo y un alquíleno opcionalmente sustituido que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L2} está presente y R^{L3} está ausente; y

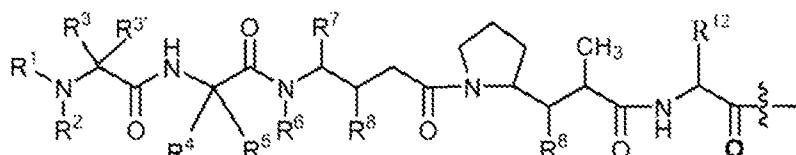
5 R^{L3} es opcional y se selecciona de un aminoácido hidrófilo y un alquíleno opcionalmente sustituido que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L3} está presente;

el subíndice p es un número entero de 4 a aproximadamente 20;

el subíndice p' es un número entero de 1 a 4; y

D tiene la fórmula:

10



20

donde:

R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno (H) y alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido; con la condición de que tanto R¹ como R² no sean H, a menos que ambos de R³ y R^{3'} no sean H;

R³ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido H;

25

R^{3'} se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido H, y al menos uno de R³ y R^{3'} no es H;

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido H;

R⁵ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido H; o

30

R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR^aR^b)_n-, donde R^a y R^b se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo -C₁-C₈ opcionalmente sustituido y n se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;

R⁶ se selecciona del grupo que consiste en alquilo -C₁-C₈ opcionalmente sustituido;

R⁷ se selecciona del grupo que consiste en alquilo -C₁-C₈ opcionalmente sustituido;

cada R⁸ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, -OH, alquilo -C₁-C₈ opcionalmente sustituido y -O-(alquilo C₁-C₈) opcionalmente sustituido;

35 R¹² se selecciona entre H, alquilo -C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilo -X¹ opcionalmente sustituido, carbociclo -C₃-C₈ opcionalmente sustituido, -X¹-(carbociclo C₃-C₈) opcionalmente sustituido, alquíleno-C₁-C₈-NH₂ opcionalmente sustituido, heterociclo -C₃-C₈ opcionalmente sustituido y -X¹-(heterociclo C₃-C₈) opcionalmente sustituido; y

40

cada X¹ es independientemente alquíleno -C₁-C₁₀;

en donde el conjugado Ligando-Enlazador-Fármaco tiene un índice de hidrofilicidad menor o igual a 2;

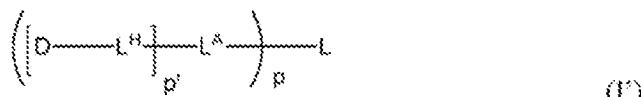
en donde las líneas izquierda y derecha de L^H indican uniones covalentes a la unidad de Fármaco y L^A, respectivamente; y

la línea ondulada de cada D indica una unión covalente a L^H.

45

[0064] Los conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco que tienen la siguiente fórmula también se divulgan en este documento:

50



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,

en donde:

55

L es un ligando que se une específicamente a un objetivo;

L^A es un componente de unión del ligando;

L^H es un enlazador hidrófilo opcionalmente ramificado, cada rama de L^H tiene la fórmula:

60

-AA₁-R^{L1}- R^{L2}- R^{L3}-

en donde:

AA₁ es un aminoácido hidrófilo que forma un enlace peptídico escindible con el extremo C-terminal de la unidad de fármaco al que está unido;

65

R^{L1} se selecciona de un aminoácido hidrófilo y un alquíleno opcionalmente sustituido que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L3} y R^{L3'} no están presentes;

R^{L2} es opcional y se selecciona de un aminoácido hidrófilo y un alquíleno opcionalmente sustituido que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L2} está presente y R^{L3} no está presente; y
 R^{L3} es opcional y se selecciona de un aminoácido hidrófilo y un alquíleno opcionalmente sustituido que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L3} está presente;

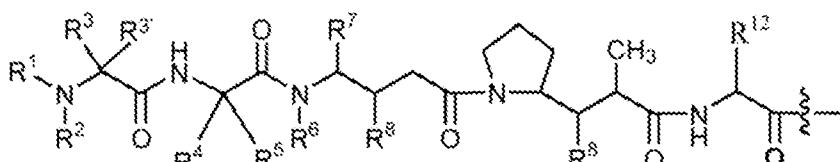
5 el subíndice p es un número entero de entre 4 y aproximadamente 20;

el subíndice p' es un número entero de entre 1 y 4; y

D tiene la fórmula:

10

15



20

en donde:

R^1 y R^2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno (H) y alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido; con la condición de que tanto R^1 como R^2 no sean H, a menos que ambos de R^3 y R^3' no sean H;

25 R^3 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido H,

R^3' se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido H, y al menos uno de R^3 y R^3' no es H;

30 R^4 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido H;

R^5 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido H; o

35 R^4 y R^5 forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR^aR^b)_n-, donde R^a y R^b se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido y n se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;

40 R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido;

45 R^7 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido;

cada R^8 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, -OH, alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido y -O-(alquilo C₁-C₄) opcionalmente sustituido;

50 R^{12} se selecciona entre H, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilo X¹ opcionalmente sustituido, carbociclo C₃-C₈ opcionalmente sustituido, X¹-(carbociclo C₃-C₈) opcionalmente sustituido, alquíleno C₁-C₈-NH₂ opcionalmente sustituido, heterociclo C₃-C₈ opcionalmente sustituido y X¹-(heterociclo C₃-C₈) opcionalmente sustituido; y cada X¹ es independientemente alquíleno C₁-C₁₀;

en donde el conjugado Ligando-Enlazador-Fármaco tiene un índice de hidrofilitad menor o igual a 2;

en donde las líneas izquierda y derecha de L^H indican uniones covalentes a la unidad de Fármaco y L^A, respectivamente; y la línea ondulada de cada D indica una unión covalente a L^H.

45

[0065] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco de fórmulas I e I' se describen con más detalle a continuación.

50

[0066] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco pueden comprender una unidad de Ligando y al menos cuatro unidades de Enlazador-Fármaco, en donde la unidad de Ligando y cada una de las unidades de Fármaco están unidas por una o más unidades de Enlazador que comprenden un conjunto de enlazador hidrófilo (L^H). Las unidades de Enlazador pueden estar unidas a la unidad de Ligando a través de un enlace tioéter. Por ejemplo, cada unidad de Enlazador puede comprender además un anillo de succinimida hidrolizado (o ácido succínico) directamente conjugado a la unidad de Ligando a través de un enlace tioéter.

55

[0067] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco pueden comprender una unidad de Ligando y al menos seis unidades de Enlazador-Fármaco, en donde la unidad de Ligando y cada una de las unidades de Fármaco están unidas por una o más unidades de Enlazador que comprenden un conjunto de enlazador hidrófilo (L^H). Las unidades de Enlazador pueden estar unidas a la unidad de Ligando a través de un enlace tioéter. Por ejemplo, cada unidad de enlace puede comprender además un anillo de succinimida hidrolizada (o ácido succínico) conjugado directamente con la unidad de ligando a través de un enlace tioéter.

60

[0068] Los conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco pueden comprender una unidad de ligando y al menos ocho unidades de enlace-fármaco, en donde la unidad de ligando y cada una de las unidades de fármaco están unidas por una unidad de enlace que comprende un conjunto de enlace hidrófilo (L^H). Las unidades de enlace pueden estar unidas a la unidad de ligando a través de un enlace tioéter. Por ejemplo, cada unidad de enlace puede comprender además

un anillo de succinimida hidrolizada (o ácido succínico) conjugado directamente con la unidad de ligando a través de un enlace tioéter.

[0069] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco comprenden una unidad de Ligando y al menos diez unidades de Enlazador-Fármaco, en donde la unidad de Ligando y cada una de las unidades de Fármaco están unidas por una o más unidades de Enlazador que comprenden un conjunto de enlazador hidrófilo (L^H). Las unidades de Enlazador pueden estar unidas a la unidad de Ligando a través de un enlace tioéter. Por ejemplo, cada unidad de Enlazador puede comprender además un anillo de succinimida hidrolizado (o ácido succínico) directamente conjugado a la unidad de Ligando a través de un enlace tioéter.

[0070] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco comprenden una unidad de Ligando y al menos diecisésis unidades de Enlazador-Fármaco, en donde la unidad de Ligando y cada una de las unidades de Fármaco están unidas por una o más unidades de Enlazador que comprenden un conjunto de enlazador hidrófilo (L^H). Las unidades de Enlazador pueden estar unidas a la unidad de Ligando a través de un enlace tioéter. Por ejemplo, cada unidad de enlace puede comprender además un anillo de succinimida hidrolizado (o ácido succínico) directamente conjugado con la unidad de ligando a través de un enlace tioéter.

Unidad de fármaco

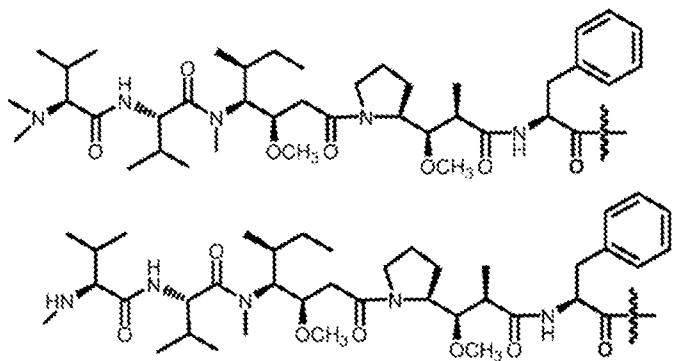
[0071] Con referencia a la unidad de fármaco de fórmulas I e I', R^{12} puede seleccionarse entre H, alquilo -C₁-C₈ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilo -X¹ opcionalmente sustituido, carbociclo -C₃-C₈ opcionalmente sustituido, -X¹-(carbociclo -C₃-C₈) opcionalmente sustituido, alquieno-C₁-C₈-NH₂ opcionalmente sustituido, heterociclo -C₃-C₈ opcionalmente sustituido y -X¹-(heterociclo -C₃-C₈) opcionalmente sustituido.

[0072] En algunos aspectos, R^{12} no es la cadena lateral de fenilalanina o prolina. En algunos aspectos adicionales, R^{12} no es la cadena lateral de fenilalanina, metionina, triptófano o prolina. En algunos aspectos, R^{12} se selecciona de entre las cadenas laterales de L-aminoácidos naturales distintos de prolina y glicina. En algunos aspectos adicionales, R^{12} se selecciona de entre las cadenas laterales de L-aminoácidos naturales distintos de prolina, glicina o fenilalanina. En algunos aspectos adicionales, R^{12} se selecciona de entre las cadenas laterales de L-aminoácidos naturales distintos de prolina, glicina, triptófano, metionina o fenilalanina.

[0074] En algunos aspectos adicionales, R^{12} se selecciona de entre las cadenas laterales del grupo de aminoácidos hidrófilos que consiste en treonina, serina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, homoserina, hidroxivalina, furil alanina, treonina (PO₃H₂), pirazolil alanina, triazolil alanina y tiazolil alanina.

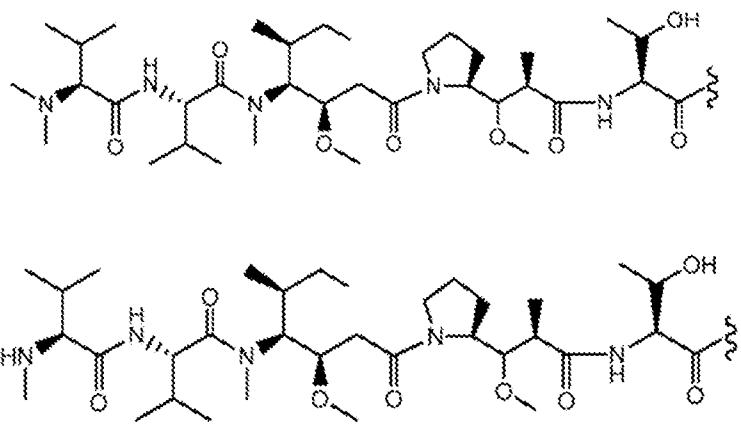
[0075] En algunos aspectos, R^{12} es la cadena lateral de treonina.

[0076] Las unidades de fármaco ejemplares tienen la siguiente fórmula, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde la línea ondulada indica el sitio de unión a la unidad de enlace. En algunas unidades ejemplares, la unidad de fármaco es dimetil- o monometil-auristatina F, como se muestra a continuación:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

[0077] Otras unidades de fármaco ejemplares son las formas dimetil- o monometil de auristatina T.



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

20 La unidad de enlace

[0078] Con referencia a la unidad de enlace de fórmulas I e I', en algunos aspectos L^A está unido covalentemente a un átomo de azufre del ligando. En algunos aspectos, el átomo de azufre es el de un residuo de cisteína que puede formar un enlace disulfuro entre cadenas de un anticuerpo. En otro aspecto, el átomo de azufre es el de un residuo de cisteína que se ha introducido en la unidad de ligando (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio o reacción química). En aspectos adicionales, los átomos de azufre a los que están unidos los L^A se seleccionan entre residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro intercatenario de un anticuerpo y residuos de cisteína que se han introducido en la unidad de ligando (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio o reacción química).

30 **[0079]** AA₁ forma un enlace escindible con la unidad de fármaco. En aspectos en los que AA₁ está unido a un aminoácido de la unidad de fármaco, AA₁ forma un enlace peptídico escindible con la unidad de fármaco. El enlace peptídico escindible es susceptible de escisión por proteasas cuando el conjugado alcanza su sitio diana. En algunos aspectos, AA₁ es un aminoácido hidrófilo, típicamente un aminoácido que se selecciona del grupo que consiste en glicina y formas L de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina. En algunos aspectos, AA₁ es glutamato.

35 **[0080]** En aspectos en los que R^{L1} está presente y es un aminoácido hidrófilo, se puede seleccionar del grupo que consiste en glicina; formas L o D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; -NH-CH(R^a)-CO-; y -NH-CH(COOH)-R^b; en donde R^a se selecciona de -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona de -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-. En algunos aspectos adicionales, R^{L1} se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; glicina; -NH-CH(R^a)-C(O); y -NH-CH(COOH)-R^b; en donde R^a se selecciona entre -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona entre -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

40 **[0081]** En aspectos donde R^{L1} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, puede ser un alquíleno C₁-C₆, opcionalmente sustituido con 1-4 sustituyentes seleccionados entre -NH-, -C(O)-, -COOH, -N(alquilo C₁-C₃), -NH₂ o -NH(alquilo C₁-C₃). En aspectos, R^{L1} es etilendiamina, -NH-CH(COOH)-CH₂-NH- o -C(O)-CH(CH₂NH₂)-.

45 **[0082]** En aspectos donde R^{L2} está presente y es un aminoácido hidrófilo, puede seleccionarse del grupo que consiste en glicina; formas L o D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; -NH-CH(R^a)-C(O)-; y -NH-CH(COOH)-R^b; donde R^a se selecciona de -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona entre -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-. En algunos aspectos adicionales, cuando R^{L2} está presente, se selecciona entre el grupo que consiste en los aminoácidos D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; glicina; -NH-CH(R^a)-C(O)-; y -NH-CH(COOH)-R^b; en donde R^a se selecciona entre -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona entre -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

50 **[0083]** En aspectos en los que R^{L2} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, puede ser un alquíleno C₁-C₆, opcionalmente sustituido con 1-4 sustituyentes seleccionados entre -NH-, -C(O)-, -COOH, -N(alquilo C₁-C₃)-,

NH₂ o -NH(alquilo C₁-C₃). En algunos aspectos, R^{L2} es etilendiamina, -NH-CH(COOH)-CH₂-NH- o -C(O)-CH(CH₂NH₂)-

[0084] En aspectos en los que R^{L3} está presente, y es un aminoácido hidrófilo, puede seleccionarse entre el grupo que consiste en glicina; formas L o D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; -NH-CH(R^a)-C(O)-; y NH-CH(COOH)-R^b-; donde R^a se selecciona de -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona de -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

[0085] En algunos aspectos adicionales cuando R^{L3} está presente, se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; glicina; -NH-CH(R^a)-C(O)-; y -NH-CH(COOH)-R^b-; donde R^a se selecciona entre -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona entre -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

[0086] En aspectos en los que R^{L3} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, puede ser un alquíleno C₁-C₆, opcionalmente sustituido con 1-4 sustituyentes seleccionados entre -NH-, -C(O)-, -COOH, -N(alquilo C₁-C₃)-, -NH₂ o -NH(alquilo C₁-C₃). En algunos aspectos, R^{L1} es etilendiamina, -NH-CH(COOH)-CH₂-NH- o -C(O)-CH(CH₂NH₂)-

[0087] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ está presente y R^{L1}, R^{L2} y R^{L3} están ausentes.

[0088] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ está presente, R^{L1} está presente y R^{L2} y R^{L3} están ausentes.

[0089] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ está presente, R^{L1} está presente, R^{L2} está presente y R^{L3} está ausente.

[0090] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ está presente, R^{L1} está presente, R^{L2} está presente y R^{L3} está presente.

[0091] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ es un aminoácido hidrófilo y al menos uno de R^{L1}, R^{L2} y R^{L3} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, como se establece anteriormente.

[0092] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ es glutamato y al menos uno de R^{L1}, R^{L2} y R^{L3} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, como se establece anteriormente.

[0093] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ es glutamato, R^{L1} es un aminoácido hidrófilo y al menos uno de R^{L2} y R^{L3} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, como se establece anteriormente.

[0094] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ y R^{L1} son aminoácidos hidrófilos y al menos uno de R^{L2} y R^{L3} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, como se establece anteriormente.

[0095] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ es un aminoácido hidrófilo y R^{L1} y opcionalmente R^{L2} son un alquíleno opcionalmente sustituido, como se establece anteriormente.

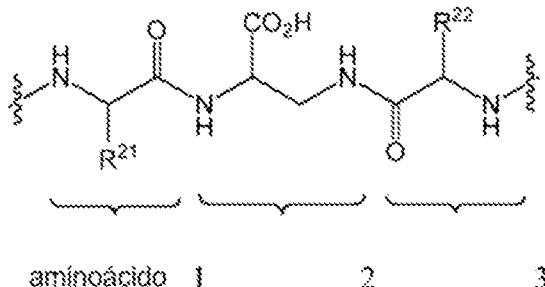
[0096] En algunos aspectos de lo anterior, L^H no incluye un dipéptido de glicina (Gly-Gly), tripéptido o tetrapéptido. En algunos aspectos, L^H no incluye el péptido Asn-(D)Lys.

[0097] En algunos aspectos, L^H incluirá un péptido modificado, que tiene de dos a cuatro aminoácidos. El péptido modificado tiene un aminoácido en la posición 1 (AA₁) que se selecciona para optimizar la liberación de la unidad de fármaco (por ejemplo, mediante escisión de proteasa a través de un enlace peptídico de amida). En una o ambas posiciones, R^{L1} y R^{L2} es un aminoácido que invierte la orientación de los enlaces N a C típicos de los péptidos (formando enlaces amida) y facilita la unión del último aminoácido (por ejemplo, R^{L2} o R^{L3}) que, antes de la unión de la unidad de ligando, incluye un grupo amino a protegido como maleimida. El aminoácido que tiene un enlace N a C invertido está unido al siguiente grupo a través de su cadena lateral. En algunos aspectos, este aminoácido es un aminoácido alfa. En otros aspectos, puede ser un aminoácido beta o gamma. En algunos de estos aspectos, la cadena lateral se selecciona de -CH₂NH₂-, -CH₂CH₂NH₂-, -CH₂CH₂CH₂NH₂- y -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-.

[0098] En algunos aspectos de L^H, el aminoácido que tiene un enlace N a C invertido (R^{L1}) está unido a R^{L2} o R^{L3}, donde R^{L2} o R^{L3} es un aminoácido hidrófilo o un alquíleno opcionalmente sustituido, de acuerdo con cualquiera de los aspectos descritos anteriormente.

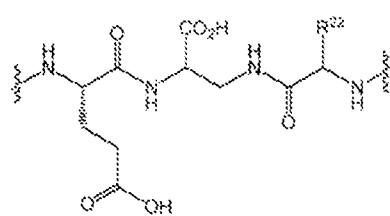
[0099] En algunos aspectos de L^H, el aminoácido que tiene un enlace N a C invertido (R^{L1}) está unido a R^{L2}, donde R^{L2} es un alquíleno opcionalmente sustituido, de acuerdo con cualquiera de los aspectos descritos anteriormente.

[0100] En algunos aspectos adicionales, L^H es un enlazador hidrofílico, escindible, cada rama tiene la fórmula:



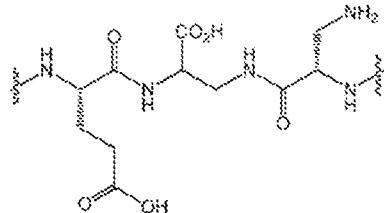
15 donde R^{21} se selecciona entre $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2OH$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CO_2H$, $-CH_2CH_2CO_2H$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ y $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; y R^{22} se selecciona entre $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2OH$ y $-CH_2CH_2OH$. Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

20 [0101] En aspectos adicionales L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:



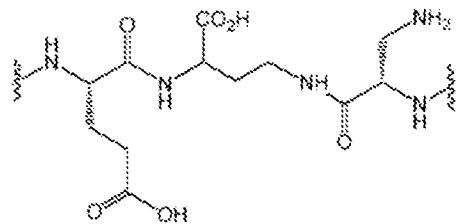
30 en donde R^{22} se selecciona entre $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2OH$ y $-CH_2CH_2OH$. En algunos aspectos, R^{22} se selecciona entre $-CH_2NH_2$ y $-CH_2CH_2NH_2$. Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

35 [0102] En ciertos aspectos, L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:



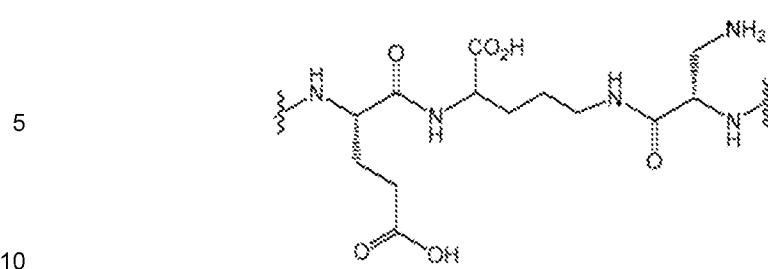
Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y L^A , respectivamente.

45 [0103] En ciertos aspectos, L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:



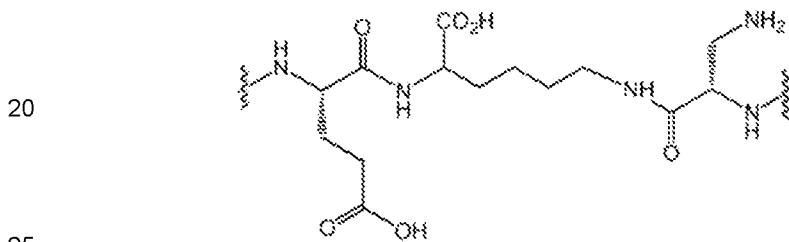
55 Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

60 [0104] En ciertos aspectos, L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:



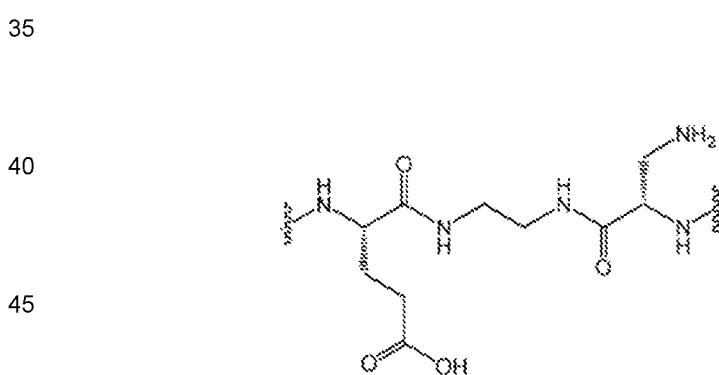
Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

- 15 [0105] En ciertos aspectos, L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:



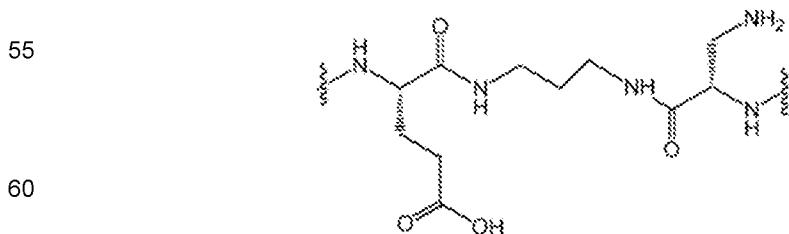
Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

- 30 [0106] En ciertos aspectos, L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:



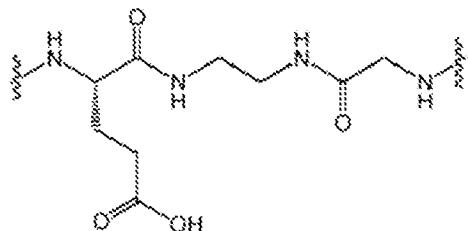
50 Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

- 55 [0107] En ciertos aspectos, L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:



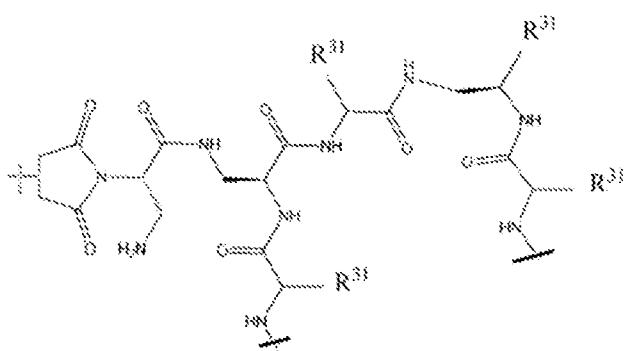
65 Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y L^A , respectivamente.

- [0108] En ciertos aspectos, L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:



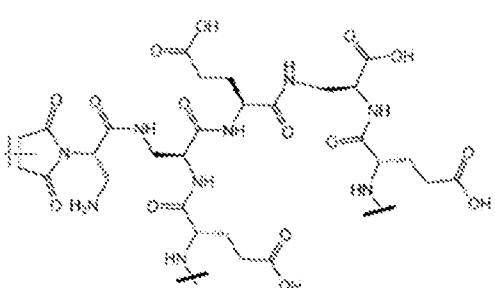
10 Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

15 [0109] En algunos aspectos adicionales de lo anterior, L^H es un enlazador hidrófilo ramificado que tiene la fórmula:



30 en donde cada R^{31} se selecciona independientemente del grupo que consiste en -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CO₂H, -CH₂CH₂CO₂H, -CH₂CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; y cada una de las barras adyacentes al R^{31} indica una unión a una unidad D_E, y la línea discontinua vertical indica una unión a una unidad de Ligando.

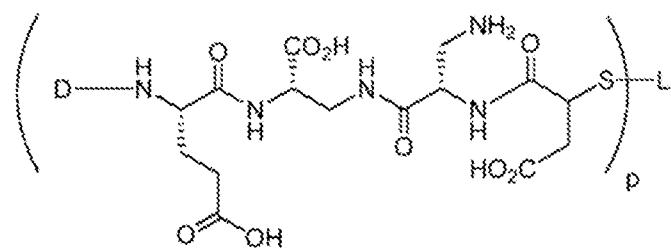
35 [0110] En algunos aspectos adicionales de lo anterior, L^H es un enlazador hidrófilo ramificado que tiene la fórmula:



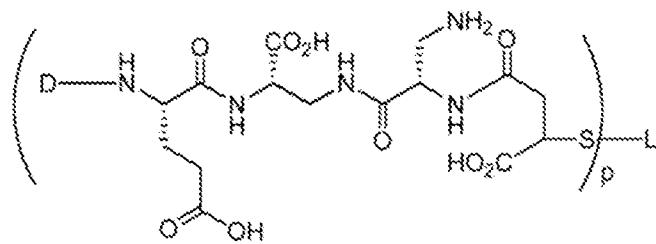
45 en donde cada una de las barras indica una unión a una unidad de Fármaco, y la línea discontinua vertical indica una unión a una unidad de Ligando.

50 [0111] La subunidad L^A se describe con más detalle a continuación.

[0112] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco pueden tener una fórmula seleccionada de:

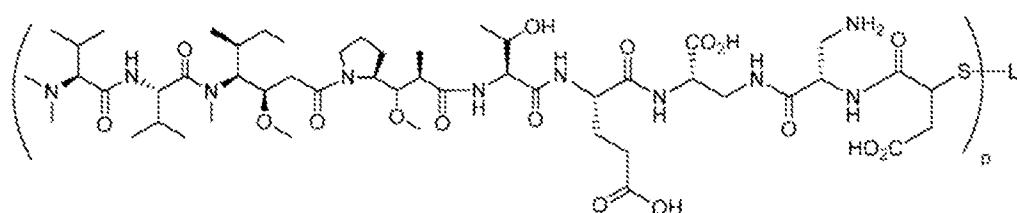


y

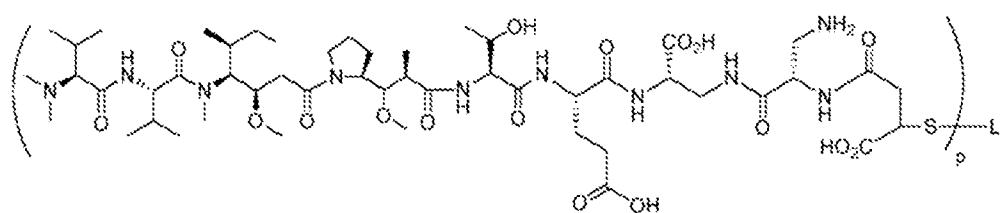


25 donde S se refiere a un átomo de azufre del Ligando.

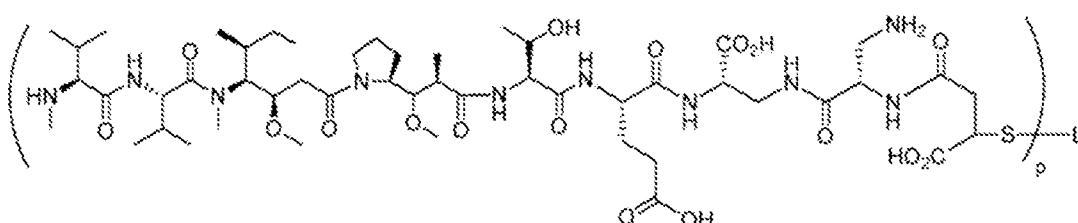
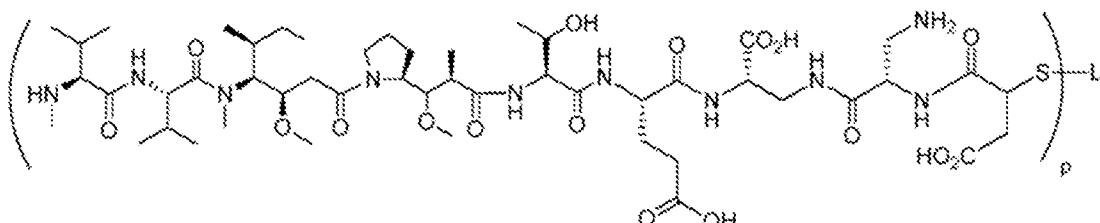
[0113] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco pueden tener las siguientes estructuras:



(a).

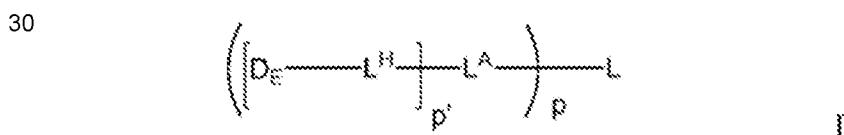


(b).



25 donde S se refiere a un átomo de azufre del Ligando, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0114] En el presente documento se describen conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco que tienen la siguiente fórmula:



L es un Ligando que se une específicamente a un objetivo;

L^A es un componente de unión del Ligando;

L^H es un enlazador hidrófilo opcional, teniendo cada rama de L^H la fórmula:

40 -AA₁-R^{L1}-R^{L2}- R^{L3}-

donde AA₁ es un aminoácido hidrófilo que forma un enlace escindible con D_E;

R^{L1} es opcional y se selecciona de un aminoácido hidrófilo o un alqueno opcionalmente sustituido, que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L1} está presente y R^{L2} y R^{L3} no están presentes;

R^{L2} es opcional y se selecciona de un aminoácido hidrófilo y un alqueno opcionalmente sustituido, que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L2} está presente y R^{L3} no está presente; y

R^{L3} es opcional y se selecciona de un aminoácido hidrófilo y un alqueno opcionalmente sustituido, que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L3} está presente;

50 L^A es un componente de unión de ligando;

el subíndice p es un número entero de entre 4 y aproximadamente 20;

el subíndice p' es un número entero de entre 1 y 4; y

el conjugado Ligando-Enlazador-Fármaco tiene un índice de hidrofilicidad menor o igual a 2;

en donde las líneas izquierda y derecha de L^H indican uniones covalentes a la unidad D_E y L^A, respectivamente; y

D_E es una fracción efectora, como se describe con más detalle en este documento.

[0115] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco de fórmula II se describen con más detalle a continuación.

[0116] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco pueden comprender una unidad de Ligando y al menos cuatro unidades Enlazador-D_E, en donde la unidad Ligando y cada una de las unidades D_E están unidas por una unidad Enlazador que comprende un conjunto enlazador hidrófilo (L^H). Las unidades Enlazador pueden estar unidas a la unidad Ligando a través de un enlace tioéter. Por ejemplo, la unidad Enlazador puede comprender además un anillo de succinimida hidrolizado (o ácido succínico) directamente conjugado a la unidad Ligando a través de un enlace tioéter.

- 5 [0117] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco pueden comprender una unidad Ligando y al menos seis unidades Enlazador-D_E, en donde la unidad Ligando y cada una de las unidades D_E están unidas por una unidad Enlazador que comprende un conjunto enlazador hidrófilo (L^H). Las unidades de enlace pueden estar unidas a la unidad de ligando a través de un enlace tioéter. Por ejemplo, la unidad de enlace puede comprender además un anillo de succinimida hidrolizada (o ácido succínico) conjugado directamente a la unidad de ligando a través de un enlace tioéter.
- 10 [0118] Los conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco pueden comprender una unidad de ligando y al menos ocho unidades de enlazador-D_E, en donde la unidad de ligando y cada una de las unidades D_E están unidas por una unidad de enlace que comprende un conjunto de enlazador hidrófilo (L^H). Las unidades de enlace pueden estar unidas a la unidad de ligando a través de un enlace tioéter. Por ejemplo, la unidad de enlace puede comprender además un anillo de succinimida hidrolizada (o ácido succínico) conjugado directamente a la unidad de ligando a través de un enlace tioéter.
- 15 [0119] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco pueden comprender una unidad Ligando y al menos diez unidades Enlazador-D_E, en donde la unidad Ligando y cada una de las unidades D_E están unidas por una unidad Enlazador que comprende un conjunto enlazador hidrófilo (L^H). Las unidades Enlazador pueden estar unidas a la unidad Ligando a través de un enlace tioéter. Por ejemplo, la unidad Enlazador puede comprender además un anillo de succinimida hidrolizado (o ácido succínico) directamente conjugado a la unidad Ligando a través de un enlace tioéter.
- 20 [0120] Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco pueden comprender una unidad Ligando y al menos dieciséis unidades Enlazador-D_E, en donde la unidad Ligando y cada una de las unidades D_E están unidas por una unidad Enlazador que comprende un conjunto enlazador hidrófilo (L^H). Las unidades Enlazador pueden estar unidas a la unidad Ligando a través de un enlace tioéter. Por ejemplo, la unidad de enlace puede comprender además un anillo de succinimida hidrolizado (o ácido succínico) directamente conjugado con la unidad de ligando a través de un enlace tioéter. Con referencia a la unidad de enlace de fórmula II, en algunos aspectos, el L^A está unido covalentemente a un átomo de azufre del Ligando. En algunos aspectos, el átomo de azufre es el de un residuo de cisteína que forma un enlace disulfuro intercatenario de un anticuerpo. En otro aspecto, el átomo de azufre es el de un residuo de cisteína que se ha introducido en la unidad de ligando (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio o reacción química). En otros aspectos, el átomo o los átomos de azufre a los que están unidos los L^A se seleccionan entre residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro intercatenario de un anticuerpo y residuos de cisteína que se han introducido en la unidad de ligando (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio o reacción química).
- 25 [0122] AA₁ forma un enlace escindible con la unidad D_E. En aspectos en los que AA₁ está unido a un aminoácido de la unidad D_E, AA₁ forma un enlace peptídico escindible con la unidad D_E. El enlace peptídico escindible es susceptible de escisión por proteasas cuando el conjugado alcanza su sitio diana. En otros aspectos, AA₁ forma un enlace amida con un sitio de unión de la fracción efectora (D_E) que es susceptible de escisión (por ejemplo, por proteasas) cuando el conjugado alcanza su sitio diana. En algunos aspectos de la fórmula II, AA₁ es un aminoácido hidrófilo, típicamente un aminoácido natural que se selecciona del grupo que consiste en glicina y formas L de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina. En algunos aspectos, AA₁ es glutamato.
- 30 [0123] En aspectos en los que R^{L1} está presente y es un aminoácido hidrófilo, se puede seleccionar del grupo que consiste en glicina; Formas L o D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; -NH-CH(R^a)-C(O)-; y NH-CH(COOH)-R^b-; en donde R^a se selecciona entre -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona entre -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-. En algunos aspectos adicionales, R^{L1} se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; glicina; -NH-CH(R^a)-C(O); y -NH-CH(COOH)-R^b-; en donde R^a se selecciona de -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona de -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.
- 35 [0124] En aspectos donde R^{L1} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, puede ser un alquíleno C₁-C₆, opcionalmente sustituido con 1-4 sustituyentes seleccionados entre -NH-, -C(O)-, -COOH, -N(alquilo C₁-C₃)-, -NH₂ o -NH(alquilo C₁-C₃). En algunos aspectos, R^{L1} es etilendiamina, -NH-CH(COOH)-CH₂-NH- o -C(O)-CH(CH₂NH₂)-.
- 40 [0125] En aspectos donde R^{L2} está presente y es un aminoácido hidrófilo, se puede seleccionar del grupo que consiste en glicina; formas L o D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; -NH-CH(R^a)-C(O)-; y NH-CH(COOH)-R^b-; donde R^a se selecciona de -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona entre -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.
- 45 [0126] En algunos aspectos adicionales, cuando R^{L2} está presente, se selecciona entre el grupo que consiste en los aminoácidos D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; glicina; -

NH-CH(R^a)-C(O)-; y -NH-CH(COOH)-R^b-; en donde R^a se selecciona entre -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona entre -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂C(O)-.

- 5 [0127] En aspectos en los que R^{L2} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, puede ser un alquíleno C₁-C₆, opcionalmente sustituido con 1-4 sustituyentes seleccionados entre -NH-, -C(O)-, -COOH, -N(alquilo C₁-C₃)-, -NH₂ o -NH(alquilo C₁-C₃). En algunos aspectos, R^{L2} es etilendiamina, -NH-CH(COOH)-CH₂-NH- o -C(O)-CH(CH₂NH₂)-
- 10 [0128] En aspectos en los que R^{L3} está presente, y es un aminoácido hidrófilo, puede seleccionarse entre el grupo que consiste en glicina; formas L o D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; -NH-CH(R^a)-C(O)-; y NH-CH(COOH)-R^b-; en donde R^a se selecciona de -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona de -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂C(O)-.
- 15 [0129] En algunos aspectos adicionales cuando R^{L3} está presente, se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina; glicina; -NH-CH(R^a)-C(O)-; y -NH-CH(COOH)-R^b-; donde R^a se selecciona entre -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H, H₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R^b se selecciona entre -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- y -CH₂CH₂CH₂C(O)-.
- 20 [0130] En aspectos en los que R^{L3} está presente, y es un alquíleno opcionalmente sustituido, puede ser un alquíleno C₁-C₆, opcionalmente sustituido con 1-4 sustituyentes seleccionados entre -NH-, -C(O)-, -COOH, -N(alquilo C₁-C₃)-, -NH₂ o -NH(alquilo C₁-C₃). En algunos aspectos, R^{L3} es etilendiamina, -NH-CH(COOH)-CH₂-NH- o -C(O)-CH(CH₂NH₂)-
- 25 [0131] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ está presente y R^{L1}, R^{L2} y R^{L3} están ausentes.
- 30 [0132] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ está presente, R^{L1} está presente y R^{L2} y R^{L3} están ausentes.
- 35 [0133] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ está presente, R^{L1} está presente, R^{L2} está presente y R^{L3} está ausente.
- 40 [0134] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ está presente, R^{L1} está presente, R^{L2} está presente y R^{L3} está presente.
- 45 [0135] En algunos aspectos adicionales de lo anterior, AA₁ es un aminoácido hidrófilo y al menos uno de R^{L1}, R^{L2} y R^{L3} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, como se establece anteriormente.
- 50 [0136] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ es glutamato y al menos uno de R^{L1}, R^{L2} y R^{L3} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, como se establece anteriormente.
- 55 [0137] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ es glutamato, R^{L1} es un aminoácido hidrófilo y al menos uno de R^{L2} y R^{L3} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, como se establece anteriormente.
- 60 [0138] En algunos aspectos adicionales de lo anterior, AA₁ y R^{L1} son aminoácidos hidrófilos y al menos uno de R^{L2} y R^{L3} está presente y es un alquíleno opcionalmente sustituido, como se establece anteriormente.
- 65 [0139] En algunos aspectos de lo anterior, AA₁ es un aminoácido hidrófilo y R^{L1} y opcionalmente R^{L2} son un alquíleno opcionalmente sustituido, como se establece anteriormente.
- 70 [0140] En algunos aspectos de lo anterior, L^H no incluye un dipéptido de glicina (Gly-Gly), tripéptido o tetrapéptido. En algunos aspectos, L^H no incluye el péptido Asn-(D)Lys.
- 75 [0141] En algunos aspectos, L^H incluirá un péptido modificado, que tiene de dos a cuatro aminoácidos. El péptido modificado tiene un aminoácido en la posición I (AA₁) que se selecciona para optimizar la liberación de la unidad D_E (por ejemplo, mediante escisión de proteasa a través de un enlace peptídico de amida). En una o ambas posiciones, R^{L1} y R^{L2} es un aminoácido que invierte la orientación de los enlaces N a C típicos de los péptidos y facilita la unión del último aminoácido (por ejemplo, R^{L2} o R^{L3}) que, antes de la unión de la unidad de ligando, incluye un grupo amino protegido como maleimida. El aminoácido que tiene un enlace N a C invertido está unido al siguiente grupo a través de su cadena lateral. En algunos aspectos, este aminoácido es un aminoácido alfa. En otros aspectos, puede ser un aminoácido beta o gamma. En algunos aspectos, se selecciona la cadena lateral de -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂- y -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂.

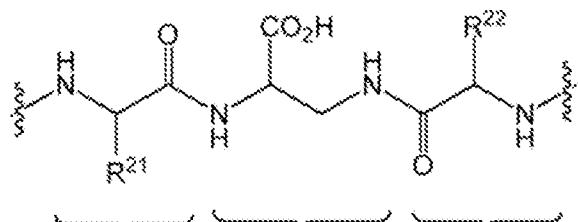
[0142] En algunos aspectos de L^H, el aminoácido que tiene un enlace N a C invertido (R^{L1}) está unido a R^{L2} o R^{L3}, donde R^{L2} o R^{L3} es un aminoácido hidrófilo o un alquíleno opcionalmente sustituido, de acuerdo con cualquiera de los aspectos descritos anteriormente.

5 [0143] En algunos aspectos de L^H, el aminoácido que tiene un enlace N a C invertido (R^{L1}) está unido a R^{L2}, donde R^{L2} es un alquíleno opcionalmente sustituido, de acuerdo con cualquiera de los aspectos descritos anteriormente.

[0144] En algunos aspectos adicionales, L^H es un enlazador hidrofílico, escindible, cada ramificación tiene la fórmula:

10

15



20

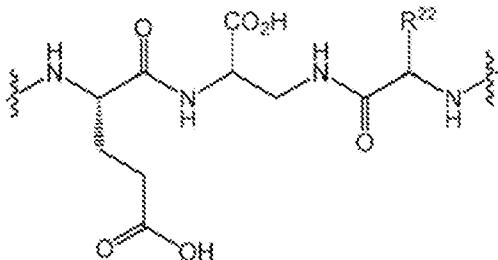
aminoácido 1 2 3

25 donde R²¹ se selecciona entre -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, CH₂CO₂H, -CH₂CH₂CO₂H, -CH₂CH₂CH₂CO₂H y -CH₂CH₂CH₂CO₂H; y R²² se selecciona entre -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂OH y -CH₂CH₂OH. Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad D_E y L^A, o la ramificación de L^H, respectivamente.

30

[0145] En otros aspectos, L^H, o una de sus ramas, tiene la fórmula:

35



40

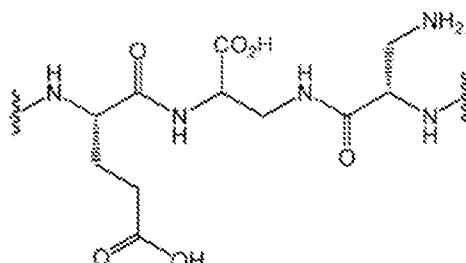
donde R²² se selecciona de -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂OH y -CH₂CH₂OH. En algunos aspectos, R² se selecciona de -CH₂NH₂ y -CH₂CH₂NH₂. Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad D_E y L^A, respectivamente.

45

[0146] En ciertos aspectos, L^H, o una de sus ramas, tiene la fórmula:

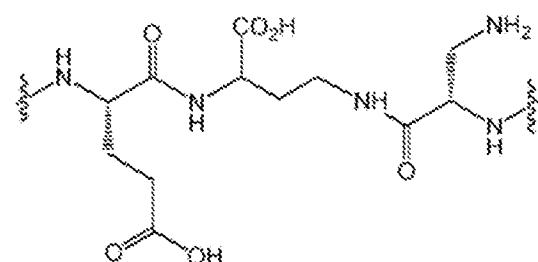
50

55



Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad D_E y L^A, o la rama de L^H, respectivamente.

[0147] En ciertos aspectos, L^H, o una de sus ramas, tiene la fórmula:

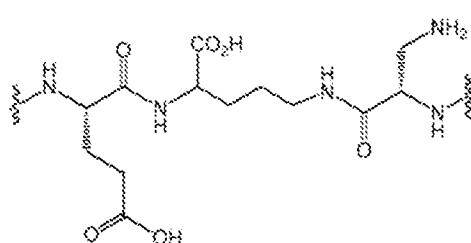


Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad D_E y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

[0148] En ciertos aspectos, L^H , o una de sus ramas, tiene la fórmula:

15

20

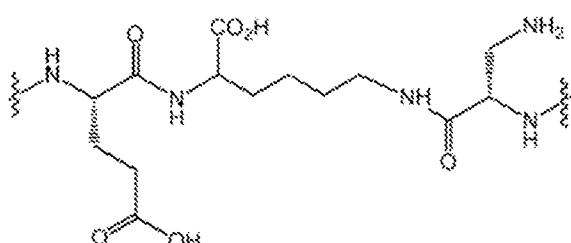


Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad D_E y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

[0149] En ciertos aspectos, L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:

35

40



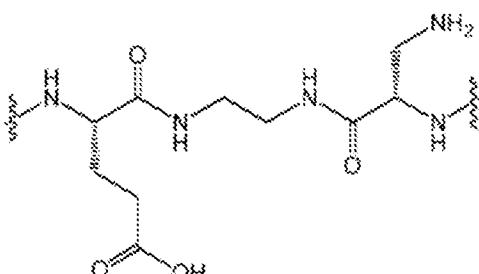
Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad D_E y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

45

[0150] En ciertos aspectos, L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:

50

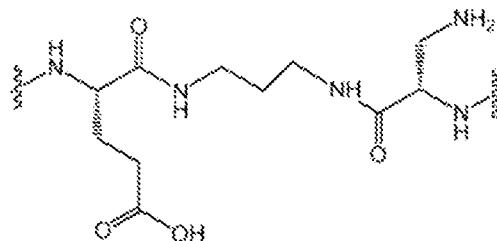
55



Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad D_E y L^A , respectivamente.

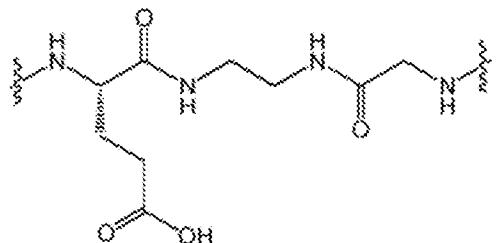
60

[0151] En ciertos aspectos, L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:



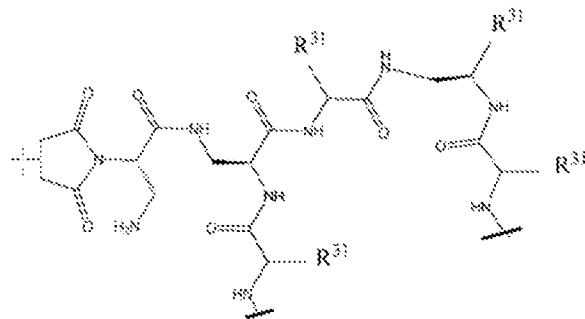
Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad D_E y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

[0152] En ciertos aspectos, L^H , o una rama de la misma, tiene la fórmula:



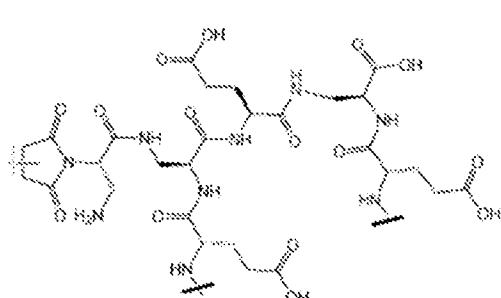
25 Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad D_E y L^A , o la rama de L^H , respectivamente.

[0153] En algunos aspectos adicionales de lo anterior, L^H es un enlazador hidrófilo ramificado que tiene la fórmula:



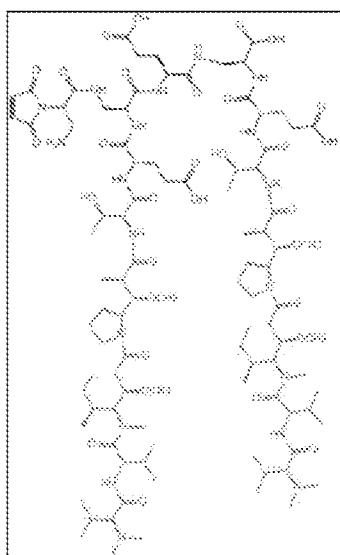
40 en donde cada R^{31} se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2OH$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CO_2H$, $-CH_2CH_2CO_2H$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ y $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; y cada una de las barras adyacentes al R^{31} indica una unión a una unidad D_E y la línea discontinua vertical indica una unión a una unidad de Ligando.

45 [0154] En algunos aspectos adicionales de lo anterior, L^H es un enlazador hidrófilo ramificado que tiene la fórmula:



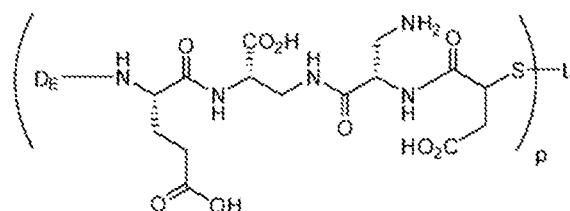
60 en donde cada una de las barras indica una unión a una unidad D_E , y la línea discontinua vertical indica una unión a una unidad de Ligando.

[0155] En algunos aspectos adicionales de lo anterior, un enlazador hidrófilo ramificado tiene la fórmula:

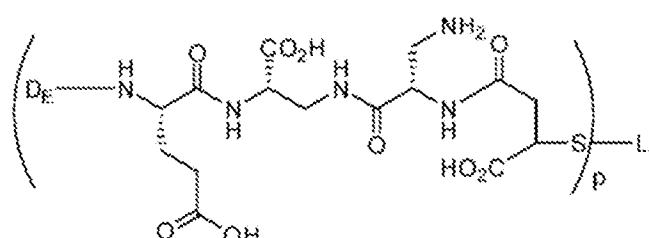
5
10
15
20

Los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco pueden tener una fórmula seleccionada de:

25

30
35

y

40
45

donde S se refiere a un átomo de azufre del Ligando.

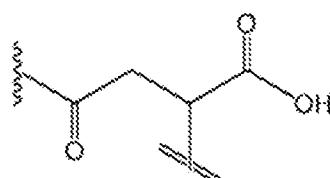
50

L^A - El componente de unión del Ligando

55
55

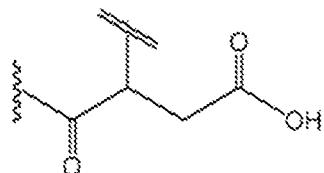
[0157] Haciendo referencia nuevamente a las fórmulas I, I' y II (supra), L^A es un componente de unión del Ligando. L^A puede ser un grupo maleimida o maleimida o succinimida hidrolizada (ilustrado a continuación como una fracción de ácido succínico). Cuando L^A está unido a una unidad de Ligando, puede ser un grupo maleimida o succinimida hidrolizada (ilustrado como una fracción de ácido succínico). En consecuencia, L^A puede tener la fórmula:

60



65 donde la línea ondulada indica el punto de unión a L^H y la \W indica el punto de unión a L, la unidad de Ligando.

[0158] Alternativamente, L^A puede tener la fórmula:



10 donde la línea ondulada indica el punto de unión a L^H y la \\\ indica el punto de unión a L, la unidad de Ligando.

[0159] L^A puede ser el vestigio de un grupo maleimida utilizado para la unión de la porción de Ligando. El diseño de L^H y L^A permite la adición fácil de una unidad de Ligando, así como proporcionar un grupo de ácido carboxílico adicional que aumenta la hidrofilicidad del Conjugado Ligando-Fármaco. Además, el nitrógeno de maleimida se convierte en una α-amina del aminoácido 3 (con referencia a L^H).

L - El Ligando

20 [0160] Refiriéndonos nuevamente a las fórmulas I, I' y II, la unidad de Ligando (L-) es un agente de focalización que se une específicamente a una fracción diana. El Ligando puede unirse específicamente a un componente celular o a otras moléculas diana de interés. La fracción diana, o diana, está típicamente en la superficie celular. La unidad de ligando puede actuar para administrar la unidad de fármaco a la población de células diana particular con la que interactúa la unidad de ligando. Los ligandos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, polipéptidos y péptidos, así como agentes no proteínicos como carbohidratos. Las unidades de ligando adecuadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa (intactos), así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

30 [0161] Cuando la unidad de ligando es un agente de selección de objetivos que no es un anticuerpo, puede ser un péptido o polipéptido, o una molécula no proteínica. Los ejemplos de dichos agentes de selección de objetivos incluyen un interferón, una linfocina, una hormona, un factor de crecimiento y un factor estimulante de colonias, una vitamina, una molécula de transporte de nutrientes (como, pero no se limita a, transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de unión celular.

35 [0162] El L^A puede estar unido covalentemente a un átomo de azufre del ligando. El átomo de azufre puede ser el de un residuo de cisteína que forma un enlace disulfuro entre cadenas de un anticuerpo. Como alternativa, el átomo de azufre puede ser el de un residuo de cisteína que se ha introducido en la unidad de ligando (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio o reacción química). Los átomos de azufre a los que están unidos los L^A se pueden seleccionar entre residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro intercatenario de un anticuerpo y residuos de cisteína que se han introducido en la unidad de ligando (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio o reacción química). El residuo de cisteína se puede introducir en la región Fc en la posición 239 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de la UE como en Kabat (Kabat EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a edición, publicación del NIH n.º 91 3242).

45 [0163] La unidad de ligando puede formar un enlace con la maleimida presente en L^H a través de un grupo sulfhidrilo del ligando para formar una succinimida tio-sustituida. El grupo sulfhidrilo puede estar presente en el Ligando en el estado natural del Ligando, por ejemplo, un anticuerpo de origen natural, o puede introducirse en el Ligando mediante modificación química. La hidrólisis de la succinimida restante produce la porción L^A.

50 [0164] La unidad de Ligando puede tener uno o más residuos de lisina que pueden modificarse químicamente para introducir uno o más grupos sulfhidrilo. Los reactivos que pueden usarse para modificar lisinas incluyen, entre otros, N-succinimidilo S-acetiltioacetato (SATA) e hidrocloruro de 2-iminotiolano (reactivo de Traut).

55 [0165] La unidad de Ligando puede tener uno o más grupos de carbohidratos que pueden modificarse químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrilo.

[0166] Los grupos sulfhidrilo pueden generarse mediante la reducción de los disulfuros intercatenarios. Por consiguiente, una unidad de enlace puede conjugarse con un residuo de cisteína de los disulfuros intercatenarios reducidos.

60 [0167] El grupo sulfhidrilo puede introducirse químicamente en el anticuerpo, por ejemplo, mediante la introducción de un residuo de cisteína. Por consiguiente, en algunas formas de realización, la unidad de enlace se conjuga con un residuo de cisteína introducido.

65 [0168] Los ligandos proteicos, polipeptídicos o peptídicos no inmunorreactivos útiles incluyen, entre otros, 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-α y

TGF- β , factor de crecimiento de vaccinia ("VGF"), insulina y factores de crecimiento similares a la insulina I y II, somatostatina, lectinas y apoproteína de lipoproteína de baja densidad.

5 [0169] Los ligandos particularmente preferidos son anticuerpos. Los anticuerpos polyclonales útiles son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un determinante antigenético particular (por ejemplo, contra un antígeno de célula cancerosa, un antígeno viral, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un carbohidrato, una sustancia química, un ácido nucleico o fragmentos de los mismos). Un anticuerpo monoclonal (mAb) contra un antígeno de interés se puede preparar utilizando cualquier técnica conocida en la técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo.

10 [0170] Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados o anticuerpos monoclonales químéricos de humano-ratón (u otras especies). Los anticuerpos incluyen anticuerpos de longitud completa y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse mediante cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72-79; y Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16).

15 [0171] El anticuerpo puede ser un fragmento de unión a antígeno, un derivado o un análogo de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a las células diana (por ejemplo, antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos) u otro anticuerpo unido a células tumorales o matriz. En este sentido, "unión a antígeno" significa que el fragmento, el derivado o el análogo es capaz de unirse específicamente a la fracción diana. En concreto, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina se puede mejorar mediante la eliminación de las secuencias de la estructura y de CDR que son C-terminales con respecto a la secuencia de CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, se pueden utilizar péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica (por ejemplo, el ensayo de núcleo BIA) (véase, 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).

20 [0172] Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos tales como, pero no limitados a fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab, Fv, anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, scFv, scFv-FV, o cualquier otra molécula derivada de un anticuerpo y que tenga la misma especificidad que el anticuerpo.

25 [0173] Adicionalmente, los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales químéricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, que se pueden preparar utilizando técnicas de ADN recombinante estándar, son anticuerpos útiles. Un anticuerpo químérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, como, por ejemplo, aquellas que tienen una región variable derivada de un monoclonal murino y regiones constantes de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 4.816.567; y la Patente de EE. UU. Nº 4.816.397.) Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región marco derivada de una molécula de inmunoglobulina humana (Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 5.585.089). Dichos anticuerpos monoclonales químéricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, utilizando métodos descritos en la Publicación Internacional Nº WO 87/02671; la Publicación de Patente Europea Nº 0 184 187; la Publicación de Patente Europea Nº 0 171 496; la Publicación de Patente Europea Nº 0 173 494; Publicación Internacional Nº WO 86/01533; Patente de EE. UU. nº 4.816.567; Publicación de Patente Europea Nº 012 023; Berter et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu y col., 1987, Proc. Nacional. Acad. Sci. EE. UU. 84:3439-3443; Liu y col., 1987, J Immunol. 139:3521-3526; Sun y col., 1987, Proc. Nacional. Acad. Sci. EE. UU. 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood y col., 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; Patente de EE. UU. Nº 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.

30 [0174] Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables y se pueden producir utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras humanas.

35 [0175] Los anticuerpos pueden tener modificaciones (por ejemplo, sustituciones, delecciones y/o adiciones) en los residuos de aminoácidos que interactúan con los receptores de Fc. En particular, los anticuerpos pueden tener modificaciones en los residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Nº WO 97/34631). Los anticuerpos también pueden tener modificaciones en los residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor gamma III de Fc.

5 [0176] Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se pueden obtener comercialmente o producir por cualquier método conocido por un experto en la materia, como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se puede obtener, por ejemplo, de la base de datos GenBank o una base de datos similar, las publicaciones bibliográficas o por clonación y secuenciación rutinarias.

10 [0177] Se pueden utilizar anticuerpos para el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se pueden obtener comercialmente o producir por cualquier método conocido por un experto en la materia, como, por ejemplo, técnicas de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se puede obtener, por ejemplo, de la base de datos GenBank o una base de datos similar, de las publicaciones bibliográficas o por clonación y secuenciación rutinarias.

15 [0178] También se pueden utilizar anticuerpos para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de una célula que es responsable de producir anticuerpos autoinmunes se pueden obtener de cualquier organización (por ejemplo, un científico universitario o una empresa) o producir por cualquier método conocido por un experto en la materia, como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinante.

20 [0179] Los anticuerpos útiles se pueden unir a un receptor o a un complejo de receptores. El receptor o complejo receptor puede comprender, por ejemplo, un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, una integrina, un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, una proteína principal de histocompatibilidad, una lectina o una proteína de control del complemento.

25 [0180] El anticuerpo puede ser un anticuerpo CD70 humanizado (véase, por ejemplo, US 2009/0148942), un anticuerpo CD19 humanizado (véase, por ejemplo, US 2009/0136526), un anticuerpo CD30 químérico o humanizado (véase, por ejemplo, US 2010/0239571), un anticuerpo CD33 humanizado (US 2013/0309223), un anticuerpo Beta6 humanizado (véase, por ejemplo, WO 2013/123152) o un anticuerpo Liv-1 humanizado (véase, por ejemplo, US 2013/0259860).

30 Carga de fármaco - "p"

35 [0181] Haciendo referencia nuevamente en general a los conjugados Ligando-Enlazador-Fármaco de fórmulas I, I' y II, el número de unidades de Fármaco-Enlazador por Ligando está representado por p. (En este contexto, el fármaco del Fármaco-Enlazador puede ser un agente citotóxico). Cuando los enlazadores no están ramificados, p representa el número de moléculas de Fármaco-Enlazador por Ligando (por ejemplo, anticuerpo). Cuando se hace referencia a conjugados individuales, p es un entero que representa el número de moléculas de Fármaco-Enlazador por Ligando. Cuando se hace referencia a una composición que contiene múltiples conjugados, p representa el número promedio de Fármaco-Enlazadores por Ligando (o en formas de realización donde los enlazadores no están ramificados, el número promedio de moléculas de Fármaco-Enlazador por Ligando (por ejemplo, anticuerpo)). La variable p varía de 4 a 20, típicamente de 6 a 12, de 8 a 12 o de 8 a 16, o hasta 20.

40 [0182] El número promedio de unidades de fármaco-enlazador por unidad de ligando en una preparación a partir de una reacción de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA, HIC y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco en términos de p. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de conjugados de ligando-fármaco homogéneos, donde p es un cierto valor del conjugado de ligando-fármaco con otras cargas de fármaco, se puede lograr por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

50 **Ensayos de actividad**

55 [0183] Hay una serie de ensayos diferentes que se pueden utilizar para determinar si un conjugado de ligando-fármaco que comprende un compuesto de fármaco-enlazador de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas ejerce un efecto citotóxico sobre una línea celular. En un ejemplo para determinar si un conjugado de ligando y fármaco ejerce un efecto citotóxico sobre 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 durante un período de 72 horas y se exponen a 0,5 µCi de 3H-timidina durante las últimas 8 horas del período de 72 horas, y se mide la incorporación de 3H-timidina en las células del cultivo en presencia y ausencia del conjugado de ligando y fármaco. El conjugado de ligando y fármaco tiene un efecto citotóxico sobre las células si las células del cultivo tienen una incorporación reducida de 3H-timidina en comparación con las mismas células cultivadas en las mismas condiciones pero que no entran en contacto con el conjugado de ligando y fármaco. (Véase también Klussman et al., Bioconjugate Chemistry 15: 765-773 (2004); Doronina et al., Bioconjugate Chemistry 17:114-124 (2006).)

60 [0184] En otro ejemplo, para determinar si un conjugado de ligando-fármaco que comprende un compuesto fármaco-enlazador según las reivindicaciones adjuntas ejerce un efecto citotóxico sobre una línea celular, se mide la viabilidad celular determinando en una célula la captación de un colorante como rojo neutro, azul tripán o azul ALAMAR™ (véase,

por ejemplo, Page et al., 1993, Intl. J of Oncology 3:473-476). En un ensayo de este tipo, las células se incuban en un medio que contiene el colorante, se lavan las células y el colorante restante, que refleja la captación celular del colorante, se mide espectrofotómetricamente. El colorante de unión a proteínas sulfurodamina B (SRB) también se puede utilizar para medir la citotoxicidad (Skehan et al., 1990, J Nat'l Cancer Inst. 82:1107-12). Los conjugados de ligando-fármaco preferidos incluyen aquellos con un valor de CI_{50} (definido como la concentración de mAb que da un 50 % de muerte celular) de menos de 1000 ng/ml, preferiblemente menos de 500 ng/ml, más preferiblemente menos de 100 ng/ml, incluso más preferiblemente menos de 50 o incluso menos de 10 ng/ml en la línea celular.

Compuestos de unión a fármaco

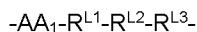
[0185] Se describen en este documento compuestos de unión a fármaco que tienen la fórmula:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,
en donde:

20 L^A es un componente de unión a ligando;

L^H es un enlazador hidrófilo opcionalmente ramificado, cada ramificación tiene la fórmula:



25 donde:

AA₁ es un aminoácido hidrófilo que forma un enlace escindible con el extremo C-terminal de la unidad D_E a la que está unido;

R^{L1} es opcional y es un aminoácido hidrófilo o un alquíleno opcionalmente sustituido, que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L1} está presente y R^{L2} y R^{L3} están ausentes;

30 R^{L2} es opcional y se selecciona entre un aminoácido hidrófilo y un alquíleno opcionalmente sustituido, que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L2} está presente y R^{L3} está ausente; y

R^{L3} es opcional y se selecciona entre un aminoácido hidrófilo y un alquíleno opcionalmente sustituido, que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L3} está presente;

el subíndice p' es un número entero de 1 a 4; y

35 D_E es una fracción efectora (como se describe en este documento);

en donde un conjugado Ligando-Enlazador-Fármaco formado con los Enlazadores de Fármaco tiene un índice de hidrofilicidad menor o igual a 2; y

en donde las líneas izquierda y derecha de L^H indican uniones covalentes a la unidad D_E y L^A , respectivamente.

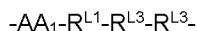
40 **[0186]** También se describen en el presente documento compuestos de enlace de fármaco que tienen la siguiente fórmula:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,
en donde:

50 L^A es un componente de unión de ligando;

L^H es un enlazador hidrófilo opcionalmente ramificado que tiene la fórmula:



55 en donde:

AA₁ es un aminoácido hidrófilo que forma un enlace escindible con el extremo C-terminal de la unidad D_E a la que está unido;

60 R^{L1} es un aminoácido hidrófilo o un alquíleno opcionalmente sustituido, que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L3} y R^{L3} no están presentes;

R^{L2} es opcional y se selecciona de un aminoácido hidrófilo y un alquíleno opcionalmente sustituido, que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L2} está presente y R^{L3} no está presente; y

R^{L3} es opcional y se selecciona de un aminoácido hidrófilo y un alquíleno opcionalmente sustituido, que puede compartir un átomo con L^A cuando R^{L3} está presente;

L^A es un componente de unión de ligando;

el subíndice p' es un número entero de 1 a 4;

y

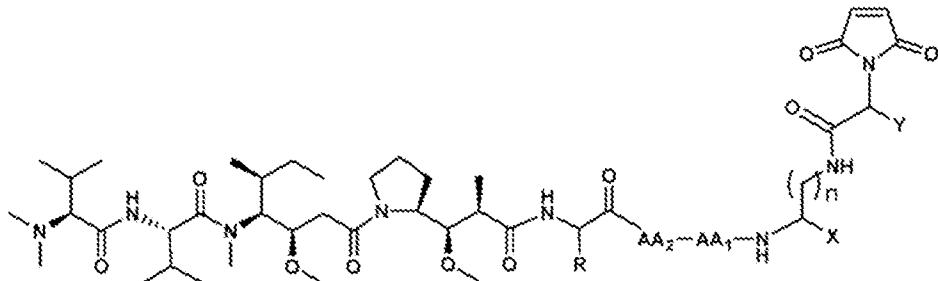
D_E es una fracción efectora (como se describe en el presente documento);

en donde los conjugados de ligando-enlazador-fármaco formados a partir de los enlazadores de fármaco tienen un índice de hidrofilicidad menor o igual a 2;

en donde las líneas izquierda y derecha de L^H indican uniones covalentes a la unidad D_E y L^A , respectivamente.

[0187] Los componentes de los compuestos de enlazador de fármaco de fórmulas IV y IV', por ejemplo, D_E y L^H , pueden ser como se definió anteriormente en relación con los conjugados de ligando-enlazador-fármaco.

En el presente documento se proporciona un compuesto enlazador de fármacos según las reivindicaciones adjuntas que tiene la fórmula:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,
en la que:

R es la cadena lateral de un aminoácido hidrófilo que se selecciona del grupo que consiste en treonina, serina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, homoserina, hidroxivalina, furil alanina, treonina (PO_3H_2), pirazolil alanina, triazolil alanina y tiazolil alanina;

AA_2 es un aminoácido hidrófilo seleccionado del grupo que consiste en glicina y formas L de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina;

AA_1 es un aminoácido hidrófilo seleccionado del grupo que consiste en glicina y formas L o D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina, o está ausente;

X es el subíndice n es 1, X es COOH y el subíndice n es 1, o X es COOH y el subíndice n es 4; y
Y es H o CH_2NH_2 , siempre que: cuando X es H, Y es CH_2NH_2 .

Unidad de fármaco

[0192] En algunas formas de realización, R es la cadena lateral de treonina.

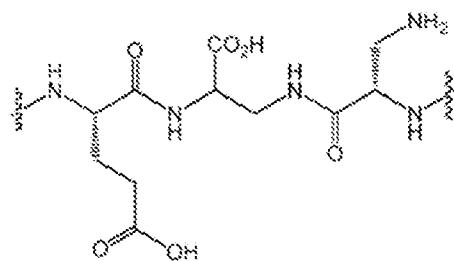
La unidad de enlace

[0194] AA_2 forma un enlace escindible con la unidad de fármaco. En particular, AA_2 forma un enlace peptídico escindible con la unidad de fármaco. El enlace peptídico escindible es susceptible de escisión por proteasas. AA_2 es un aminoácido hidrófilo, típicamente un aminoácido natural que se selecciona del grupo que consiste en glicina y formas L de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina. En algunas formas de realización, AA_2 es glutamato.

[0195] En formas de realización en las que AA_1 está presente, es un aminoácido hidrófilo seleccionado del grupo que consiste en glicina; y formas L o D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina. En algunas formas de realización adicionales, AA_1 se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina.

[0211] En algunas formas de realización de lo anterior, el enlazador hidrófilo (L^H) no incluye un dipéptido de glicina (Gly-Gly), o tripéptido. En algunas formas de realización, L^H no incluye el péptido Asn-(D)Lys.

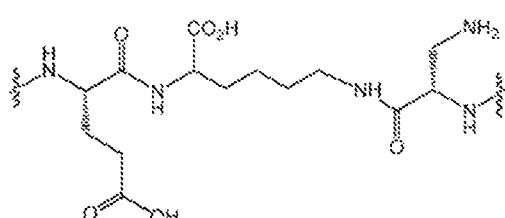
[0217] En ciertas formas de realización, L^H tiene la fórmula:



Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y maleimida, respectivamente.

[0220] En ciertas formas de realización, L^H tiene la fórmula:

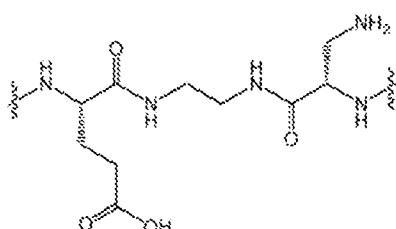
15



Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y maleimida, respectivamente.

[0221] En ciertas formas de realización, L^H tiene la fórmula:

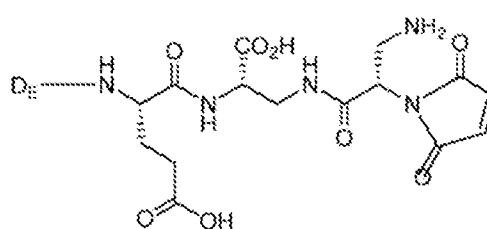
30



Las líneas onduladas izquierda y derecha indican uniones a la unidad de fármaco y maleimida, respectivamente.

[0227] En algunas formas de realización adicionales, los enlazadores de fármaco tienen una fórmula seleccionada de:

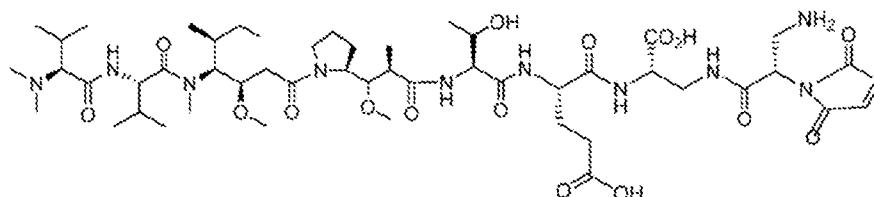
45



donde D_E es la unidad de fármaco.

[0228] Una forma de realización específica incluye lo siguiente:

60



65

(IVa); o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Tratamiento de enfermedades

5 [0301] Los conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco que comprenden compuestos de fármaco-enlazador como se define en las reivindicaciones adjuntas se pueden utilizar para tratar enfermedades. La enfermedad puede ser, por ejemplo, un cáncer o una enfermedad autoinmune. Dichos conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco se pueden administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz y en un programa terapéuticamente eficaz.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

10 [0324] Se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden: conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco que comprenden un compuesto de fármaco-enlazador como se define en las reivindicaciones adjuntas; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los conjugados de Ligando-Enlazador-Fármaco pueden estar en cualquier forma que permita que el compuesto se administre a un paciente para el tratamiento de un trastorno asociado con la expresión del antígeno al que se une específicamente la unidad de ligando. Por ejemplo, los conjugados pueden estar en forma de líquido o sólido.

Métodos para preparar conjugados de ligando-fármaco

20 [0338] En el presente documento se describen métodos para preparar conjugados de ligando-fármaco, enlazadores, enlazador de fármaco y conjugados enlazador-ligando

25 [0339] Los métodos pueden comprender los pasos de proporcionar un enlazador de fármaco o una unidad enlazadora como se describe en el presente documento, conjugar dicho enlazador de fármaco o una unidad enlazadora con un grupo sulfhidrilo de una unidad de ligando para formar un conjugado. El grupo o los grupos maleimida o succinimida tio-sustituidos del conjugado pueden sufrir una reacción de hidrólisis.

30 [0341] Los métodos para preparar un conjugado de ligando-fármaco pueden comprender los pasos de proporcionar una unidad de enlazador de fármaco o una unidad enlazadora; conjugar dicho enlazador de fármaco o unidad de enlazador con un grupo sulfhidrilo de un ligando para formar un conjugado de ligando-fármaco que comprende una succinimida tio-sustituida no hidrolizada; permitir que la succinimida tio-sustituida no hidrolizada experimente una reacción de hidrólisis, en la que toda, sustancialmente 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. La reacción de hidrólisis puede ocurrir bajo las mismas condiciones de reacción que la reacción de conjugación. Las condiciones de conjugación pueden ser un pH de aproximadamente 7,4 y una temperatura de aproximadamente 22 °C.

Ensamblaje de los conjugados de ligando-fármaco

40 Los conjugados de ligando-fármaco descritos en este documento pueden ensamblarse siguiendo el esquema general esbozado en la Figura 1.

EJEMPLOS

45 Se proporcionan ejemplos que quedan fuera del alcance de las reivindicaciones adjuntas para una mejor comprensión de la invención.

General

50 [0342] A menos que se indique lo contrario, los materiales se obtuvieron de proveedores comerciales en el grado de pureza más alto disponible y se utilizaron sin purificaciones adicionales. El DMF anhídrido y el CH₂Cl₂ se adquirieron de Aldrich. El Fmoc-Dolaproína-OH fue sintetizado de manera personalizada por Albany Molecular Research, Inc. (Albany, NY). Se preparó dolavalina-Val-Dil-OH como se describe en otro lugar. Se compraron resina de cloruro de 2-clorotritilo y Fmoc-Dpr(ivDde)-OH (200-300 mesh, 1 % DVB, sustitución 1 mmol/gramo) a Novabiochem. La síntesis en fase sólida se realizó en jeringas de plástico (National Scientific Company) equipadas con un filtro cortado de una lámina porosa de grado medio de PE frita (Scienceware). Se utilizó un agitador Burrell wrist action® (Burrell Scientific, Pittsburgh, PA) para la agitación. Todos los rendimientos en fase sólida informados se basan en el nivel de sustitución inicial de la resina y constituyen un balance de masa de material puro aislado, a menos que se indique lo contrario.

60 [0343] Las purificaciones por HPLC preparativa se realizaron en un instrumento Varian equipado con una columna de fase inversa C12 Phenomenex Synergy MAX-RP de 4 μ, 250 x 10 mm, eluyendo con TFA al 0,05 % en un gradiente de agua-acetonitrilo.

65 [0344] Los datos de los espectros de masas se obtuvieron en un XEVO TOF MS interconectado con un HPLC Waters 2795 equipado con una columna de fase inversa C12 Phenomenex Synergi de 2,0 x 150 mm, 4 μm, 80 Å. El eluyente consistió en un gradiente lineal de acetonitrilo del 5 % al 95 % en ácido fórmico acuoso al 0,1 % durante 10 min, seguido de acetonitrilo isocrático al 95 % durante 5 min a una velocidad de flujo de 0,4 mL/min.

5 [0345] El anticuerpo humanizado h1F6 se une específicamente al antígeno CD70 humano (Cancer Res 2006, 66(4), p. 2328; Patente de EE. UU. Nº 8.067.546). El anticuerpo humanizado hBU12 se une específicamente al antígeno CD19 humano (Blood, 2009, 113(18), p. 4362; Patente de EE. UU. Nº 7.968.687). Las líneas celulares de carcinoma de células renales humanas 786-O y Caki-1 que expresan CD70 humano, y las células de linfoma folicular transformadas humanas DOHH2 que expresan CD19 humano se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Virginia). Todas las líneas celulares se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones de los proveedores y se controlaron de forma rutinaria para detectar contaminación por micoplasma.

10 [0346] Abreviaturas: DPR significa ácido diaminopropiónico; ivDde es 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)-3-metilbutil.

Ejemplo 1 - Procedimientos generales para síntesis

15 [0347] **Síntesis de maleimido-Dpr(Boc)-OH**

Se disolvieron ácido N_{β} -Boc-L-2,3-diaminopropiónico (1 mmol) y anhídrido maleico (98 mg, 1 mmol) en ácido acético (1 mL) en un matraz de fondo redondo de 50 ml, y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, la solución se concentró hasta obtener un aceite a presión reducida. El intermedio de ácido maleico se precipitó añadiendo ~10 mL de CH_2Cl_2 /hexano, 1/1, v/v, y el precipitado se recogió mediante filtración al vacío. A continuación, este material se suspendió en tolueno (9 mL), seguido de la adición de DMA (0,3 mL) y trietilamina (0,42 mL, 3 mmol). La mezcla se agitó a 40-60 °C bajo N_2 hasta que todo el material estuvo en solución. A continuación, el matraz se equipó con un condensador y la solución se calentó a 120 °C y se calentó a reflujo durante 4 horas sobre tamices moleculares. La mezcla de reacción se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado y se concentró hasta casi sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo (10 mL), se transfirió a un embudo de decantación y se lavó con ácido cítrico al 10 % en agua (2 x 10 mL) y salmuera (2 x 10 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se concentró a presión reducida y se secó a alto vacío durante la noche, obteniéndose el producto como un polvo blanco con un rendimiento del 72 %. RMN ^1H (DMSO): δ 1,29 (s, 9H), 3,41 (m, 1H), 3,52 (m, 1H) 4,57 (dd, 1H). 6,97 (t, 1H), 7,07 (s, 2H). LCMS (ESI) calculado para ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ 307,09; encontrado, *m/z* 307,17.

30 [0348] **Procedimientos generales para la síntesis de auristatina-AA₁-MDpr.**

[0349] La Figura 1 ilustra una síntesis ejemplar de enlaces farmacológicos de auristatina-(AA₂)-AA₁-MDpr.

35 [0350] **Carga de resina.** En un recipiente de reacción en fase sólida de 20 mL (jerlinga de plástico con frita de PET) se añadió 1 g de resina de cloruro de 2-clorotritilo (1 mmol según la etiqueta del fabricante), seguido de una solución de Fmoc-Dpr(ivDde)-OH o Fmoc-Lys(ivDde)-OH (1,5 mmol, 1,5 equiv), y DIEA (1 mmol, 1 equiv) en 10 mL de CH_2Cl_2 /DMF seco, 1/1, v/v. El recipiente se agitó durante 5 min, y luego se añadió más DIEA. (1,5 mmol, 1,5 equiv). La mezcla se agitó durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Se añadió metanol (2,5 mL) para extinguir los sitios que no reaccionaron. Despues de 30 min, la resina se lavó con DMF (5 x 10 mL), CH_2Cl_2 (5 x 10 mL), éter etílico (5 x 10 mL) y se secó al vacío.

40 [0351] La carga se determinó tratando la pequeña cantidad de resina (2-4 mg) con 20 % de piperidina/DMF (2 mL) durante 2 horas en un matraz volumétrico (10 o 20 mL). El volumen se ajustó con DMF; se midió la absorción a 301 nm. La carga se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$45 \quad \text{Carga (mmol/g)} = (\text{volumen del matraz} \times A_{301}) / (7800 \times \text{mg}) \times 1000$$

La carga promedio fue de ~ 0,6 mmol/g

50 [0352] **Paso de eliminación de Fmoc.** La resina que contiene el péptido protegido con Fmoc se trató con 20 % de piperidina en DMF (10 mL por gramo de resina) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, la resina se lavó con DMF (5 x 1 mL por gramo de resina), CH_2Cl_2 (5 x 1 mL por gramo de resina), éter etílico (5 x 1 mL por gramo de resina) y se secó al vacío.

55 [0353] **Etapa de acoplamiento.** A la resina (1 equiv) que contiene el aminoácido N-terminal desprotegido (AA), se añadió una solución de Fmoc-AA-OH (2 equiv), HATU (2 equiv) y DIEA (4 equiv) en DMF (1 mL por gramo de resina). El recipiente de reacción se agitó durante 3-4 h. A continuación, la resina se lavó con DMF (5 x 1 mL por gramo de resina), CH_2Cl_2 (5 x 1 mL por gramo de resina), éter etílico (5 x 1 mL por gramo de resina) y se secó al vacío. La finalización de la reacción se confirmó mediante una prueba de Kaiser negativa cuando fue apropiado.

60 [0354] El acoplamiento de Dolavalina-Val-Dil-OH N-terminal se realizó de manera similar.

65 [0355] **ivDde Desprotección y acoplamiento de MDpr(Boc)-OH.** Despues del acoplamiento del tripéptido Dolavalina-Val-Dil-OH, la resina se trató con 2 % de hidrazina/DMF (1 mL por gramo de resina) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, la resina se lavó con DMF (5 x 1 mL por gramo de resina), CH_2Cl_2 (5 x 1 mL por gramo de resina), éter etílico (5 x 1 mL por gramo de resina) y se secó al vacío. Se añadió una solución de Fmoc-

MDpr(Boc)-OH (2 equiv), HATU (2 equiv) y DIEA (4 equiv) en DMF (1 mL por gramo de resina) a la resina y la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente (TA). La finalización de la reacción se confirmó mediante una prueba de Kaiser negativa. La resina se lavó con DMF (5 x 1 mL por gramo de resina), CH₂Cl₂ (5 x 1 mL por gramo de resina), éter etílico (5 x 1 mL por gramo de resina) y se secó al vacío.

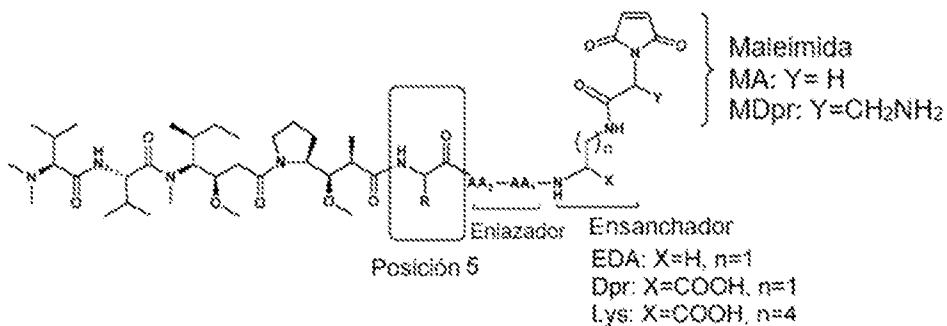
5 [0356] **Escisión de la resina y desprotección.** La resina que contenía péptidos se trató con 20 % de TFAI CH₂Cl₂ (2 mL por gramo de resina) durante 10 min a temperatura ambiente y la solución se recogió en un matraz de fondo redondo. La resina se lavó con 20 % de TFA/CH₂Cl₂ (2 x 0,5 mL por gramo de resina). Las soluciones agrupadas se dejaron a TA durante 3 horas. Después de la desprotección, se confirmó la finalización mediante LC-MS. Los volátiles se eliminaron a presión reducida en Rotavap y el producto final se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa. Todos los enlaces de fármacos se obtuvieron con >95 % de pureza mediante HPLC de fase inversa a 215 nm.

10 [0357] Los enlaces de fármacos con MA maleimida se prepararon de una manera similar a la descrita anteriormente utilizando ácido α-maleimidoacético-NHS (Molecular Biosciences, Boulder CO) en lugar de MDpr(Boc)-OH.

15 [0358] Los enlaces de fármacos con un extensor de etilendiamina (EDA) se prepararon mediante un procedimiento similar al informado anteriormente (Bioconjugate Chem. 2008, 19, 1960-1963).

Ejemplo 2 - Enlaces de fármacos

20 Los enlaces de fármacos se sintetizaron como se describió anteriormente. La fórmula general fue la siguiente:



35 (En esta fórmula, tenga en cuenta que la designación de AA₂ y AA₁ está invertida. R corresponde a R¹²).

[0359] La siguiente Tabla 1 resume las síntesis y caracterizaciones de los diversos enlazadores de fármacos. En la tabla, la primera columna (izquierda) se refiere al Número de Compuesto. La segunda columna (izquierda) se refiere al aminoácido en el extremo C de la auristatina. Las columnas tercera, cuarta y quinta se refieren a los componentes del enlazador. En la columna 3, se identifican los componentes de aminoácidos del enlazador. En la columna 4, se identifican componentes de aminoácidos y/o no aminoácidos adicionales del enlazador. En la columna 5, se identifica la composición de la fracción de maleimida del enlazador. La sexta columna se refiere al rendimiento del enlazador de fármacos. La séptima y octava columnas se refieren a las masas calculadas y observadas de los enlazadores de fármacos, determinadas mediante espectroscopia de masas. La última columna (a la derecha) se refiere al tiempo de retención de HIC de los ADC que contienen los enlazadores de fármacos como 8 cargas (generalmente determinado como se describe en el Ejemplo 3).

Tabla 1

ES 2 994 375 T3

Nº	Posición 5 de la sustitución	Enzimador			Rendimiento, %	MS: Calculado (m/z)*	MS: Encontrado, m/z	Tiempo de retención de HIC (min)
		Aminoácido(s)	Aminoácido u otro extensor	Maleimida (MA o MDpr)				
5	1 Phe	Ninguno	Opx	MA	14	989,6	989,7	NT
10	2 Phe	Glu	Opx	MA	11	1098,6	1098,6	NT
	3 Thr	Ninguno	Opx	MA	7,0	923,6	923,7	NT
	4 Thr	Glu	Opx	MA	8,1	1052,6	1052,6	5
	5 Phe	Glu	Opx	MDpr	20	1127,6	1127,4	NT
15	6 Thr	Glu	Opx	MDpr	20	1081,6	1081,7	4,6
	7 Thr	Glu	Lys	MDpr	36	1123,7	562,5 dobl. carg	4,6
	8 Tiazol	Glu	Lys	MDpr	28	1176,6	588,9 dobl. carg	NT
20	9 Phe	Glu	EDA	MDpr	30	1093,6	1093,9	5,8
	10 Thr	Glu	EDA	MDpr	23	1037,6	1037,8	NT
	11 Phe	Ile	EDA	MDpr	25	1067,7	1067,9	6,9
	12 Thr	Ile	EDA	MDpr	20	1081,7	511,5 dobl. carg	5,2
25	13 Tiazol	Glu	EDA	MDpr	43	1090,6	1091,6	4,9
	14 Ser	Ala	Lys	MDpr	70	1079,6	1079,8	4,96
	15 Glu	Ala	Lys	MDpr	81	1093,6	1093,8	5,02
	16 Fosfoty	Ala	Lys	MDpr	4,8	1146,6	1146,8	4,91
30	17 Asn	AlaGlu	Opx	MDpr	70	1166,6	1166,8	5
	18 Glu	AlaGlu	Opx	MDpr	46	1176,7	1180,69	5,1
	19 Asp	AlaGlu	Opx	MDpr	67	1166,6	1167,3	4,99
35	20 Glu	AlaGlu	Opx	MDpr	72	1180,6	1180,96	4,98
	21 Ser	AlaGlu	Opx	MDpr	71	1152,6	1152,7	5,1
	22 ValOrn	AlaGlu	Opx	MDpr	21	1166,7	1167,1	5,2
	23 Fosfoty	AlaGlu	Opx	MDpr	13	1232,6	1232,79	4,9
40	24 Pirazol	Glu	Opx	MDpr	73	1133,6	1137,6	5,2
	25 Tiazol	Glu	Opx	MDpr	65	1118,6	1118,7	5
	26 Asn	Glu	Opx	MDpr	51	1108,6	1108,6	4,9
	27 Ser	Glu	Opx	MDpr	90	1098,6	1098,4	4,9
45	28 Ser	Glu	Opx	MDpr	21	1137,6	1117,6	5,6
	29 ValOrn	Glu	Opx	MDpr	22	1098,6	1098,7	5,1
	30 Ser	Glu	Opx	MDpr	86	1081,6	1088,9	4,9
50	31 Ser	Glu	Opx	MDpr	68	1081,6	1081,8	4,96
	32 Thr	IleLeu	Opx	MDpr	30-50	1178,7	1178,8	6,1
	33 Phe	IleLeu	Opx	MDpr	30-50	1028,7	1024,9	7,4
	34 Glu	FmeLeu	Opx	MDpr	30-50	1240,7	1241,1	5,9

55

(Continuación)

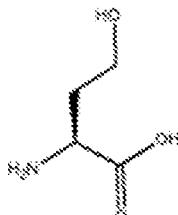
Nº	Posición 5 de la auristatina	Enlazador			Rendimiento, %	MS: Calculado ($M+1$) ^a	MS: Encontrado, m/z	Tiempo de retención de HIC (min)
		Aminoácido(s)	Aminoácido u otro extensor	Maleimida (MA o MOpr)				
5	35	Thr	LeuPhe	Opx	30-50	1212.7	1212.6	6.9
	36	Phe	LeuPhe	Opx	30-50	1258.7	1258.9	7.8
	37	Gle	PhePhe	Opx	30-50	1274.7	1274.6	6.1
	38	Thr	LysAla	Opx	30-50	1161.7	1161.9	4.9
	39	Thr	Lys	Opx	30-50	1080.6	1101.1	4.9
10	ac-NHAP							7.0
	ac-vo-PAsC-NHAP							8.2
	ac-vo-PAsC-NHAC							9.8

Abreviaturas:

25 Ala se refiere a L-alanina; Asn se refiere a asparagina; Asp se refiere a L-aspartato; Gln se refiere a L-glutamina; Glu se refiere a L-glutamato; Ile se refiere a L-isoleucina; Leu se refiere a L-leucina; Lys se refiere a L-lisina; Phe se refiere a L-fenilalanina; PhosphoThr se refiere a L-fosfotreonina; Thr se refiere a L-treonina;

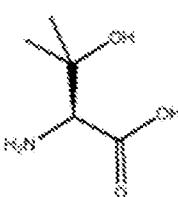
hSer se refiere a L-hidroxiserina:

30



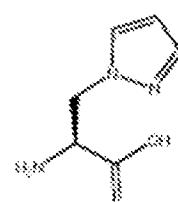
40 ValOH se refiere a L-hidroxivalina:

45

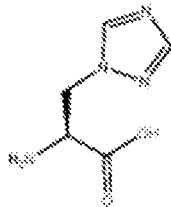


50 Pirazol se refiere a:

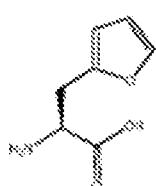
55



60 Triazol se refiere a:



Fur se refiere a:



15

MA se refiere a maleimido acetilo; Dpr se refiere a ácido diaminopropiónico; MDpr se refiere a ácido maleimido diaminopropiónico; EDA se refiere a etilendiamina; mc-MMAF se refiere al enlazador maleimidocaprol MMAF; mc-vc-PABC-MMAF se refiere a maleimidocaprol-valina-citrulina-p-aminobencil-carbamoil MMAF; mc-vc-PABC MMAF se refiere a maleimidocaprol-valina-citrulina-p-aminobencil-carbamoil MMAE.

Ejemplo 3 - Conjugados anticuerpo-fármaco

25 [0360] **Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco. Ejemplo para ADC h1F6.**

[0361] Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) h1F6 con ocho fármacos por anticuerpo se prepararon mediante reducción completa del anticuerpo seguida de reacción con el enlazador fármaco deseado. El anticuerpo (10 mg/mL) se redujo completamente mediante la adición de 10 equivalentes molares de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 1 mM de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), seguido de una incubación a 37 °C durante ~1 h. El exceso de TCEP se eliminó mediante una dilución 10X con PBS y la concentración del anticuerpo, repetida 2 veces utilizando un filtro giratorio de 30 KD MWCO (EMD Millipore, Billerica, MA). La reducción completa del anticuerpo se confirmó mediante un análisis de HPLC de fase inversa donde las cadenas ligeras y pesadas se resuelven completamente a partir del anticuerpo no reducido. A continuación, se añadió el fármaco-enlazador (10 equivalentes) a partir de una solución madre preparada en DMSO (10 mM). La reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas para permitir la conjugación y la posterior hidrólisis del anillo de tiosuccinimida (MDpr). La mezcla de reacción se purificó y se intercambió el tampón en PBS utilizando columnas de desalinización PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). La relación fármaco/Ab del producto final se estimó mediante análisis PLRP-MS y varió de 7,8 a 8,0 fármacos/Ab. Además, cada ADC se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño donde las especies de HMW variaron de 0,5 a 2,0 %.

45 [0362] **Cromatografía de interacción hidrofóbica**

[0363] El análisis de los ADC se realizó utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). La HIC se realiza mediante la ejecución de un gradiente lineal de 0-100 % de Fase Móvil B (MPB), donde la Fase Móvil A (MPA) consta de 1,5 M de sulfato de amonio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7,0, y la MPB consta de 75 % de fosfato de potasio 25 mM, pH 7,0, 25 % de isopropanol. La separación se logró utilizando una columna de t-butilo Tosoh (TSK-Gel Butyl-NPR 4,6 x 35 mm, PN: 14947) calentada a 25 °C. Los artículos de prueba se prepararon diluyendo 70 µg de ADC en MPA de modo que la concentración total de sal fuera mayor o igual a 1,0 M de sulfato de amonio en un volumen total de 100 µL. Las muestras se inyectaron a 90 µL y se eluyeron utilizando un gradiente de 12 minutos. Monitoreo a $\lambda = 280$ nm. Los ADC con mayor hidrofobicidad, o un mayor número de fármacos por molécula, eluyen en tiempos de retención posteriores.

55 [0364] Las **figuras 4 y 5** muestran los resultados de los análisis de HIC de varios ADC cargados con 8, en comparación con el anticuerpo original no conjugado (h1F6). Los ADC se prepararon como se describió anteriormente. Los resultados muestran en general que aumentar la hidrofilicidad de la auristatina, en combinación con un enlazador hidrófilo, disminuye la hidrofobicidad aparente del conjugado.

60 [0365] La siguiente Tabla 2 resume las composiciones de varios enlazadores de fármacos de la Tabla 1 y los análisis de los conjugados de anticuerpo-fármaco cargados con 8 resultantes con el anticuerpo h1F6. El tiempo de retención de HIC (HIC RT) se determinó como se describió anteriormente. Los ADC h1F6 que contienen los enlazadores de fármacos MC-vc-PABC-MMAE, MC-vc-PABC-MMAF y MC-MMAF se utilizaron como controles.

Tabla 2

	Nº [AAS de auristatina]- AA1-AA2-MDpr	HIC RT (min) HIF6 8-cargas
4967	(Asp)-Ala-Lys(MDpr)	4.98
4968	(Glu)-Ala-Lys(MDpr)	5.02
4969	- (Fosfo-Thr)-Ala-Lys(MDpr)	4.81
4970	(Asn)-Ala-Glu-MDpr	5.0
4971	(Gln)-Ala-Glu-MDpr	5.1
4972	(Asp)-Ala-Glu-MDpr	4.95
4973	(Glo)-Ala-Glu-MDpr	4.98
4974	(homoser)-Ala-Glu-MDpr	5.1
4975	(ValOH)-Ala-Glu-MDpr	5.2
4976	- (Fosfo-Thr)-Ala-Glu-MDpr	4.8
4977	(Pirazol)-Glu-MDpr	5.2
4978	(Triazol)-Glu-MDpr	5.0
4979	(Asn)-Glu-MDpr	4.9
4980	(Asp)-Glu-MDpr	4.8
4981	(Furil)-Glu-MDpr	5.6
4982	(ValOH)-Glu-MDpr	5.1
4983	(Ser)-Glu-MDpr	4.9
4984	(homoser)-Glu-MDpr	4.96
4830	(Thr)-Glu-MDpr	4.8
4868	(Thr)-Glu-MA	5.0
4851	(Thr)-Glu-Lys(MDpr)	4.6
4854	(Thr)-Glu-EDA-MDpr	NT

(Continuación)

Nº	(AAS de auristatina) AAT-AAS-MDpr	HIC RT (min)
		h1F6 8-cargas
4856	(Thr)-Ile-EDA-MDpr	5.2
4853	(Phe)-Glu-EDA-MDpr	5.8
4855	(Phe)-Ile-EDA-MDpr	6.9
4882	(Tiazol)-Glu-EDA-MDpr	4.9
4883	(Met)-Asn-(D)Lys-EDA-MDpr	4.8
1086	MC-vc-PABC-MMAE	9.8
1251	MC-vc-PABC-MMAF	8.2
1269	MC-MMAF	7.8

Ejemplo 4 - Ensayos de actividad in vitro

[0366] Los ensayos de citotoxicidad in vitro se realizaron generalmente como se describió anteriormente (ver supra, Ensayos de actividad). Brevemente, se recogieron cultivos de células en fase logarítmica y las células se sembraron en placas a densidades de siembra que oscilaban entre 500 y 10.000 células/pocillo de acuerdo con las condiciones predeterminadas. Después de incubar durante 24 horas para permitir la reconstitución de la proteína de superficie, se añadieron diluciones seriadas de los conjugados de prueba y los cultivos se incubaron durante 4 días más. La evaluación del crecimiento celular y la reducción del colorante para generar valores de Cl_{50} se realizó utilizando el ensayo de reducción del colorante Alamar Blue (Biosource International, Camarillo, CA). Brevemente, se preparó una solución al 40 % (peso/volumen) de Alamar Blue en un medio completo justo antes de añadir los cultivos. Noventa y dos horas después de la exposición al fármaco, se añadió la solución de Alamar Blue a las células para constituir el 10 % del volumen de cultivo. Las células se incubaron durante 4 h y se midió la reducción del colorante en un lector de placas fluorescentes Fusion HT (Packard Instruments, Meriden, CT).

[0367] Se utilizaron las líneas celulares de cáncer renal de células claras Caki-1 y renales 786-O. Estas líneas celulares expresaron aproximadamente 190.000 y 135.000 moléculas CD70 humanas por célula, respectivamente. Los enlaces de fármacos unidos al anticuerpo h1F6 se describen en las Tablas 1 y 2. Con referencia a las siguientes Tablas 3A-C, los ADC h1F6 tienen una carga de fármaco promedio de 8 fármacos/anticuerpo, a menos que se indique lo contrario. Los ADC h1F6 hidrofílicos analizados mostraron una actividad (valores de Cl_{50}) comparable o mejor que el control, h1F6-mcMMAF (1269), en estos estudios.

55

60

65

5
10
15
20
25
30
35

Tabla 3A
Resumen de CI₅₀ para los ADC basados en auristatina

ADCs	Dr/Ab	Caki-1	786-O
hIF6-1	4	21	21
	8	8	7
hIF6-2	4	17	21
	8	7	7
hIF6-3	4	27	28
	8	13	13
hIF6-4	4	20	21
	8	11	9
hIF6-5	4	39	32
	8	22	19
hIF6-6	4	23	26
	8	7	9
hIF6-7	4	80	10
	8	24	4
hIF6-8	8	19	4
hIF6-9	8	21	3
hIF6-10	8	57	5
hIF6-11	8	9	1
hIF6-12	8	12	4
hIF6-13	8	60	5

DR/Ab se refiere a la carga promedio del fármaco;

Tabla 3B
Resumen de CI₅₀ para los ADC basados en auristatina

	ADC basados en auristatina	DnAb	786-O	Caki-1
5	h1F6-16	8.0	6	19
	h1F6-18	8.0	8	18
	h1F6-19	8.0	9	12
	h1F6-17	8.0	8	14
10	h1F6-18	8.0	8	18
	h1F6-19	8.0	7	20
	h1F6-20	8.0	7	9
	h1F6-21	8.0	12	22
15	h1F6-22	8.0	24	21
	h1F6-23	8.0	13	18
	h1F6-24	8.0	13	33
	h1F6-25	8.0	14	34
20	h1F6-26	8.0	8	18
	h1F6-27	8.0	7	19
	h1F6-28	8.0	7	21
25	h1F6-29	8.0	33	33
	h1F6-30	8.0	12	18
	h1F6-31	8.0	13	20
30	h1F6-6	8.0	13	12
	h1F6-mcMMAF	4.0	34	42

Tabla 3C
CI50 para ADC h1F6, ng/ml

	ADC basados en auristatina	DnAb	786-O ROS class	Caki-1 ROS class
35	h1F6-32	8.0	5	3
40	h1F6-33	8.0	0.8	0.8
	h1F6-34	8.0	3	6
	h1F6-35	8.0	3	3
45	h1F6-36	8.0	0.7	0.8
	h1F6-37	8.0	4	4
	h1F6-38	8.0	3	3
	h1F6-39	8.0	3	3
50	h1F6-6	8.0	7	5
	h1F6-mcMMAF	4.0	34	12

Ejemplo 5 - Estudios farmacocinéticos

[0368] Radiomarcaje de anticuerpos y ADC

[0369] Se realizaron experimentos farmacocinéticos (PK) utilizando anticuerpos radiomarcados o ADC. Los artículos de prueba PK se radiomarcaron utilizando el siguiente procedimiento. A una solución de anticuerpo o ADC en fosfato de potasio 500 mM (pH 8,0) y cloruro de sodio 500 mM se le añadieron 55 µCi de propionato de N-succinimidilo, se realizaron experimentos farmacocinéticos (PK) utilizando anticuerpos radiomarcados o ADC. Los artículos de prueba PK se radiomarcaron utilizando el siguiente procedimiento. A una solución de anticuerpo o ADC en fosfato de potasio 500 mM (pH 8,0) y cloruro de sodio 500 mM se agregaron 55 µCi de propionato de N-succinimidilo, [propionato-2,3-³H]- (Moravek Biochemicals, Cat. No.: MT 919, 80 Ci/mmol, 1 mCi/mL, solución de hexano:acetato de etilo 9:1) por mg de anticuerpo o ADC. La mezcla resultante se agitó en vórtex y se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se centrifugó a 4000 x g durante 5 minutos y la capa acuosa inferior se eliminó y se dividió en unidades de

5 filtro centrífugo Amicon Ultra-15 (Millipore, Cat. N°: UFC903024, 30 kDa MWCO). La radiactividad no conjugada se eliminó mediante 4 rondas de dilución y centrifugación a 4000 x g. Los productos resultantes se filtraron a través de unidades de filtro centrífugo Ultrafree-MC estériles de 0,22 µm (Millipore, Cat. No.: UFC30GV0S) y la concentración final de anticuerpo o ADC se midió espectrofotométricamente. La actividad específica (μ Ci/mg) de cada producto se determinó mediante recuento de centelleo líquido.

[0370] Estudios farmacocinéticos

10 [0371] Las propiedades farmacocinéticas de un anticuerpo no conjugado y varios ADC de ese anticuerpo (carga de fármaco de 8) se examinaron en varios modelos de roedores. En cada experimento, se inyectaron 3 mg de anticuerpo radiomarcado o ADC por kg de peso animal a través de la vena de la cola. Cada artículo de prueba se dosificó una vez en 3 animales replicados. La sangre se extrajo en tubos K2EDTA a través de la vena safena o por punción cardíaca para hemorragias terminales en varios puntos de tiempo. El plasma se aisló por centrifugación durante 10 minutos a 10.000 x g. Se añadieron 10 μ L de muestra de plasma de cada punto temporal a 4 mL de cóctel de centelleo líquido Ecosint-A (National Diagnostics) y se midió la radiactividad total mediante recuento de centelleo líquido. Los valores de desintegraciones por minuto resultantes se convirtieron a μ Ci y la actividad específica de los artículos de prueba radiomarcados se utilizó para calcular la concentración de anticuerpo o ADC restante en el plasma en cada punto temporal.

15 [0372] Con referencia a la Figura 2, se compararon las propiedades farmacocinéticas de h1F6 y dos ADC hidrófilos del mismo con las propiedades de tres ADC de control. Los ADC hidrófilos fueron h1F6-4 ((auristatina-T)-Glu-Dpr-MA)₈ cargados con 8 - h1F6) y h1F6-11 ((auristatina F)-Ile EDA-MDpr)₈ - h1F6). Los resultados muestran que los ADC hidrófilos exhibieron una estabilidad farmacocinética mejorada a lo largo de este estudio en ratones. La auristatina hidrófila con una auristatina-T exhibió una estabilidad cercana a la del anticuerpo no conjugado. El diseño hidrófilo del ADC h1F6-11 exhibió una estabilidad pK mejorada en comparación con los controles, dos de los cuales incluyen una forma monometil de la misma auristatina (auristatina F vs. auristatina F monometilo).

20 [0373] Con referencia a la Figura 3, las propiedades farmacocinéticas de los conjugados hidrófilos de otro anticuerpo monoclonal se compararon con las propiedades de un conjugado de control, mAb mCMMAF. Todos los ADC tenían una carga de fármaco promedio de 8. Cada uno de los ADC hidrófilos exhibió una estabilidad farmacocinética mejorada, en comparación con el ADC de control.

25 [0374] Dos ADC hidrófilos de los mismos se compararon con las propiedades de tres ADC de control. Los ADC hidrófilos fueron h1F6-8 ((auristatina-thiazole)-Glu-Lys-MDpr)₈ cargados con 8 - h1F6) y h1F6-11 ((auristatina F)-Ile-EDA-MDpr)₈ - h1F6). Los resultados muestran que los ADC hidrófilos exhibieron una estabilidad farmacocinética mejorada en el transcurso de este estudio en ratones. En particular, el diseño hidrófilo de h1F6-11 exhibió una estabilidad mejorada en comparación con los controles, dos de los cuales incluyen una forma monometil de la misma auristatina (auristatina F vs monometilauristatina F).

30 **40 Ejemplo 6 - Experimentos de terapia in vivo**

35 [0375] Se obtuvieron células 786-O de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y se propagaron en las condiciones de cultivo recomendadas por la ATCC. Para establecer tumores 786-O, se implantaron 5×10^6 células en el flanco derecho de ratones donantes hembra nu/nu atípicos (Harlan, Indianápolis, IN). Cuando los tumores donantes tenían aproximadamente 500 mm^3 , se sacrificó a los ratones y se extirparon asepticamente los tumores y se cargaron fragmentos de $\sim 0,5 \times 0,5 \text{ mm}$ en un trocar de calibre 13 esterilizado para su implantación en ratones nu/nu. Cuando los tumores alcanzaron $\sim 100 \text{ mm}^3$, los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento.

40 [0376] Para establecer tumores DOHH2, se implantaron 5×10^6 células en el flanco derecho de ratones SCID C.B.-17 (Harlan, Indianápolis, IN). Cuando los tumores tenían aproximadamente $\sim 100 \text{ mm}^3$, los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento.

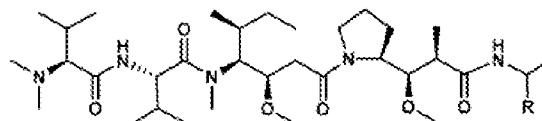
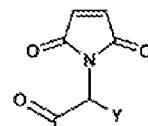
45 [0377] Los grupos experimentales se trataron mediante inyección intraperitoneal con compuestos en la dosis y el programa indicados o, alternativamente, se dejaron sin tratamiento. Los tumores se midieron periódicamente y los volúmenes se calcularon utilizando la fórmula $V = ((L \times W^2)/2)$. Los animales fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron el volumen de 1000 mm^3 o al final del estudio, lo que ocurría primero.

50 [0378] Los tiempos de cuadruplicación del tumor se eligieron como tiempo hasta el punto final (TTE), que se determinó utilizando el análisis de regresión no lineal para el crecimiento exponencial de cada conjunto de datos de crecimiento del tumor individual de cada animal experimental. El tiempo de cuadruplicación del tumor medio se calculó en función del volumen del tumor al comienzo del tratamiento. A los animales que no alcanzaron el punto final se les asignó un valor de TTE igual al último día del estudio.

- [0379] El análisis estadístico se realizó utilizando el software Prism (GraphPad) para Windows. La prueba Logrank del TTE se utilizó para analizar la significancia de las diferencias entre los dos grupos, con diferencias consideradas significativas en $0,01 \leq P \leq 0,05$, y altamente significativas en $P \leq 0,01$.
- 5 [0380] Con referencia a la Figura 6, la actividad de los ADC cargados con 4 y 8 (4d/Ab y 8d/Ab, respectivamente) se probaron en estudios de xenoinjerto de ratón de dosis única. En primer lugar, con referencia al control, h1F6-mc-vc-PABC-MMAF, el ADC cargado con 4 dio una mejor actividad que el ADC cargado con 8. Por el contrario, los ADC cargados con 8 de h1F6-6 hidrófilo (auristatina T-Glu-Dpr-MDPr) y h1F6-13 (auristatina tiazol-Glu-EDA-MDPr) exhibieron una mayor actividad que sus contrapartes cargadas con 4.
- 10 [0381] Con referencia a la Figura 7, la actividad de diferentes ADC cargados con 4 y 8 se probaron en estudios de xenoinjerto de ratón de dosis única. Nuevamente en este modelo, el ADC hidrófilo cargado en 8 de hBU12-6 (auristatina T-Glu-Dpr-MDPr) exhibió una mayor actividad que su contraparte cargada en 4.
- 15 [0382] Con referencia a la Figura 8, se probó la actividad de varios ADC cargados en 4 y 8 en estudios de xenoinjerto de ratón de dosis única. En este modelo, los ADC cargados en 8 de h1F6-12 (auristatina T-Ile-EDA-MDPr) y h1F6-5 (auristatina F-Glu-Dpr-MDPr) exhibieron una mayor actividad que las contrapartes cargadas en 4. El ADC cargado en 8 h1F6-11 (auristatina F-Ile EDA-MDPr) exhibió la tendencia opuesta.
- 20 [0383] Con referencia a la Figura 9, se probó la actividad de varios ADC cargados con 4 y 8 en estudios de xenoinjerto de ratón de dosis única. En este modelo, los ADC cargados con 8 de h1F6-17, h1F6-20, h1F6-24 y h1F6-29 exhibieron una mayor actividad que sus contrapartes cargadas con 4.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto enlazador de fármacos que tiene la fórmula:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,
en donde:

R es la cadena lateral de un aminoácido hidrófilo que se selecciona del grupo que consiste en treonina, serina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, homoserina, hidroxivalina, furil alanina, treonina (PO_3H_2), pirazolil alanina, triazolil alanina y tiazolil alanina;

AA_2 es un aminoácido hidrófilo seleccionado del grupo que consiste en glicina y formas L de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina;

AA_1 es un aminoácido hidrófilo seleccionado del grupo que consiste en glicina y formas L o D de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina, serina y alanina, o está ausente;

X es H y subíndice n es 1, X es COOH y subíndice n es 1, o X es COOH y subíndice n es 4; e
Y es H o CH_2NH_2 , siempre que: cuando X es H, Y es CH_2NH_2 .

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R es la cadena lateral de L-treonina; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que AA_2 se selecciona del grupo que consiste en formas L de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina y serina.

4. El compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que AA_2 se selecciona del grupo que consiste en formas L de glutamato, lisina y alanina.

5. El compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que AA_2 es glutamato.

6. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que AA_1 se selecciona del grupo que consiste en formas L de aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina y serina, o está ausente.

7. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que AA_1 se selecciona del grupo que consiste en formas L de glutamato o alanina, o está ausente.

8. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que AA_1 es glutamato.

9. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que AA_1 está ausente.

10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 o 7, en el que X es COOH y el subíndice n es 1.

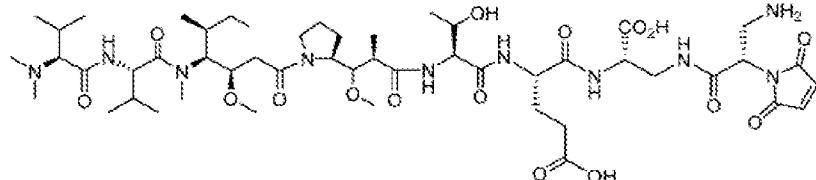
11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 o 7, en el que X es COOH y el subíndice n es 4.

12. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 o 7, en el que X es H y el subíndice n es 1.

13. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 o 7, en el que Y es CH_2NH_2 .

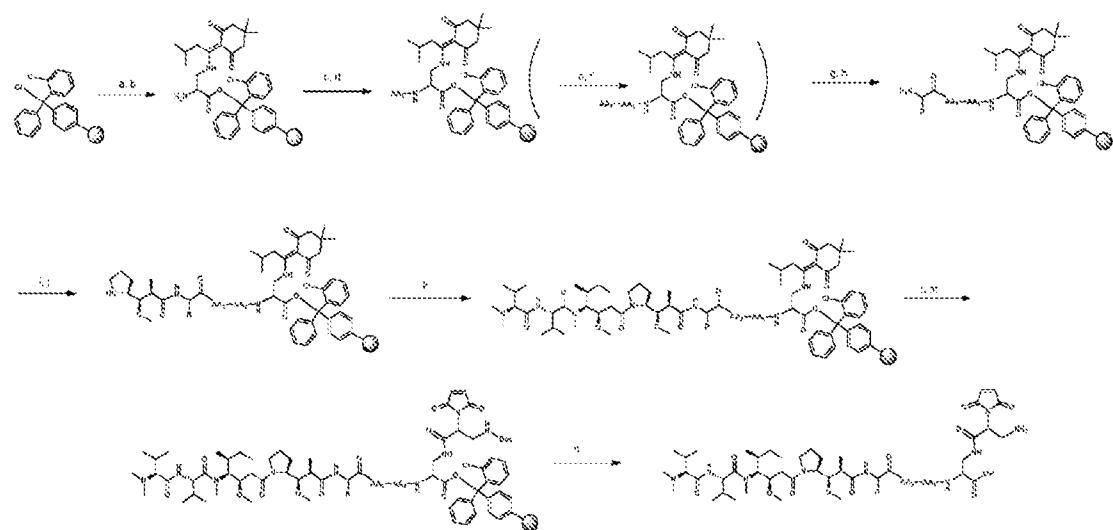
14. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 o 7, en el que Y es H.

15. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la fórmula siguiente:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Figura 1

Síntesis ejemplar de enlazadores de fármaco de auristatina-(AA₂)-AA₁-MDpr

Condición de reacción: (a) Fmoc-Dpr(ivDde)-OH (1,5 equiv), DIEA (2,5 equiv), CH₂Cl₂/DMF, 2 h; (b) 20 % piperidina/DMF, 2h; (c) Fmoc-AA₁-OH (2 equiv), HATU (2 equiv), y DIEA (4 equiv), DMF, 3h; (d) 20 % piperidina/DMF, 2h; (e, opcional) Fmoc-AA₂-OH (2 equiv), HATU (2 equiv), y DIEA (4 equiv), DMF, 3h; (f, opcional) 20 % piperidina/DMF, 2h; (g) Fmoc-Phe-OH, o Fmoc-Met-OH, o Fmoc-Trp(Boc)-OH (2 equiv), HATU (2 equiv), y DIEA (4 equiv), DMF, 3h; (h) 20 % piperidina/DMF, 2h; (i) Fmoc-Dap-OH (2 equiv), HATU (2 equiv), y DIEA (4 equiv), DMF, 3h; (j) 20 % piperidina/DMF, 2h; (k) Dov-Val-Dil-OH (2 equiv), HATU (2 equiv), y DIEA (4 equiv), DMF, 2h; (l) 2 % hidrazina&DMF, 2h; (m) MDpr(Boc)-OH (2 equiv), DIEA (4 equiv), CH₂Cl₂, 2h; (n) 20 % TFA/CH₂Cl₂, 2h.

Figura 2

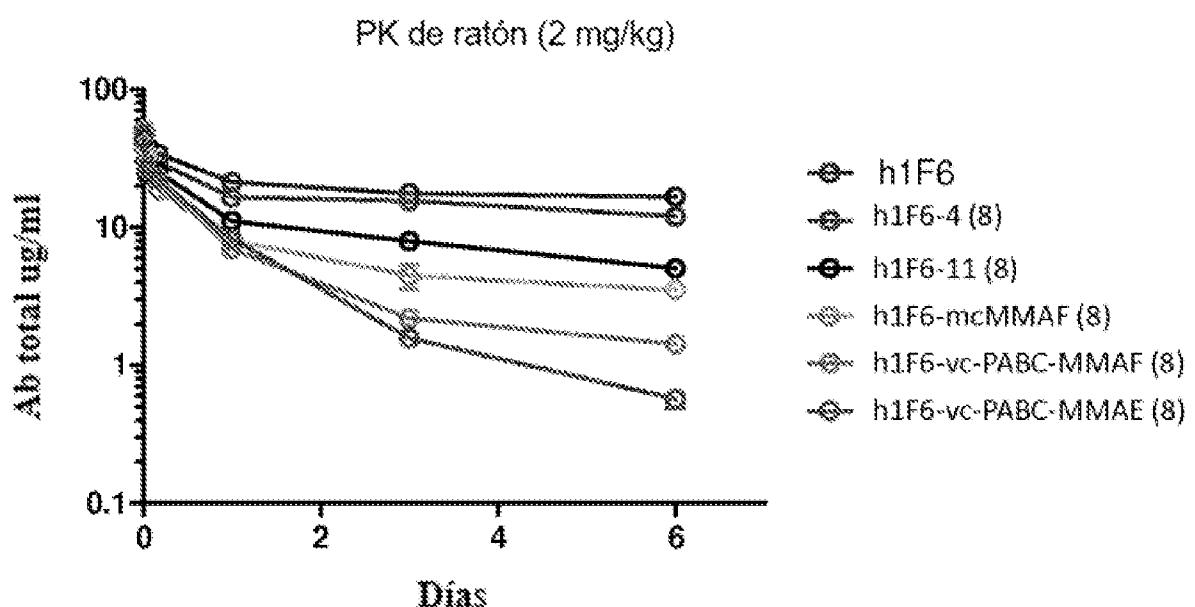


Figura 3

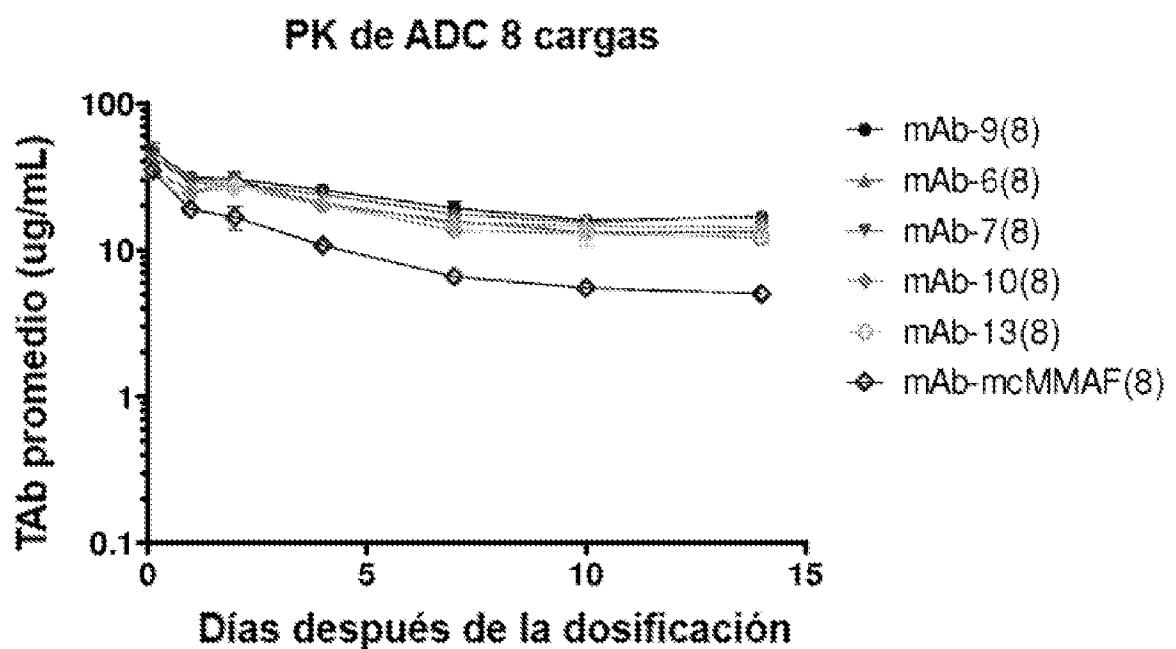


Figura 4

Trazas HIC de ADC 8 cargas

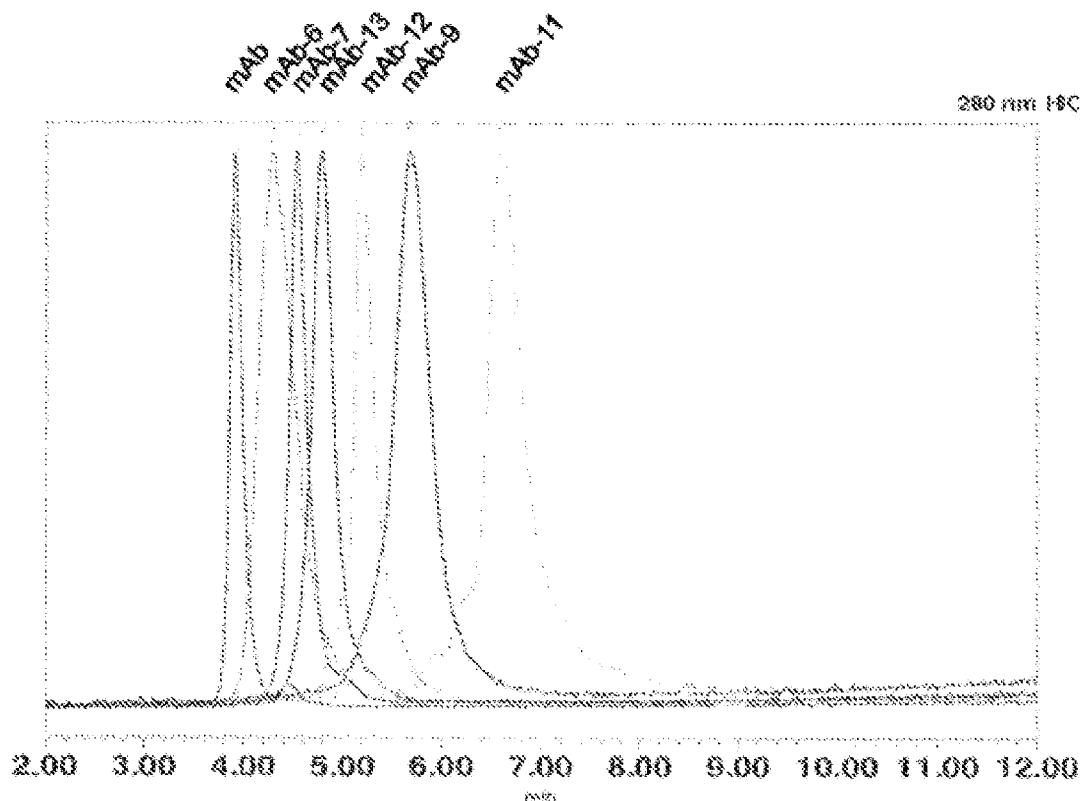


Figura 5

Trazas HIC de ADC 8 cargas

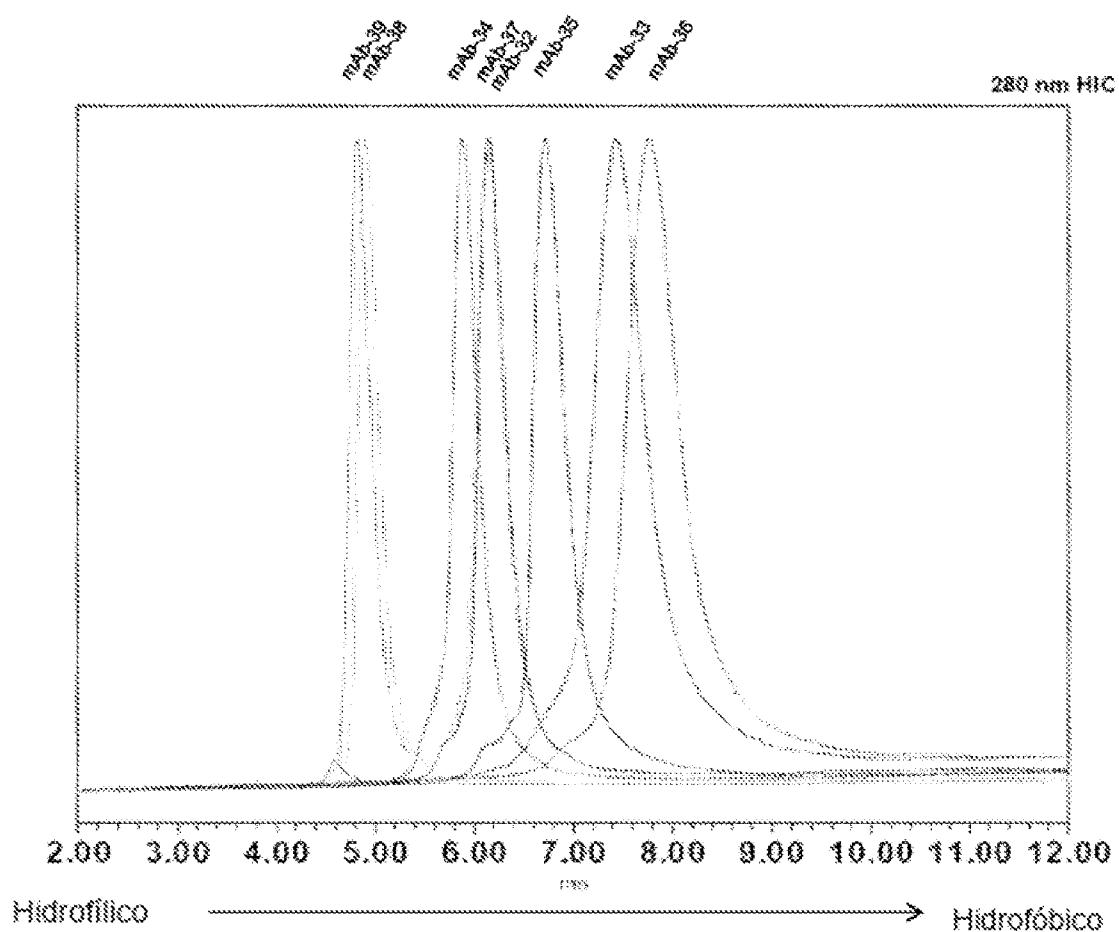


Figura 6

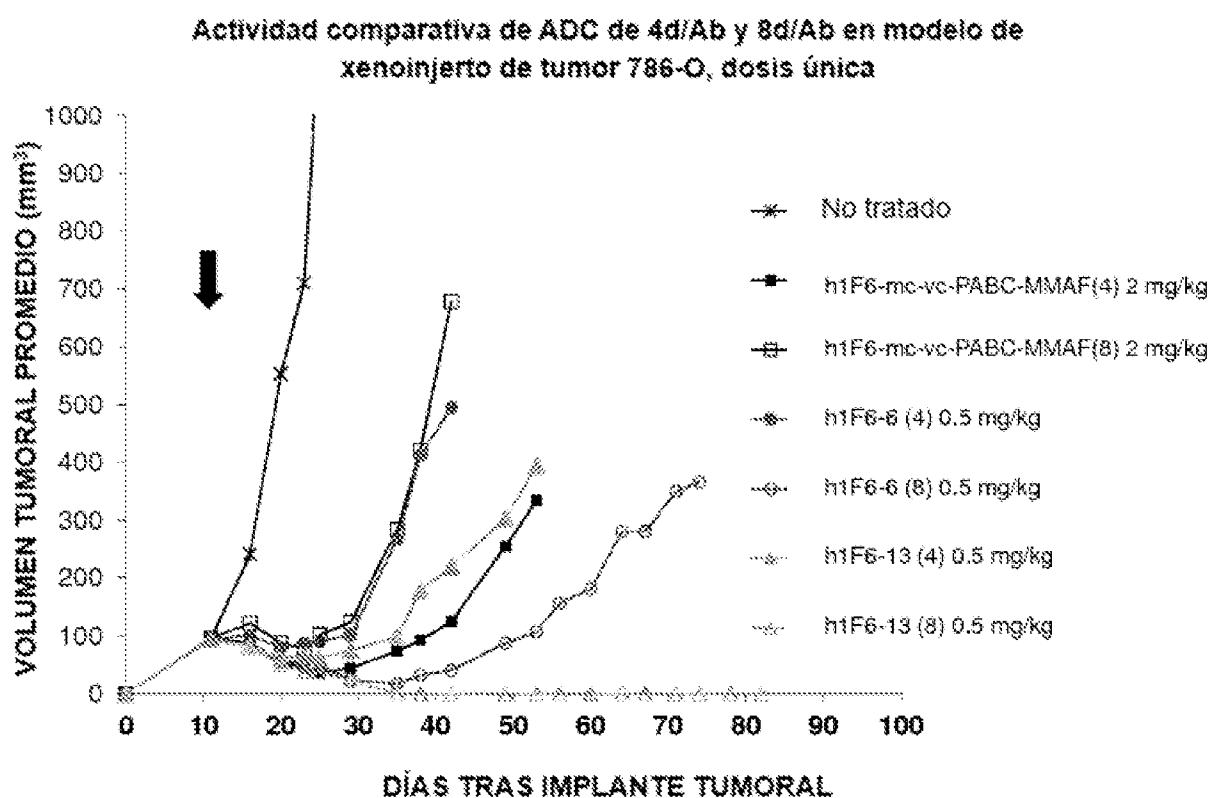
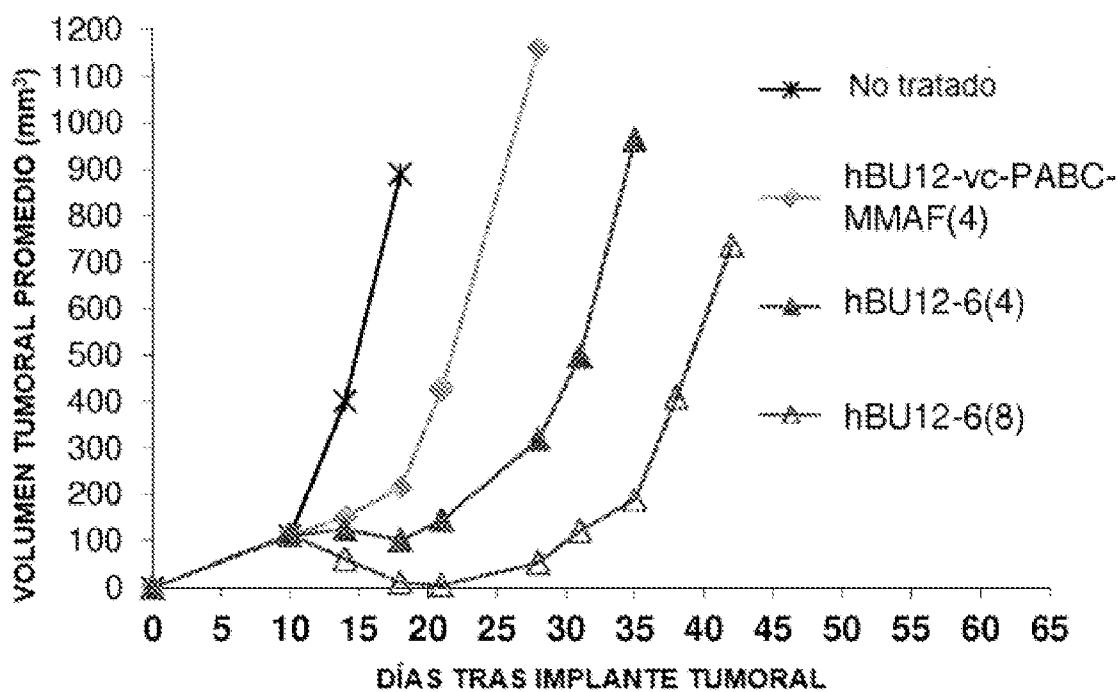


Figura 7

Actividad de ADC de 4 y 8 cargas en xenoinjertos de DOHH2
(linfoma de células B), dosis única 4 mg/kg



1

Figura 8

Potencia de ADC de 4 y 8 cargas en modelo de xenoinjerto de tumor
786-O, dosis única 1 mg/kg

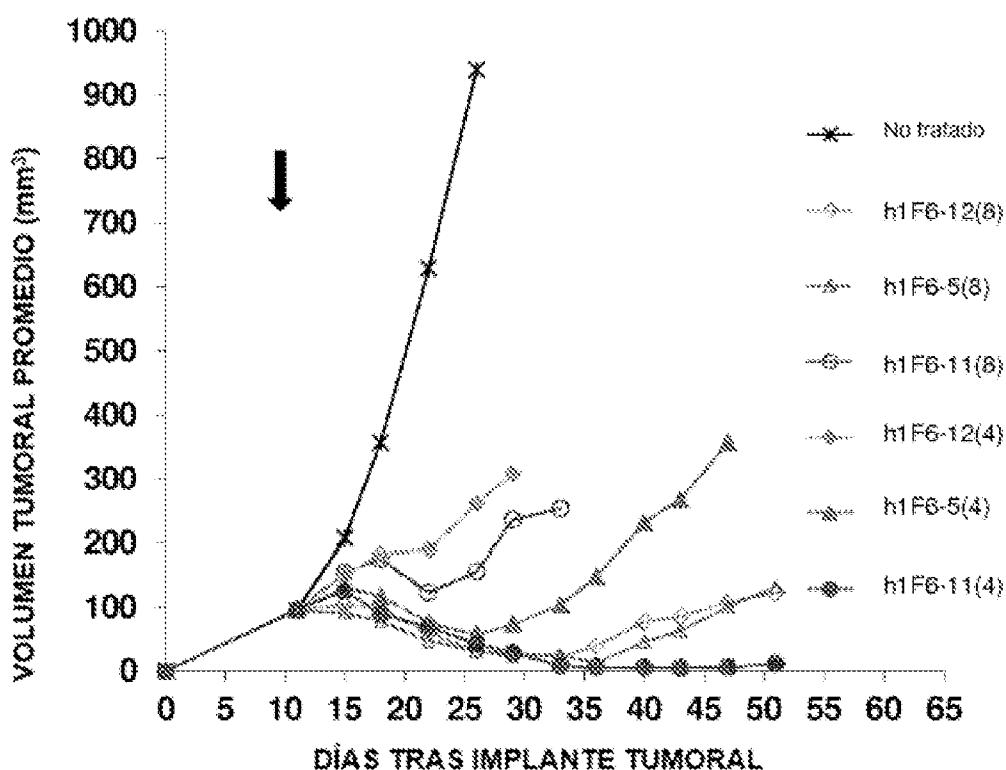


Figura 9

