

COMPUESTOS RELACIONADOS CON AURISTATINA, COMPUESTOS CONJUGADOS DE AURISTATINA Y MÉTODOS DE USO DE ELLOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 [001] La invención reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º 62/957 780, presentada el 6 de enero de 2020, cuyo contenido se incorpora aquí mediante esta referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 [002] La presente descripción se refiere en general a nuevos compuestos de la familia de las auristatinas. La presente descripción también se refiere en general a nuevos enlazadores para acoplar una carga útil a otra molécula, tal como una molécula de unión a la diana. La presente descripción también se refiere en general a nuevas moléculas de toxina enlazadora. La presente descripción se refiere a moléculas de unión a diana conjugadas con nuevas moléculas de toxina enlazadora, en las que la toxina es un nuevo compuesto de la familia de las auristatinas.

15 REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

- [003] El «Listado de secuencias» presentado electrónicamente al mismo tiempo que la presente, de conformidad con el título 37 del C.F.R., párrafo 1821, en formato legible por computadora (formato ASCII) a través de EFS-Web con el nombre de archivo «CYTX_070_PCT_ST25.txt», se incorpora a la presente mediante esta referencia. La copia
20 ASCII del listado de secuencias se creó el 6 de enero de 2021 y tiene un tamaño de 48 kilobytes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- [004] Varios compuestos peptídicos cortos, conocidos como dolastatinas, se han aislado de fuentes naturales y se ha encontrado que tienen actividad biológica antimitótica al unirse y bloquear la polimerización de la tubulina. También se han preparado análogos de estos
25 compuestos, conocidos como auristatinas, y se encontró que algunos tenían una actividad similar.

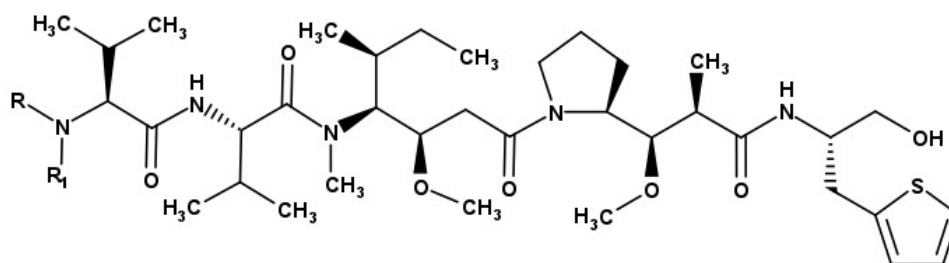
[005] Dichas moléculas se usan terapéuticamente al conjugarlas a través de un enlace químico con un resto de unión a la diana, como un anticuerpo monoclonal específico de la diana, de forma que libera la carga útil tóxica de una manera específica de la diana. La eficacia y

seguridad de tales moléculas pueden depender de la naturaleza de la toxina y la estabilidad del enlazador de conexión, ya que los enlazadores con baja estabilidad liberarán el fármaco *in situ*, lo que potencialmente aumenta la toxicidad y la tolerabilidad del fármaco.

- [006] La conjugación del fármaco con anticuerpos o anticuerpos activables normalmente se basa en reacciones químicas que unen el fármaco a cadenas laterales de amino o tiol en las cadenas pesadas o ligeras. Sin embargo, depender de estos residuos de aminoácidos nativos puede dar como resultado estequiometrías variables entre el fármaco y el anticuerpo (DAR) después de la conjugación, o la necesidad de reducir el anticuerpo para romper los enlaces disulfuro de cisteína existentes para permitir la conjugación.
- [007] En consecuencia, existe una necesidad continua en el campo de fármacos con una eficacia adecuada y enlazadores suficientemente estables. También existe una necesidad continua en el campo de nuevas variantes de anticuerpos que permitan una conjugación controlada y específica del sitio.

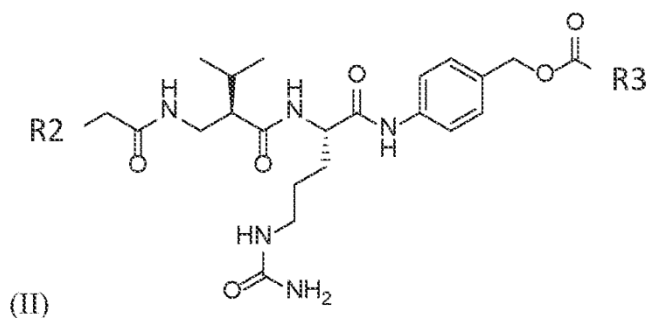
COMPENDIO DE LA INVENCION

- [008] En la presente, se proporcionan compuestos de fórmulas (I), (II) y (III);

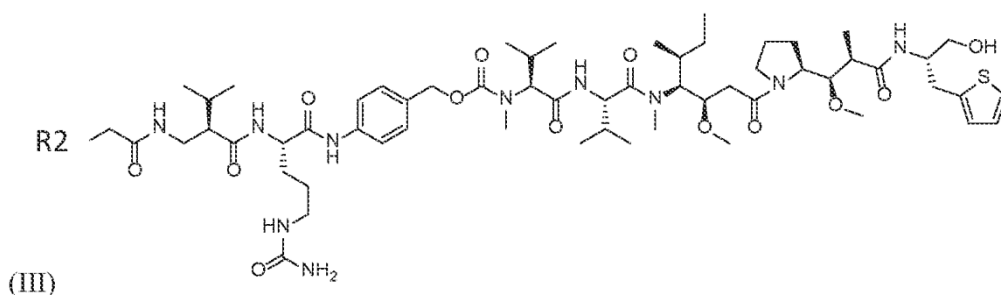


(I)

en donde R₁ es un hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₆ y en donde R se selecciona del grupo que consiste en: un hidrógeno, un alquilo C₁₋₆, un enlazador o un grupo X₁-Y₁*, en donde * es el punto de unión al nitrógeno,



en donde R3 es un agente unido a la fórmula (II) donde el punto de unión es un átomo de nitrógeno, azufre, oxígeno o carbono y en donde R2 es un resto unido a la fórmula (II), en donde el punto de unión se selecciona del grupo compuesto por: un grupo cloro, un grupo yodo, un grupo bromo y un grupo tiol,



en donde R2 es un resto unido a la fórmula (III), en donde el punto de unión se selecciona del grupo que consiste en: un grupo cloro, un grupo yodo, un grupo bromo y un grupo tiol.

[009] En el presente documento, se proporcionan anticuerpos y anticuerpos activables en donde la posición de Kabat 328 es una cisteína. En algunas modalidades, los compuestos de fórmulas (I), (II) y (III) se conjugan con un polipéptido. En algunas modalidades, los compuestos de fórmulas (I), (II) o (III) se conjugan con un anticuerpo contra un grupo tiol de cadena lateral de una cisteína en la posición de Kabat 328.

[0010] En algunas modalidades del compuesto de fórmula (I) de la presente descripción, Y1 es un grupo oxicarbonilo y X1 es un grupo alquilo C₁₋₆, un grupo 9-fluorenilmetilo, un grupo bencilo o un grupo tert-butilo. En algunas modalidades del compuesto de fórmula (I), R1 es un grupo metilo y R es un hidrógeno. En algunas modalidades del compuesto de fórmula (I), X1-Y1 es un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

[0011] En algunas modalidades del compuesto de fórmula (II) de la presente descripción, R2 es un resto de unión a diana, en donde el punto de unión en R2 es un grupo tiol. En algunas

modalidades del compuesto de fórmula (II), el resto de unión a diana es un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno de este (AB) que se une específicamente a la diana. En algunas modalidades del compuesto de fórmula (II), el resto de unión a la diana es un anticuerpo activable que, en un estado activado, se une específicamente a la diana y el anticuerpo activable incluye un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este (AB) que se une específicamente a la diana, un resto de enmascaramiento (MM) acoplado al AB, en donde el MM inhibe la unión del AB a la diana cuando el anticuerpo activable está en un estado no escindido, un resto escindible (CM) acoplado al AB, en donde el CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa. En algunas modalidades de fórmula (II), el MM tiene una constante de disociación para unirse al AB que es mayor que la constante de disociación del AB a su diana, el MM no interfiere ni compite con el AB para unirse a su diana cuando el anticuerpo activable está en un estado escindido, el MM es un polipéptido de no más de 40 aminoácidos de longitud, la secuencia del polipéptido MM es diferente de la secuencia diana o la secuencia del polipéptido MM no es más del 50 % idéntica a cualquier compañero de fijación natural del AB. En algunas modalidades de fórmula (II), la diana se selecciona del grupo que consiste en CD44, CD147, CD166, ITGa3, ITGb1, PSMA y SLC34A2. En algunas modalidades de fórmula (II), el agente se selecciona del grupo que consiste en auristatina E, monometil auristatina F (MMAF), monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina D (MMAD), maitansinoide DM4, maitansinoide DM1, una caliqueamicina, una duocarmicina, una pirrolobenzodiazepina y un dímero de pirrolobenzodiazepina

[0012] En algunas modalidades de fórmula (I), R es un enlazador. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador escindible. En algunas modalidades, el enlazador está enlazado a un resto de unión a la diana. En algunas modalidades, el resto de unión a diana es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este. En algunas modalidades, la diana se selecciona del grupo que consiste en CD44, CD147, CD166, ITGa3, ITGb1, PSMA y SLC34A2. En algunas modalidades, el anticuerpo o el anticuerpo activable comprende un residuo de cisteína en la posición de Kabat 328.

[0013] En algunas modalidades, el compuesto de fórmula (I), (II) o (III) está unido a un polipéptido a un grupo tiol. En algunas modalidades, el grupo tiol es una cadena lateral del grupo

tiol de un residuo de cisteína. En algunas modalidades, el residuo de cisteína es un residuo de cisteína en la posición Kabat 328 de un anticuerpo.

[0014] En algunas modalidades de la presente descripción, un método para conjugar un método para conjugar un compuesto con un polipéptido, el método comprende conjugar un compuesto de fórmula (I) con un polipéptido, en donde R1 es un hidrógeno o un grupo alquilo C1-6, en donde R se selecciona del grupo que consiste en: un hidrógeno, un alquilo C1-6, un enlazador o un grupo X1-Y1-* en donde * es el punto de unión al nitrógeno y en donde Y1 es un grupo oxicarbonilo y X1 es un grupo alquilo C1-6, un grupo 9-fluorenilmetilo, un grupo bencilo o un grupo tert-butilo, en donde al menos un equivalente del compuesto de fórmula (I) o un derivado de este se conjuga con el polipéptido.

[0015] En algunas modalidades de la presente descripción, un método para conjugar un método para conjugar un compuesto con un polipéptido, el método comprende conjugar un compuesto de fórmula (II) con un polipéptido, en donde R2 es un resto unido a la fórmula (II) en donde el punto de unión se selecciona del grupo que consiste en: un grupo cloro, un grupo yodo, un grupo bromo y un grupo tiol.

[0016] En algunas modalidades de la presente divulgación, un método para conjugar un método para conjugar un compuesto con un polipéptido comprende reducir el polipéptido con un agente reductor, en donde al menos un grupo disulfuro se reduce a un grupo tiol libre, lo que reoxida el polipéptido con un agente oxidante sin oxidar el grupo tiol libre y conjuga el compuesto de fórmula (I) o (III) con el grupo tiol libre.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0017] La figura 1 es una vista general esquemática de una vía sintética para las especies de auristatina de la presente descripción.

[0018] En las Figuras 2A y 2B se muestran gráficos que representan la estabilidad *in vitro* ejemplar de un enlazador de la presente descripción a la catepsina B activada.

[0019] En las Figuras 3A y 3B se muestran gráficos que representan la estabilidad *in vitro* ejemplar de un enlazador de la presente descripción a lisosomas activados.

[0020] En la figura 4 se muestra un diagrama de flujo del proceso de un método ejemplar de activación de la toxina enlazadora y conjugación de la toxina enlazadora con un anticuerpo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0021] La presente descripción se refiere en general a nuevos compuestos de la familia de las auristatinas. La presente descripción también se refiere en general a nuevos enlazadores para acoplar una carga útil a otra molécula, tal como una molécula de unión a la diana. La presente descripción también se refiere en general a nuevas moléculas de toxina enlazadora. A continuación, en los Ejemplos, se describen ejemplos de esas modalidades.

[0022] En algunas modalidades, un resto de unión a la diana a la que se pueden conjugar los compuestos de la presente descripción incluye anticuerpos anti-PSMA, ejemplos del cual se describen en las secuencias a continuación:

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de CDR de VL

Anticuerpo	CDR1 de VL (SEQ ID NO:)	CDR2 de VL (SEQ ID NO:)	CDR3 de VL (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-4 cHv75-2a11.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 1) RSSQSLLHSDGYNLYD	SECUENCIA (SEQ ID NO: 2) LGSNRAS	SECUENCIA (SEQ ID NO: 3) MQALQTPWT
[Ag]AB-5 cHv75-2a7.G1(C99Y;L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 4) RASQGISNWLA	SECUENCIA (SEQ ID NO: 5) AASSLQS	SECUENCIA (SEQ ID NO: 6) QQANSFPLT

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de VH CDR

Anticuerpo	CDR1 de VH (SEQ ID NO:)	CDR2 de VH (SEQ ID NO:)	CDR3 de VH (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-4 cHv75-2a11.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 7) SYDMH	SECUENCIA (SEQ ID NO: 8) VIWYDGSNKYYADSLKG	SECUENCIA (SEQ ID NO: 9) VIAARTFYYYGMDV
[Ag]AB-5 cHv75-2a7.G1(C99Y; L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 10) NYWMS	SECUENCIA (SEQ ID NO: 11) NIKKDGSEKFYVDSVKG	SECUENCIA (SEQ ID NO: 12) EIQLYLQH

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de FR de VL

Anticuerpo	FR1 de VL (SEQ ID NO:)	FR2 de VL (SEQ ID NO:)	FR3 de VL (SEQ ID NO:)	FR4 de VL (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-4 cHv75- 2a11.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 13) DIVMTQSPLSLPV TPGEPASISC	SECUENCIA (SEQ ID NO: 14) WYLQKSGQSPQL LIY	SECUENCIA (SEQ ID NO: 15) GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAE DVGYYC	SECUENCIA (SEQ ID NO: 16) FGQGTKVEIKR
[Ag]AB-5 cHv75- 2a7.G1(C99Y;L32 8C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 17) DIQMTQSPSSVS ASVGGRVTITC	SECUENCIA (SEQ ID NO: 18) WYQQKPGKAPKL LIY	SECUENCIA (SEQ ID NO: 19) GVPSRFSGSGSG TDFTLTISNLQPE DFASYC	SECUENCIA (SEQ ID NO: 20) FGGGTKVEIKR

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de FR de VH

Anticuerpo	FR1 de VH (SEQ ID NO:)	FR2 de VH (SEQ ID NO:)	FR3 de VH (SEQ ID NO:)	FR4 de VH (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-4 cHv75- 2a11.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 21) QVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCA ASGFTFS	SECUENCIA (SEQ ID NO: 22) WVRQAPGKGLE WVA	SECUENCIA (SEQ ID NO: 23) RFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAED TAVYYCAR	SECUENCIA (SEQ ID NO: 24) WGQGTTVTVSS
[Ag]AB-5 cHv75- 2a7.G1(C99Y;L32 8C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 25) EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGITFS	SECUENCIA (SEQ ID NO: 26) WVRQAPGKGLE WVA	SECUENCIA (SEQ ID NO: 27) RFTISRDNAKNS LYLQINSLRAEDT AMYYCAR	SECUENCIA (SEQ ID NO: 28) WGQGTLVTVSS

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de dominio VL

Región variable (subrayado doble), región constante (subrayado punteado)

Antic.	VL (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-4 cHv75- 2a11.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 29) <u>DIVMTQSPLSLPVT</u> <u>PGEPASISCRSSQSLHSDG</u> <u>NYLDWYLQKSGQSP</u> <u>QLLIYLG</u> <u>SNRASGV</u> <u>PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQ</u> <u>TPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> <u>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV</u> <u>YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
[Ag]AB-5 cHv75- 2a7.G1(C99Y;L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 30) <u>DIQMTQSPSSVSASVGGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY</u> <u>AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISNLOPEDFASYYCQOANSFPLTE</u> <u>GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> <u>AKVQW</u> <u>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT</u> <u>HQGLSSPVTKSFNRGEC</u>

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos del dominio VH

Región variable (subrayado doble), región constante (subrayado punteado)

Antic.	VH (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-4 cHv75- 2a11.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 31) <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAV</u> <u>IWYDGSNKYYADSLKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVIAAR</u> <u>TFYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD</u> <u>YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICN</u> <u>VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKACPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE</u> <u>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK</u> <u>LTVDKSRWQOGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
[Ag]AB-5 cHv75- 2a7.G1(C99Y;L32 8C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 32) <u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVANI</u> <u>KKDGSEKFYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQINSLRAEDTAMYYCAREIQLYL</u> <u>QHWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN</u> <u>TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u> <u>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD</u> <u>WLNGKEYKCKVSNKACPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS</u> <u>LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR</u> <u>WQOGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>

Tabla 7. Secuencias de ácidos nucleicos de VL

Antic.	Secuencias de nucleótidos
[Ag]AB-4 cHv75- 2a11.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 33) GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGAGC CGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATGGATA CAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGTCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTG ATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCA GTGGATCAGGCACAGATTTTAACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA TGTGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAACTCCGTGGACGTTCCGGCC AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGACTGTCGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
[Ag]AB-5 cHv75- 2a7.G1(C99Y;L32 8C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 34) GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGG CAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAACTGGTTAG CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACTCCTGATCTATGCT GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACCTGCAGCCTGAAGATTTT GCAAGTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCCCTCACTTTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGGACTGTCGCTGCACCATCTGTCTTCA TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGT GCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAA AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

Tabla 8. Secuencias de ácidos nucleicos de VH

Antic.	Secuencias de nucleótidos
[Ag]A	SECUENCIA
B-4	(SEQ ID NO: 35)
cHv75	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAG
-	ACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGACATGCACTGGGTCCGC
2a11.	CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTGGTATGATGGAAGTAATA
G1(L3	AATACTATGCAGACTCCTTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC
28C)k	ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTCAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CGAGGGTTATAGCAGCTCGTACCTTCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC ATGCCACACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCTGCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Antic.	Secuencias de nucleótidos
[Ag]A	SECUENCIA
B-5	(SEQ ID NO: 36)
cHv75	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAG
-	ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCACCTTTAGTAATTATTGGATGAGCTGGGTCCGCC
2a7.G	AGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGAAAGATGGAAGTGAGA
1(C99	AATTCTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA
Y;L32	CTCACTGTATCTGCAAATCAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATGTATTACTGT
8C)k	GCGAGAGAAATACAGCTATACCTGCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAACGTC
	TCCTCAGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA
	CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
	TGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTG
	TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG
	CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG
	GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAG
	CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACAC
	CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
	AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
	GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
	CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
	GCCTGCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
	CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC
	CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
	AATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
	TCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
	TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
	CTCCCTGTCTCCGGGTAAA

[0023] En algunas modalidades, un resto de unión a la diana al que se pueden conjugar los compuestos de la presente descripción incluye anticuerpos anti-SLC34A2, ejemplos de los cuales se describen en las secuencias a continuación:

Tabla 9. Secuencias de aminoácidos de la CDR de VL

Anticuerpo	CDR1 de VL (SEQ ID NO:)	CDR2 de VL (SEQ ID NO:)	CDR3 de VL (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-2 cHv83- 3a23.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 37) RASQSISRFLN	SECUENCIA (SEQ ID NO: 38) VTSSLQS	SECUENCIA (SEQ ID NO: 39) QQSYNTPIT
[Ag]AB-3 cHv83- 1b15.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 40) RASQSIGTFLN	SECUENCIA (SEQ ID NO: 41) VASSLQS	SECUENCIA (SEQ ID NO: 42) QQSYSVPIT

Tabla 10. Secuencias de aminoácidos de la CDR de VH

Anticuerpo	CDR1 de VH (SEQ ID NO:)	CDR2 de VH (SEQ ID NO:)	CDR3 de VH (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-2 cHv83- 3a23.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 43) SYVMH	SECUENCIA (SEQ ID NO: 44) GVSSSGDSTFYVDSVKG	SECUENCIA (SEQ ID NO: 45) GGITGAPLVFDI
[Ag]AB-3 cHv83- 1b15.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 46) SHIMY	SECUENCIA (SEQ ID NO: 47) GISSNGLSSYYVDSVKG	SECUENCIA (SEQ ID NO: 48) GGRDRVPAVFDY

Tabla 11. Secuencias de aminoácidos de la FR de VL

Anticuerpo	FR1 de VL (SEQ ID NO:)	FR2 de VL (SEQ ID NO:)	FR3 de VL (SEQ ID NO:)	FR4 de VL (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-2 cHv83- 3a23.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 49) DIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITC	SECUENCIA (SEQ ID NO: 50) WYQQKPGKAPK VLIY	SECUENCIA (SEQ ID NO: 51) GVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQP EDFATYYC	SECUENCIA (SEQ ID NO: 52) FGQGTRLEIKR
[Ag]AB-3 cHv83- 1b15.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 53) DIQMTQSPSSLS ASIGDRVTITC	SECUENCIA (SEQ ID NO: 54) WYQQKPGKAPK VLIY	SECUENCIA (SEQ ID NO: 55) GVPSRFIGSGSG TDFTLTISLQPE DFATYYC	SECUENCIA (SEQ ID NO: 56) FGQGTRLEIKR

Tabla 12. Secuencia de aminoácidos de FR de VH

Anticuerpo	FR1 de VH (SEQ ID NO:)	FR2 de VH (SEQ ID NO:)	FR3 de VH (SEQ ID NO:)	FR4 de VH (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-2 cHv83- 3a23.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 57) EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTFS	SECUENCIA (SEQ ID NO: 58) WVRQAPGKGLE YVS	SECUENCIA (SEQ ID NO: 59) RFTISRDNSKNT LYLQMGSRAED MAVYYCAR	SECUENCIA (SEQ ID NO: 60) WGQGTMTVSS
[Ag]AB-3 cHv83- 1b15.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 61) EVQLVESGGGW VQPGGSLRLSC AASGFTFS	SECUENCIA (SEQ ID NO: 62) WVRQAPGKGLE YVS	SECUENCIA (SEQ ID NO: 63) RFTISRDNSKNL LYVHMGSLKPED MAMYYCAR	SECUENCIA (SEQ ID NO: 64) WGQGTLVTVSS

Tabla 13. Secuencias de aminoácidos del dominio VL

Región variable (subrayado doble), región constante (subrayado punteado)

Antic	VL (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-2	SECUENCIA
cHv83-	(SEQ ID NO: 65)
3a23.G1(L328C)k	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ</u> <u>SISRFLN</u> <u>WYQQKPGKAPK</u> <u>VLIYVTSS</u> <u>LQS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISSLPEDFATYYC</u> <u>QSYNTPITFGQ</u> <u>GTRLEIKRTVAAP</u> <u>SVFIFPPSDEQLKSGTASV</u> <u>VCLLNNFY</u> <u>PREAKVOWKVDNAL</u> <u>OSGNSQESVTEQDS</u> <u>KDSTYSL</u> <u>SSTLTLSKADYE</u> <u>KHKVYACEVTHQGL</u> <u>SSPVT</u> <u>KSFNRGEC</u>
[Ag]AB-3	SECUENCIA
cHv83-	(SEQ ID NO: 66)
1b15.G1(L328C)k	<u>DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQ</u> <u>SIGTFLN</u> <u>WYQQKPGKAPK</u> <u>VLIYVASS</u> <u>LQSG</u> <u>VPSRFIGSGSGTDFTLT</u> <u>ISSLPEDFATYYC</u> <u>QSYSVPITFGQ</u> <u>GTRLEIKRTVAAPS</u> <u>VFIFPPSDEQLKSGTASV</u> <u>VCLLNNFY</u> <u>PREAKVOWKVDNAL</u> <u>OSGNSQESVTEQDSK</u> <u>DSTYSL</u> <u>SSTLTLSKADYE</u> <u>KHKVYACEVTHQGL</u> <u>SSPVT</u> <u>KSFNRGEC</u>

Tabla 14. Secuencias de aminoácidos del dominio VH

Región variable (subrayado doble), región constante (subrayado punteado)

Antic	VH (SEQ ID NO:)
[Ag]AB-2 cHv83- 3a23.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 67) <u>EVQLVESGGGLVQP</u> <u>GGSLRLSCAASGFTFSSYVMHWVRQAPGK</u> <u>GLEIVSG</u> <u>VSSSGDSTFYVDSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQM</u> <u>GSLRAEDMAVYYCARGGIT</u> <u>GAPLVFDIWGQGTMTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF</u> <u>PEPVT</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>TVPS</u> <u>SSLGTQTYICNV</u> <u>NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKACPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE</u> <u>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYKTT</u> <u>PPVLDSDGSFFLYSK</u> <u>LTVDKSRWQOGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
[Ag]AB-3 cHv83- 1b15.G1(L328C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 68) <u>EVQLVESGGGWVQP</u> <u>GGSLRLSCAASGFTFSSHIMYWVRQAPGK</u> <u>GLEIVSGI</u> <u>SSNGLSSYYVDSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNLLYVHM</u> <u>GSLKPEDMAMYYCARGGRD</u> <u>RVPAVFDYWGQGT</u> <u>LVTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF</u> <u>PEPVT</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>TVPS</u> <u>SSLGTQTYICNV</u> <u>NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKACPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE</u> <u>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYKTT</u> <u>PPVLDSDGSFFLYSK</u> <u>LTVDKSRWQOGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>

Tabla 15. Secuencias de ácido nucleico de VL

Antic.	Secuencias de nucleótidos
[Ag] AB-2 cHv83- 3a23.G1(L328 C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 69) GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGGTTTTTAAATTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTATGTTACATCCAGT TTACAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT CACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCA ACAGAGTTACAATACCCCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA AACGGACTGTCGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT
[Ag]AB-3 cHv83- 1b15.G1(L328 C)k	SECUENCIA (SEQ ID NO: 70) GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTATAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTGGCACCTTTTTTAAATTGGT ATCAACAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTATGTTGCATCCAGT TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCATTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT CACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCA ACAGAGTTACAGTGTTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA AACGGACTGTCGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT

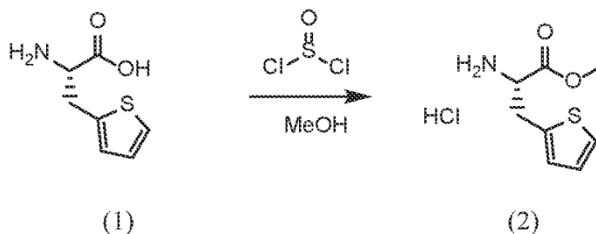
Tabla 16. Secuencias de ácido nucleico de VH

Antic	Secuencias de nucleótidos
[Ag]A	SECUENCIA
B-2	(SEQ ID NO: 71)
cHv8	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAG
3-	ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGTTATGCACTGGGTCCGCC
3a23.	AGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAATATGTTTCAGGTGTTAGTAGTAGTGGGGATAGCAC
G1(L3	ATTTTATGTAGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACA
28C)k	CGCTTTATCTTCAAATGGGCAGCCTGAGAGCTGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGC GAGAGGGGGTATAACTGGAGCTCCACTGGTTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG GTCACCGTCTCTTCAGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCT CCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCTGCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

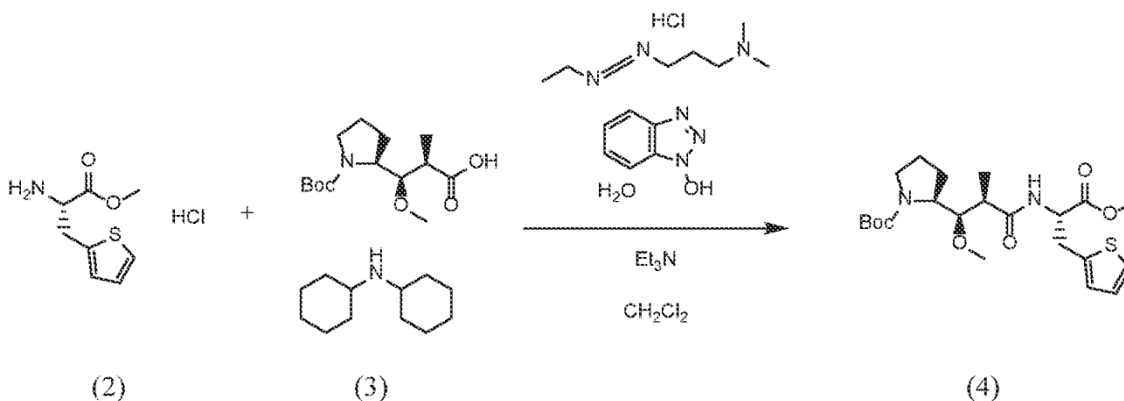
Antic	Secuencias de nucleótidos
[Ag]A	SECUENCIA
B-3	(SEQ ID NO: 72)
cHv8	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAG
3-	ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTCATATTATGTACTGGGTCCGCC
1b15.	AGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAATATGTTTCGGGTATTAGCAGTAATGGACTTAGCTC
G1(L3	ATATTATGTTGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATTT
28C)k	ACTGTATGTTTCATATGGGCAGCCTGAAACCTGAGGACATGGCTATGTATTACTGTGCGA
	GAGGGGGCCGGGATAGAGTGCCAGCTGTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGG
	TCACCGTCTCCTCCGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC
	CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
	CGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTT
	CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
	TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA
	CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGACAAAACCTCACACATGCCACC
	GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCC
	AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTG
	AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCAT
	AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
	GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
	CCAACAAAGCCTGCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC
	CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
	GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
	GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
	CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
	GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
	AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Ejemplo 1: Ejemplo de preparación de especies de auristatina

[0024] Este ejemplo proporciona un método ejemplar de preparación del compuesto de MMATH (molécula 14), una molécula de monometilauristatina con sustituyentes tiofenilmetilo e hidroximetilo. En la Figura 1 se muestra una vista esquemática de la preparación sintética de esta molécula.

Esquema 1:

[0025] Haciendo referencia a la reacción descrita en el Esquema 1, a una suspensión agitada (0 °C) de Ala(2-Th)-OH (molécula 1; 50,04 g, 0,29 mol) en MeOH (500,00 mL) se le añadió SOCl_2 (100,07 mL, 1,38 mol) durante 2 horas. La mezcla se agitó a 23°C. Después de 17 h, las cosas volátiles se evaporaron a presión reducida. El residuo se secó más durante 144 horas. Se obtuvo Ala(2-Th)-OMe_HCl (molécula 2). HPLC $t_r = 0,59$ min (método estándar), ESI $[M+H]^+$ 186,2.

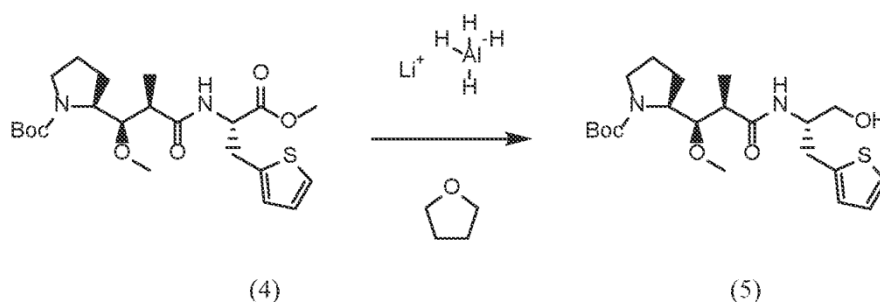
Esquema 2:

[0026] Haciendo referencia a la reacción descrita en el Esquema 2, a una suspensión agitada (23 °C) de Ala(2-Th)-OMe_HCl (molécula 2: 64,43 g, 0,29 mol), Boc-Dap-OH_DCHA (molécula 3: 163,64 g, 0,35 mol), WSC_HCl (67,25 g, 0,35 mol) y HOBt_H2O (42,77 g, 0,28 mol) en DCM (1,00 L) se añadió Et_3N (49,00 mL, 0,35 mol). Después de 18 h, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice (aproximadamente 500 g) y la torta del filtro se lavó con DCM (1 L). El filtrado se concentró a presión reducida hasta que el remanente fue de aproximadamente 500 mL. Los materiales no disueltos se filtraron y la torta del filtro se lavó con DCM (100 mL). Al filtrado se le añadió HCl 1,0 M ac. (500 mL) y luego la mezcla se agitó durante 30 minutos. Después de filtrar los materiales no disueltos, se separó el filtrado. A la capa

orgánica separada se le añadió HCl 1,0 M ac. (500 mL) nuevamente y luego la mezcla se agitó durante 30 minutos. Después de la separación, la capa orgánica se lavó con solución saturada de NaHCO₃ ac. (500 mL), salmuera (500 mL) y se secó en MgSO₄. Después de filtrar la capa orgánica, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se secó más durante 3 horas.

- 5 Al material bruto se le añadió AcOEt (200 mL) y luego la mezcla se calentó a 80°C (temperatura interna). La mezcla se filtró a través de Celite antes de concentrar el filtrado a presión reducida. Al residuo se le añadió AcOEt (150 mL) y luego la mezcla se calentó a 80°C (temperatura interna) hasta que se disolvieron los materiales. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 24 horas, la mezcla se filtró y el sólido se lavó dos veces con 50 mL de
- 10 una mezcla 10:1 de hexano/AcOEt. El sólido se secó más durante 14 horas. Se obtuvo Boc-Dap-Ala(2-Th)-OMe (molécula 4; 92,30 g, 0,20 mol). HPLC *rt* = 1,52 min (método estándar), ESI [M+H]⁺ 455,2.

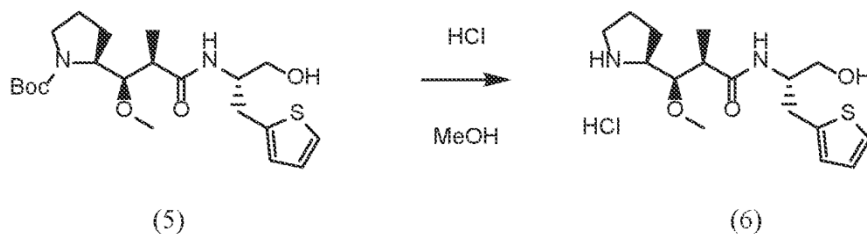
Esquema 3:



- 15 **[0027]** Con referencia al esquema 3; bajo enfriamiento con baño de hielo, a una solución agitada de LAH (8,25 g, 0,22 mol) en THF (500,00 mL) se le añadió Boc-Dap-Ala(2-Th)-OMe (molécula 4; 39,10 g, 0,09 mol) en THF (100 mL) manteniendo la temperatura interior por debajo de 5°C durante 2 horas. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura (temperatura interna; 5°C). Después de 5 min, bajo enfriamiento con baño de hielo, se añadieron lentamente a la
- 20 mezcla H₂O (8,5 mL), NaOH acuoso al 15 % (8,5 mL) y H₂O (25,5 mL) en este orden. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite y luego la torta del filtro se lavó tres veces con 100 mL de AcOEt. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se secó más durante 4 horas. Al material bruto se añadió tolueno (110 mL) y luego la mezcla se calentó a 60 °C hasta que se disolvieron todos
- 25 los materiales. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 24 horas, la

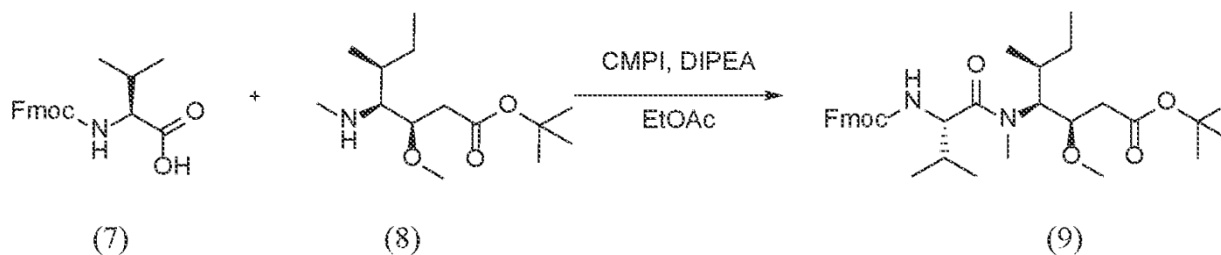
mezcla se filtró y luego el sólido se lavó con 50 mL de tolueno dos veces y se secó durante 15 horas más. Se obtuvo Boc-Dap-Ala(2-Th)-CH₂OH (molécula 5; 28,43 g, 0,07 mol). HPLC rt = 1,38 min (método estándar), ESI [M+H]⁺ 427,3.

Esquema 4:



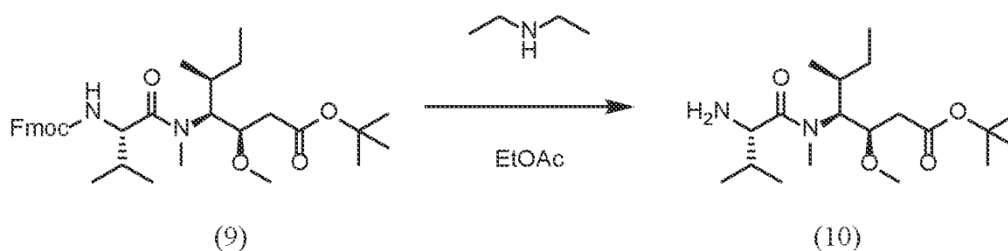
[0028] Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 4, a una solución agitada (23 °C) de Boc-Dap-Ala(2-Th)-CH₂OH (molécula 5; 19,42 g, 0,05 mol) en MeOH (100,00 mL) se añadió HCl/dioxano (91,00 mL, 0,36 mol). Después de 2 h, las cosas volátiles se evaporaron a presión reducida. Al residuo se le añadió AcOEt (250 mL) y luego la mezcla se concentró al vacío. Este proceso se repitió dos veces. El residuo se secó más durante 20 horas. Al material bruto se añadió una mezcla 20:1 de ACN/H₂O (38 mL). La mezcla se calentó a 70°C (temperatura interna) hasta que todos los materiales se disolvieron y luego la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 24 horas, la mezcla se filtró y luego el sólido se lavó dos veces con 15 mL de ACN. El sólido se secó más durante 8 horas. Se obtuvo H-Dap-Ala(2-Th)-CH₂OH·HCl (12,84 g, 0,04 mol). HPLC rt = 0,60 min (método estándar), ESI [M+H]⁺ 327,2 a una suspensión agitada (0 °C) de Ala(2-TH)-OH (50,04 g, 0,29 mol) en MeOH (500,00 mL) se añadió SOCl₂ (100,07 mL, 1,38 mol) durante 2 horas. La mezcla se agitó a 23°C. Después de 17 h, las cosas volátiles se evaporaron a presión reducida. El residuo se secó más durante 144 horas. Se obtuvo Ala(2-Th)-OMe·HCl (molécula 6). HPLC rt = 0,59 min (método estándar), ESI [M+H]⁺ 327,2.

Esquema 5:



[0029] Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 5, a una solución agitada (20 °C) de ácido (2S)-2-[[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]-3-metilbutanoico (molécula 7; 100,00 g, 294,65 mmol), (3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-(metilamino)heptanoato de tert-butilo (molécula 8; 63,69 g, 245,54 mmol) y yoduro de 2-cloro-1-metilpiridin-1-io (106,64 g, 417,42 mmol) en acetato de etilo (2,50 l) se añadió N,N-diisopropiletilamina (154,38 mL, 883,95 mmol) una vez que se logró una mezcla uniforme. Después de 16 h, la mezcla de reacción en bruto se filtró y se lavó con EtOAc. La solución se extrajo con 1 L de HCl 1 M, seguido de 1 L de agua, seguido de 0,5 L de bicarbonato de sodio, seguido de 0,5 L de salmuera. La fracción orgánica combinada se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida. Se obtuvo (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]-N,3-dimetilbutanamido]-3-metoxi-5-metilheptanoato de tert-butilo (molécula 9; 149,00 g, 0,26 mol) como un sólido rosa. HPLC t_r = 1,55 min (método estándar), ESI $[M+H]^+$ 581,4.

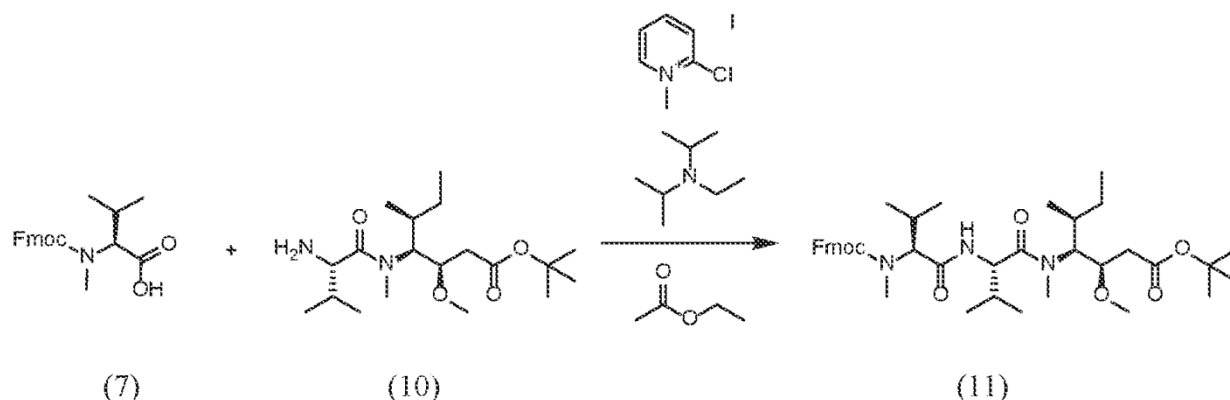
Esquema 6:



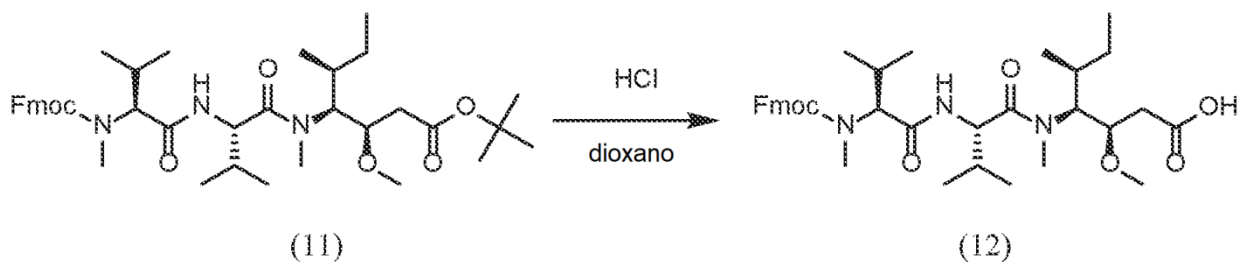
[0030] Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 6, a una solución agitada (20 °C) de (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]-N,3-dimetilbutanamido]-3-metoxi-5-metilheptanoato de tert-butilo (molécula 9; 143,00 g, 246,23 mmol) en acetato de etilo (200,00 mL) se añadió dietilamina (200,00 mL, 1930,63 mmol). Después de 1 h, la mezcla en bruto se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 200 mL de acetato de etilo y luego se concentró nuevamente. Esta operación se repitió dos veces. Al residuo se añadieron 50 mL de tolueno y luego se concentró. El residuo se disolvió en 1000 mL de hexano. A la mezcla se le añadieron 500 mL de ácido clorhídrico 1 M y 500 mL de agua. La mezcla se agitó durante 5 min. La mezcla bifásica se colocó en un embudo de separación y se separó la fase acuosa. La capa orgánica se extrajo dos veces con 500 mL de ácido clorhídrico 0,1 M. La capa acuosa combinada se lavó dos veces con 500 mL de hexano. A la capa acuosa se añadió carbonato de potasio para ajustar el pH por encima de 10. La solución acuosa se colocó en un embudo de

separación y se extrajo 3 veces con 500 mL de acetato de etilo. La capa orgánica combinada se lavó con 500 mL de salmuera, se secó en sulfato de magnesio y se concentró al vacío. Se obtuvo (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-amino-N,3-dimetilbutanamido]-3-metoxi-5-metilheptanoato de tert-butilo (molécula 10; 66,80 g, 0,19 mol) como un aceite rosa HPLC $r_t = 0,82$ min (método estándar), ESI $[M+H]^+$ 359,4.

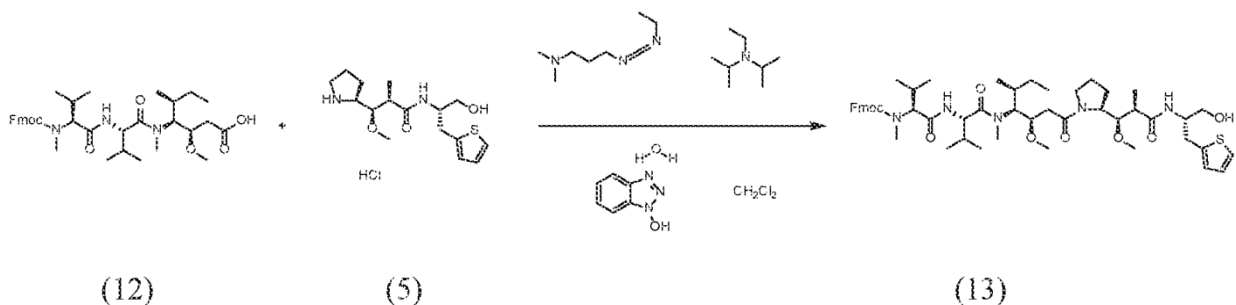
Esquema 7:



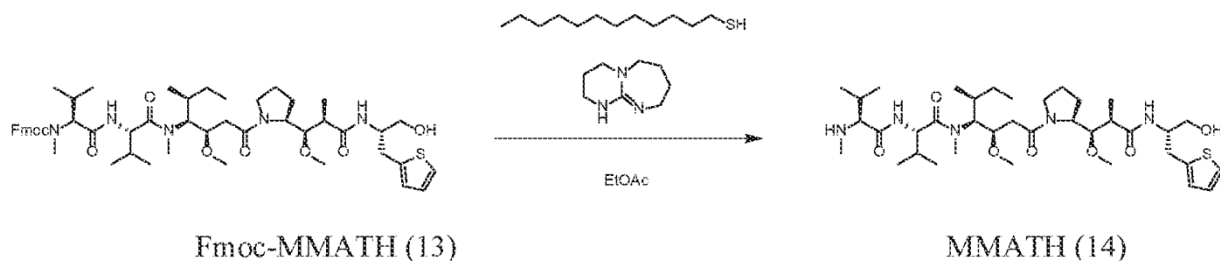
[0031] Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 7, a una solución agitada (20 °C) de ácido (2S)-2-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil](metil)amino]-3-metilbutanoico (molécula 7; 55,00 g, 155,63 mmol), (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-amino-N,3-dimetilbutanamido]-3-metoxi-5-metilheptanoato de tert-butilo (molécula 10, 55,79 g, 0,16 mol) y yoduro de 2-cloro-1-metilpiridin-1-io (67,59 g, 264,56 mmol) en acetato de etilo (1,50 L) se añadió N,N-diisopropiletilamina (97,85 mL, 560,25 mmol) una vez que se logró una mezcla uniforme. Después de 16 h, el precipitado amarillo se eliminó mediante filtración con Celite y se lavó con 100 mL de EtOAc. El filtrado se colocó en un embudo de separación y se lavó dos veces con 200 mL de ácido clorhídrico 1 M, 200 mL de agua, 200 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio dos veces y salmuera. La capa orgánica se secó en sulfato de magnesio y se concentró al vacío. El residuo se secó al vacío durante 24 horas para obtener Fmoc-MeVal-Val-Dil-OtBu (molécula 11; 103,53 g, 0,15 mol) como una espuma amarilla. HPLC $r_t = 1,86$ min (método estándar), ESI $[M+H]^+$ 694,5.

Esquema 8:

[0032] Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 8, a una solución agitada (20 °C) de ácido clorhídrico (57,64 mL, 230,58 mmol) se añadió (3R,4S,5S)-4-[(2S)- 2-[(2S)-2-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil](metil)amino]-3-metilbutanamido]-N,3-dimetilbutanamido]-3-metoxi-5-metilheptanoato de tert-butilo (molécula 11, 20,00 g, 28,82 milimoles). Después de 16 h, se concentró la mezcla en bruto al vacío. El residuo se suspendió en 50 mL de tolueno y se concentró al vacío. Esta operación se repitió 3 veces. El residuo obtenido se secó al vacío durante 24 horas para obtener Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH (molécula 12; 18,00 g, 0,03 mol) como una espuma beige. HPLC $t_r = 1,58$ min (método estándar), ESI $[M+H]^+$ 638,6.

Esquema 9:

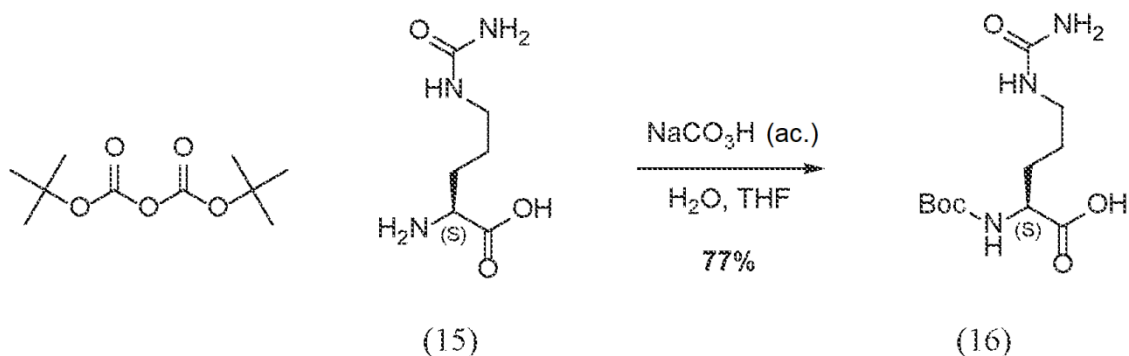
[0033] Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 9, a Dap-(2-Th)Ala-CH₂OH_HCl (molécula 5; 3,94 g, 10,86 mmol) se añadieron Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH (molécula 12; 6,30 g, 9,88 mmol), EDCI_HCl (2,84 g, 14,82 mmol), HOBT (1,51 g, 9,88 mmol) y DIPEA (4,30 mL, 24,69 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23 °C. Después de agitar durante 18 h, se añadió CH₂Cl₂ (100 mL) a la mezcla. La mezcla se lavó con HCl acuoso 0,1 M (100 mL), NaHCO₃ ac. saturado (100 mL) y luego salmuera (100 mL). La capa orgánica se secó con MgSO₄ y el sólido se eliminó por filtración. La capa orgánica se concentró al vacío para dar Fmoc-MMATH (tiofenilmetil hidroximetil monometilauristatina) (molécula 13; 7,63 g, 0,01 mol). HPLC $t_r = 1,63$ min (método estándar), ESI $[M+H]^+$ 946,8.

Esquema 10:

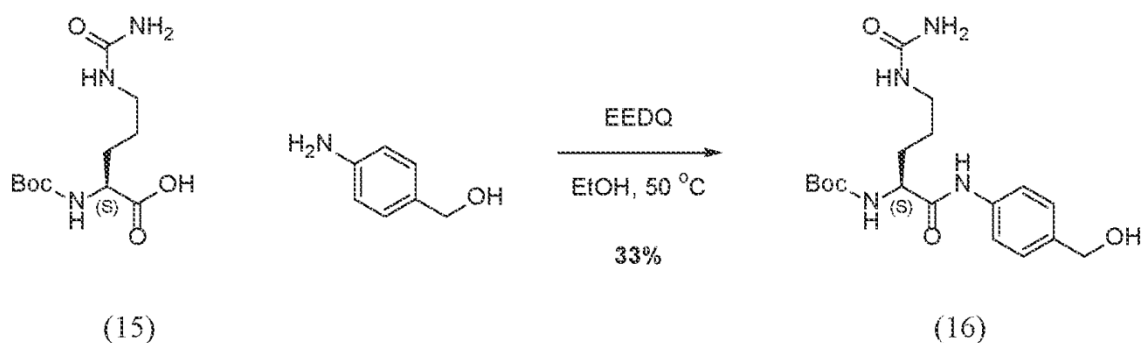
[0034] Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 10, a Fmoc-MMATH (molécula 13; 7,13 g, 7,54 mmol) se le añadieron EtOAc (100,00 mL), dodecil mercaptano (3,61 mL, 15,07 mmol) y DBU (0,23 mL, 1,51 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23 °C. Después de agitar durante 18 h, la mezcla en bruto se colocó en un embudo de separación y se extrajo dos veces con 50 mL de ácido clorhídrico 1,0 M. La capa acuosa combinada se lavó dos veces con 100 mL de acetato de etilo. La solución acuosa se pasó a un matraz de fondo redondo. A la mezcla se añadió carbonato de potasio para ajustar el pH de la mezcla por encima de 10. La solución acuosa se colocó en un embudo de separación y se extrajo dos veces con 100 mL de acetato de etilo. La capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó en sulfato de magnesio y se concentró al vacío. El residuo se secó al vacío durante 16 horas para obtener MMATH (molécula 14; 4,51 g, 0,01 mol) como una espuma incolora. HPLC $t_r = 0,95$ min (método estándar), ESI $[M+H]^+$ 724,7.

Ejemplo 2: Ejemplo de preparación de especies de toxina enlazadora de auristatina

[0035] Este ejemplo proporciona un método ejemplar de preparación del compuesto de MMATH (molécula 14), una molécula de tiofenilmetil hidroximetil auristatina, con un enlazador adecuado para acoplarse a una molécula dirigida.

Esquema 11:

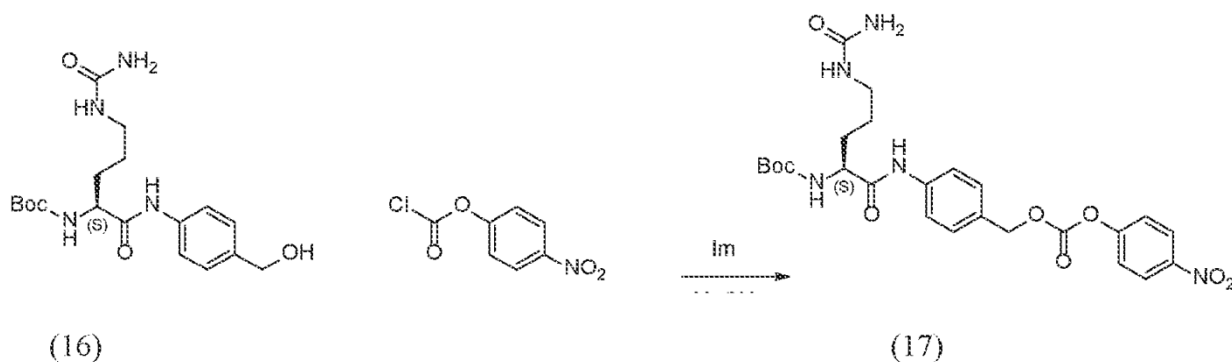
[0036] Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 11, a una solución agitada a 23 °C de Boc₂O (137,0 g, 628 mmol) en THF (600 mL) se añadió H₂N-Cit-OH (molécula 15; 100,0 g ,
 5 571 mmol) y NaCO₃H (71,9 g, 856 mmol) en agua (600 mL). Después de 16 h, se formó un precipitado y después de 20 h, la reacción se completó conforme a análisis LCMS. Los componentes orgánicos volátiles se eliminaron a presión reducida, se ajustó el pH de la reacción a 4 con HCl 2 M y se extrajo con EtOAc (4 x 750 mL). Los componentes orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron con MgSO₄. La solución se filtró y se concentró a presión
 10 reducida para dar un 77 % de la molécula 16 como un sólido blanco.

Esquema 12:

[0037] Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 12, a una solución agitada de Boc-Cit a 50 °C (molécula 16, 120,0 g, 436 mmol) en EtOH (600 mL) se le añadieron Paba (64,4 g,
 15 523 mmol) y EEDQ (129,3 g, 523 mmol). La solución se agitó durante 24 h y los disolventes orgánicos se concentraron a 300 mL. La solución en bruto concentrada se tritura con la adición de 1,0 L de EtOAc seguido de la adición de 2,0 L de hexanos y se agita durante 1 h. El sólido

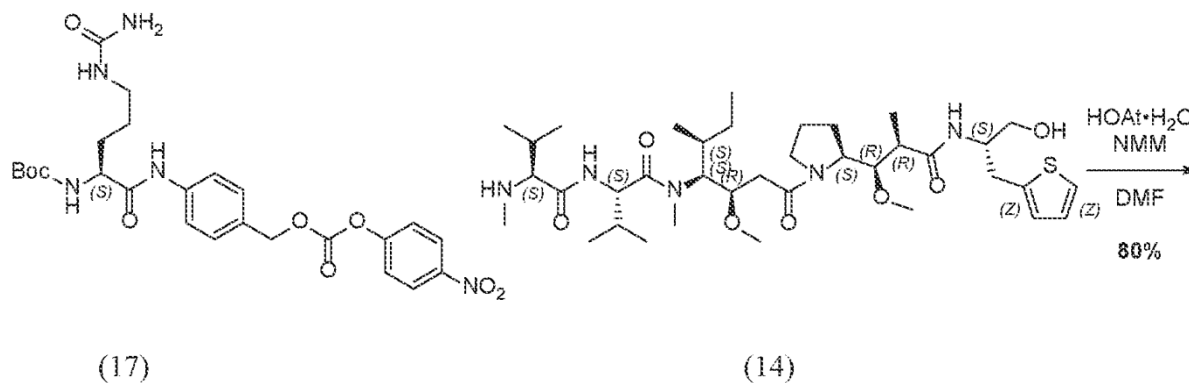
blanco se recogió por filtración y se secó a presión reducida para obtener la molécula 16 con un rendimiento del 77 %.

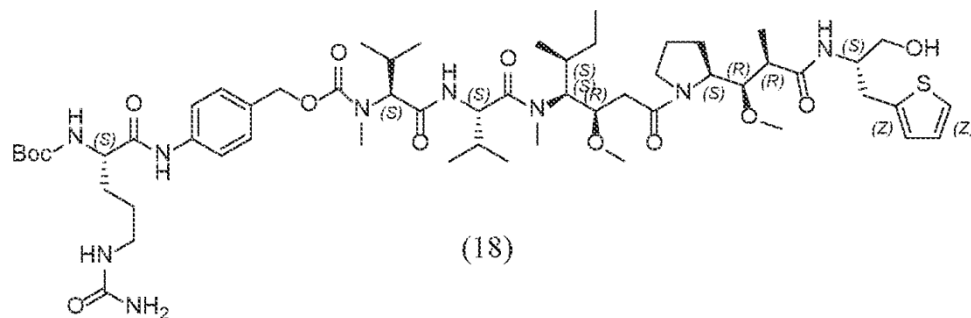
Esquema 13:



- 5 **[0038]** Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 13, a una solución a 23 °C agitada de Boc-Cit-Paba (molécula 16, 10,0 g, 26,3 mmol) en MeCN (300 mL) se le añadieron Im (1,79 g, 26,3 mmol) y PNP-COCl (7,95 g, 39,4 mmol). Después de 16 h, la reacción se concentró a presión reducida para dar un aceite amarillo. Al aceite se le añadieron 300 mL de EtOAc y la solución se trituro durante 15 minutos. El precipitado blanco se recogió por filtración y el
- 10 sobrenadante se concentró al 50 % del volumen y el segundo lote se trituro durante 15 min y se recogió por filtración. Los materiales combinados se secaron a presión reducida para producir la molécula 17 como un polvo blanco con un rendimiento del 69 %.

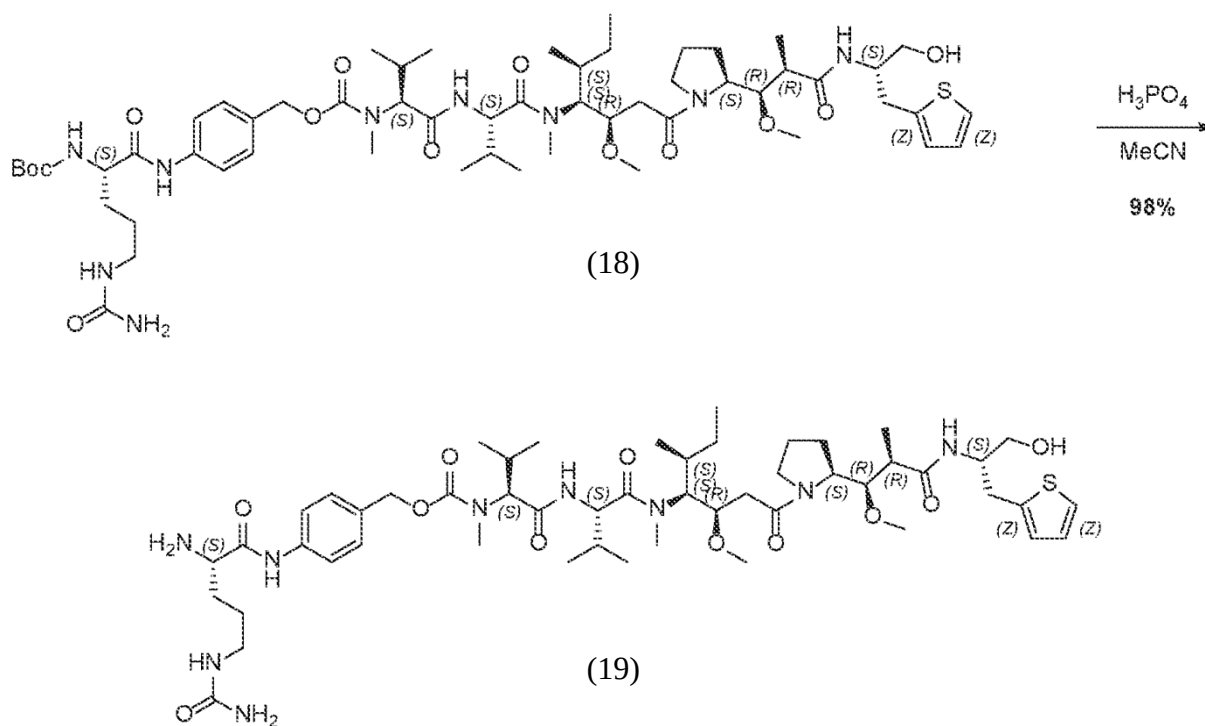
Esquema 14:





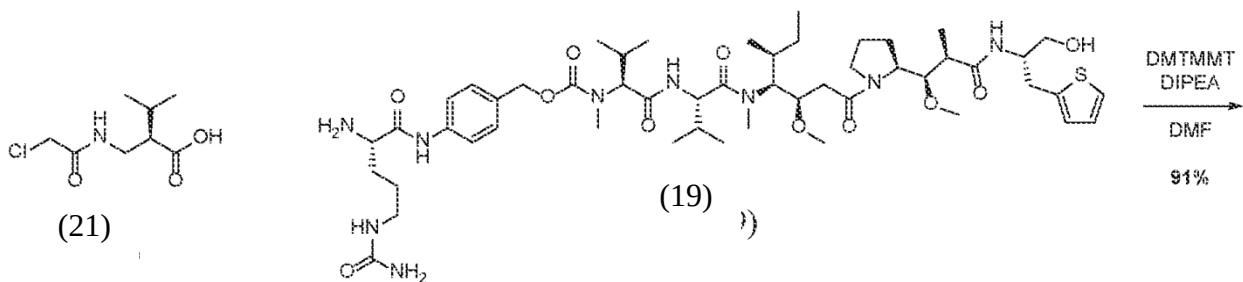
[0039] Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 14, a una solución a 23 °C agitada de Boc-Cit-Paba-PNP (molécula 17, 1,45 g, 2,65 mmol) en DMF (21 mL) se le añadieron MMATH (molécula 14, 1,2 g, 1,66 mmol) y HOAt (83,7 mg, 0,55 mmol) y luego, NMM (0,73 mL, 6,63 mmol). Después de 72 h, se diluyó la reacción con EtOAc (200 mL) y se lavó con HCl 1,0 M (2 x 100 mL), seguido de NaHCO₃ saturado (1 x 100 mL) y salmuera (1 x 100 mL). La capa orgánica se secó en MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. La espuma amarilla se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice con 0 % a 10 % MeOH en EtOAc para dar Boc-Cit-Paba-MMATH (molécula 18) como una espuma blanca con un rendimiento del 80 %.

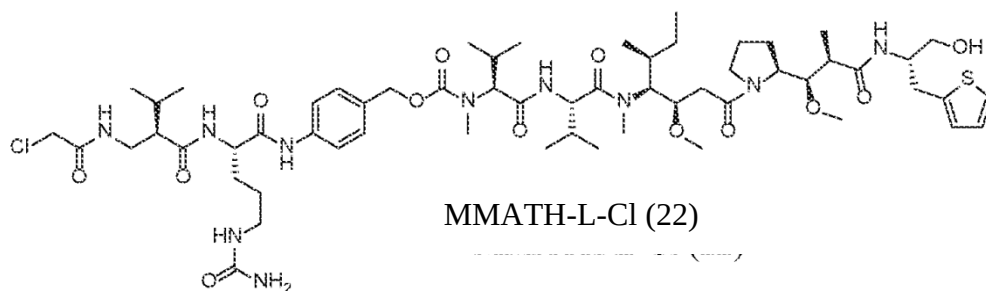
Esquema 15:



5

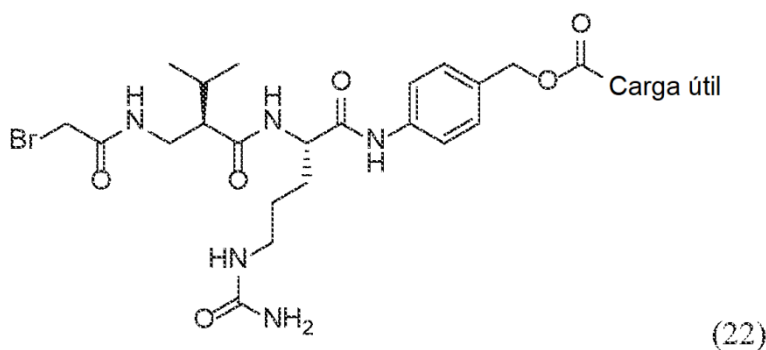
20

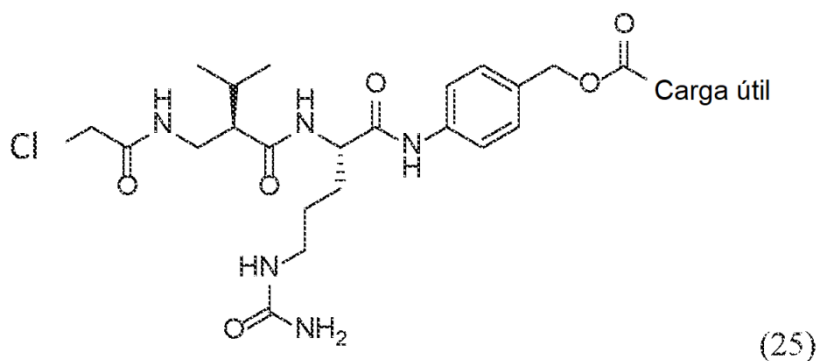
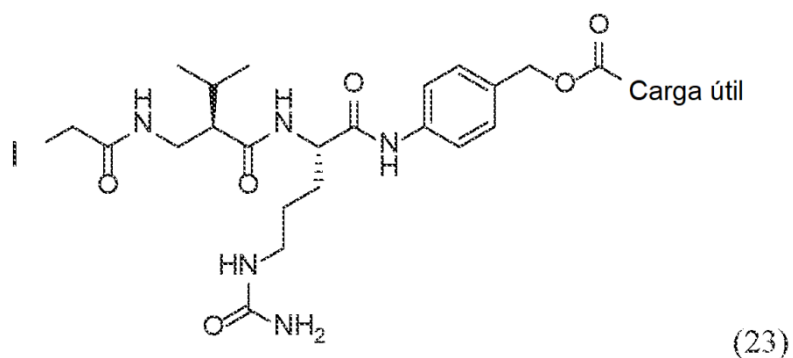




[0042] Con referencia a la reacción descrita en el Esquema 17, a una solución agitada a 0 °C de DMTMMT (55 mg, 0,14 mmol) en DMF (0,5 mL) se añadió DIPEA (100 µL, 0,57 mmol) seguido de H₂N-Cit-Paba-MMATH (molécula 19; 105 mg, 0,1 mmol). Después de agitar la reacción durante 5 min, se añadió ClAc-β-homoVal (molécula 21; 30 mg, 0,14 mmol). Después de 1 h, la solución en bruto se purificó mediante RP-HPLC preparatoria con una columna Phenomenex Gemini 10 µ, C18 110 Å utilizando de 5 % a 98 % de MeCN en TFA acuoso al 0,05 % como eluyente. Se obtuvo MMATH-L-Cl (molécula 22) como un polvo blanco (114 mg, 91%).

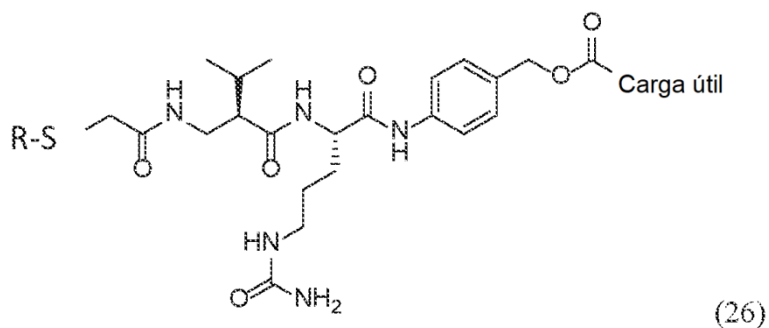
[0043] En otras modalidades de la presente descripción, una combinación de toxina enlazadora y MMATH incluye un derivado de bromo y yodo de la molécula 22, donde el grupo cloro se reemplaza con un grupo bromo (molécula 23) o un grupo yodo (molécula 24), donde «carga útil» representa una toxina. En algunas modalidades de la presente descripción, la toxina es MMATH (molécula 22) conectada a través del nitrógeno de extremo N.





[0044] En algunas modalidades de la presente descripción, la carga útil de las moléculas 23, 24 o 25 puede estar representada por un agente, como una toxina.

- 5 **[0045]** En algunas modalidades de la presente descripción, un compuesto está representado por la molécula 26, en la que la carga útil representa un agente, como una toxina, y R representa un resto de unión a la diana, como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este, o cualquier otra molécula a través de un grupo tiol libre.



Ejemplo 3: Citotoxicidad *in vitro* de especies de auristatina

[0046] En este estudio ejemplar, se usó una citotoxicidad *in vitro* para evaluar la toxicidad relativa de MMATH (un derivado de tiofenilmetil hidroximetilo de una auristatina), como se muestra aquí como fórmula (I), una especie de auristatina de la presente descripción.

- 5 [0047] En este ensayo, las células de prueba se cultivaron en placas y se cultivaron hasta una densidad celular apropiada (por ejemplo., 1500 células/pocillo (50 μ L por pocillo) para células SW780). Las células se trataron con el fármaco (MMATH o MMAE (monometilauristatina E)) a concentraciones que oscilaban entre 10 μ M y 10^{-4} nM por triplicado durante 5 días. En el punto final del día 6, las células se incubaron con 20 μ L de Presto Blue a 37C durante 2 horas y la
- 10 señal se leyó en un lector de placas Biotek synergy H4. Después de restar el fondo del medio, se calculó y se graficó el porcentaje de supervivencia para determinar el valor de CE50, como se muestra en los resultados ejemplares de la Tabla 1.

Tabla 1: Citotoxicidad *in vitro* de especies de auristatina

Toxina	EC50 (nM)				
	SW780	SKOV3	SW780	HCC1954	PC3
MMAE	0,31	0,19	0,22	0,03	0,24
MMATH	0,38	0,20	0,26	0,03	0,24

- 15 [0048] En un estudio ejemplar, se midió la unión de MMAE y MMATH a la tubulina, lo que muestra una K_D de 69,9 nM (MMAE) y 204,4 nM (MMATH). Los resultados ejemplares muestran que la nueva especie de auristatina MMATH tiene una toxicidad comparable a la de MMAE. Estos resultados ejemplares también muestran que esta eficacia *in vitro* comparable se logró con una molécula con una afinidad menor por la tubulina, su supuesta diana molecular para la
- 20 eficacia.

Ejemplo 4: Estabilidad de especies enlazadoras

[0049] En este estudio ejemplar, se usó un estudio *in vitro* para evaluar la estabilidad de un enlazador (molécula 26) de la presente descripción en comparación con un enlazador de valina y citrulina (vc).

[0050] En este estudio, las tasas cinéticas relativas de escisión por una variedad de catepsinas para dos enlazadores de fármacos conjugados con cisteína diferentes se midieron mediante LCMS. Las enzimas (catepsinas B, D, H, K, L y S) se activaron antes de la introducción al sustrato. Un sustrato era la auristatina MMAE unida a cisteína a través de un enlazador de valina-citrulina-PAB-carboxi (n.º de CAS: 646502-53-6) y el otro era la auristatina MMATH de la presente descripción (molécula 14) unida a una cisteína a través de un enlazador de la molécula 26.

[0051] Se incubaron dos auristatinas unidas a cisteína unidas a tiol (MMATH-L-Cys y Cys-vc-MMAE) a 37°C con enzimas preactivadas durante un período de tiempo de 48 h. Los puntos de tiempo se dividieron en alícuotas directamente en amortiguador Tris 2 M, a pH 9 para detener la actividad enzimática y luego se congelaron inmediatamente a -80°C. Se monitorearon a lo largo del tiempo las AUC de MS XIC tanto del fármaco libre como del fármaco unido a cisteína para cada uno. Todas las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas Thermo LTQ Velos Orbitrap utilizando un extremo frontal Dionex LC. Las cantidades de fármaco ligado a cisteína original, fármaco libre y fragmentos «enlazadores» escindidos se midieron a lo largo del tiempo.

[0052] Con referencia a las Figuras 2A y 2B, los resultados ejemplares muestran que una cisteína unida a MMATH con el enlazador de la molécula 26 demostró una mayor estabilidad que la correspondiente cisteína unida a vcMMAE. En los resultados con las catepsinas H, D, L, K y S, los resultados mostraron una estabilidad relativa similar entre los dos enlazadores para todas las catepsinas. Las catepsinas D y L se escindieron a una velocidad comparable a la de la catepsina B, mientras que la catepsina H se escindió de forma relativamente más lenta que la catepsina B. Las catepsinas K y S se escindieron de forma relativamente más rápida que la catepsina B.

[0053] En otro estudio ejemplar, se probó la estabilidad de las dos especies de auristatina unidas a cisteína en un lisado derivado de lisosoma activado. En este estudio, los lisosomas se lisaron mediante tres ciclos consecutivos de congelación y descongelación, seguidos de 30 minutos de sonicación. Las auristatinas unidas a cisteína se incubaron a 37°C con lisosomas preactivados durante un período de tiempo de 24 h. En este estudio, el sustrato de cisteína-MMATH-L se incubó con una concentración de lisosomas de 5 veces. Se tomaron puntos de tiempo a lo largo

de la incubación y se controlaron a lo largo del tiempo las AUC de MS XIC tanto para el fármaco libre como para la cys-DL. Todas las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas Thermo LTQ Velos OrbiTrap utilizando un extremo frontal Dionex LC. Las cantidades de fármaco ligado a cisteína original, fármaco libre y fragmentos «enlazadores» escindidos se midieron a lo largo del tiempo.

[0054] Con referencia a las Figuras 3A y 3B, los resultados ejemplares muestran que una cisteína unida a MMATH con el conector de la molécula 26 mostró una estabilidad comparable en lisosomas activados que la correspondiente cisteína unida a vcMMAE, incluso con la primera tratada con una concentración lisosomal de 5 veces, lo que indica una tasa de escisión aproximadamente 5 veces más lenta que el enlazador vcMMAE.

[0055] En otro estudio ejemplar, se determinó la estabilidad de los sustratos en presencia de cuatro carboxilesterasas diferentes (CES-1 y CES-1C humana o de ratón). En este estudio, las enzimas se activaron antes de la introducción del sustrato y luego se incubaron con el sustrato a 37°C durante un período de 48 horas. Los puntos de tiempo se dividieron en alícuotas directamente en amortiguador Tris 2 M, a pH 9 para detener la actividad enzimática y luego se congelaron inmediatamente a -80°C. Se monitorearon a lo largo del tiempo las AUC de MS XIC tanto del fármaco libre como del fármaco unido a cisteína para cada uno. Todas las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas Thermo LTQ Velos OrbiTrap utilizando un extremo frontal Dionex LC. Las cantidades de fármaco ligado a cisteína original, fármaco libre y fragmentos «enlazadores» escindidos se midieron a lo largo del tiempo.

[0056] En este estudio usando carboxilesterasas humanas o de ratón CES-1 o CES-1C, no se observó división de ninguno de los sustratos por CES-1 humano o de ratón. Sin embargo, la cisteína-vcMMAE se escindió completamente en 48 horas tanto por CES-1C humano como de ratón. Para el enlazador de MMATH de la presente divulgación, la escisión por CES-1C de ratón o humano comienza alrededor de las 12 horas, ya una velocidad sustancialmente más lenta que la observada con vcMMAE.

[0057] Estos resultados ejemplares muestran que el enlazador de la molécula 26 tiene una mayor estabilidad que el enlazador de valina y citrulina tanto en enzimas activadas como en

lisosomas. Estos resultados ejemplares muestran que el MMATH enlazador de la molécula 26 tiene una mayor estabilidad que vcMMAE tanto en enzimas activadas como en lisosomas.

Ejemplo 5: Nuevo sitio de conjugación de anticuerpos

[0058] En este estudio ejemplar, un residuo de leucina ubicado en el bucle FG de la región constante de cadena pesada de IgG1 humana. Como referencia, la leucina en cuestión se encuentra en el contexto de la secuencia KVSNKALPAPI (*es decir*, la posición 328 de la numeración de Kabat). En la presente descripción, la leucina en esta posición se modificó de forma específica del sitio a cisteína, *es decir*, KVSNKACPAPI.

[0059] En este estudio, el anticuerpo monoclonal trastuzumab, que se une específicamente al HER2 diana, se modificó en esta posición de leucina a cisteína para determinar la idoneidad para la conjugación del fármaco y otros efectos. A continuación, se presenta una comparación entre el trastuzumab nativo y la versión modificada de la presente divulgación.

	trastuzumab	trastuzumab (L328C)
Relación fármaco-anticuerpo (DAR)	2	1,7
% no conjugado	36 %	1 %
% agregado	5%	8%
Eficacia <i>in vivo</i> de ADC		8/8
Unión a FcγR1 (pM)	239	701 (reducción de 2,93x)
disminución de C1q	reducción 1,02x	reducción 3,4x

[0060] Estos resultados ejemplares mostraron una disminución significativa en la unión a los receptores Fcγ de la variante L328C de la presente descripción en comparación con el anticuerpo original, al tiempo que dieron como resultado una DAR específica de aproximadamente 2, pero resultaron en una conjugación altamente eficiente, *es decir*, menos del 1 % de anticuerpo conjugado.

[0061] Otros ejemplos de estas mutaciones como se describen en este documento (anticuerpos anti-PSMA y anti-SLC34A2)

[0062] Estos resultados ejemplares demuestran las ventajas de usar anticuerpos o anticuerpos activables con esta modificación específica del sitio para proporcionar un sitio controlado y eficaz para la conjugación con una estequiometría específica.

Ejemplo 6: Ejemplo de método de conjugación

- 5 **[0063]** En este ejemplo, se describe un método de conjugación ejemplar para conjugar un MMATH de auristatina de la presente descripción con una molécula de anticuerpo.

10 **[0064]** Con referencia al diagrama de flujo del proceso ejemplar de la Figura 4, en un método ejemplar de la presente descripción, se proporciona un anticuerpo que tiene un residuo de cisteína en la posición de Kabat 328 a una concentración de 14 g/L y a un pH de 7,2. La solución de anticuerpo se filtra y luego se reduce con el agente reductor tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en una relación molar TCEP:anticuerpo de 9:1 durante 80 a 120 minutos a 20°C. La reacción se filtró mediante filtración de flujo tangencial (TFF) a 8 diavolumenes y se recuperó a 12 g/L. El anticuerpo se reoxidó con ácido (L)-deshidroascórbico (DHA) en una relación molar de DHA:anticuerpo de 10:1 durante 90 minutos a 20°C.

- 15 **[0065]** El compuesto toxina enlazadora MMATH que tiene una fórmula (III), donde R2 es un cloro, se activó con yoduro de sodio. La toxina enlazadora activada se añadió al anticuerpo reoxidado en una relación molar de toxina enlazadora:anticuerpo de 9:1 durante 12-16 horas a 20°C para permitir la conjugación de la toxina enlazadora con el anticuerpo. La mezcla de reacción se filtró por TFF a 10 diavolumenes y se recuperó a 17 g/L. El análisis del anticuerpo
20 conjugado mostró una conjugación específica del sitio en las posiciones de cisteína de Kabat 328 con una DAR de 2.

[0066] Estos resultados ejemplares mostraron que los derivados de auristatina de la presente descripción se pueden conjugan con un anticuerpo en una manera específica del sitio para proporcionar un conjugado de anticuerpo y fármaco con una DAR de 2.

- 25 **[0067]** Estos resultados ejemplares también mostraron que al conjugan la toxina enlazadora con una cisteína específica del sitio en la posición de Kabat 328, la conjugación puede proceder usando un acoplamiento activado por yodo de la toxina enlazadora al grupo tiol de cisteína. De esta manera, el producto conjugado es menos susceptible a las reacciones de desconjugación que los conjugados de tiol y maleimida, el último de los cuales puede revertirse más fácilmente

mediante el intercambio de tiol, lo que da como resultado una liberación no deseada de la toxina enlazadora. El uso de anticuerpos con cisteínas específicas del sitio para la conjugación de toxina enlazadora, como los de la posición de Kabat 328, también proporciona un producto de anticuerpo conjugado con una DAR de 2. El uso de tales anticuerpos con residuos de cisteína
5 específicos del sitio, como aquellos en la posición de Kabat 328, también permite la conjugación de toxina enlazadora con el anticuerpo sin romper los enlaces disulfuro intra o intercatenarios nativos del anticuerpo.

Otras modalidades

[0068] Si bien la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de esta, la
10 descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de lo que se indica a continuación.