

CONJUGADOS DE NEODEGRADADORES

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

[0001] El contenido del listado de secuencias presentado electrónicamente en un archivo de texto ASCII (Nombre 4547_016PC02_Seqlisting_ST25; Tamaño: 24.777 bytes; y fecha de creación: 31 de mayo de 2022) presentado con la solicitud se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención proporciona conjugados de neodegradadores (neoDegradars), en donde el neodegradador está conjugado con una fracción de unión. También se proporcionan composiciones que comprenden los conjugados. Los conjugados y composiciones son útiles para tratar el cáncer en un sujeto que los necesita.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

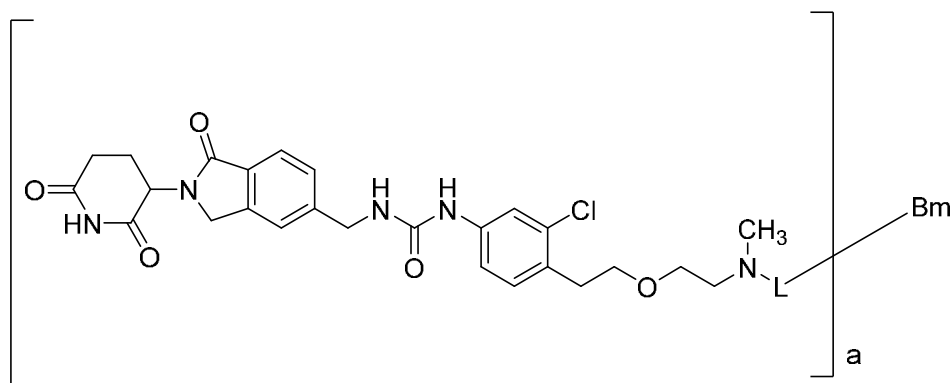
[0003] La degradación de proteínas ha sido validada como estrategia terapéutica por la eficacia de los fármacos imidas inmunomoduladores. Estos compuestos tienen la capacidad de unirse al cerebrón (CRBN) y promover el reclutamiento y la ubiquitinación de proteínas sustrato mediadas por CRL4^{CRBN} de ubiquitina ligasa E3. Se cree que las imidas inmunomoduladoras actúan como “pegamentos moleculares”, llenando la interfaz de unión como un parche hidrofóbico que reprograma las interacciones proteicas entre la ligasa y los neosustratos.

[0004] A pesar del entusiasmo por estos compuestos como tratamientos novedosos para el cáncer, hasta ahora se han limitado a su uso en neoplasias hematológicas como el mieloma múltiple y el síndrome mielodisplásico (MDS). Un área activa en el desarrollo de fármacos es la de ampliar la biblioteca de compuestos que pueden funcionar degradando otras oncoproteínas, muchas de las cuales se han considerado “no susceptibles de tratamiento”. Por consiguiente, existe una necesidad continua de nuevos compuestos que puedan atacar estas oncoproteínas alternativas y tratar una amplia gama de cánceres.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0005] Se ha demostrado que el tratamiento de pacientes con cáncer con degradadores de GSPT1 de molécula pequeña impulsa respuestas clínicas, pero se ha asociado con acontecimientos adversos (AE) graves. Los cánceres frecuentemente expresan antígenos en sus superficies que no se expresan, o se expresan en niveles mucho más bajos, en las células sanas. La presente invención se basa en el descubrimiento de que la combinación de una molécula de carga útil que degrada GSPT1 con un anticuerpo, que se une al antígeno de la superficie celular de una célula cancerosa, puede mejorar tanto la eficacia clínica como la tolerabilidad de un degradador de GSPT1.

[0006] En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un conjugado de la fórmula (I):

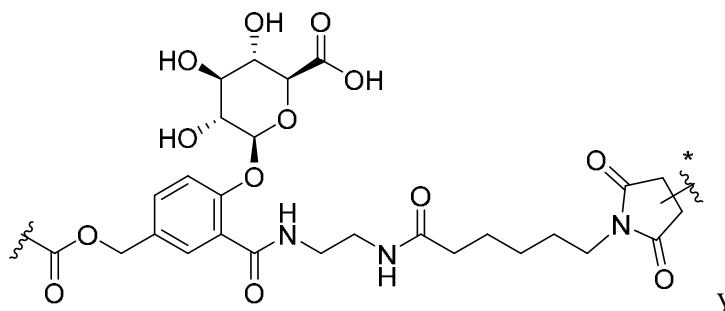


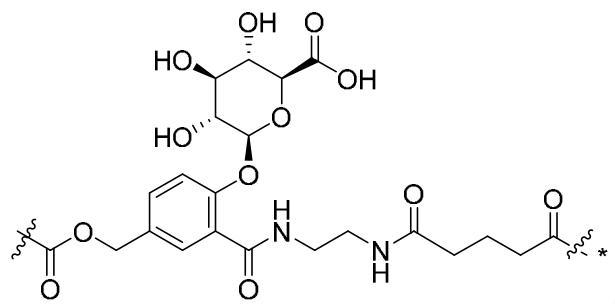
(I);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

[0007] a es de 1 a 10;

[0008] L es un enlazador seleccionado entre





en donde:

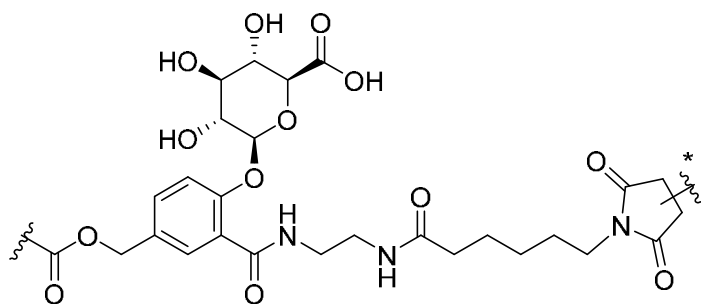
[0009]  es el punto de unión al átomo de nitrógeno; y

[0010]  es el punto de unión a Bm; y

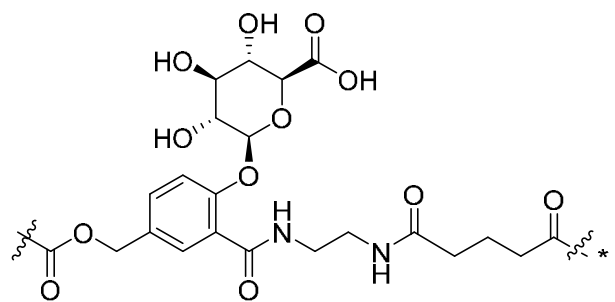
[0011] Bm es una fracción de unión que es capaz de unirse específicamente a una proteína, por ejemplo, una proteína que es un antígeno de la superficie celular.

[0012] En ciertos aspectos, la fracción de unión es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. En algunos aspectos, a es de 2 a 8.

[0013] En algunos aspectos, L es



[0014] En algunos aspectos, L es



[0015] En algunos aspectos, Bm es un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo. En algunos aspectos, la proteína a la que se une la fracción de unión es un antígeno de superficie. En algunos aspectos, el antígeno de superficie comprende 5T4, ACE, ADRB3, AKAP-4, ALK, receptor de andrógenos, AOC3, APP, Axin1, AXL, B7H3, B7-H4, BCL2, BCMA, bcr-abl, BORIS, BST2, C242, C4.4a, CA 125, CA6, CA9, CAIX, CCL11, CCR5, CD123, CD133,

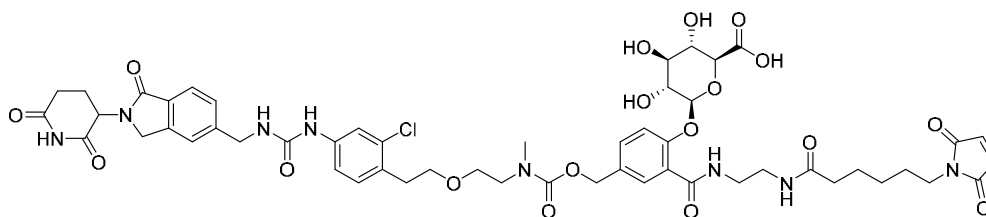
CD138, CD142, CD15, CD15-3, CD171, CD179a, CD18, CD19, CD19-9, CD2, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27L, CD28, CD3, CD30, CD31, CD300LF, CD33, CD352, CD37, CD38, CD4, CD40, CD41, CD44, CD44v6, CD5, CD51, CD52, CD54, CD56, CD62E, CD62P, CD62L, CD70, CD71, CD72, CD74, CD79a, CD79b, CD80, CD90, CD97, CD125, CD138, CD141, CD147, CD152, CD154, CD326, CEA, CEACAM5, CFTR, factor de aglomeración, cKit, Claudina 3, Claudina 18.2, CLDN6, CLEC12A, CLL-1, cll3, c-MET, factor de crecimiento Crypto 1, CS1, CTLA-4, CXCR2, CXORF61, Ciclina B1, CYP1B1, Cadherina-3, Cadherina-6, DLL3, E7, EDNRB, EFNA4, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EMR2, ENPP3, EPCAM, EphA2, Efrina A4, Efrina B2, EPHB4, ERBB2 (Her2/neu), ErbB3, ERG (gen de fusión TPRSS2 ETS), ETBR, ETV6-AML, FAP, FCAR, FCRL5, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, receptor de folato alfa, receptor de folato beta, FOLR1, antígeno 1 relacionado con Fos, Fucosilo GM1, GCC, GD2, GD3, GloboH, GM3, GPC1, GPC2, GPC3, gp100, GPNMB, GPR20, GPRC5D, GUCY2C, HAVCR1, HER2, HER3, HGF, HML24, HMWMAA, HPV E6, hTERT, ICAM, ICOS-L, IFN- α , IFN- γ , receptor de IGF-I, IGLL1, receptor de IL-2 (IL-2R α (es decir, CD25), IL-2R β (es decir, CD122), IL-2R γ (es decir, CD132)), receptor de IL-4 (IL-4R, IL-2R γ /IL-13R α 1), receptor de IL-13 (IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-4R), receptor de IL-1 (IL-1 lRa), receptor de IL-12 (IL-12R β 1, IL-12R β 2), receptor de IL-23 (IL-12R β 1, IL -23R), receptor de IL-22 (IL-22R α 1, IL-22R α 2, IL-10R β), receptor de IL-5 (IL-5R α , CSF2RB), receptor de IL-6 (IL-6R α , gp130), receptor de interferón, integrinas (incluyendo las integrinas α 4, α v β 3, α v β 5, α v β 6, α 1 β 4, α 4 β 1, α 4 β 7, α 5 β 1, α 6 β 4, α 11b β 3), integrina alfaV, carboxil esterasa intestinal, KIT, LAGE-1a, LAIR1, LAMP-1, LCK, Legumain, LewisY, LFA-1(CD11a), L-selectina(CD62L), LILRA2, LIV-1, LMP2, LRRC15, LY6E, LY6K, LY75, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE A1, MelanA/MART1, Mesotelina, ML-IAP, MSLN, mucina, MUC1, MUC16, mut hsp70-2, MYCN, miostatina, NA17, NaPi2b, NCA-90, NCAM, Nectin-4, NGF, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, NY-BR-1, NY-ESO-1, o-acetil-GD2, OR51E2, OY-TES1, p53, mutante de p53, PANX3, PAP, PAX3, PAX5, p-CAD, PCTA-1/Galectina 8, PD-L1, PD-L2, PDGFR, PDGFR-beta, fosfatidilserina, PIK3CA, PLAC1, ácido polisiálico, prostasa, prostateína, survivina y telomerasa, PRSS21, PSCA, PSMA, PTK7, RAGE-1, RANKL, Ras, mutante de Ras, factor Rhesus, RhoC, RON, ROR1, ROR2, RU1, RU2, SART3, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, proteína espermática 17, esfingosina -1-fosfato, SSEA-4, SSX2, STEAP1, TAG72, TARP, TCR β , TEM1/CD248, TEM7R, tenascina C, TF, TGF-1, TGF- β 2, TNF- α , TGS5, Tie 2, TIM-1, Tn Ag, TRAC, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TROP-2, TRP-2, TRPV1, TSHR, antígeno

tumoral CTAA16.88, tirosinasa, UPK2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, vimentina, WTI, XAGE1 o combinaciones de los mismos.

[0016] En algunos aspectos, el antígeno de superficie comprende HER2, CD20, CD38, CD33, BCMA, CD138, EGFR, FGFR4, GD2, PDGFR, TEM1/CD248, TROP-2 o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el antígeno de superficie comprende CD33.

[0017] En algunos aspectos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en rituximab, trastuzumab, gemtuzumab, CD33AB, pertuzumab, obinutuzumab, ofatumumab, olaratumab, ontuximab, isatuximab, Sacituzumab, U3-1784, daratumumab, STI-6129, lintuzumab, huMy9-6, huMy9-6-IgG4-S228P, balantamab, indatuximab, cetuximab, dinutuximab, anticuerpo anti-CD38 A2, anticuerpo HuAT13/5, alemtuzumab, ibritumomab, tositumomab, bevacizumab, panitumumab, tremelimumab, ticilimumab, catumaxomab, oregovomab y veltuzumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es rituximab, trastuzumab, pertuzumab, huMy9-6, huMy9-6-IgG4-S228P, CD33AB, lintuzumab o gemtuzumab. En algunos aspectos, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo comprende una región determinante de complementariedad (CDR) 1 de la región variable de cadena pesada (VH) (VH-CDR1), que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 1, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 2, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de la región variable de cadena ligera (VL) (VL-CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 5, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 6, y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 4 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, el anticuerpo es CD33AB.

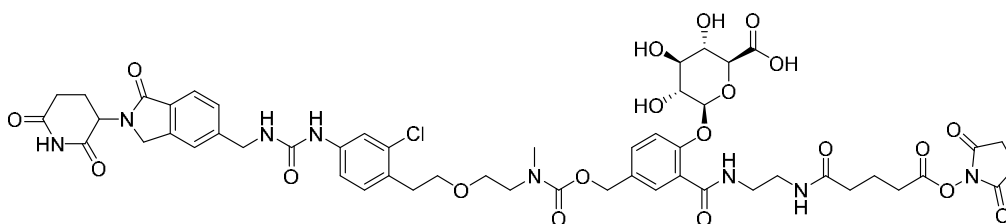
[0018] En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula (II):



(II);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

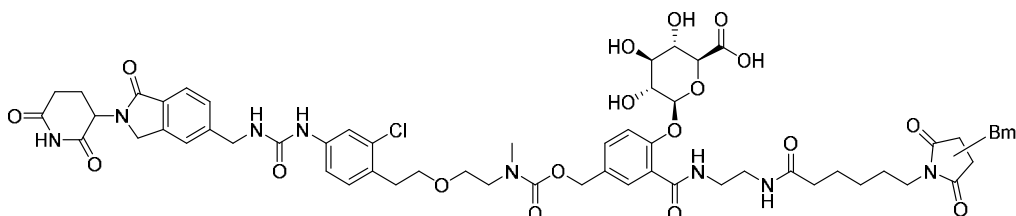
[0019] En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula (III):



(III);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

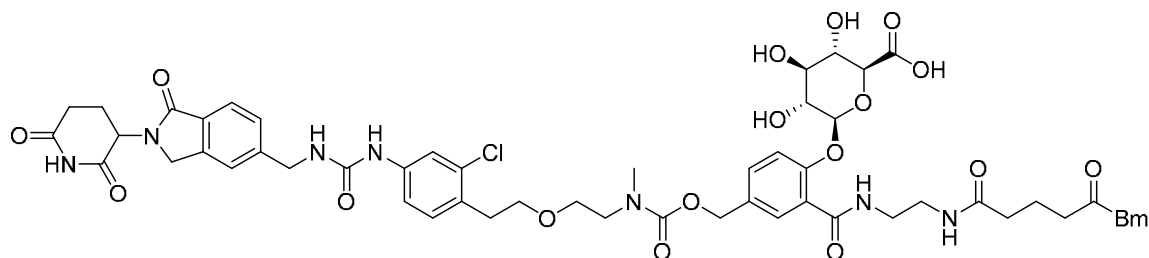
[0020] En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula (IV):



(IV);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde Bm es una fracción de unión que se une específicamente a una proteína, por ejemplo, una proteína que es un antígeno de la superficie celular.

[0021] En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula (V):



(V);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde Bm es una fracción de unión que se une específicamente a una proteína, por ejemplo, una proteína que es un antígeno de la superficie celular.

[0022] En ciertos aspectos, la presente invención proporciona compuestos de la fórmula (IV) o (V), en donde Bm es un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo. En ciertos aspectos, la proteína a la que se une específicamente la fracción de unión es un antígeno de superficie. En algunos aspectos, el antígeno de superficie comprende 5T4, ACE, ADRB3, AKAP-4, ALK, receptor de andrógenos, AOC3, APP, Axin1, AXL, B7H3, B7-H4, BCL2, BCMA, bcr-abl, BORIS, BST2, C242, C4.4a, CA 125, CA6, CA9, CAIX, CCL11, CCR5, CD123, CD133, CD138, CD142, CD15, CD15-3, CD171, CD179a, CD18, CD19, CD19-9, CD2, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27L, CD28, CD3, CD30, CD31, CD300LF, CD33, CD352, CD37, CD38, CD4, CD40, CD41, CD44, CD44v6, CD5, CD51, CD52, CD54, CD56, CD62E, CD62P, CD62L, CD70, CD71, CD72, CD74, CD79a, CD79b, CD80, CD90, CD97, CD125, CD138, CD141, CD147, CD152, CD154, CD326, CEA, CEACAM5, CFTR, factor de aglomeración, cKit, Claudina 3, Claudina 18.2, CLDN6, CLEC12A, CLL-1, cll3, c-MET, factor de crecimiento Crypto 1, CS1, CTLA-4, CXCR2, CXORF61, Ciclina B1, CYP1B1, Cadherina-3, Cadherina-6, DLL3, E7, EDNRB, EFNA4, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EMR2, ENPP3, EPCAM, EphA2, Efrina A4, Efrina B2, EPHB4, ERBB2 (Her2/neu), ErbB3, ERG (gen de fusión TPRSS2 ETS), ETBR, ETV6-AML, FAP, FCAR, FCRL5, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, receptor de folato alfa, receptor de folato beta, FOLR1, antígeno 1 relacionado con Fos, Fucosilo GM1, GCC, GD2, GD3, GloboH, GM3, GPC1, GPC2, GPC3, gp100, GPNMB, GPR20, GPRC5D, GUCY2C, HAVCR1, HER2, HER3, HGF, HMI.24, HMWMAA, HPV E6, hTERT, ICAM, ICOS-L, IFN- α , IFN- γ , receptor de IGF-I, IGLL1, receptor de IL-2 (IL-2R α (es decir, CD25), IL-2R β (es decir, CD122), IL-2R γ (es decir, CD132)), receptor de IL-4 (IL-4R, IL-2R γ /IL-13R α 1), receptor de IL-13 (IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-4R), receptor de IL-1 (IL-1 lRa), receptor de IL-12 (IL-12R β 1, IL-12R β 2), receptor de IL-23 (IL-12R β 1, IL-23R), receptor de IL-22 (IL-22R α 1, IL-22R α 2, IL-10R β), receptor de IL-5 (IL-5R α , CSF2RB), receptor de IL-6 (IL-6R α , gp130), receptor de interferón, integrinas (incluyendo las integrinas α ₄, α _v β ₃, α _v β ₅, α _v β ₆, α ₁ β ₄, α ₄ β ₁, α ₄ β ₇, α ₅ β ₁, α ₆ β ₄, α _{IIb} β ₃), integrina alfaV, carboxil esterasa intestinal, KIT, LAGE-1a, LAIR1, LAMP-1, LCK, Legumain, LewisY, LFA-1(CD11a), L-selectina(CD62L), LILRA2, LIV-1, LMP2, LRRC15, LY6E, LY6K, LY75, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE A1, MelanA/MART1, Mesotelina, ML-IAP, MSLN, mucina, MUC1, MUC16, mut hsp70-2, MYCN, miostatina, NA17, NaPi2b, NCA-90, NCAM, Nectin-4, NGF,

NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, NY-BR-1, NY-ESO-1, o-acetil-GD2, OR51E2, OY-TES1, p53, mutante de p53, PANX3, PAP, PAX3, PAX5, p-CAD, PCTA-1/Galectina 8, PD-L1, PD-L2, PDGFR, PDGFR-beta, fosfatidilserina, PIK3CA, PLAC1, ácido polisiálico, prostasa, prostateína, survivina y telomerasa, PRSS21, PSCA, PSMA, PTK7, RAGE-1, RANKL, mutante de Ras, factor Rhesus, RhoC, RON, ROR1, ROR2, RU1, RU2, SART3, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, proteína espermática 17, esfingosina-1-fosfato, SSEA-4, SSX2, STEAP1, TAG72, TARP, TCR β , TEM1/CD248, TEM7R, tenascina C, TF, TGF-1, TGF- β 2, TNF- α , TGS5, Tie 2, TIM-1, Tn Ag, TRAC, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TROP-2, TRP-2, TRPV1, TSHR, antígeno tumoral CTAA16.88, tirosinasa, UPK2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, vimentina, Wt1, XAGE1 o combinaciones de los mismos.

[0023] En algunos aspectos, el antígeno de superficie comprende HER2, CD20, CD38, CD33, BCMA, CD138, EGFR, FGFR, GD2, PDGFR, TEM1/CD248, TROP-2 o combinaciones de los mismos.

[0024] En algunos aspectos, el anticuerpo comprende rituximab, trastuzumab, gemtuzumab, pertuzumab, obinutuzumab, ofatumumab, olaratumab, ontuximab, isatuximab, sacituzumab, U3-1784, daratumumab, STI-6129, lintuzumab, huMy9-6, huMy9-6-IgG4-S228P, balantamab, indatuximab, cetuximab, dinutuximab, anticuerpo anti-CD38 A2, anticuerpo HuAT13/5, CD33AB, alemtuzumab, ibritumomab, tositumomab, bevacizumab, panitumumab, tremelimumab, ticilimumab, catumaxomab, oregovomab o veltuzumab.

[0025] En algunos aspectos, el anticuerpo es rituximab, trastuzumab, pertuzumab, huMy9-6, huMy9-6-IgG4-S228P, CD33AB, lintuzumab o gemtuzumab. En algunos aspectos, el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo comprende una VH-CDR1, que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 1, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 2, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 3, VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 5, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 6, y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 4 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la

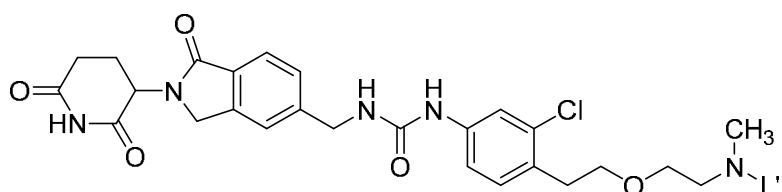
SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, el anticuerpo es CD33AB.

[0026] En algunos aspectos, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado o compuesto como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

[0027] En algunos aspectos, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer o el síndrome mielodisplásico (MDS) en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente aceptable de un conjugado, compuesto o composición como se describió anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos aspectos, el cáncer es un tumor sólido. En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer hematológico/sanguíneo. En algunos aspectos, el cáncer es cáncer de mama, cáncer gástrico, linfoma, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas y/o carcinoma hepatocelular. En algunos aspectos, el cáncer es refractario o resistente a Mylotarg.

[0028] En algunos aspectos, el método comprende, además, administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente aceptable de un agente adicional antes, después o simultáneamente con el conjugado o compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos aspectos, el agente adicional es un agente citotóxico o un modificador de la respuesta inmune. En algunos aspectos, el modificador de la respuesta inmune es un inhibidor de punto de control. En algunos aspectos, el inhibidor del punto de control comprende un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de CTLA-4, un inhibidor de TIM3 y/o un inhibidor de LAG-3.

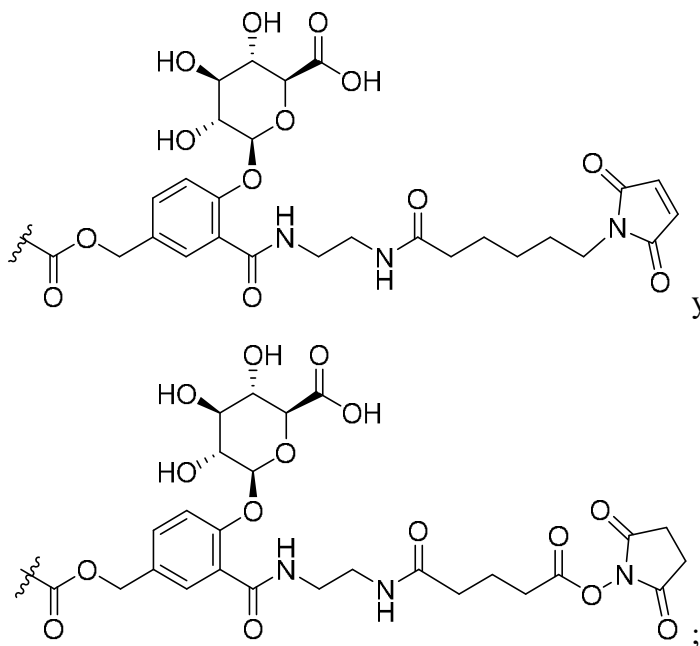
[0029] En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un método para preparar el conjugado de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo el proceso hacer reaccionar una fracción de unión con un compuesto de la fórmula (I-1):



(I-1);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

[0030] L' se selecciona de

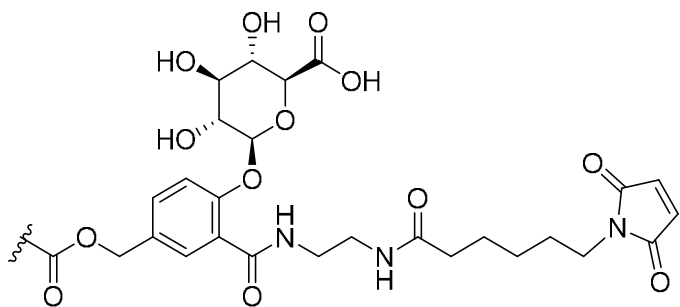


en donde:

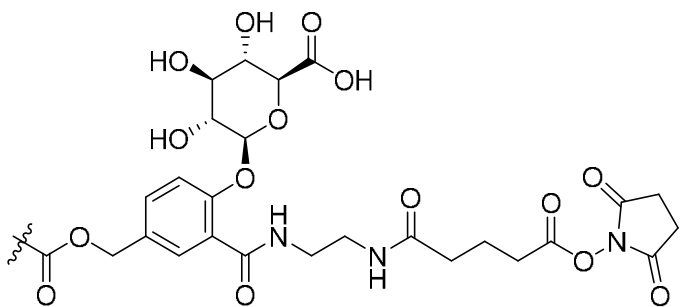
[0031]  es el punto de unión al átomo de nitrógeno.

[0032] En algunos aspectos, el método comprende, además, reducir la fracción de unión antes de reaccionar con el compuesto de la fórmula (I-1).

[0033] En algunos aspectos, L' es



[0034] En algunos aspectos, L' es



[0035] En algunos aspectos, el compuesto de la fórmula (I-1) se hace reaccionar con una fracción de unión, que comprende un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo.

[0036] En algunos aspectos, el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo se une a un antígeno de superficie. En algunos aspectos, el antígeno de superficie comprende 5T4, ACE, ADRB3, AKAP-4, ALK, receptor de andrógenos, AOC3, APP, Axin1, AXL, B7H3, B7-H4, BCL2, BCMA, bcr-abl, BORIS, BST2, C242, C4.4a, CA 125, CA6, CA9, CAIX, CCL11, CCR5, CD123, CD133, CD138, CD142, CD15, CD15-3, CD171, CD179a, CD18, CD19, CD19-9, CD2, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27L, CD28, CD3, CD30, CD31, CD300LF, CD33, CD352, CD37, CD38, CD4, CD40, CD41, CD44, CD44v6, CD5, CD51, CD52, CD54, CD56, CD62E, CD62P, CD62L, CD70, CD71, CD72, CD74, CD79a, CD79b, CD80, CD90, CD97, CD125, CD138, CD141, CD147, CD152, CD154, CD326, CEA, CEACAM5, CFTR, factor de aglomeración, cKit, Claudina 3, Claudina 18.2, CLDN6, CLEC12A, CLL-1, cll3, c-MET, factor de crecimiento Crypto 1, CS1, CTLA-4, CXCR2, CXORF61, Ciclina B1, CYP1B1, Cadherina-3, Cadherina-6, DLL3, E7, EDNRB, EFNA4, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EMR2, ENPP3, EPCAM, EphA2, Efrina A4, Efrina B2, EPHB4, ERBB2 (Her2/neu), ErbB3, ERG (gen de fusión TPRSS2 ETS), ETBR, ETV6-AML, FAP, FCAR, FCRL5, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, receptor de folato alfa, receptor de folato beta, FOLR1, antígeno 1 relacionado con Fos, Fucosilo GM1, GCC, GD2, GD3, GloboH, GM3, GPC1, GPC2, GPC3, gp100, GPNMB, GPR20, GPRC5D, GUCY2C, HAVCR1, HER2, HER3, HGF, HMI.24, HMWMAA, HPV E6, hTERT, ICOS-L, IFN- α , IFN- γ , receptor de IGF-I, IGLL1, receptor de IL-2 (IL-2R α (es decir, CD25), IL-2R β (es decir, CD122), IL-2R γ (es decir, CD132)), receptor de IL-4 (IL-4R, IL-2R γ /IL-13R α 1), receptor de IL-13 (IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-4R), receptor de IL-1 (IL-1 lRa), receptor de IL-12 (IL-12R β 1, IL-12R β 2), receptor de IL-23 (IL-12R β 1, IL-23R), receptor de IL-22 (IL-22R α 1, IL-22R α 2, IL-10R β), receptor de IL-5 (IL-5R α , CSF2RB), receptor de IL-6 (IL-6R α , gp130), receptor de interferón, integrinas (incluyendo las integrinas α_4 , $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_1\beta_4$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_{IIb}\beta_3$), integrina alfaV, carboxil esterasa intestinal, KIT, LAGE-1a, LAIR1, LAMP-1, LCK, Legumain, LewisY, LFA-1(CD11a), L-selectina(CD62L), LILRA2, LIV-1, LMP2, LRRC15, LY6E, LY6K, LY75, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE A1, MelanA/MART1, Mesotelina, ML-IAP, MSLN, mucina, MUC1, MUC16, mut hsp70-2, MYCN, miostatina, NA17, NaPi2b, NCA-90, NCAM, Nectin-4, NGF, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, NY-BR-1, NY-ESO-1, o-acetil-GD2, OR51E2, OY-TES1, p53, mutante de p53, PANX3, PAP, PAX3, PAX5, p-CAD, PCTA-1/Galectina 8, PD-L1, PD-L2, PDGFR, PDGFR-beta, fosfatidilserina, PIK3CA, PLAC1, ácido polisiálico, prostasa, prosteína, survivina y telomerasa, PRSS21, PSCA, PSMA, PTK7, RAGE-1, RANKL, mutante de Ras, factor Rhesus, RhoC, RON, ROR1, ROR2, RU1, RU2,

SART3, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, proteína espermática 17, esfingosina-1-fosfato, SSEA-4, SSX2, STEAP1, TAG72, TARP, TCR β , TEM1/CD248, TEM7R, tenascina C, TF, TGF-1, TGF- β 2, TNF- α , TGS5, Tie 2, TIM-1, Tn Ag, TRAC, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TROP-2, TRP-2, TRPV1, TSHR, antígeno tumoral CTAA16.88, tirosinasa, UPK2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, vimentina, WTI, XAGE1 o combinaciones de los mismos.

[0037] En algunos aspectos, el antígeno de superficie comprende HER2, CD20, CD38, CD33, BCMA, CD138, EGFR, FGFR4, GD2, PDGFR, TEM1/CD248, Trop-2 o combinaciones de los mismos.

[0038] En algunos aspectos, el anticuerpo comprende rituximab, trastuzumab, gemtuzumab, pertuzumab, obinutuzumab, ofatumumab, olaratumab, ontuximab, isatuximab, sacituzumab, U3-1784, daratumumab, STI-6129, lintuzumab, huMy9-6, huMy9-6-IgG4-S228P, balantamab, indatuximab, cetuximab, dinutuximab, anticuerpo anti-CD38 A2, CD33AB, anticuerpo HuAT13/5, alemtuzumab, ibritumomab, tositumomab, bevacizumab, panitumumab, tremelimumab, ticilimumab, catumaxomab, oregovomab o veltuzumab.

[0039] En algunos aspectos, el anticuerpo es rituximab, trastuzumab, pertuzumab, huMy9-6, huMY9-6-IgG4-S228P, CD33AB, lintuzumab o gemtuzumab. En algunos aspectos, el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo comprende una VH-CDR1, que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 1, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 2, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 3, una VL-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 5, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 6, y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 4 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 10.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0040] La figura 1A representa la actividad *in vivo* de conjugados de neodegradadores representativos contra tumores de MV411 (CD33+). El eje X muestra el día después de la dosificación. El eje Y muestra el volumen tumoral (mm³) después de la dosificación con un vehículo, 3,02 mg/kg de CD33AB – Compuesto (Ia), 2,94 mg/kg de CD33AB – Compuesto (Ib), 0,1 mg/kg de Mylotarg, 50 mg/kg x 21 de Venetoclax, o 5 mg/kg dos veces al día x 10 de CC-90009.

[0041] La figura 1B representa la actividad *in vivo* de conjugados de neodegradadores representativos contra tumores de MV411 (CD33+). El eje X muestra el día después de la dosificación. El eje Y muestra el volumen tumoral (mm³) después de la dosificación con un vehículo, 3 mg/kg de CD33AB - Compuesto (Ic), 2,83 mg/kg de CD33AB - Compuesto (Ie), 3,02 mg/kg de CD33AB - Compuesto (Ia), 2,99 mg/kg de CD33AB - Compuesto (Ih), 2,94 mg/kg de CD33AB – Compuesto (Ib), 0,1 mg/kg Mylotarg, 50 mg/kg x 21 de Venetoclax o 5 mg/kg dos veces al día x 10 de CC-90009.

[0042] La figura 2 representa la actividad *in vitro* de CD33AB-Compuesto (Ia), CC-90009 y Mylotarg contra células de AML (CD33+) y células no de AML (CD33-).

[0043] La figura 3 representa la actividad *in vitro* del conjugado de CD33AB – Compuesto (Ia) contra células de MV4-11 (CD33+). El eje X muestra la concentración. El eje Y muestra el % de viabilidad celular después de la dosificación con un conjugado de anticuerpo que no se une a CD33 - neodegradador, CD33AB, neodegradador P1, Venetoclax, CC-885, CC-90009, Mylotarg y CD33AB - Compuesto (Ia).

[0044] La figura 4 representa la actividad *in vitro* del conjugado de CD33AB - Compuesto (Ia), Mylotarg y CC-90009 contra células primarias recurrentes/resistentes de AML derivadas del paciente.

[0045] La figura 5 representa la actividad *in vitro* del conjugado de CD33AB - Compuesto (Ia), CC-90009 y Mylotarg en progenitores eritroides, mieloides y megacariocitos normales, según lo medido en ensayos de células formadoras de colonias (CFC).

[0046] La figura 6 representa la actividad *in vivo* de CD33AB - Compuesto (Ia) contra tumores de MV4-11 (CD33+). En el gráfico de la izquierda, el eje X muestra el día después de la dosificación y el eje Y muestra el volumen tumoral (mm³) después de la dosificación con un vehículo, 5 mg/kg dos veces al día de CD-90009, 0,1 mg/kg de Mylotarg, 50 mg/kg una vez al día de Venetoclax y 3 mg/kg de CD33AB – Compuesto (Ia). En el gráfico de la derecha, el eje X

muestra el día después de la dosificación y el eje Y muestra el volumen tumoral (mm^3) después de la dosificación con un vehículo, 3 mg/kg del conjugado de neodegradadores de anticuerpos no unidos a CD33, 8 mg/kg de azacitidina y 50 mg/kg de venetoclax, 1 mg/kg de CD33AB – Compuesto (Ia) y 3 mg/kg de CD33AB – Compuesto (Ia).

[0047] La figura 7 representa la actividad *in vivo* de CD33AB – Compuesto (Ia) en células de MV4-11 y OCI-AML2.

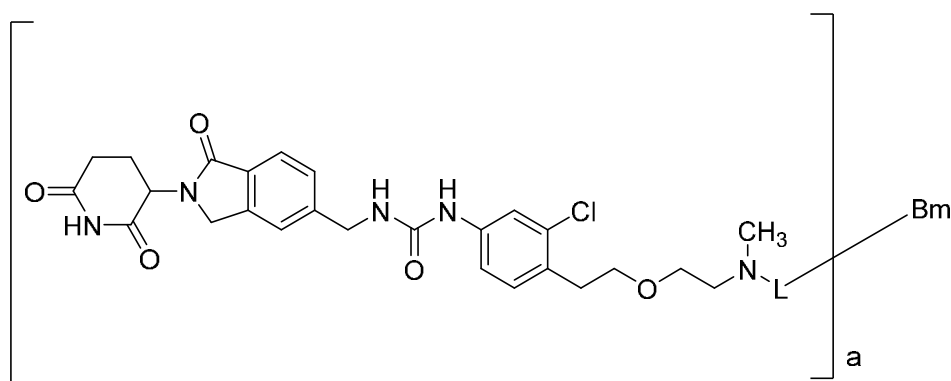
[0048] La figura 8 es un western blot que muestra la degradación de GSPT1 después de tratamiento *in vitro* de células de MV4-11 con el conjugado de CD33AB - Compuesto (Ia). GSPT1 se degrada completamente en 12 horas cuando se trata con el conjugado de CD33AB - Compuesto (Ia).

[0049] La figura 9 representa el sostenido efecto *in vitro* de CD33AB - Compuesto (Ia) en GSPT1 (arriba) y la farmacocinética del conjugado de CD33AB - Compuesto (Ia) (QDx1 IV) (abajo).

[0050] Las figuras 10A y 10B representan la actividad *in vitro* del conjugado de CD33AB-Compuesto (Ia) contra células de AML insensibles a Mylotarg (AML-193 (Figura 10A) y Kasumi-6 (Figura 10B). El eje X muestra la concentración y el eje Y muestra el porcentaje de viabilidad de la línea celular después del tratamiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0051] La presente invención está dirigida a un conjugado de la fórmula (I):

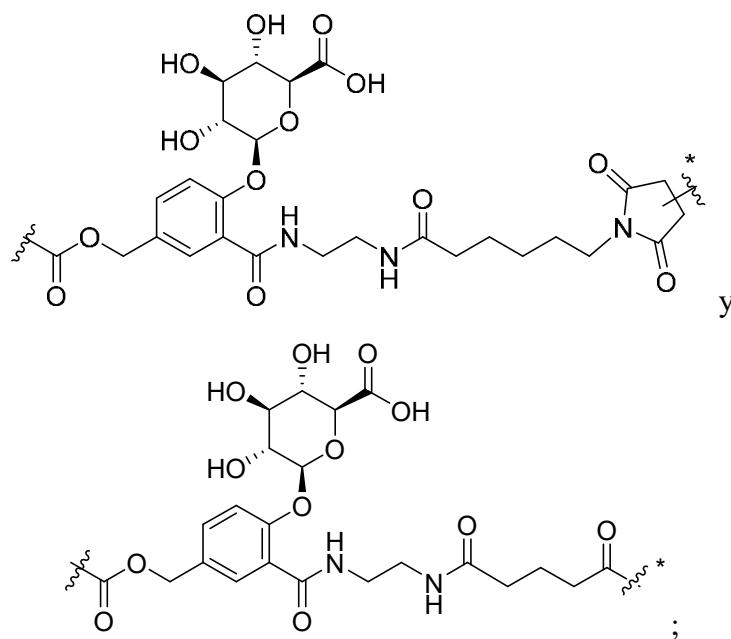


(I);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

[0052] a es de 1 a 10;

[0053] L es un enlazador seleccionado entre



en donde:

[0054] ~~~~ es el punto de unión al átomo de nitrógeno; y

[0055] ~~~~* es el punto de unión a Bm; y

[0056] Bm es una fracción de unión que es capaz de unirse específicamente a una proteína. En algunos aspectos, la fracción de unión es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno.

[0057] La presente invención también proporciona el compuesto anterior que está fusionado a la fracción de unión, la composición que comprende el compuesto o el conjugado, o el método para usar o preparar el compuesto o el conjugado.

I. Definiciones

[0058] Para que la presente descripción pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar, se definen ciertos términos. A lo largo de la descripción detallada se establecen definiciones adicionales.

[0059] Cabe señalar que el término “un” o “una” entidad se refiere a una o más de esas entidades; por ejemplo, se entiende que “una secuencia de nucleótidos” representa una o más secuencias de nucleótidos. Por ende, los términos “un” (o “una”), “uno o más” y “al menos uno” pueden usarse indistintamente en el presente documento. Cabe señalar además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Por ende, esta

declaración pretende servir como base previa para el uso de terminología exclusiva como “únicamente”, “solamente” y similares en relación con la enumeración de elementos de reivindicación, o el uso de una limitación negativa.

[0060] Además, “y/o” cuando se utiliza en el presente documento, debe considerarse una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por consiguiente, el término “y/o” tal como se utiliza en una frase como “A y/o B” en el presente documento pretende incluir “A y B”, “A o B”, “A” (solo) y “B” (solo). Asimismo, el término “y/o” tal como se utiliza en una frase como “A, B y/o C”, pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

[0061] Se entiende que siempre que se describan aspectos en el presente documento con el lenguaje “que comprende”, también se proporcionan aspectos análogos descritos en términos de “que consiste en” y/o “que consiste esencialmente en”.

[0062] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con conocimientos básicos en la materia con la que se relaciona esta invención. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2a ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3a ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a los expertos un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta invención.

[0063] Las unidades, prefijos y símbolos se indican en su forma aceptada por el Système International de Unites (SI). Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. Cuando se menciona un rango de valores, se debe entender que cada valor entero intermedio, y cada fracción del mismo, también se divulga específicamente entre los límites superior e inferior mencionados de ese rango, junto con cada subrango entre dichos valores. Los límites superior e inferior de cualquier rango pueden incluirse o excluirse independientemente del rango, y cada rango en el que se incluyen uno de, ninguno de o ambos límites también se incluye dentro de la invención. Por consiguiente, se entiende que los rangos mencionados en el presente documento son una abreviatura de todos los valores dentro del rango, incluyendo los criterios de valoración mencionados. Por ejemplo, se entiende que un rango de 1 a 10 incluye cualquier número, combinación de números o subrango del grupo formado por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

[0064] Cuando se menciona explícitamente un valor, se debe entender que los valores que son aproximadamente la misma cantidad que el valor mencionado también están dentro del alcance de la invención. Cuando se divulga una combinación, cada subcombinación de los elementos de esa combinación también se divulga específicamente y está dentro del alcance de la invención. Por el contrario, cuando se divulgan individualmente diferentes elementos o grupos de elementos, también se divulgan combinaciones de los mismos. Cuando se divulga que cualquier elemento de una divulgación tiene una pluralidad de alternativas, también se divulgan ejemplos de esa divulgación en los que cada alternativa se excluye individualmente o en cualquier combinación con las otras alternativas; más de un elemento de una divulgación puede tener tales exclusiones, y por la presente se divulgan todas las combinaciones de elementos que tienen tales exclusiones.

[0065] El término “DAR”, como se usa en el presente documento, se refiere a la proporción de anticuerpos del fármaco del conjugado, que es el número promedio de complejos neodegradador-enlazador enlazados a cada anticuerpo. En ciertos aspectos, el DAR de los conjugados descritos en el presente documento es de 1 a 10. En algunos aspectos, el DAR de los conjugados descritos en el presente documento es de 1 a 8. En algunos aspectos, el DAR de los conjugados descritos en el presente documento es 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9; 3,0; 3,1; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5; 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4,0; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7,0; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9; 8; 8,1; 8,2; 8,3; 8,4; 8,5; 8,6; 8,7; 8,8; 8,9; 9,0; 9,1; 9,2; 9,3; 9,4; 9,5; 9,6; 9,7; 9,8; 9,9 o 10.

[0066] El término “anticuerpo”, como se usa en el presente documento, también se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno de una diana. de interés o parte de los mismos, tales objetivos incluyendo, entre otros, células cancerosas o células que producen anticuerpos autoinmunes asociados con una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina descrita en el presente documento 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 de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivarse de cualquier especie. Sin embargo, en un aspecto, la inmunoglobulina es de origen humano, murino o de conejo.

[0067] El término “anticuerpo de dominio único”, también conocido como nanocuerpo, es un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio de anticuerpo variable monomérico único

con un peso molecular de aproximadamente 12 kDa a aproximadamente 15 kDa. Los anticuerpos de un solo cuerpo pueden basarse en dominios variables de cadena pesada o cadena ligera. Ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen, entre otros, fragmentos $V_{\text{H}}\text{H}$ y V_{NAR} .

[0068] Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la unión al antígeno o la región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores que se unen inmuno específicamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0069] Un “anticuerpo intacto” es uno que comprende una región variable de unión al antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. 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.

[0070] El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que pueden sintetizarse sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador “monoclonal” indica que el anticuerpo se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante el método del hibridoma o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante. Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos fagos.

[0071] Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de región constante humana.

[0072] Se han empleado varios métodos para producir anticuerpos monoclonales (MAb). La tecnología de hibridoma, que se refiere a una línea celular clonada que produce un solo tipo de anticuerpo, utiliza células de varias especies, incluyendo ratones (murinos), hámsteres, ratas y humanos. Otro método para preparar MAb utiliza la ingeniería genética, incluyendo técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales elaborados a partir de estas técnicas incluyen, entre otros, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo quimérico combina regiones que codifican ADN de más de un tipo de especie. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede derivar la región variable de un ratón y la región constante de un ser humano. Un anticuerpo humanizado proviene predominantemente de un ser humano, aunque contenga porciones no humanas. Al igual que un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado puede contener una región constante completamente humana. Pero a diferencia de un anticuerpo quimérico, la región variable puede derivar parcialmente de un ser humano. Las porciones sintéticas no humanas de un anticuerpo humanizado a menudo provienen de los CDR en anticuerpos murinos. En cualquier caso, estas regiones son cruciales para permitir que el anticuerpo reconozca y se una a un antígeno específico. Si bien son útiles para diagnósticos y terapias a corto plazo, los anticuerpos murinos no pueden administrarse a personas a largo plazo sin aumentar el riesgo de una respuesta inmunogénica nociva. Esta respuesta, llamada Anticuerpo Anti-Ratón Humano (HAMA), ocurre cuando un sistema inmunológico humano reconoce el anticuerpo murino como extraño y lo ataca. Una respuesta de HAMA puede provocar un shock tóxico o incluso la muerte.

[0073] Los anticuerpos quiméricos y humanizados reducen la probabilidad de una respuesta de HAMA al minimizar las porciones no humanas de los anticuerpos administrados. Además, los anticuerpos quiméricos y humanizados pueden tener el beneficio adicional de activar

respuestas inmunitarias humanas secundarias, como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

[0074] El anticuerpo intacto puede tener una o más “funciones efectoras” que se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc.

[0075] Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes “clases”. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de ellas pueden dividirse en “subclases” (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

[0076] El término “aproximadamente” se utiliza en el presente documento para decir aproximadamente, más o menos, alrededor o cerca de. Cuando el término “aproximadamente” se usa junto con un rango numérico, modifica ese rango extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término “aproximadamente” puede modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado por una variación de, por ejemplo, 10 por ciento, hacia arriba o hacia abajo (más arriba o más abajo).

[0077] Los términos “administración”, “administrar” y sus variantes gramaticales se refieren a la introducción de una composición, como una EV (por ejemplo, exosoma) de la presente invención, en un sujeto a través de una vía farmacéuticamente aceptable. La introducción de una composición, como una EV (por ejemplo, exosoma) de la presente invención, en un sujeto es por cualquier vía adecuada, incluyendo intratumoral, oral, pulmonar, intranasal, parenteral (intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea), rectal, intralinfática, intratecal, periocular o tópica. La administración incluye la autoadministración y la administración por terceros. Una vía de administración adecuada permite que la composición o el agente realice su función prevista. Por ejemplo, si una vía adecuada es intravenosa, la composición se administra introduciendo la composición o agente en una vena del sujeto.

[0078] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” abarca una inmunoglobulina, ya sea natural o producida parcial o totalmente de manera sintética, y fragmentos de la misma. El término también cubre cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo a un dominio de unión de inmunoglobulina. “Anticuerpo” incluye, además, un polipéptido que comprende una región marco de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une específicamente a un antígeno y lo reconoce. El uso del término “anticuerpo” pretende incluir anticuerpos completos, anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes, fragmentos de los mismos y, además, incluye anticuerpos monocatenarios, anticuerpos humanizados, anticuerpos murinos, anticuerpos monoclonales quiméricos, de ratón-humano, de ratón-primate, de primate-humano, anticuerpos antiidiotipo, fragmentos de anticuerpos, tales como, por ejemplo, scFv, (scFv)₂, Fab, Fab’ y F(ab’)₂, F(ab1)₂, fragmentos Fv, dAb y Fd, diacuerpos y polipéptidos relacionados con anticuerpos. Anticuerpo incluye anticuerpos biespecíficos y anticuerpos multiespecíficos, siempre que presenten la actividad o función biológica deseada. En algunos aspectos de la presente invención, la molécula biológicamente activa es un anticuerpo o una molécula que comprende un fragmento de unión al antígeno del mismo.

[0079] Los términos “conjugado de anticuerpo-fármaco” y “ADC” se usan indistintamente y se refieren a un anticuerpo enlazado, por ejemplo, covalentemente, a un agente terapéutico (a veces denominado en el presente documento agente, fármaco o ingrediente farmacéutico activo) o agentes. En algunos aspectos de la presente invención, la molécula biológicamente activa es un conjugado de anticuerpo-fármaco.

[0080] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente”, aplicado a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertos aspectos, el término “aproximadamente” se refiere a un rango de valores que se encuentran dentro del 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos. en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100 % de un valor posible).

[0081] Una “sustitución de aminoácido conservadora” es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la materia se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales

ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por consiguiente, si un aminoácido de un polipéptido se reemplaza por otro aminoácido de la misma familia de cadenas laterales, la sustitución se considera conservadora. En otro aspecto, una cadena de aminoácidos se puede reemplazar de manera conservadora con una cadena estructuralmente similar que difiere en el orden y/o composición de los miembros de la familia de cadenas laterales.

[0082] Como se usa en el presente documento, el término “conservado” se refiere a nucleótidos o residuos de aminoácidos de una secuencia polinucleotídica o secuencia polipeptídica, respectivamente, que son aquellos que aparecen inalterados en la misma posición de dos o más secuencias que se están comparando. Los nucleótidos o aminoácidos que están relativamente conservados son aquellos que se conservan entre secuencias más relacionadas que los nucleótidos o aminoácidos que aparecen en otras partes de las secuencias.

[0083] En algunos aspectos, se dice que dos o más secuencias están “completamente conservadas” o “idénticas” si son 100 % idénticas entre sí. En algunos aspectos, se dice que dos o más secuencias están “altamente conservadas” si son al menos aproximadamente un 70 % idénticas, al menos aproximadamente un 80 % idénticas, al menos aproximadamente un 90 % idénticas o al menos aproximadamente un 95 % idénticas entre sí. En algunos aspectos, se dice que dos o más secuencias están “conservadas” si son al menos aproximadamente un 30 % idénticas, al menos aproximadamente un 40 % idénticas, al menos aproximadamente un 50 % idénticas, al menos aproximadamente un 60 % idénticas, al menos aproximadamente un 70 % idénticos, al menos aproximadamente 80 % idénticos, al menos aproximadamente 90 % idénticos o al menos aproximadamente 95 % idénticos entre sí. La conservación de la secuencia puede aplicarse a toda la longitud de un polinucleótido o polipéptido o puede aplicarse a una porción, región o característica del mismo.

[0084] Como se usan en el presente documento, los términos “enlazar” y “conjugar” se usan indistintamente y cada uno se refiere a la unión covalente o no covalente de dos o más fracciones que comprenden un neodegradador y una fracción de unión. En algunos aspectos, el enlace o la conjugación pueden comprender un enlazador.

[0085] La expresión “variante de secuencia de aminoácidos” se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia nativa. Normalmente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente un 70 % de identidad de secuencia con al menos un dominio de unión al receptor de un anticuerpo nativo o con al menos un dominio de unión a ligando de un receptor nativo, y típicamente, tendrán al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, más típicamente, al menos aproximadamente un 90 % de homología por secuencia con dichos dominios de unión a receptor o ligando. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, eliminaciones y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa. Los aminoácidos se designan con los nombres convencionales, códigos de una y tres letras.

[0086] La “identidad de secuencia” se define como el porcentaje de residuos en la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Los métodos y programas informáticos para la alineación son muy conocidos en la materia. Uno de esos programas informáticos es “Align 2”, escrito por Genentech, Inc., que se presentó junto con la documentación del usuario en la Oficina de derechos de autor de Estados Unidos, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

[0087] Los términos “receptor Fc” o “FcR” se utilizan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Un FcR ejemplar es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR puede ser uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de Fc.gamma.RI, Fc.gamma.RII y Fc.gamma. Subclases RIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores Fc.gamma.RII incluyen Fc.gamma.RIIA (un “receptor activador”) y Fc.gamma.RIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador Fc.gamma.RIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina (ITAM) de inmunorreceptor en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor Fc.gamma.RIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático. Otros FcR, incluyendo aquellos que se identificarán en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG materna al feto.

[0088] “Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la capacidad de una molécula para la lisis de una diana en presencia de un complemento. La vía de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) formando un complejo con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC.

[0089] Los “anticuerpos nativos” suelen ser glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está enlazada a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

[0090] El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente entre los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables tanto en el dominio variable de la cadena ligera como en el de la cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de hoja beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de hoja beta. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las FR y, junto con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

[0091] El término “región hipervariable”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al supra) y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable” (por ejemplo, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada). Los residuos de “región marco” o “FR” son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se definen en el presente documento.

[0092] La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual “Fc”, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión al antígeno y todavía es capaz de reticular el antígeno.

[0093] “Fv” es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha y no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

[0094] El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab’ se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab’-SH es la designación en el presente documento para Fab’ en el que el residuo de cisteína de los dominios constantes porta al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab’ que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0095] Las “cadenas ligeras” de anticuerpos de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), según las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0096] Los fragmentos de anticuerpo “Fv monocatenario” o “scFv” comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. El polipéptido Fv puede comprender además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

[0097] El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio pesado variable (VH) conectado a un dominio ligero variable (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al utilizar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno.

[0098] Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. La humanización es un método para transferir la información de unión del antígeno murino a un aceptor de anticuerpos humanos no inmunogénicos y ha dado lugar a muchos fármacos terapéuticamente útiles. El método de humanización generalmente comienza transfiriendo las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) murinas a una estructura de anticuerpo humano. Estos anticuerpos injertados con CDR generalmente no conservan su afinidad original por la unión al antígeno y, de hecho, la afinidad suele verse gravemente afectada. Además de las CDR, también se deben incorporar residuos estructurales de anticuerpos no humanos seleccionados para mantener la conformación adecuada de las CDR. Se ha demostrado que la transferencia de residuos clave de la estructura del ratón al aceptor humano, para respaldar la conformación estructural de las CDR injertadas, restablece la unión y la afinidad del antígeno. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones

se realizan para refinar aún más el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

[0099] Un anticuerpo “aislado” es aquel que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos terapéuticos o de diagnóstico del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En ciertos aspectos, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo según se determina mediante el método de Lowry, o más del 99 % en peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal o interno mediante el uso de un secuenciador de proteínas en fase gaseosa, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción azul o plateada de Coomassie. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, normalmente el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación.

[0100] Un “cáncer” se refiere a un amplio grupo de diversas enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. La división y el crecimiento celular no regulados dan como resultado la formación de tumores malignos que invaden los tejidos vecinos y también pueden metastatizar a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo. “Cáncer”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cánceres primarios, metastásicos y recurrentes.

[0101] Como se usa en el presente documento, el término “respuesta inmune” se refiere a una respuesta biológica dentro de un vertebrado contra agentes extraños, cuya respuesta protege al organismo contra estos agentes y las enfermedades causadas por ellos. Una respuesta inmune está mediada por la acción de una célula del sistema inmunológico (por ejemplo, un linfocito T, un linfocito B, una célula asesina natural (NK), un macrófago, un eosinófilo, un mastocito, una célula dendrítica o un neutrófilo) y las macromoléculas solubles producidas por cualquiera de estas células o por el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas y complemento) que resultan en la

selección selectiva, unión, daño, destrucción y/o eliminación del cuerpo del vertebrado de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas u otras células anormales o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales. Una reacción inmune incluye, por ejemplo, activación o inhibición de una célula T, por ejemplo, una célula T efectora o una célula Th, como una célula T CD4⁺ o CD8⁺, o la inhibición de una célula Treg. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos “célula T” y “linfocitos T” son intercambiables y se refieren a cualquier linfocito producido o procesado por la glándula timo. En algunos aspectos, una célula T es una célula T CD4⁺. En algunos aspectos, una célula T es una célula T CD8⁺. En algunos aspectos, una célula T es una célula NKT.

[0102] Un “sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano. El término “animal no humano” incluye, entre otros, vertebrados tales como primates no humanos, ovejas, perros y roedores tales como ratones, ratas y conejillos de indias. En algunos aspectos, el sujeto es un ser humano. Los términos “sujeto” y “paciente” se utilizan indistintamente en el presente documento.

[0103] El término “cantidad terapéuticamente eficaz” o “dosis terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un agente (por ejemplo, neodegradador o conjugado de neodegradadores descrito en el presente documento) que proporciona el resultado biológico, terapéutico y/o profiláctico deseado. Ese resultado puede ser una reducción, mejora, paliación, disminución, retraso y/o alivio de uno o más de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En referencia a tumores sólidos, una cantidad eficaz comprende una cantidad suficiente para hacer que un tumor se reduzca y/o disminuir la tasa de crecimiento del tumor (tal como para suprimir el crecimiento del tumor) o para prevenir o retrasar otra proliferación celular no deseada. En algunos aspectos, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo del tumor. En algunos aspectos, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para prevenir o retrasar la recurrencia del tumor. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. La cantidad eficaz de la composición puede, por ejemplo, (i) reducir el número de células cancerosas; (ii) reducir el tamaño del tumor; (iii) inhibe, retarda, retarda hasta cierto punto y puede detener la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; (iv) inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y puede detener la metástasis tumoral; (v) inhibir el crecimiento tumoral; (vi) prevenir o retrasar la aparición y/o recurrencia del tumor; y/o (vii) aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer.

[0104] En algunos aspectos, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es la cantidad de neodegradador o conjugado de neodegradadores clínicamente demostrado que afecta a una

disminución significativa del cáncer o a una ralentización de la progresión (regresión) del cáncer, tal como un tumor sólido avanzado. La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad se puede evaluar usando una variedad de métodos conocidos por el profesional experto, tales como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelos animales predictivos de eficacia en humanos, o ensayando la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

[0105] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “estándar de atención” se refiere a un tratamiento aceptado por expertos médicos como un tratamiento adecuado para un determinado tipo de enfermedad y que es ampliamente utilizado por los profesionales de la salud. El término se puede utilizar de forma intercambiable con cualquiera de los siguientes términos: “mejores prácticas”, “estándar de atención médica” y “terapia estándar”.

[0106] A modo de ejemplo, un “agente anticancerígeno” promueve la regresión del cáncer en un sujeto o previene un mayor crecimiento tumoral. En ciertos aspectos, una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco promueve la regresión del cáncer hasta el punto de eliminarlo.

[0107] Los términos “eficaz” y “eficacia” con respecto a un tratamiento incluyen tanto la eficacia farmacológica como la seguridad fisiológica. La eficacia farmacológica se refiere a la capacidad del fármaco para promover la regresión del cáncer en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de órgano y/u organismo (efectos adversos) resultantes de la administración del fármaco.

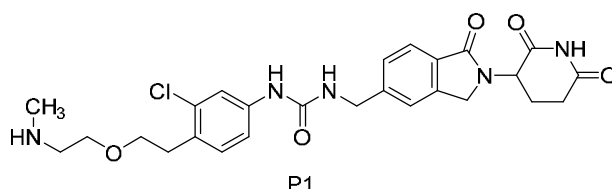
[0108] Como se usa en el presente documento, el término “inhibidor de punto de control inmunológico” se refiere a moléculas que reducen, inhiben, interfieren o modulan total o parcialmente una o más proteínas de punto de control. Las proteínas de punto de control regulan la activación o función de las células T. Se conocen numerosas proteínas de punto de control, como CTLA-4 y sus ligandos CD80 y CD86; y PD-1 con sus ligandos PD-L1 y PD-L2. Pardoll, DM, *Nat Rev Cancer* 12(4):252-64 (2012). Estas proteínas son responsables de interacciones coestimuladoras o inhibitoras de las respuestas de las células T. Las proteínas de los puntos de control inmunológico regulan y mantienen la autotolerancia y la duración y amplitud de las respuestas inmunes fisiológicas. Los inhibidores de punto de control inmunológico incluyen anticuerpos o se derivan de anticuerpos.

[0109] Los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo o la propagación

del cáncer. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión, mejora o paliación de la enfermedad. del estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o trastorno, así como aquellos propensos a padecer la afección o trastorno o aquellos en los que se debe prevenir la afección o trastorno.

II. Neodegradadores

[0110] La presente invención proporciona un neodegradador de la fórmula (P1):

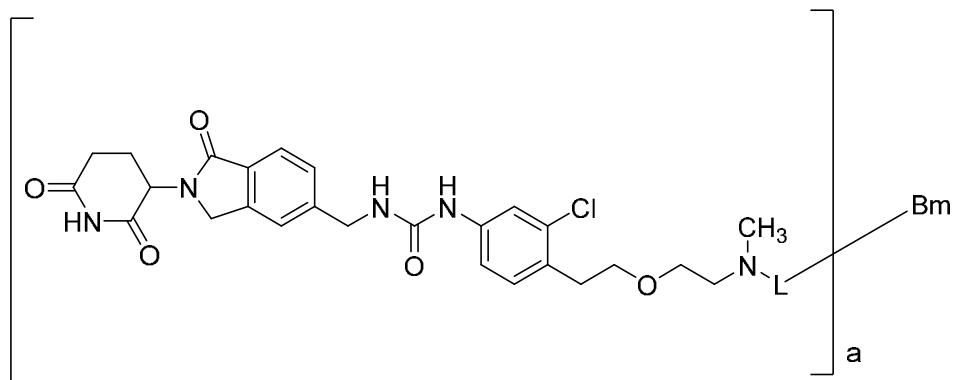


[0111] En algunos aspectos, un neodegradador es una molécula que forma un complejo ternario con una ubiquitina ligasa E3 que es capaz de dirigirse a una proteína para su degradación.

III. Conjugados de neodegradadores

[0112] La presente invención proporciona conjugados de uno o más neodegradadores descritos en el presente documento y una fracción de unión. Estos conjugados pueden degradar proteínas uniéndose al cereblón (CRBN), promoviendo el reclutamiento y la ubiquitinación de proteínas sustrato mediadas por CRL4^{CRBN} de ubiquitina ligasa E3. Estos agentes actúan como “pegamentos moleculares”, llenando la interfaz de unión como un parche hidrofóbico que reprograma las interacciones proteicas entre la ligasa y los neosustratos.

[0113] En algunos aspectos, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula (I),

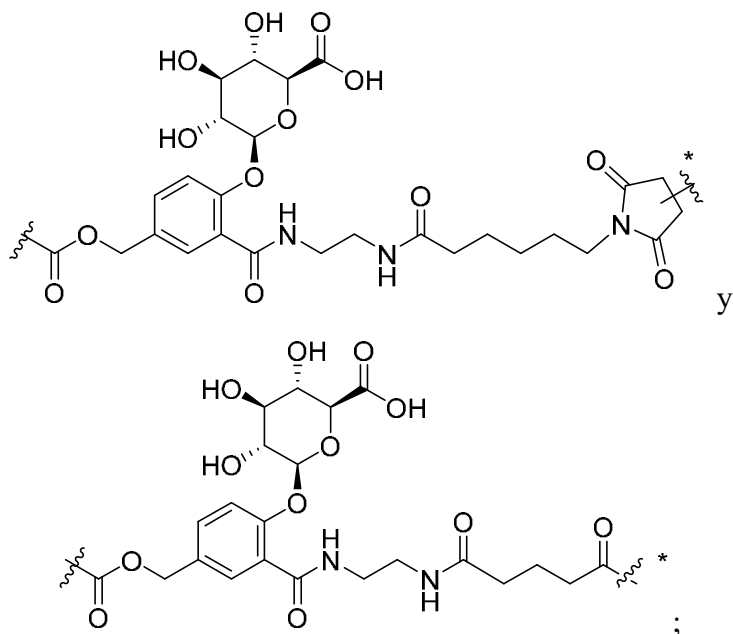


(I);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

[0114] a es de 1 a 10;

[0115] L es un enlazador seleccionado entre



en donde:

[0116] es el punto de unión al átomo de nitrógeno; y

[0117] es el punto de unión a Bm; y

[0118] En algunos aspectos, el conjugado de neodegradadores descrito en el presente documento tiene actividad antiproliferativa *in vitro* contra una línea celular tumoral. En algunos aspectos, el conjugado de neodegradadores que comprende un neodegradador y una fracción de unión tiene actividad antiproliferativa *in vitro* al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al

menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 100 % mayor que el neodegradador solo o la fracción de unión sola. En algunos aspectos, el conjugado de neodegradadores que comprende un neodegradador y una fracción de unión tiene actividad antiproliferativa *in vitro* al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces mayor que el neodegradador solo o la fracción de unión sola.

[0119] En algunos aspectos, los conjugados de neodegradadores descritos en el presente documento tienen actividad antiproliferativa *in vitro* contra una línea celular de cáncer de mama BT-474, por ejemplo, mayor actividad antiproliferativa contra una línea celular de cáncer de mama BT-474, en comparación con el neodegradador solo o la fracción de unión sola. En algunos aspectos, los conjugados de neodegradadores descritos en el presente documento tienen actividad antiproliferativa *in vitro* contra una línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, por ejemplo, mayor actividad antiproliferativa contra una línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, en comparación con el neodegradador solo o la fracción de unión sola. En algunos aspectos, los conjugados de neodegradadores descritos en el presente documento tienen actividad antiproliferativa *in vitro* contra una línea celular de cáncer gástrico NCI-N87, por ejemplo, mayor actividad antiproliferativa contra una línea celular de cáncer gástrico NCI-N87, en comparación con el neodegradador solo o la fracción de unión sola. En algunos aspectos, los conjugados de neodegradadores descritos en el presente documento tienen actividad antiproliferativa *in vitro* contra una línea celular de linfoma de Daudi, por ejemplo, mayor actividad antiproliferativa contra una línea celular de linfoma de Daudi, en comparación con el neodegradador solo o la fracción de unión sola. En algunos aspectos, los conjugados de neodegradadores descritos en el presente documento tienen actividad antiproliferativa *in vitro* contra la línea celular de leucemia mieloide aguda HL-60, por ejemplo, mayor actividad antiproliferativa contra una línea celular de leucemia mieloide aguda HL-60, en comparación con el neodegradador solo o la fracción de unión sola. En algunos aspectos, los conjugados de neodegradadores descritos en el presente documento tienen actividad antiproliferativa *in vitro* contra una línea celular de linfoma no Hodgkins de Ramos, por ejemplo, mayor actividad antiproliferativa contra una línea celular de linfoma no Hodgkins de Ramos, en comparación con el neodegradador solo o la fracción de unión sola. En algunos aspectos, los conjugados de neodegradadores descritos en el presente documento tienen actividad

antiproliferativa *in vitro* contra una línea celular MV411 de AML, por ejemplo, mayor actividad antiproliferativa contra una línea celular MV411 de AML, en comparación con el neodegradador solo o la fracción de unión sola. En algunos aspectos, los conjugados de neodegradadores descritos en el presente documento son capaces de mantener su actividad antiproliferativa en presencia de suero humano. Los conjugados de neodegradadores descritos en el presente documento se pueden utilizar en el tratamiento de cánceres.

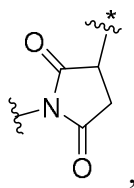
[0120] En algunos aspectos, un conjugado de anticuerpos neodegradadores (AnDC) es un conjugado de uno o más neodegradadores descritos en el presente documento y un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo divulgado en el presente documento.

III.A. Enlazador

[0121] El neodegradador de la presente invención está enlazado a la fracción de unión mediante un enlazador. Como se usa en el presente documento, el término “enlazador” se refiere a cualquier fracción química capaz de conectar la fracción de unión (Bm) al neodegradador P1.

[0122] En ciertos aspectos, el enlazador puede contener un grupo heterobifuncional. En la presente invención, el término “grupo heterobifuncional” se refiere a una fracción química que conecta el enlazador del que forma parte con la fracción de unión. Los grupos heterobifuncionales se caracterizan por tener diferentes grupos reactivos en cada extremo de la fracción química. La unión a “Bm” se puede lograr mediante conjugación química o enzimática, o una combinación de ambas. La conjugación química implica la reacción controlada de residuos de aminoácidos accesibles en la superficie de la fracción de unión con un mango de reacción en el grupo heterobifuncional. Ejemplos de conjugación química incluyen, entre otros, acoplamiento de lisina amida, acoplamiento de cisteína y acoplamiento mediante un aminoácido no natural incorporado mediante ingeniería genética, en donde residuos de aminoácidos no naturales con un mango de reacción deseada se instalan en “Bm”. En la conjugación enzimática, una enzima media el acoplamiento del enlazador con un residuo amino accesible en la fracción de unión. Ejemplos de conjugación enzimática incluyen, entre otros, transpeptidación usando sortasa, transpeptidación usando transglutaminasa microbiana e ingeniería de N-glucanos. También se pueden utilizar secuencialmente la conjugación química y la conjugación enzimática. Por ejemplo, la conjugación enzimática también se puede utilizar para instalar mangos de reacción únicos en “Bm” que se utilizarán en la conjugación química posterior.

[0123] En algunos aspectos, el grupo heterobifuncional es

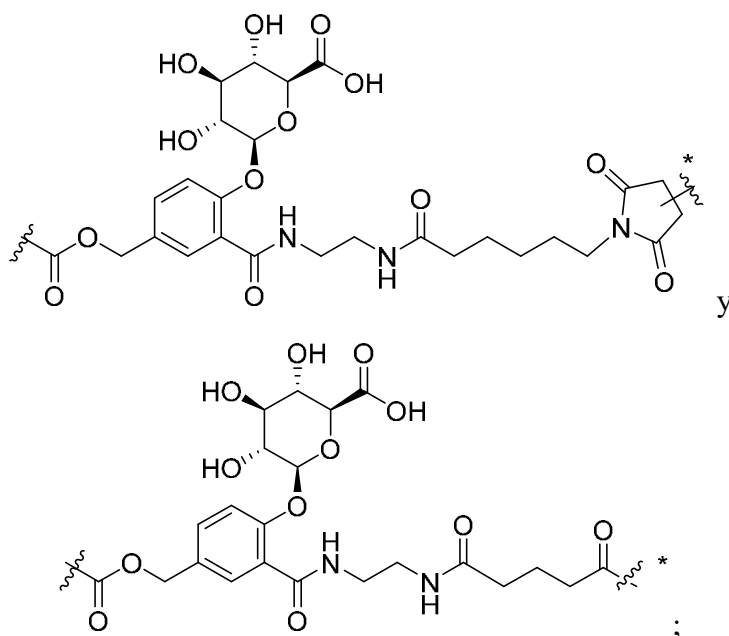


en donde

es el punto de unión a la porción restante del enlazador; y

el punto de unión a Bm.

[0124] En ciertos aspectos, L es un enlazador escindible por beta-glucuronidasa. En algunos aspectos, L es un enlazador escindible por beta-glucuronidasa seleccionado entre:



en donde:

[0125] es el punto de unión al neodegradador P1; y

[0126] es el punto de unión a la fracción de unión.

III.B. Fracción de unión

[0127] La presente invención proporciona neodegradadores conjugados con fracciones de unión. El término “fracción de unión”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula que reconoce y se une a un marcador o receptor de la superficie celular. En ciertos aspectos, la fracción de unión se une a una proteína, sin limitarse a una fracción polipeptídica. La fracción de unión, además de dirigir el neodegradador a una célula, tejido o ubicación específica,

también puede tener cierto efecto terapéutico, como actividad antiproliferativa (citostática y/o citotóxica) contra una célula o vía diana. En ciertos aspectos, la fracción de unión puede comprender o puede diseñarse para que comprenda al menos un grupo químicamente reactivo tal como un ácido carboxílico, amina, tiol o una fracción o cadena lateral de aminoácido químicamente reactivo. En algunos aspectos, la fracción de unión puede comprender una fracción de direccionamiento que se une o forma complejos con una molécula de la superficie celular, tal como un receptor o antígeno de la superficie celular, para una población determinada de células diana. Después de la unión específica o la formación de complejos con el receptor, la célula es permisiva para la absorción de la fracción objetivo o del conjugado de neodegradadores, que luego se internaliza en la célula.

[0128] En algunos aspectos, el grupo “Bm” puede ser una fracción que puede unirse específicamente a una molécula de la superficie celular. En algunos aspectos, el grupo “Bm” puede ser un péptido o una proteína que se une a un receptor o antígeno de la superficie celular.

[0129] En ciertos aspectos, el grupo “Bm” puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunológico que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. Un antígeno diana generalmente tiene numerosos sitios de unión, también llamados epítomos, reconocidos por las CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítomo diferente tiene una estructura diferente. Por consiguiente, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. El término “anticuerpo” en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos de dominio único, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies.

[0130] Los anticuerpos monoclonales que pueden conjugarse con el neodegradador son poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un determinante antigénico particular (por ejemplo, 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 del mismo). Se puede preparar un anticuerpo monoclonal (mAb) contra un antígeno de interés utilizando cualquier técnica conocida en la materia que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, entre otras, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de células B humanas y la técnica de hibridoma EBV. Dichos anticuerpos pueden ser

de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA e IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los mAb de uso en esta invención se puede cultivar in vitro o in vivo.

[0131] Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos monoclonales quiméricos ratón-humano (u otras especies). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse mediante cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la materia.

[0132] El anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. En la materia se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante pasos de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos.

[0133] De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión puede ser con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C.sub.H2 y C.sub.H3. La primera región constante de cadena pesada (C.sub.H1) puede contener el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ácidos nucleicos con secuencias que codifican las fusiones de cadenas pesadas de inmunoglobulinas y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulinas, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en aspectos en los que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen importancia particular.

[0134] Los anticuerpos biespecíficos pueden tener una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Usando dichas técnicas, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos para la conjugación con los neodegradadores en el tratamiento o prevención de enfermedades como se define en el presente documento.

[0135] Los anticuerpos híbridos o bifuncionales pueden derivarse biológicamente, es decir, mediante técnicas de fusión celular, o químicamente, especialmente con agentes reticulantes o reactivos formadores de puentes disulfuro, y pueden comprender anticuerpos completos o fragmentos de los mismos.

[0136] El anticuerpo puede ser un fragmento, derivado o análogo funcionalmente activo de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos u otros anticuerpos unidos a células o matrices tumorales. A este respecto, “funcionalmente activo” significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de provocar anticuerpos anti-antiidiotipo que reconocen el mismo antígeno que reconoció el anticuerpo del que se deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en un aspecto ejemplar, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina se puede mejorar mediante la eliminación de secuencias estructurales y de CDR que son C-terminales de la secuencia de CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR en ensayos de unión con el antígeno, mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la materia.

[0137] Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, entre otros, fragmentos F(ab')₂, que contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada que se pueden producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Otros anticuerpos útiles son dímeros de anticuerpos de cadena pesada y cadena ligera, o cualquier fragmento mínimo de los mismos, tales como Fv o anticuerpos monocatenarios (SCA), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

[0138] Además, son anticuerpos útiles los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, que pueden prepararse usando técnicas estándar de ADN recombinante. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un monoclonal murino y regiones constantes de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia.

[0139] Se pueden producir anticuerpos completamente humanos utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas endógenas, pero que pueden expresar genes de cadenas pesadas y ligeras humanas. Los ratones transgénicos se inmunizan de forma normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener utilizando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de las células B y posteriormente sufren un cambio de clase y una mutación somática. Por consiguiente, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Otros anticuerpos humanos pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, de Abgenix, Inc. (Freemont, California) y Genpharm (San José, California).

[0140] Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado mediante una técnica denominada “selección guiada”. En este enfoque se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos.

[0141] El anticuerpo puede ser una proteína de fusión de un anticuerpo, o un fragmento funcionalmente activo del mismo, por ejemplo, en el que el anticuerpo está fusionado mediante un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), ya sea en el extremo N-terminal o en el

extremo C-terminal para una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma, tal como una porción de al menos 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es el anticuerpo. El anticuerpo o fragmento del mismo puede estar enlazado covalentemente a la otra proteína en el extremo N-terminal del dominio constante.

[0142] Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula, siempre que dicha unión covalente permita que el anticuerpo conserve su inmunoespecificidad de unión al antígeno. Por ejemplo, entre otros, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que han sido modificados adicionalmente, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. Además, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

[0143] Los anticuerpos en los conjugados de neodegradadores pueden incluir anticuerpos que tienen modificaciones (por ejemplo, sustituciones, eliminaciones o adiciones) en residuos de aminoácidos que interactúan con los receptores Fc. En particular, los anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen modificaciones en residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor FcRn. Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, de Genentech (San Francisco, California) o producirse mediante cualquier método conocido por una persona con conocimientos básicos en la materia tal como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se puede obtener, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos similar, de las publicaciones bibliográficas o mediante clonación y secuenciación de rutina.

[0144] En ciertos aspectos, el anticuerpo de los conjugados de neodegradadores puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En algunos aspectos, el anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab.

[0145] Los anticuerpos conocidos para el tratamiento o la prevención del cáncer se pueden conjugar con los neodegradadores descritos en el presente documento. Los anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de célula cancerosa pueden obtenerse comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido por una persona con conocimientos básicos en la materia tal como, por ejemplo, técnicas de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de célula cancerosa se puede obtener, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos similar, de las publicaciones bibliográficas o mediante clonación y secuenciación de rutina. Ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer incluyen, entre otros, anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico HERCEPTIN® (trastuzumab); RITUXAN® (rituximab; Genentech) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin; OvaRex (oregovomab; AltaRex Corporation, MA), que es un anticuerpo murino para el tratamiento del cáncer de ovario; Panorex (edrecolomab, Glaxo Wellcome, NC), que es un anticuerpo IgG2a murino para el tratamiento del cáncer colorrectal; Cetuximab Erbitux (cetuximab, Imclone Systems Inc., NY), que es un anticuerpo quimérico IgG anti-EGFR para el tratamiento de cánceres positivos al factor de crecimiento epidérmico, tales como cáncer de cabeza y cuello; Vitaxin (etaracizumab, MedImmune, Inc., MD), que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento del sarcoma; Campath I/H (alemtuzumab, Leukosite, MA), que es un anticuerpo humanizado IgG1 para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA), que es un anticuerpo humanizado IgG anti-CD33 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML); LymphoCide (epratuzumab, Immunomedics, Inc., NJ), que es un anticuerpo humanizado IgG anti-CD22 para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA), que es un anticuerpo humanizado anti-HLA-DR para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; Oncolym (Techniclone, Inc., CA), que es un anticuerpo murino anti-HLA-Dr10 radiomarcado para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; Allomune (BioTransplant, CA), que es un mAb anti-CD2 humanizado para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o linfoma no Hodgkin; Avastin (bevacizumab, Genentech), Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado anti-VEGF para el tratamiento de cánceres de pulmón y colorrectal; Epratuzamab (Immunomedics, Inc., Nueva Jersey y Amgen, CA), que es un anticuerpo anti-CD22 para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; y CEAcide (Immunomedics, Nueva Jersey), que es un anticuerpo humanizado anti-CEA para el tratamiento del cáncer colorrectal.

[0146] Otros anticuerpos útiles para los conjugados de neodegradadores incluyen, entre otros, trastuzumab, gemtuzumab, pertuzumab, obinutuzumab, ofatumumab, daratumumab, STI-6129, lintuzumab, huMy9-6, balantamab, indatuximab, dinutuximab, anticuerpo anti-CD38 A2, anticuerpo HuAT13/5 H3s, ibritumomab, tositumomab, panitumumab, tremelimumab, ticilimumab, catumaxomab y veltuzumab. En ciertos aspectos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en rituximab, trastuzumab, pertuzumab, huMy9-6-IgG4-S228P, lintuzumab y gemtuzumab.

[0147] Otros anticuerpos útiles para los conjugados de neodegradadores incluyen, entre otros, anticuerpos contra los siguientes antígenos: CA125 (ovario), CA15-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas), L6 (carcinomas), Lewis Y (carcinomas), Lewis X (carcinomas), alfa fetoproteína (carcinomas), CA 242 (colorrectal), alcalino placentario fosfatasa (carcinomas), antígeno prostático específico (próstata), fosfatasa ácida prostática (próstata), factor de crecimiento epidérmico (carcinomas), MAGE-1 (carcinomas), MAGE-2 (carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE-4 (carcinomas), receptor anti-transferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MUC1-KLH (cáncer de mama), CEA (colorrectal), gp100 (melanoma), MART1 (melanoma), PSA (próstata), receptor de IL-2 (Leucemia y linfomas de células T), CD20 (linfoma no Hodgkin), CD52 (leucemia), CD33 (leucemia), CD22 (linfoma), gonadotropina coriónica humana (carcinoma), CD38 (mieloma múltiple), CD40 (linfoma), mucina (carcinomas), P21 (carcinomas), MPG (melanoma) y producto oncogén Neu (carcinomas). Algunos anticuerpos específicos útiles incluyen, entre otros, BR96 mAb (Trail, PA, et al Science (1993) 261, 212-215), BR64 (Trail, PA, et al Cancer Research (1997) 57, 100- 105), mAb contra el antígeno CD40, tal como mAb S2C6 (Francisco, JA, et al. Cancer Res. (2000) 60:3225-3231), mAb contra el antígeno CD70, tal como mAb 1F6, y mAb contra el antígeno CD30, como AC10. Se pueden utilizar y se han revisado muchos otros anticuerpos internalizantes que se unen a antígenos asociados a tumores.

[0148] Otros antígenos a los que se pueden unir los presentes conjugados incluyen, entre otros, 5T4, ACE, ADRB3, AKAP-4, ALK, receptor de andrógenos, AOC3, APP, Axin1, AXL, B7H3, B7-H4, BCL2, BCMA, bcr-abl, BORIS, BST2, C242, C4.4a, CA 125, CA6, CA9, CAIX, CCL11, CCR5, CD123, CD133, CD138, CD142, CD15, CD15-3, CD171, CD179a, CD18, CD19, CD19-9, CD2, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27L, CD28, CD3, CD30, CD31, CD300LF, CD33, CD352, CD37, CD38, CD4, CD40, CD41, CD44, CD44v6, CD5, CD51, CD52, CD54, CD56, CD62E, CD62P, CD62L, CD70, CD71, CD72, CD74, CD79a, CD79b, CD80, CD90, CD97, CD125, CD138, CD141, CD147, CD152, CD154, CD326, CEA, CEACAM5, CFTR, factor

de aglomeración, cKit, Claudina 3, Claudina 18.2, CLDN6, CLEC12A, CLL-1, clI3, c-MET, proteína Cripto, CS1, CTLA-4, CXCR2, CXORF61, Ciclina B1, CYP1B1, Cadherina-3, Cadherina-6, DLL3, E7, EDNRB, EFNA4, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EMR2, ENPP3, EPCAM, EphA2, Efrina A4, Efrina B2, EPHB4, ERBB2 (Her2/neu), ErbB3, ERG (gen de fusión TPRSS2 ETS), ETBR, ETV6-AML, FAP, FCAR, FCRL5, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, receptor de folato alfa, receptor de folato beta, FOLR1, antígeno 1 relacionado con Fos, Fucosilo GM1, GCC, GD2, GD3, GloboH, GM3, GPC1, GPC2, GPC3, gp100, GPNMB, GPR20, GPRC5D, GUCY2C, HAVCR1, HER2, HER3, HGF, HMI.24, HMWMAA, HPV E6, hTERT, transcriptasa inversa de telomerasa humana, ICAM, ICOS-L, IFN- α , IFN- γ , receptor de IGF-I, IGLL1, receptor de IL-2 (IL-2R α (es decir, CD25), IL-2R β (es decir, CD122), IL-2R γ (es decir, CD132)), receptor de IL-4 (IL-4R, IL-2R γ /IL-13R α 1), receptor de IL-13 (IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-4R), receptor de IL-1 (IL-1 lRa), receptor de IL-12 (IL-12R β 1, IL-12R β 2), receptor de IL-23 (IL-12R β 1, IL-23R), receptor de IL-22 (IL-22R α 1, IL-22R α 2, IL-10R β), receptor de IL-5 (IL-5R α , CSF2RB), receptor de IL-6 (IL-6R α , gp130), receptor de interferón, integrinas (incluyendo las integrinas α 4, α v β 3, α v β 5, α v β 6, α 1 β 4, α 4 β 1, α 4 β 7, α 5 β 1, α 6 β 4, α IIb β 3), integrina alfaV, carboxil esterasa intestinal, KIT, LAGE-Ia, LAIR1, LAMP-1, LCK, Legumain, LewisY, LFA-1(CD11a), L-selectina(CD62L), LILRA2, LIV-1, LMP2, LRRC15, LY6E, LY6K, LY75, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE A1, MelanA/MART1, Mesotelina, ML-IAP, MSLN, mucina, MUC1, MUC16, mut hsp70-2, MYCN, miostatina, NA17, NaPi2b, NCA-90, NCAM, Nectin-4, NGF, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, NY-BR-1, NY-ESO-1, o-acetil-GD2, OR51E2, OY-TES1, p53, mutante de p53, PANX3, PAP, PAX3, PAX5, p-CAD, PCTA-1/Galectina 8, PD-L1, PD-L2, PDGFR, PDGFR-beta, fosfatidilserina, PIK3CA, PLAC1, ácido polisiálico, prostasa, células de carcinoma de próstata, prosteina, pseudomonas aeruginosa, rabia, survivina y telomerasa, PRSS21, PSCA, PSMA, PTK7, RAGE-1, RANKL, mutante de Ras, virus respiratorio sincitial, factor Rhesus, RhoC, RON, ROR1, ROR2, RU1, RU2, puntos de corte de translocación de sarcoma, SART3, SLAMF7, SLC44A4, sLe, SLITRK6, proteína espermática 17, esfingosina-1-fosfato, SSEA-4, SSX2, STEAP1, TAG72, TARP, TCR β , TEM1/CD248, TEM7R, tenascina C, TF, TGF-1, TGF- β 2, TNF- α , TGS5, Tie 2, TIM-1, Tn Ag, TRAC, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TROP-2, TRP-2, TRPV1, TSHR, antígeno tumoral CTAA16.88, tirosinasa, UPK2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, vimentina, WT1 y/o XAGE1.

[0149] Anticuerpos que se unen a antígenos asociados con células presentadoras de antígenos como CD40, OX40L, endoglina, DEC-205, 4-1BBL, CD36, CD36, CD204, MARCO,

DC-SIGN, CLEC9A, CLEC5A, Dectina 2, CLEC10A, CD206, CD64, CD32A, CD1A, HVEM, CD32B, PD-L1, BDCA-2, XCR-1 y CCR2 también se pueden conjugar con los neodegradadores.

[0150] Los anticuerpos de un conjugados de neodegradadores pueden unirse tanto a un receptor como a un complejo de receptores expresado en un linfocito activado. El receptor o complejo de receptores puede comprender un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, una integrina, un receptor de citoquinas, un receptor de quimiocinas, una proteína principal de histocompatibilidad, una lectina o una proteína de control del complemento. Ejemplos no limitantes de miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas adecuados son CD2, CD3, CD4, CD8, CD 19, CD22, CD28, CD79, CD90, CD 152/CTLA-4, PD-1 e ICOS. Ejemplos no limitantes de miembros de la superfamilia de receptores de TNF adecuados son CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerina, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 y APO-3. Ejemplos no limitantes de integrinas adecuadas son CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD 103 y CD 104. Ejemplos no limitantes de lectinas adecuadas son lectinas de tipo C, tipo S y tipo I.

[0151] En algunos aspectos, los anticuerpos que pueden ser útiles para la presente invención incluyen, entre otros, 3F8, 8H9, abagovomab, abciximab (REOPRO[®]), abituzumab, abrezekimab, abrilumab, actoxumab, adalimumab (HUMIRA[®]), adecatumumab, aducanumab, afasevikumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, ALD518, alemtuzumab (CAMPATH[®]), alirocumab (PRALUENT[®]), altumomab, amatuximab, anatumomab, andecaliximab, anetumab, anifrolumab, anrukinzumab, apolizumab, aprutumab, arcitumomab (CEA-SCAN[®]), ascrinvacumab, aselizumab, atidortoxumab, atlizumab (tocilizumab, ACTEMRA[®], ROACTEMRA[®]), atezolizumab (TECENTRIQ[®]), atinumab, atorolimumab, avelumab (Bavencio), azintuxizumab, balantamab, bapineuzumab, basiliximab (SIMULECT[®]), bavituximab, BCD-100, bectumomab (LYMPHOSCAN[®]), begelomab, belantamab, belimumab (BENLYSTA[®]), bemarituzumab, benralizumab (FASENRA[®]), bermekimab, bersanimab, bertilimumab, besilesomab (SCINITIMUN[®]), bevacizumab (AVASTIN[®]), bezlotoxumab (ZINPLAVA[®]), biciromab (FIBRISCINT[®]), bimagrumab, bimekizumab, birtamimab, bivatumab, bleselumab, blinatumomab, blontuvetmab, blosozumab, bococizumab, brazikumab, brentuximab, briakinumab, brodalumab (SILIQ[™]), brolucizumab (BEOVU[®]), brontictuzumab, burosumab (CRYSVITA[®]), cabiralizumab, caplacizumab (CABLIVI[®]), camidanlumab,

camrelizumab, canakinumab (ILARIS[®]), cantuzumab, capromab, carlumab, carotuximab, catumaxomab (REMOVAB[®]), cBR96, CC49, cedelizumab, cemiplimab (LIBTAYO[®]), cergutuzumab, certrelimab, certolizumab, cetuximab (ERBITUX[®]), cibisatamab, cirmtuzumab, citatuzumab, cixutumumab, clazakizumab, clenoliximab, clivatuzumab, codrituzumab, cofetuzumab, coltuximab, conatumumab, concizumab, cosfroviximab, CR6261, crenezumab, crizanlizumab (ADAKVEO[®]), crotedumab, cusatuzumab, dacetuzumab, daclizumab (ZINBRYTA[®]), dalotuzumab, dapirolizumab, daratumumab (DARZALEX[®]), dectrekumab, demcizumab, denintuzumab, denosumab (PROLIA[®]), depatuxizumab, derlotuximab, detumomab, dezamizumab, dinutuximab (UNITUXIN[®]), diridavumab, domagrozumab, dostarlimab, dorlimomab, dorlixizumab, drozitumab, DS-8201, duligotuzumab, dupilumab (DUPIXENT[®]), durvalumab (IMFINZI[®]), dusigitumab, ecromeximab, eculizumab (SOLIRIS[®]), edobacomab, edrecolomab (PANOREX[®]), efalizumab (RAPTIVA[®]), efungumab (MYCOGRAB[®]), eldelumab, elezanumab, elgemtumab, elotuzumab (EMPLICITI[®]), elsilimomab, emactuzumab emapalumab (GAMIFANT[®]), emibetuzumab, emicizumab (HEMLIBRA[®]), enapotamab, enavatuzumab, enfortumab (PADCEV[®]), enlimomab, enoblituzumab, enokizumab, enoticumab, ensituximab, epitumomab, eptinezumab (VYEPTI[®]), epratuzumab, erenumab (AIMOVIG[®]), erlizumab, ertumaxomab (REXOMUN[®]), etaracizumab (ABEGRIN[®]), etigilimab, etrolizumab, evinacumab, evolocumab (REPATHA[®]), exbivirumab, fanolesomab (NEUTROSPEC[®]), faralimomab, faricimab, farletuzumab, fasinumab, FBTA05, felvizumab, fezakinumab, fibatuzumab, ficlatuzumab, figitumumab, firivumab, flanvotumab, fletikumab, flotetuzumab, fontolizumab (HUZAF[®]), foralumab, foravirumab, fremanezumab (AJOVY[®]), fresolimumab, frovocimab, frunevetmab, fulranumab, futuximab, galcanezumab (EMGALITY[®]), galiximab, gancotamab, ganitumab, gantenerumab, gavilimomab, gedivumab, gentuzumab, gevokizumab, gilvetmab, gimsilumab, girentuximab, glembatumumab, golimumab (SIMPONI[®]), gomiliximab, guselkumab (TREMIFYA[®]), huMy9-6, huMY9-6-IgG4-S228P, ianalumab, ibalizumab (TROGARZO[®]), IBI308, ibritumomab, icrucumab, idarucizumab (PRAXBIND[®]), ifabotuzumab, igovomab (INDIMACIS-125), iladatuzumab, IMAB362, imalumab, imaprelimab, imciromab (MYOSCINT[®]), imgatuzumab, inclacumab, indatuximab, indusatumab, inebilizumab, infliximab (REMICADE[®]), intetumumab, inolimomab, inotuzumab, iomab-B, ipilimumab, iratumumab, isatuximab (SARCLISA[®]), iscalimab, istiratumab, itolizumab, ixekizumab (TALTZ[®]), keliximab, labetuzumab (CEA-CIDE[™]), lacnotuzumab, ladiratuzumab, lampalizumab, lanadelumab (TAKHZYRO[®]), landogrozumab, laprituximab, larcaviximab, lebrikizumab, lemalesomab,

lendalizumab, lenvervimab, lenzilumab, lerdelimumab, leronlimab, lesosfavumab, letolizumab, lexatumumab, libivirimab, lifastuzumab, ligelizumab, lilotomab, lintuzumab, lirilumab, lodelcizumab, lokivetmab, loncastuximab, lorvotuzumab, losatuxizumab, lucatumumab, lulizumab, lumiliximab, lumretuzumab, lupartumab, lutikizumab, mapatumumab, margetuximab, marstacimab, maslimomab, matuzumab, mavrilimumab, mepolizumab (NUCALA®), metelimumab, milatuzumab, minretumomab, mirikizumab, mirvetuximab, mitumomab, modotuximab, molalizumab, mogamulizumab (POTELIGEO®), morolimumab, mosunetuzumab, motavizumab (NUMAX®), moxetumomab (LUMOXITI®), muromonab-CD3 (ORTHOCLONE OKT3®), nacolomab, namilumab, naptumomab, naratuximab, narnatumab, natalizumab (TYSABRI®), navicixizumab, navivumab, naxitamab, nebacumab, necitumumab (PORTRAZZA®), nemolizumab, NEOD001, nerelimomab, nesvacumab, netakimab, nimotuzumab (THERACIM®), nirsevimab, nivolumab, nofetumomab, obiltoxaximab (ANTHIM®), obinutuzumab, ocaratuzumab, ocrelizumab (OCREVUS®), odulimumab, ofatumumab (ARZERRA®), olaratumab (LARTRUVO®), oleclumab, olendalizumab, olokizumab, omalizumab (XOLAIR®), omburtamab, OMS721, onartuzumab, ontecizumab, ontuxizumab, onvatilimab, opicinumab, oportuzumab, oregovomab (OVAREX), orticumab, otelixizumab, otilimab, otlertuzumab, oxelumab, ozanezumab, ozogamicin, ozoralizumab, pagibaximab, palivizumab (SYNAGIS®), pamrevlumab, panitumumab (VECTIBIX®), pankomab, panobacumab, parsatuzumab, pascolizumab, pasotuxizumab, pateclizumab, patritumab, PDR001, pembrolizumab, pentumomab (THERAGYN®), perakizumab, pertuzumab (OMNITARG®), pexelizumab, pidilizumab, pinatuzumab, pintumomab, placulumab, polatuzumab (Polivy), prezalumab, plozalizumab, pogalizumab, ponezumab, porgaviximab, prasinezumab, prezalizumab, priliximab, pritoxaximab, pritumumab, PRO 140, quilizumab, racotumomab, radretumab, rafivirimab, ralpancizumab, ramucirumab, ranevetmab, ranibizumab (LUCENTIS®), ravagalimab, ravulizumab (ULTOMIRIS®), raxibacumab, refanezumab, regavirumab, REGN-EB3, renatlimab, remtolumab, reslizumab (CINQAIR®), rilotumumab, rinucumab, risankizumab (SKYRIZI®), rituximab (RITUXAN®), rivabazumab, rmab, robatumumab, roledumab, romilkimab, romosozumab (EVENITY®), rontalizumab, rosmantuzumab, rovalpituzumab, rovelizumab (LEUKARREST®), rozanolixizumab, ruplizumab (ANTOVA), SA237, sacituzumab, samalizumab, samrotamab, sarilumab (KEVZARA®), satralizumab, satumomab pendetide, secukinumab (COSENTYX®), selicrelumab, seribantumab, setoxaximab, setrusumab, sevirumab, SGN-CD19A, SHP647, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, simtuzumab, siplizumab,

sirtratumab, sirukumab, sofituzumab, solanezumab, solitomab, sonepcizumab, sontuzumab, spartalizumab, stamulumab, STI-6129, sulesomab (LEUKOSCAN[®]), suptavumab, sutimlimab, suvizumab, suvratoxumab, tabalumab, tacatuzumab (AFP-CIDE[®]), tadocizumab, talacotuzumab, talizumab, tamtuvetmab, tanezumab, taplitumomab paptox, tarextumab, tavolimab, tefibazumab (AUREXIS[®]), telimomab, telisotuzumab, tesidolumab, tetraxetan, tetulomab, tenatumomab, teneliximab, teprotumumab (TEPEZZA[®]), teplizumab, tezepelumab, TGN1412, tibulizumab, ticilimumab (TREMELIMUMAB[®]), tigatuzumab, timigutuzumab, timolumab, tiragolumab, tiragotumab, tislelizumab, tisotumab, tiuxetan, tildrakizumab (ILUMYA[®]), TNX-650, tocilizumab (atlizumab, ACTEMRA[®]), tomuzotuximab, toralizumab, tosatoxumab, tositumomab (BEXXAR[®]), tovetumab, tralokinumab, trastuzumab (HERCEPTIN[®]), TRBS07, tregalizumab, tremelimumab, trevogrumab, tucotuzumab, tuvirumab, urtoxazumab, ustekinumab (STELERA[®]), ublituximab, ulocuplumab, urelumab, utomilumab, vadastuximab, vanalimab, vandortuzumab, vantictumab, vanucizumab, vapaliximab, varisacumab, varlilumab, vatelizumab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimomab, vesencumab, visilizumab (NUVION[®]), vobarilizumab, volociximab (HUMASPECT[®]), vonlerolizumab, vopratelimab, vorsetuzumab, votumumab, vunakizumab, xentuzumab, XMAB-5574, zalutumumab (HuMEX-EGFr), zanolimumab (HuMAX-CD4), zatuximab, zenocutuzumab, ziralimumab, zolbetuximab o zolimomab.

[0152] En algunos aspectos, la fracción de unión útil para la presente invención comprende un anticuerpo anti-CD33 o una porción de unión al antígeno del mismo. CD33 se expresa en aproximadamente el 90 % de los casos de leucemia mieloide aguda (AML) y ha demostrado utilidad como objetivo de anticuerpos terapéuticos. Hace aproximadamente tres décadas se reportó una alta expresión de CD33 en blastos de AML. CD33 se detectó en blastos del 85-90 % de los pacientes que presentaban AML, así como en progenitores mieloides y mielocitos normales. CD33 está restringido a las células hematopoyéticas, pero está ausente en las células madre hematopoyéticas normales, lo que lo convierte en un objetivo ideal para la terapia de AML.

[0153] Los anticuerpos anti-CD33 para los conjugados de la presente invención son capaces de unirse específicamente a CD33. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-CD33 descritos en el presente documento se unen a CD33 humano con alta afinidad, por ejemplo, con una K_D de 10^{-6} M o menos, 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, 10^{-12} M a 10^{-7} M, 10^{-11} M a 10^{-7} M, 10^{-10} M a 10^{-7} M, o 10^{-9} M a 10^{-7} M.

[0154] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (VH) y

la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (VL); en donde la VH comprende una región determinante de complementariedad (CDR) 1 de VH (VH-CDR1), una VH-CDR2 y una VH-CDR3 y la VL comprende una VL-CDR1, una VL-CDR2 y una VL-CDR3; en donde VH-CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una VH-CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una VH-CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una VL-CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una VL-CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, las CDR comprenden las secuencias que se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Secuencias CDR y secuencias de regiones variables

VH-CDR1	DSNIH
---------	-------

(SEQ ID NO: 1)	
VH-CDR2 (SEQ ID NO: 2)	YIYPYNGGTDYNQKFKN
VH-CDR3 (SEQ ID NO: 3)	GNPWLAY
VH (SEQ ID NO: 4)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIY PYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDYAFYYCVNGNPWL AYWGQGTLVTVSS
VL-CDR1 (SEQ ID NO: 5)	RASESLDNYGIRFLT
VL-CDR2 (SEQ ID NO: 6)	AASNQGSG
VL-CDR3 (SEQ ID NO: 7)	QQTKEVPWS
VL (SEQ ID NO: 8)	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWFGQKPGKAPKLLMY AASNQGSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQTKEVPWSFGQGT KVEVK

[0155] En algunos aspectos, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD33 comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD33 comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

[0156] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia con al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia con al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos

aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

[0157] En algunos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo anti-CD33 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12.

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CD33.

Cadena pesada de CD33AB (SEQ ID NO: 9)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena ligera de CD33AB (SEQ ID NO: 10)	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWFGQKPGKAPKLLMYAASNQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPDDEFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Cadena pesada de gemtuzumab (SEQ ID NO: 11)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Cadena ligera de gemtuzumab SEQ ID NO: 12)	DIQLTQSPSTLSASVGDRTTITCRASESLDNYGIRFLTWFFQQKPGKAPKLLMY AASNQGSQGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQTKVEVPWSFGQGT KVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
--	---

[0158] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10. El término “CD33AB” comprende una cadena pesada como se indica en la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera como se indica en la SEQ ID NO: 10.

[0159] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 12.

[0160] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 se describe en las patentes estadounidenses números 5.585.089 y 5.693.762, cada una de las cuales se incorpora expresamente en el presente documento como referencia.

[0161] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (VH) y

la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (VL); en donde la VH comprende una región determinante de complementariedad (CDR) 1 de VH (VH-CDR1), una VH-CDR2 y una VH-CDR3 y la VL comprende una VL-CDR1, una VL-CDR2 y una VL-CDR3; en donde VH-CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una VH-CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una VH-CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una VL-CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una VL-CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunos aspectos, las CDR comprenden las secuencias que se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Secuencias de CDR y secuencias de regiones variables de huMy9-6 y huMy9-6-IgG4-S228P

VH-CDR1 (SEQ ID NO: 13)	SYYIH
VH-CDR2 (SEQ ID NO: 14)	VIYPGNDDISYNQKFQG
VH-CDR3 (SEQ ID NO: 15)	EVRLRYFDV
VH (SEQ ID NO: 16)	QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEW VGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CAREVRLRYFDVWGQGTTTVTVSS
VL-CDR1 (SEQ ID NO: 17)	KSSQSVFFSSSQKNYLA
VL-CDR2 (SEQ ID NO: 18)	WASTRES
VL-CDR3 (SEQ ID NO: 19)	HQYLSSRT
VL (SEQ ID NO: 20)	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLS SRFTFGQGTKLEIK

[0162] En algunos aspectos, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD33 comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD33 comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

[0163] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia con al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al

menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia con al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

[0164] En algunos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo anti-CD33 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 21. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 22.

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo huMy9-6-IgG4-S228P.

Cadena pesada (SEQ ID NO: 21)	QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEW VGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYY CAREVRLRYFDVWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVERESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLGLK
Cadena ligera (SEQ ID NO: 22)	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIIYCHQYLS SRTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0165] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD33 comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al

menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 22. El anticuerpo anti-CD33 comprende una cadena pesada como se indica en la SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera como se indica en la SEQ ID NO: 22.

[0166] Un anticuerpo “que se une” a una diana molecular o un antígeno de interés es uno capaz de unirse a ese antígeno con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil para dirigirse a una célula que expresa el antígeno.

[0167] En la presente invención, el grupo “Bm” se puede conjugar con más de un neodegradador. En algunos aspectos, “Bm” se puede conjugar con 1 a 10 neodegradadores. En algunos aspectos, “Bm” se puede conjugar con 1 a 9 neodegradadores. En algunos aspectos, “Bm” se puede conjugar con 1 a 8 neodegradadores. En algunos aspectos, “Bm” se puede conjugar con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 neodegradadores. En algunos aspectos, “Bm” se puede conjugar con 7 u 8 neodegradadores. En algunos aspectos, “Bm” se conjuga con 5 neodegradadores. En algunos aspectos, “Bm” se conjuga con 6 neodegradadores. En algunos aspectos, “Bm” se conjuga con 7 neodegradadores. En algunos aspectos, “Bm” se conjuga con 8 neodegradadores. En algunos aspectos, “Bm” se conjuga con 9 neodegradadores.

IV. Composiciones y métodos de uso

[0168] Los conjugados y/o compuestos descritos en el presente documento pueden estar en forma de sales farmacéuticamente aceptables. En algunos aspectos, dichas sales se derivan de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos.

[0169] Ejemplos de sales de adición de ácido adecuadas incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, lucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato,

oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato. y undecanoato.

[0170] Ejemplos de sales de adición de bases adecuadas incluyen sales de amonio; sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio y potasio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y magnesio; sales con bases orgánicas, tales como sales de dicitclohexilamina, *N*-metil-D-glucamina; y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y similares.

[0171] Por ejemplo, Berge enumera las siguientes sales comercializadas aprobadas por la FDA: aniones acetato, besilato (bencenosulfonato), benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio (etilendiaminotetraacetato), camsilato (alcanforsulfonato), carbonato, cloruro, citrato, diclorhidrato, edetato, (etilendiaminotetraacetato), edisilato (1,2-etanodisulfonato), estolato (lauril sulfato), esilato (etanosulfonato), fumarato, gluceptato (glucoheptonato), gluconato, glutamato, glicolilarsanilato (glicolamidofenilarsonato), hexilresorcinato, hidrabamina (*N,N'*-di(deshidroabietil)etilendiamina), bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato (2-hidroxietanosulfonato), lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato (metanosulfonato), bromuro de metilo, nitrato de metilo, metilsulfato, mucato, napsilato (2-naftalenosulfonato), nitrato, pamoato (embonato), pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato (8-cloroteofilinato) y trietioduro; cationes orgánicos benztatina (*N,N'*-dibenciletilendiamina), cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (*N*-metilglucamina) y procaína; y cationes metálicos aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc.

[0172] Berge enumera además las siguientes sales comercializadas (fuera de los Estados Unidos) no aprobadas por la FDA: aniones adipato, alginato, aminosalicilato, anhidrometilenocitrato, arecolina, aspartato, bisulfato, butilbromuro, alcanforato, digluconato, dihidrobromuro, disuccinato, glicerofosfato, hemisulfato, hidrofluoruro, yodhidrato, bis(salicilato de metileno), napadisilato (1,5-naftalenodisulfonato), oxalato, pectinato, persulfato, barbitúrico de feniletilo, picrato, propionato, tiocianato, tosilato y undecanoato; cationes orgánicos benetamina (*N*-bencilfenetilamina), clemizol (1-*p*-clorobencil-2-pirrolidin-1'-ilmetilbencimidazol), dietilamina, piperazina y trometamina (tris(hidroximetil)aminometano); y cationes metálicos bario y bismuto.

[0173] Las composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de neodegradadores descritos en el presente documento también pueden comprender portadores, excipientes y auxiliares adecuados que pueden diferir según el modo de administración.

[0174] En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas se pueden formular como una forma de dosificación parenteral adecuada. Dichas formulaciones se pueden preparar mediante diversos métodos conocidos en la materia. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar directamente en el torrente sanguíneo, en el músculo o directamente en un órgano. Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen intravenoso, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular y subcutáneo. Los dispositivos adecuados para la administración parenteral incluyen inyector con aguja, inyector sin aguja y técnicas de infusión.

[0175] Las composiciones parenterales son típicamente soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tampón. Sin embargo, la composición también se puede formular como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para usarse junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril libre de pirógenos.

[0176] La preparación de composiciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo, mediante liofilización, se puede realizar fácilmente usando técnicas estándar muy conocidas por las personas con conocimientos básicos en la materia.

[0177] Las composiciones para administración parenteral se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada. Por consiguiente, las composiciones pueden formularse como un líquido sólido, semisólido o tixotrópico para administración como un depósito implantado que proporciona una liberación modificada del agente activo.

[0178] Las formulaciones parenterales se pueden mezclar con otros excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados, usados en formas de dosificación parenteral tales como, entre otros, conservantes.

[0179] En otro aspecto, las composiciones farmacéuticas se pueden formular como formas de dosificación oral adecuadas tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, suspensiones, soluciones, emulsiones y similares. Pueden estar presentes otros portadores adecuados tales como desintegrantes, diluyentes, agentes quelantes, aglutinantes, deslizantes, lubricantes, cargas, agentes de carga, antiadherentes y similares.

[0180] Las formulaciones de dosificación oral también pueden contener otros excipientes farmacéuticos adecuados tales como edulcorantes, vehículos/agentes humectantes, agentes

colorantes, agentes saborizantes, conservantes, agentes potenciadores de la viscosidad/espesantes y similares.

[0181] Los conjugados de neodegradadores descritos en el presente documento se pueden usar para tratar diversos cánceres. Ciertos conjugados de la presente invención pueden ser superiores en términos de expresión de eficacia, farmacocinética (por ejemplo, absorción, distribución, metabolismo, excreción), solubilidad (por ejemplo, solubilidad en agua), interacción con otros medicamentos (por ejemplo, acción inhibidora de enzimas metabolizadoras de fármacos), seguridad (por ejemplo, toxicidad aguda, toxicidad crónica, toxicidad genética, toxicidad reproductiva, cardiotoxicidad, carcinogenicidad, toxicidad central) y/o estabilidad (por ejemplo, estabilidad química, estabilidad a una enzima), y puede ser útil como medicamento.

[0182] Los conjugados de neodegradadores de la presente invención se pueden usar como medicamentos tales como agentes para la profilaxis o tratamiento de enfermedades, por ejemplo, cánceres, por ejemplo, cánceres colorrectales (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer colorrectal familiar, cáncer colorrectal hereditario sin poliposis, tumor del estroma gastrointestinal), cánceres de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma maligno), mesotelioma, cánceres de páncreas (por ejemplo, carcinoma ductal pancreático, tumor endocrino pancreático), cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cánceres de estómago/gástricos (por ejemplo, adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso), cáncer de duodeno, cáncer de intestino delgado, cánceres de mama (por ejemplo, carcinoma ductal invasivo, carcinoma ductal no invasivo, cáncer de mama inflamatorio), cánceres de ovario (por ejemplo, cáncer epitelial de ovario, tumor extragonadal de células germinales, tumor de ovario de células germinales, tumor de ovario de bajo potencial maligno), tumor de testículo, cánceres de próstata (por ejemplo, cáncer de próstata dependiente de hormonas, cáncer de próstata no dependiente de hormonas, cáncer de próstata resistente a la castración), cánceres de hígado (por ejemplo, cáncer hepatocelular, cáncer primario de hígado, cáncer de vías biliares extrahepáticas), cánceres de tiroides (por ejemplo, carcinoma medular de tiroides), cánceres renales (por ejemplo, cánceres de células renales (por ejemplo, cáncer de células renales de células claras), cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter), cánceres uterinos (por ejemplo, cáncer de cuello uterino, cáncer del cuerpo uterino, sarcoma uterino), coriocarcinoma gestacional, tumores cerebrales (por ejemplo, meduloblastoma, glioma, tumores astrocíticos pineales, tumores pilocíticos astrocitoma, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico, adenoma hipofisario), retinoblastoma, cánceres de piel

(por ejemplo, basalioma, melanoma maligno), sarcomas (por ejemplo, rabdomiosarcoma, leiomiomasarcoma, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de células fusiformes), tumor óseo maligno, cáncer de vejiga, cánceres hematológicos/sanguíneos (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemias (por ejemplo, leucemia mieloide aguda), linfoma maligno, enfermedad de Hodgkin, enfermedad mieloproliferativa crónica), cáncer de sitio primario desconocido; un inhibidor del crecimiento del cáncer; un inhibidor de la metástasis del cáncer; un promotor de la apoptosis; un agente para el tratamiento de lesiones precancerosas (por ejemplo, síndromes mielodisplásicos); y similares.

[0183] En ciertos aspectos, los conjugados de neodegradadores de la presente invención se pueden usar como medicamento para el tratamiento de cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, linfoma o cánceres hematológicos.

[0184] Además, los conjugados de neodegradadores de la presente invención se pueden usar al mismo tiempo que, antes o después de una terapia no farmacológica. Para ser precisos, los conjugados se pueden combinar con una terapia no farmacológica como (1) cirugía, (2) quimioterapia hipertensiva con angiotensina II, etc., (3) terapia génica, (4) termoterapia, (5) crioterapia, (6) cauterización con láser y (7) radioterapia.

[0185] Por ejemplo, al usar un conjugado de neodegradadores de la presente invención antes o después de la cirugía mencionada anteriormente y similares, se pueden obtener efectos tales como prevención de la aparición de resistencia, prolongación de la supervivencia libre de enfermedades, supresión de metástasis o recurrencia del cáncer, prolongación de la vida. y se pueden ofrecer cosas similares.

[0186] Además, es posible combinar un tratamiento con conjugados de neodegradadores de la presente invención con una terapia de apoyo: (i) administración de antibióticos (por ejemplo, tipo β -lactamasa tal como pansporina y similares, tipo macrólido tal como claritromicina y similares) para las complicaciones de diversas enfermedades infecciosas, (ii) administración de transfusiones altas en calorías, preparación de aminoácidos o preparación vitamínica general para mejorar la desnutrición, (iii) administración de morfina para mitigar el dolor, (iv) administración de un agente farmacéutico para mejorar los efectos secundarios tales como náuseas, vómitos, anorexia, diarrea, leucopenia, trombocitopenia, disminución de la concentración de hemoglobina, caída del cabello, hepatopatía, renopatía, DIC, fiebre. y similares y (v) administración de un agente farmacéutico para suprimir la resistencia a múltiples fármacos del cáncer y similares.

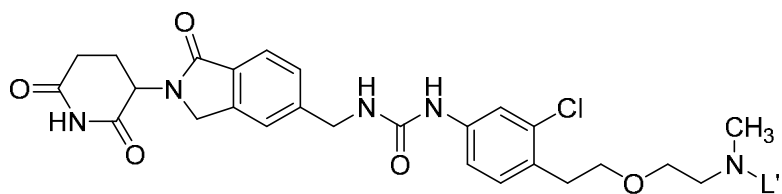
[0187] En algunos aspectos, el neodegradador o el conjugado de neodegradadores de la invención se pueden usar en combinación con una terapia estándar de atención, por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes anticancerígenos y/o agentes inmunomoduladores). Por consiguiente, en ciertos aspectos, un método para tratar un tumor descrito en el presente documento comprende administrar el neodegradador o el conjugado de neodegradadores de la invención en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos aspectos, el neodegradador o el conjugado de neodegradadores de la invención se pueden usar en combinación con uno o más agentes anticancerígenos, por ejemplo, de manera que se puedan dirigir a múltiples elementos de la vía inmune. En algunos aspectos, un agente anticancerígeno comprende un inhibidor de punto de control inmunológico (es decir, bloquea la señalización a través de la vía particular del punto de control inmunológico). Ejemplos no limitantes de inhibidores de punto de control inmunológico que se pueden usar en los presentes métodos comprenden un antagonista de CTLA-4 (por ejemplo, anticuerpo anti-CTLA-4), antagonista de PD-1 (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-PD-L1), antagonista de TIM-3 (por ejemplo, anticuerpo anti-TIM-3) o combinaciones de los mismos.

[0188] En algunos aspectos, el neodegradador o el conjugado de neodegradadores de la invención se administra al sujeto antes o después de la administración del agente terapéutico adicional. En otros aspectos, el neodegradador o el conjugado de neodegradadores de la invención se administra al sujeto simultáneamente con el agente terapéutico adicional. En ciertos aspectos, el neodegradador o el conjugado de neodegradadores de la invención y el agente terapéutico adicional se pueden administrar simultáneamente como una composición única en un portador farmacéuticamente aceptable. En otros aspectos, el neodegradador o el conjugado de neodegradadores de la invención y el agente terapéutico adicional se administran simultáneamente como composiciones separadas.

[0189] En algunos aspectos, un sujeto que puede tratarse con el neodegradador o el conjugado de neodegradadores de la presente invención es un animal no humano tal como una rata o un ratón. En algunos aspectos, el sujeto que se puede tratar es un ser humano.

V. Métodos de preparación de neodegradadores y composiciones

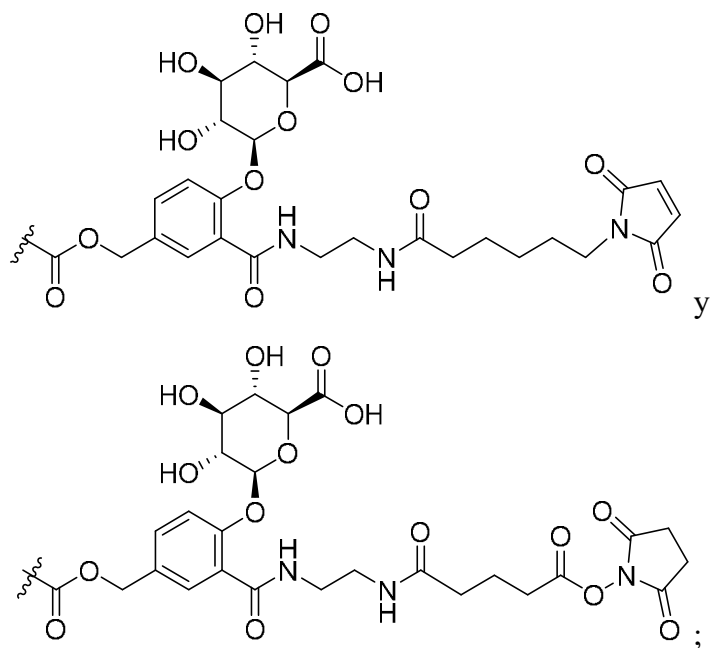
[0190] La presente invención proporciona un método para preparar los conjugados de neodegradadores, proceso que comprende hacer reaccionar una fracción de unión con un compuesto de la fórmula (I-1):



(I-1);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

[0191] L' es un precursor del enlazador seleccionado entre



en donde:

[0192]  es el punto de unión al átomo de nitrógeno.

[0193] Como se describe en el presente documento, los precursores del enlazador contienen un grupo heterobifuncional que se conecta a la fracción de unión.

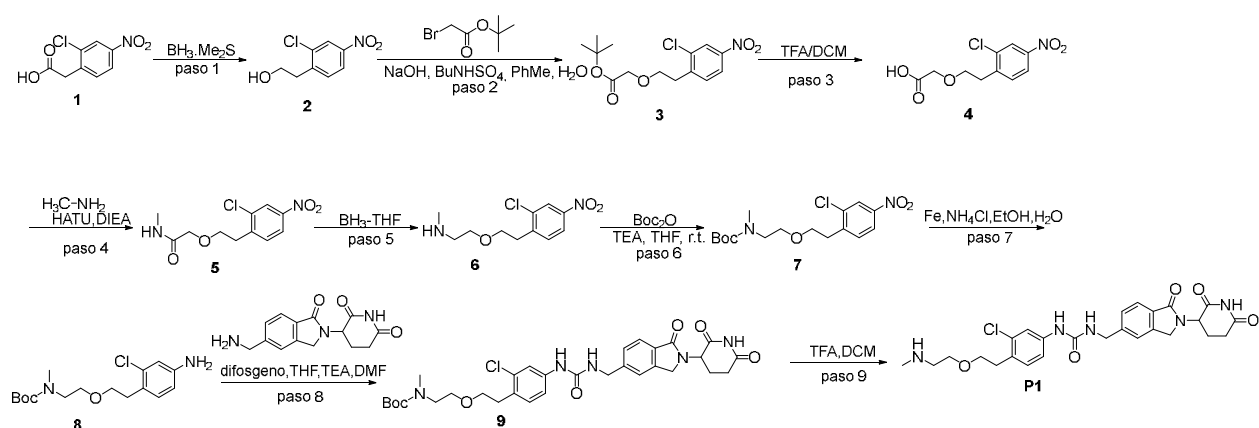
[0194] En algunos aspectos, la fracción de unión se trata previamente antes de reaccionar con el compuesto de la fórmula (I-1). En ciertos aspectos, el compuesto de la fórmula (I-1) se hace reaccionar con una fracción de unión, que comprende un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo. En aspectos en los que la fracción de unión es un anticuerpo, el anticuerpo se puede pretratar para reducir los disulfuros entre cadenas antes de la reacción con el compuesto de la fórmula (I-1).

Ejemplos

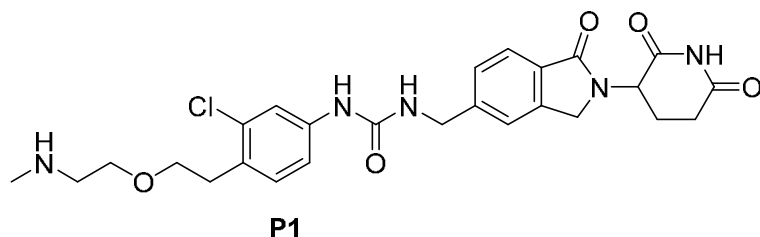
Métodos sintéticos generales e intermedios

[0195] Los compuestos de la presente invención pueden ser preparados por una persona con conocimientos básicos en la materia a la luz de la presente invención, y/o mediante referencia a los esquemas que se muestran a continuación y los ejemplos sintéticos. Se establecen vías sintéticas ejemplares en los esquemas siguientes y en los ejemplos. Debe entenderse que las variables (por ejemplo, grupos “R”) que aparecen en los siguientes esquemas y ejemplos deben leerse independientemente de las que aparecen en otras partes de la solicitud. Una persona con conocimientos básicos en la materia comprenderá fácilmente cómo los esquemas y ejemplos mostrados a continuación ilustran la preparación de los compuestos descritos en el presente documento.

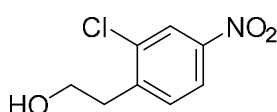
Las abreviaturas utilizadas en los esquemas generalmente siguen las convenciones utilizadas en la materia. Las abreviaturas químicas utilizadas en la memoria descriptiva y los ejemplos se definen a continuación. Las abreviaturas utilizadas en los esquemas generalmente siguen las convenciones utilizadas en la materia. Las abreviaturas químicas utilizadas en la memoria descriptiva y los ejemplos se definen de la siguiente manera: “Me” para metilo; “Bu” para butilo; “Ph” para fenilo; “TFA” para ácido trifluoroacético, “DCM” para diclorometano “HATU” para hexafluorofosfato de *N*-óxido de *N*-[(dimetilamin)-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]piridin-1-ilmetilen]-metilmetanaminio; “THF” para tetrahidrofurano; “BOC” o “Boc” para tributoxicarbonilo; “TEA” para trietilamina; “EtOH” para etanol; “DMF” para *N,N*-dimetilformamida; “PE” para éter de petróleo; “EtOAc” para acetato de etilo; “DIEA” para diisopropiletilamina; “MeOH” para “metanol”; h por horas; min por minutos; “Ac” para acetato; “EDCI” para 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; “HOBT” para hidrato de 1-hidroxibenzotriazol; “ACN” para acetonitrilo; “TCEP” para (tris(2-carboxietil)fosfina); “DMA” para *N,N*-dimetiactamida;



Esquema 1: *Preparación de neodegradador P1*

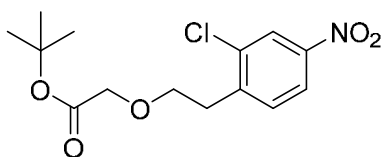


Ejemplo 1: Síntesis del neodegradador P1



Paso 1: Síntesis del Compuesto 2

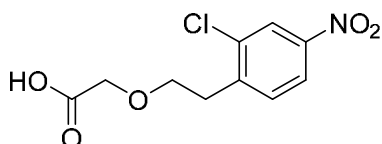
[0196] A una solución agitada de ácido 2-cloro-4-nitrofenil)acético (Compuesto 1, 5,00 g, 23,19 mmol, 1,00 eqv.) en THF (75,00 ml) se añadió BH₃-Me₂S (10 M en THF) (5,80 ml, 58,0 mmol, 2,50 eqv.) gota a gota a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 2 h a 70 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (PE:EtOAc = 1:1) para obtener 2-(2-cloro-4-nitrofenil)etanol (3 g, 64 %) en forma de un sólido amarillo. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,26 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 8,10-8,05 (m, 1H), 7,50 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 3,99-3,91 (m, 2H), 3,16-3,09 (m, 2H).



Paso 2: Síntesis del Compuesto 3

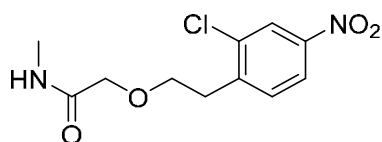
[0197] A una solución agitada de 2-cloro-4-nitrofenil)etanol (Compuesto 2, 5,00 g, 24,800 mmol, 1,00 eqv.) y 2-bromoacetato de terc-butilo (29,0 ml, 148,28 mmol, 8,00 eqv.) en tolueno (150,00 ml) se añadió Bu₄NHSO₄ (6,74 g, 19,84 mmol, 0,80 eqv.). A la mezcla anterior se añadió NaOH (5 M en H₂O) (500,00 ml) gota a gota durante 40 min a 0 °C. La mezcla resultante se agitó durante 2 h más a 25 °C. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (400 ml) y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. Después

de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (PE:EtOAc = 4:1) para obtener 2-[2-(2-cloro-4-nitrofenil)etoxi]acetato de terc-butilo (8 g, 65 %) como un aceite amarillo. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,23 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 8,10-8,04 (m, 1H), 7,60 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 4,09 (s, 2H), 3,83-3,80 (m, 2H), 3,17-3,14 (m, 2H), 1,45 (s, 9H).



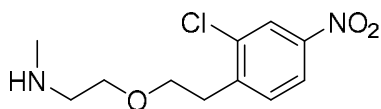
Paso 3: Síntesis del Compuesto 4

[0198] A una solución agitada de 2-[2-(2-cloro-4-nitrofenil)etoxi]acetato de terc-butilo (Compuesto 3, 8,00 g, 16,14 mmol, 1,00 eqv., 63,7 %) en DCM (80,00 ml) se añadió TFA. (16,00 ml) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró al vacío. La mezcla resultante se diluyó con agua (500 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 ml) y se secaron con Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. Esto dio como resultado ácido [2-(2-cloro-4-nitrofenil)etoxi]acético (6,5 g, bruto) en forma de un aceite amarillo. LCMS (ESI): 517 (2M-H)-



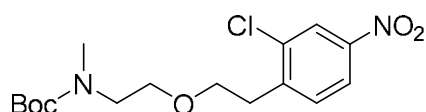
Paso 4: Síntesis del Compuesto 5

[0199] A una solución agitada de ácido [2-(2-cloro-4-nitrofenil)etoxi]acético (Compuesto 4, 6,30 g, 21,84 mmol, 1,00 eqv., 90 %) y HATU (12,46 g, 32,76 mmol, 1,50 eqv.) se añadió DMF (65,00 ml) $\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ (1,77 g, 26,21 mmol, 1,20 eqv.) y DIEA (15,20 g, 117,8 mmol, 4,00 eqv.) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla resultante se diluyó con agua. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml) y se secaron con Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM:MeOH = 10:1) para obtener 2-[2-(2-cloro-4-nitrofenil)etoxi]-N-metilacetamida (10 g, pureza: 50 %, rendimiento: 84 %) como un aceite amarillo. LCMS (ESI): 273,28 (M+H) $^+$



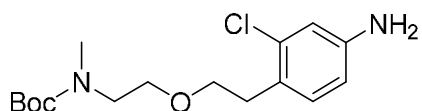
Paso 5: Síntesis del Compuesto 6

[0200] A una solución agitada de 2-[2-(2-cloro-4-nitrofenil)etoxi]-N-metilacetamida (Compuesto 5, 3,3 g, 12,10 mmol, 1,00 eqv.) en THF (35,00 ml) se añadió BH_3 -THF (1 M en THF) (12,10 ml, 12,10 mmol, 1,00 eqv.) gota a gota a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 2 h a 70 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La reacción se apagó con MeOH. El residuo se acidificó a pH 6 con 1 N de HCl. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (20 ml). La fase acuosa se basificó a pH 8 con NaHCO_3 saturado (sat., ac.). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml), se lavó con salmuera (50 ml) y se secó con Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. Esto dio como resultado [2-[2-(2-cloro-4-nitrofenil)etoxi]etil](metil)amina (2,5 g, 80 %) en forma de un aceite amarillo. LCMS (ESI): 259,26 (M+H)⁺



Paso 6. Síntesis del Compuesto 7

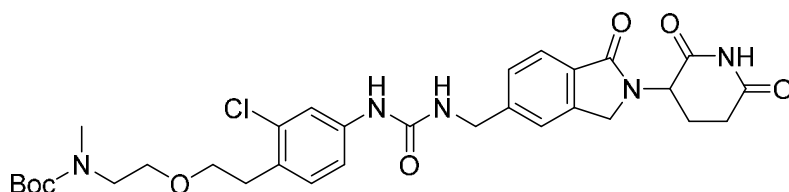
[0201] A una solución agitada de [2-[2-(2-cloro-4-nitrofenil)etoxi]etil](metil)amina (Compuesto 6, 2,50 g, 9,69 mmol, 1,00 eqv.) y Boc_2O (2,53 g, 11,6 mmol, 1,20 eqv.) en THF (40 ml) se añadió TEA (1,17 g, 11,6 mmol, 1,20 eqv.) gota a gota a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 2 h. La mezcla resultante se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM:MeOH = 5:1) para obtener N-[2-[2-(2-cloro-4-nitrofenil)etoxi]etil]-N-metilcarbamato de terc-butilo (1,70 g, 50 %) como aceite amarillo. LCMS (ESI): 359,36 (M+H)⁺



Paso 7: Síntesis del Compuesto 8

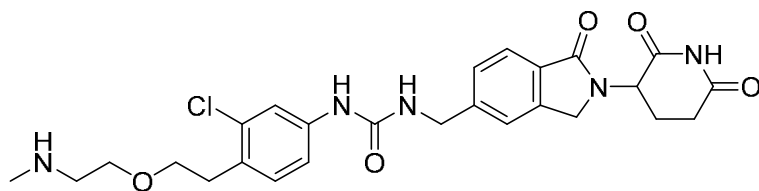
[0202] A una solución agitada de N-[2-[2-(2-cloro-4-nitrofenil)etoxi]etil]-N-metilcarbamato de terc-butilo (Compuesto 7, 1,70 g, 4,74 mmol, 1,00 eqv.) y NH_4Cl (750 mg, 14,2

mmol, 3,00 eqv.) en EtOH (85 ml) y H₂O (17 ml) se añadió Fe (1,3 g, 23,7 mmol, 5,00 eqv.) a 25 °C. La mezcla se agitó a 80 °C durante 2 h. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente. La mezcla resultante se filtró y la torta de filtración se lavó con EtOH (3 x 50 ml). El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 4:1) para obtener N-[2-[2-(4-amino-2-clorofenil)etoxi]etil]-N-metilcarbamato de terc-butilo (900 mg, 58 %) como aceite amarillo. LCMS (ESI): 329,33 (M+H)⁺



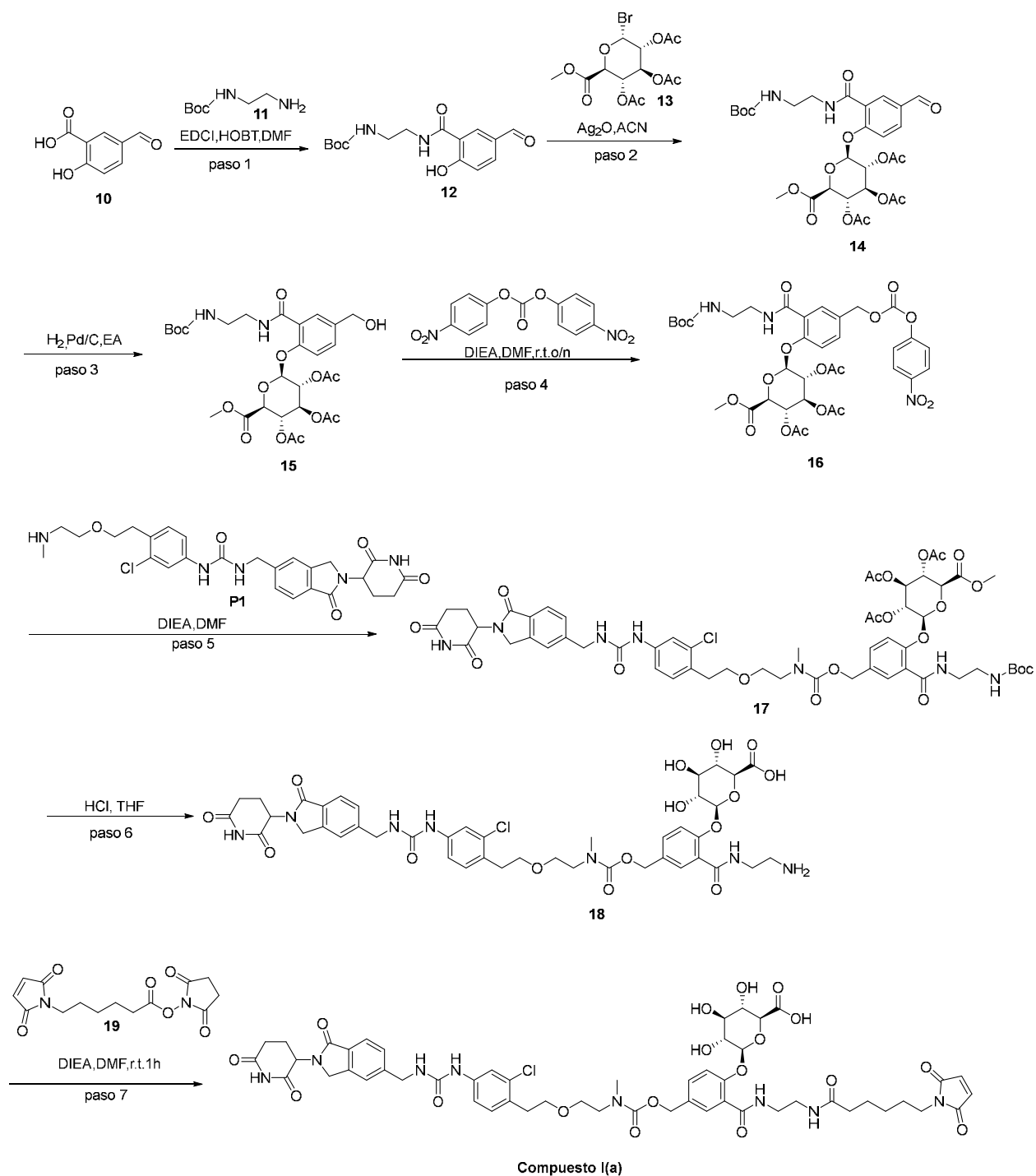
Paso 8: Síntesis del Compuesto 9

[0203] A una solución agitada de N-[2-[2-(4-amino-2-clorofenil)etoxi]etil]-N-metilcarbamato de terc-butilo (Compuesto 8, 500 mg, 1,52 mmol, 1,00 eqv.) en THF (10 ml) se añadió difosgeno (601 mg, 3,04 mmol, 2,00 eqv.) gota a gota a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. La mezcla resultante se concentró al vacío y se volvió a disolver en DMF (5 ml). A una mezcla agitada de 3-[5-(aminometil)-1-oxo-3H-isoindol-2-il]piperidin-2,6-diona (INT1, preparada como se describe a continuación, 499 mg, 1,82 mmol, 1,20 eqv.) y se añadió TEA (1,56 g, 15,45 mmol, 10,00 eqv.) en DMF (20 ml) a la solución mencionada anteriormente gota a gota a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. La mezcla resultante se diluyó con 40 ml de agua helada. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 40 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 x 40 ml) y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM: MeOH = 10:1) para obtener (2-(2-cloro-4-(3-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-ilo)-1-oxoisoindolin-5-il)metil)ureido)fenetoxi)etil)(metil)carbamato de terc-butilo (670 mg, 70 %) como un sólido blanco. LCMS: (ESI): 628,63 (M+H)⁺

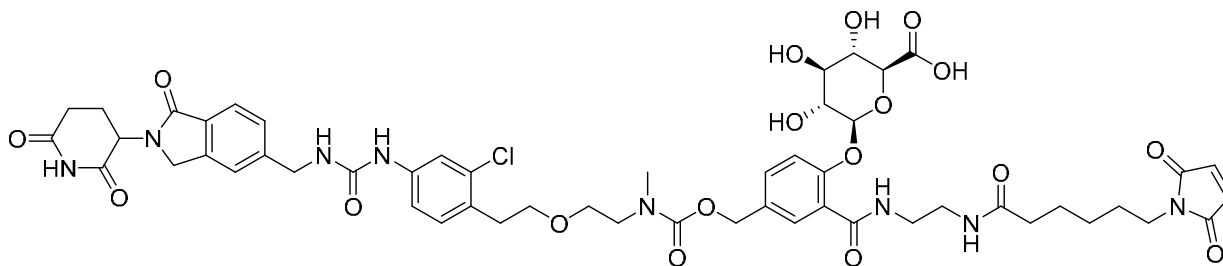


Paso 9: Síntesis del neodegradador P1

[0204] A una solución agitada de N-[2-(2-[2-cloro-4-([2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil)amino]fenil]etoxi]etil]-N-metilcarbamato de terc-butilo (Compuesto 9, 670 mg, 1,07 mmol, 1 eqv.) en DCM (10 ml) se añadió TFA (2,5 ml) gota a gota a 0 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. La mezcla resultante se concentró al vacío. El producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa con las siguientes condiciones: columna, columna OBD SunFire C18 Prep, 100 µm, 19x250 mm; fase móvil, agua (0,05 % de TFA) y ACN (5 % de fase B hasta 60 % en 30 min); detector, UV 220nm. La fracción recolectada se liofilizó para obtener 1-(3-cloro-4-[2-[2-(metilamin)etoxi]etil]fenil)-3-[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]urea (500 mg, 89 %) como un sólido blanco. LCMS (ESI): 528,53 (M+H)⁺. RMN de ¹H (400 MHz, metanol-*d*₄) δ 7,77 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,57-7,53 (m, 2H), 7,49 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,21 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H), 5,19-5,1 (m, 1H), 4,55-4,41 (m, 4H), 3,75-3,67 (m, 4H), 3,21-3,15 (m, 2H), 3,03-3,96 (m, 2H), 2,96-2,84 (m, 1H), 2,83-2,73 (m, 2H), 2,69 (s, 3H), 2,55-2,42 (m, 1H), 2,21-2,12 (m, 1H).

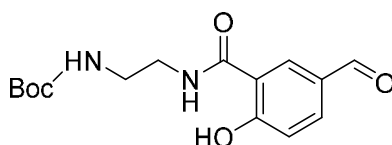


Esquema 2: Síntesis del complejo de neodegradador P1-enlazador β-glucurónico (Compuesto I(a))



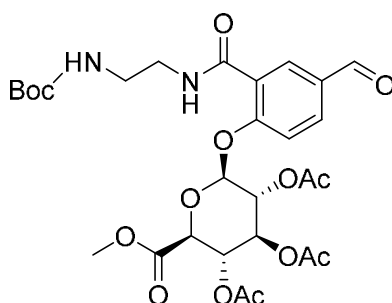
Compuesto I(a)

Ejemplo 2: Síntesis del Compuesto (Ia)



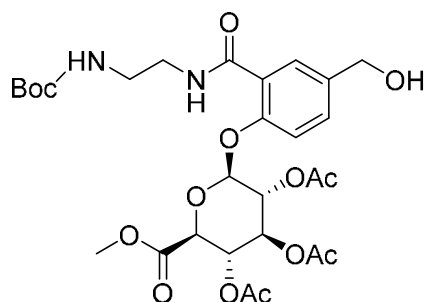
Paso 1: Síntesis del Compuesto 12

[0205] A una solución agitada de ácido 5-formil-2-hidroxibenzoico, **10** (20 g, 120,38 mmol, 1,00 eqv.) en DMF (200 ml) se añadieron EDCI (28 g, 144,44 mmol, 1,20 eqv.), HOBT (20 g, 144,46 mmol, 1,20 eqv.) y N-(2-aminoetil)carbamato de terc-butilo, **11** (23 g, 144,46 mmol, 1,20 eqv.) en porciones a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se apagó con agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (200 ml), se secó con Na₂SO₄. Después de la filtración, el filtrado se concentró hasta sequedad al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se eluyó con PE/EA (2:3) para obtener N-[2-[(5-formil-2-hidroxifenil)formamido]etil]carbamato de terc-butilo, **12** (23 g, 53 %) como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): 209 [M+H-100]⁺, 309 [M+H]⁺, 331 [M+Na]⁺.



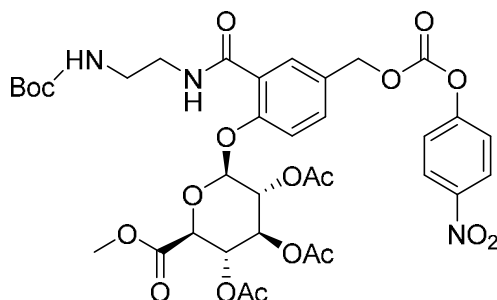
Paso 2: Síntesis del Compuesto 14

[0206] A una solución agitada de N-[2-[(5-formil-2-hidroxifenil)formamido]etil]carbamato de terc-butilo, **12** (23 g, 74,59 mmol, 1,00 eqv.) en ACN (600 ml) se añadieron Ag₂O (34,57 g, 149,17 mmol, 2,00 eqv.) y (2S,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-bromooxan-2-carboxilato de metilo, **13** (32,6 g, 82,05 mmol, 1,10 eqv.) en porciones a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. Después de la filtración, el filtrado se concentró hasta sequedad al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se eluyó con PE/EA (1:4) para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-([2-[(terc-butoxicarbonil)amino]etil]carbamoyl)-4-formilfenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo, **14** (38 g, 76 %) como un sólido verde. LCMS (ES, m/z): 525 [M+H-100]⁺, 625 [M+H]⁺, 647 [M+Na]⁺.



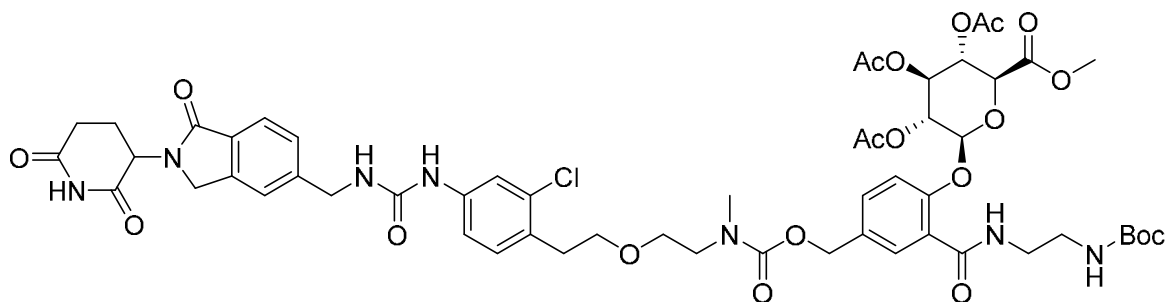
Paso 3: Síntesis del Compuesto 15

[0207] A una solución agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-({2-[(terc-butoxicarbonil)amino]etil}carbamoyl)-4-formilfenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo, **14** (20 g, 32,02 mmol, 1,00 eqv.) en EA (200 ml) se añadió Pd/C (4,0 g, 10 %) en porciones a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de hidrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. Después de la filtración, el filtrado se concentró hasta sequedad al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se eluyó con DCM/MeOH (19:1) para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-({2-[(terc-butoxicarbonil)amino]etil}carbamoyl)-4-(hidroximetil)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo, **15** (12,5 g, 58 %) como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): 527 [M+H-100]⁺, 627 [M+H]⁺, 649 [M+Na]⁺.



Paso 4: Síntesis del Compuesto 16

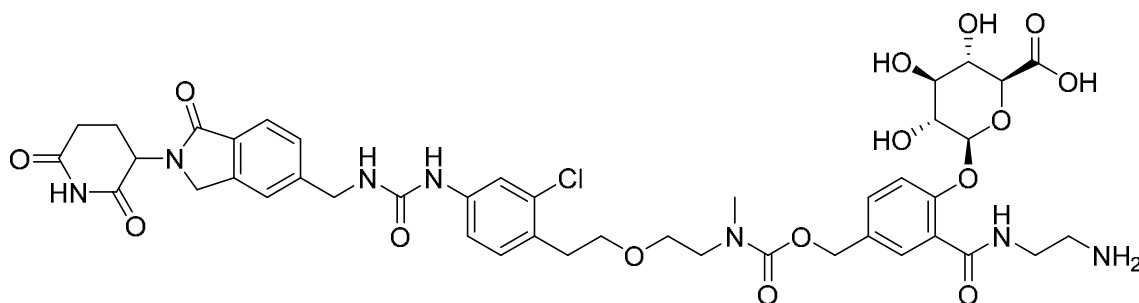
[0208] A una solución agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxy)-6-[2-({2-[(terc-butoxicarbonil)amino]etil}carbamoil)-4-(hidroximetil)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo, **15** (5,0 g, 7,98 mmol, 1,00 eqv.) en DMF (50 ml) se añadieron carbonato de bis(4-nitrofenilo) (2,67 g, 8,77 mmol, 1,10 eqv.) y DIEA (2,0 g, 15,94 mmol, 2,00 eqv.) en porciones a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía flash inversa con las siguientes condiciones: columna, gel de sílice C18; fase móvil, ACN en agua (0,1 % de FA), gradiente del 10 % al 70 % en 40 min; detector, UV 254 nm. La fracción recolectada se concentró hasta sequedad al vacío para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxy)-6-[2-({2-[(terc-butoxicarbonil)amino]etil}carbamoil)-4-[(4-nitrofenoxycarbonil)oxi]metil}fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo, **16** (5,3 g, 78 %) como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): 692 [M+H-100]⁺, 792 [M+H]⁺, 814 [M+Na]⁺.



Paso 5: Síntesis del Compuesto 17

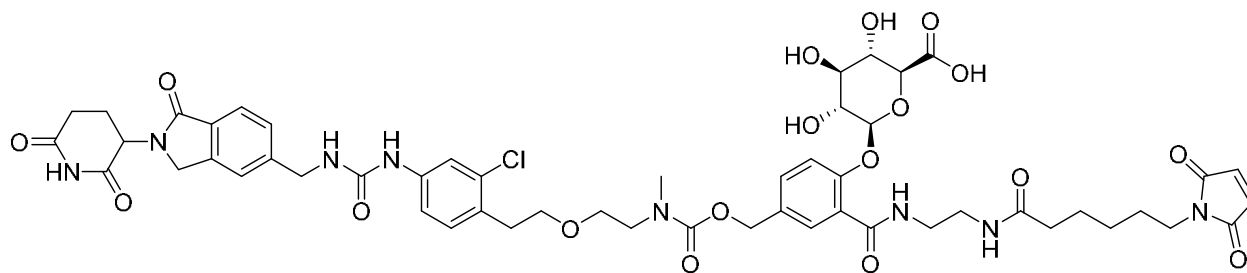
[0209] A una solución agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxy)-6-[2-({2-[(terc-butoxicarbonil)amino]etil}carbamoil)-4-[(4-nitrofenoxycarbonil)oxi]metil}fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilmetil, **16** (550 mg, 0,69 mmol, 1,00 eqv.) y 1-(3-cloro-4-{2-[2-(metilamin)etoxi]etil}fenil)-3-{[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil}urea, **P1** (367 mg, 0,69 mmol, 1,00 eqv.) en DMF (6,0 ml) se añadió DIEA (180 mg, 1,38 mmol, 2,00 eqv.) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante

se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía flash inversa con las siguientes condiciones: columna, gel de sílice C18; fase móvil, ACN en agua (0,1 % de FA), gradiente del 10 % al 70 % en 40 min; detector, UV 254 nm. La fracción recolectada se concentró al vacío para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-({2-[(terc-butoxicarbonil)amino]etil} carbamoil)-4-[(2-(2-{2-cloro-4-[(2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil} carbamoil)amino]fenil} etoxi)etil](metil)carbamoil} oxi)metil]fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo, **17** (670 mg, 77 %) como un sólido verde. LCMS (ES, m/z): 1080 [M+H-100]⁺, 1180 [M+H]⁺, 1202 [M+Na]⁺.



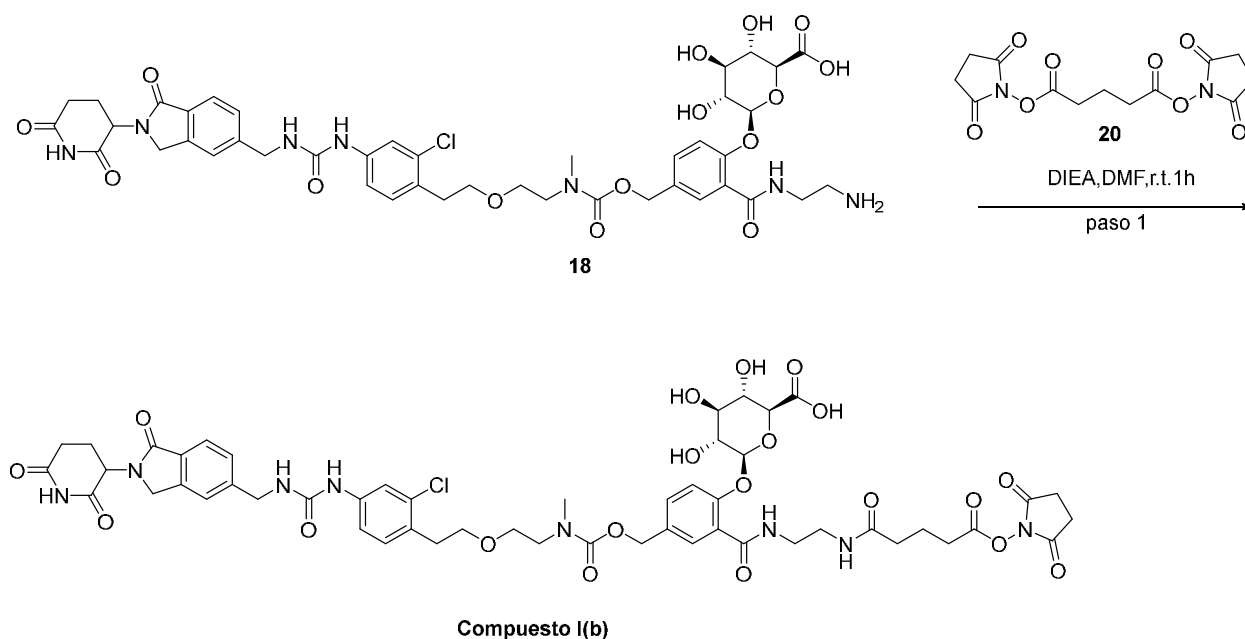
Paso 6: Síntesis del Compuesto 18

[0210] A una solución agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-({2-[(terc-butoxicarbonil)amino]etil} carbamoil)-4-[(2-(2-{2-cloro-4-[(2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil} carbamoil)amino]fenil} etoxi)etil](metil)carbamoil} oxi)metil]fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo, **17** (660 mg, 0,56 mmol, 1,00 eqv.) en THF (12 ml) se añadió HCl (12 ml, 6,0 N) en porciones a 45 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 4 h a 45 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía flash inversa con las siguientes condiciones: columna, gel de sílice C18; fase móvil, ACN en agua (0,1 % de FA), gradiente del 10 % al 40 % en 30 min; detector, UV 254 nm. La fracción recolectada se liofilizó para obtener ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-{2-[(2-aminoetil)carbamoil]-4-[(2-(2-{2-cloro-4-[(2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil} carbamoil)amino]fenil} etoxi)etil](metil)carbamoil} oxi)metil]fenoxi}-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico (320 mg, 54 %), **18** como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): 940 [M+H]⁺, 962 [M+Na]⁺.

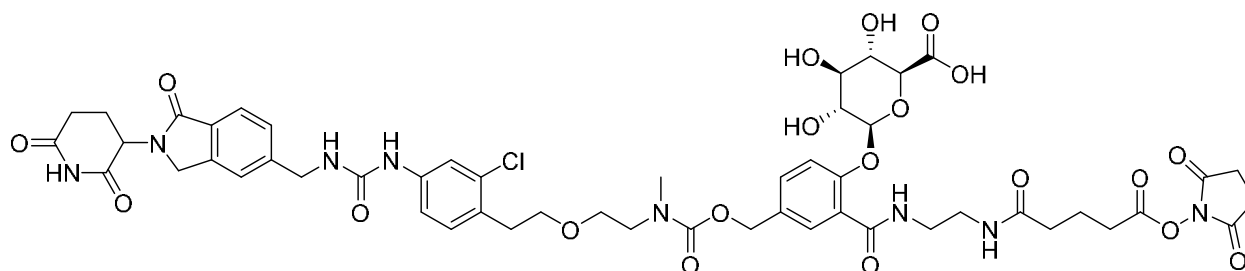


Paso 7: Síntesis del Compuesto (Ia)

[0211] A una solución agitada de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-{2-[(2-aminoetil)carbamoyl]-4-[(2-((2-(2-chloro-4-[(2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1-oxo-3H-isoindol-5-yl)methyl)carbamoyl)amino]fenil)etoxi)etil](metil)carbamoyl)oxi)metil]fenoxi}-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico, **18** (100 mg, 0,11 mmol, 1,00 eqv.) y 6-(2,5-dioxopirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, **19** (36 mg, 0,12 mmol, 1,10 eqv.) en DMF (1,00 ml) se añadió DIEA (27 mg, 0,21 mmol, 2,0 eqv.) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa con las siguientes condiciones: columna Xselect CSH F-Phenyl OBD, 19x250 mm; fase móvil A: agua (0,1 % de FA), fase móvil B: ACN; velocidad de flujo: 25 ml/min; detector, UV 254 nm. La fracción recolectada se liofilizó para obtener ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-{4-[(2-(2-(2-chloro-4-[(2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1-oxo-3H-isoindol-5-yl)methyl)carbamoyl)amino]fenil)etoxi)etil](metil)carbamoyl)oxi)metil]-2-(2-[6-(2,5-dioxopirrol-1-il)hexanamido]etil}carbamoyl)fenoxi}-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico, **Compuesto (Ia)** (46 mg, 37 %) como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): 568 [M/2+H]⁺, 1133 [M+H]⁺, 1155 [M+Na]⁺. RMN de ¹H (300MHz, DMSO-d₆): 10,98 (s, 1H), 8,87 (br s, 1H), 8,30 (t, J=6Hz, 1H), 7,86 (t, J=3 Hz, 1 H), 7,77 (s, 1 H), 7,70-7,69 (m, 2 H), 7,51-7,42 (m, 3 H), 7,30-7,10 (m, 3 H), 6,99 (s, 2 H), 6,93 (br s, 1H), 5,79-5,77 (m, 1H), 5,36 (d, J=4,2 Hz, 1 H), 5,13-5,02 (m, 4 H), 4,47-4,28 (m, 4 H), 3,95 (d, J=9,0 Hz, 1 H), 3,540-3,49 (m, 4 H), 3,39-3,36 (m, 4 H), 3,24-3,22 (m, 2 H), 2,86-2,81 (m, 7 H), 2,62-2,51 (m, 1 H), 2,49-2,41(m, 3H), 2,06-1,99(m, 3H), 1,49-1,42(m, 4H), 1,23-1,16(m, 2H).



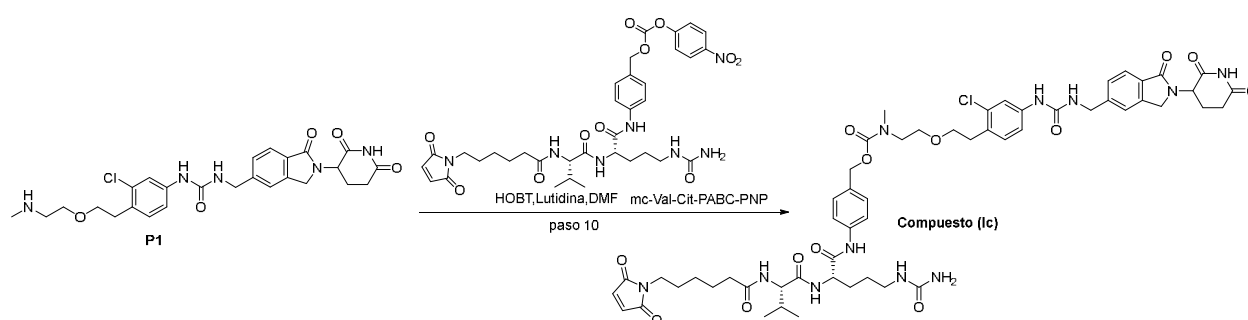
Esquema 3: Síntesis del complejo de neodegradador P1-enlazador β -glucurónico (Compuesto (Ib))



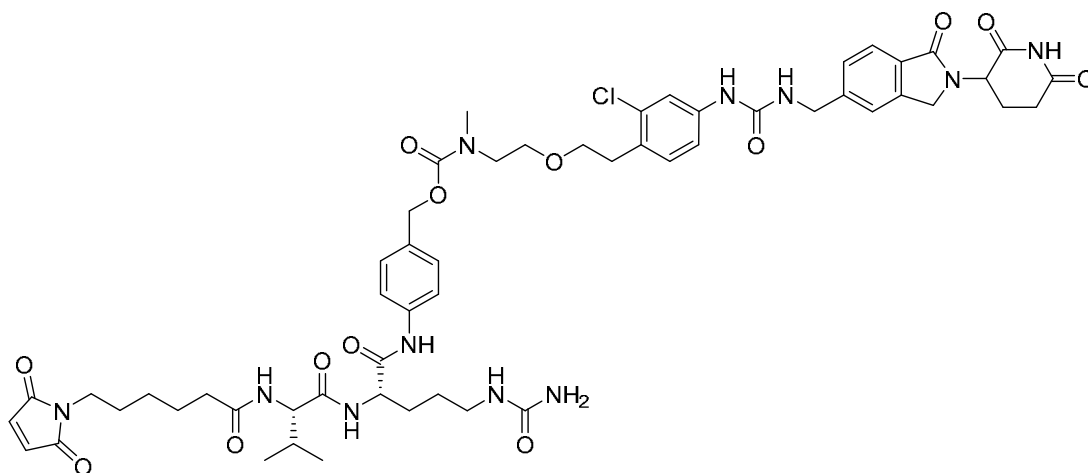
Ejemplo 3: Síntesis del Compuesto (Ib)

[0212] A una solución agitada de pentanodioato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (62 mg, 0,19 mmol, 1,2 eqv.) y ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-{2-[(2- aminoetil)carbamoil]-4-[(2-(2-{2-cloro-4-[(2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil}carbamoil)amino]fenil}etoxi)etil](metil)carbamoil}oxi)metil]fenoxi}-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico, **9** (150 mg, 0,16 mmol, 1,00 eqv.) en DMF (3,00 ml) se añadió DIEA (41 mg, 0,32 mmol, 2,00 eqv.) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. El producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa con las siguientes condiciones (columna: fase móvil A: agua (0,05 % de TFA), fase móvil B: ACN; velocidad de flujo: 60 ml/min;). La solución se liofilizó para obtener ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-{4-[(2-(2-{2-cloro-4-[(2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-

isoindol-5-il]metil}carbamoil)amino]fenil}etoxi)etil](metil)carbamoil}oxi)metil]-2-[(2-{5-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-5-oxopentanamido}etil)carbamoil]fenoxi}-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico, **Compuesto (Ib)** (50 mg, 26 %) como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): 576 [M/2+H]⁺, 1151 [M+H]⁺, 1173 [M+Na]⁺. RMN de ¹H (300MHz, DMSO-d₆): 12,90 (br s, 1H), 10,98 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,31 (t, J=3,0Hz, 1H), 7,92 (t, J=3,0Hz, 1H), 7,77 (d, J=3,0 Hz, 1H), 7,70-7,66 (m, 2H), 7,51-7,43 (m, 3H), 7,25-7,09 (m, 3H), 6,82 (t, J=3,0 Hz, 1H), 5,80 -5,20 (m, 2H), 5,12-5,02 (m, 4H), 4,47-4,27 (m, 4H), 3,98 (d, J=9,3Hz, 1H), 3,52-3,44 (m, 5H), 3,30-3,05 (m, 7H), 2,97-2,73 (m, 9H), 2,72-2,62 (m, 3H), 2,45-2,35 (m, 1H), 2,30-2,15 (m, 2H), 2,05-1,90 (m, 1H), 1,90-1,70 (m, 2H).



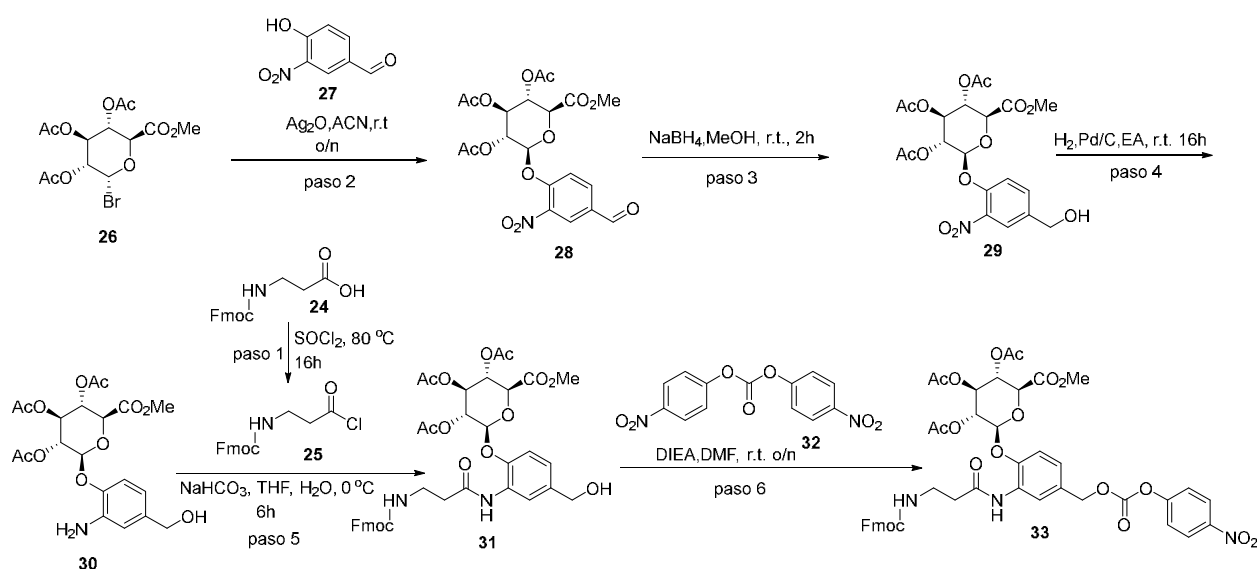
Esquema 4: Preparación del Compuesto (Ic)



Ejemplo 4: Síntesis del Compuesto (Ic)

[0213] A una mezcla agitada de 1-(3-cloro-4-[2-[2-(metilamin)etoxi]etil]fenil)-3-[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]urea se añadieron (neodegradador P1, 200 mg, 0,38 mmol, 1,00 eqv.) y lutidina (81 mg, 0,76 mmol, 2,00 eqv.) en DMF (10 ml) HOBT (26 mg, 0,19 mmol, 0,50 eqv.) y carbonato de 4-nitrofenil de [4-[(2S)-5-(carbamoilamin)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-dioxopirrol-1-il)hexanamido]-3-metilbutanamido]pentanamido]fenil]metilo (279 mg, 0,38 mmol, 1,00 eqv.) en porciones a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 12

horas a 40 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de que la reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, la reacción se apagó con agua (30 ml). La mezcla resultante se extrajo con DCM (3 x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 30 ml), salmuera (30 ml) y se secaron con Na₂SO₄. Después de la filtración, el filtrado se concentró hasta sequedad al vacío. El residuo se purificó mediante columna de fase inversa (C18, fase móvil A: 0,1 % de FA en agua, B: ACN). La fracción recolectada se concentró hasta sequedad al vacío. El producto bruto (60 mg) se purificó mediante HPLC preparativa con las siguientes condiciones (columna: columna Xselect CSH OBD 30 x 150 mm, 5 µm, n; fase móvil A: agua (0,1 % de FA), fase móvil B: ACN; velocidad de flujo: 60 ml/min; gradiente: 33 B a 50 B en 7 min; 220 nm; RT1: 5,27 min). La fracción recolectada se liofilizó para obtener N-[2-(2-[2-cloro-4-([[(2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-ilo]metil]carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil]-N-metilcarbamato de [4-[(2S)-5-(carbamoilamin)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-dioxopirrol-1-il)hexanamido]-3-metilbutanamido]pentanamido]fenil]metilo (23,8 mg, 5 %) como un sólido blanco. LCMS (ESI): 1126,11 (M+H)⁺. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,99(s, 1H), 10,00(s, 1H), 8,88(s, 1H), 8,12-8,08(m, 1H), 7,85-7,81(m, 2H), 7,70-7,67(m, 2H), 7,60-7,58(m, 1H), 7,51(s, 1H), 7,47-7,44(m, 1H), 7,28-7,25(m, 2H), 7,18-7,12(m, 2H), 7,00(s, 2H), 6,90(br s, 1H), 5,97-5,95(m, 1H), 5,42(s, 2H), 5,12-5,05(m, 1H), 4,98(s, 2H), 4,42-4,32(m, 4H), 4,18 -4,15(m, 1H), 3,56-3,40(m, 4H), 3,37-3,36(m, 3H), 3,05-2,90(m, 3H), 2,89-2,85(m, 5H), 2,72-2,55(m, 2H), 2,40-2,33(m, 2H), 2,25-2,15(m, 2H), 2,00-1,87(m, 2H), 1,74-1,57(m, 2H), 1,50-1,42(m, 5H), 1,22- 1,10(m, 3H), 0,85-0,80(m, 6H).



Esquema 5A: Síntesis del complejo de neodegradador P1-enlazador β-glucurónico

Paso 1. Síntesis del Compuesto 25

[0214] A una mezcla agitada de ácido 3-[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]-propanoico (Compuesto 24, 5,00 g, 16,06 mmol, 1,00 eqv.) en SOCl₂ (25 ml) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 16 h a 80 °C. El producto deseado pudo detectarse mediante LCMS (derivado con MeOH MS=326). LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se concentró al vacío para obtener N-(3-cloro-3-oxopropil)carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (Compuesto 25, 7,5 g, bruto) como un aceite amarillo. El producto bruto se usó en el siguiente paso directamente sin mayor purificación. El análisis de RMN de ¹H indicó que era el producto deseado (derivado con MeOH). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,81-7,77 (m, 2H), 7,63-7,59 (m, 2H), 7,46-7,40 (m, 2H), 7,40-7,31 (m, 2H), 5,33 (s, 1H), 4,42 (d, J=3,0 Hz, 2H), 4,24 (t, J=6,0 Hz, 1H), 3,74-3,67 (m, 3H), 3,50 (d, J=3,0 Hz, 2H), 2,59 (t, J=6,0 Hz, 2H).

Paso 2. Síntesis del Compuesto 28

[0215] A una solución agitada de 4-formil-2-nitrofenol (Compuesto 27, 4,21 g, 25,19 mmol, 1,00 eqv.) y Ag₂O (7,00 g, 30,20 mmol, 1,20 eqv.) en ACN (100 ml, 190,24 mmol, 75,00 eqv.) se añadió el compuesto 26 (10,00 g, 25,17 mmol, 1,00 eqv.) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂. La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se filtró y la torta de filtración se lavó con DCM (50 ml x 3). El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se eluyó con PE/EA (PE:EA=1:2) para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-(4-formil-2-nitrofenoxi)oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 28, 10,5 g, 86 %) como un sólido blanco. El análisis RMN de ¹H indicó que era el producto deseado. LCMS (ES, m/z):484 [M+1]⁺. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 10,00 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,13-8,09 (m, 1H), 7,52 (d, J=3,0 Hz, 1H), 5,47-5,29 (m, 4H), 4,37-4,35 (m, 1H), 3,75-3,73 (m, 3H), 2,17-2,06 (m, 9H).

Paso 3. Síntesis del Compuesto 29

[0216] A una solución agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-(4-formil-2-nitrofenoxi)oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 28, 6,00 g, 12,41 mmol, 1,00 eqv.) en MeOH (50 ml) se añadió NaBH₄ (0,47 g, 12,42 mmol, 1,00 eqv.) en porciones a temperatura ambiente

bajo una atmósfera de N₂. La mezcla resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂. LCMS indicó que la reacción se había completado. La reacción se apagó con agua a temperatura ambiente. El resultado se secó con Na₂SO₄. La mezcla resultante se filtró, la torta de filtración se lavó con DCM. La mezcla resultante se concentró al vacío para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxy)-6-[4-(hidroximetil)-2-nitrofenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 29, 5,5 g, 91 %) como un sólido. LCMS (ES, m/z): 486 [M+H]⁺.

Paso 4. Síntesis del Compuesto 30

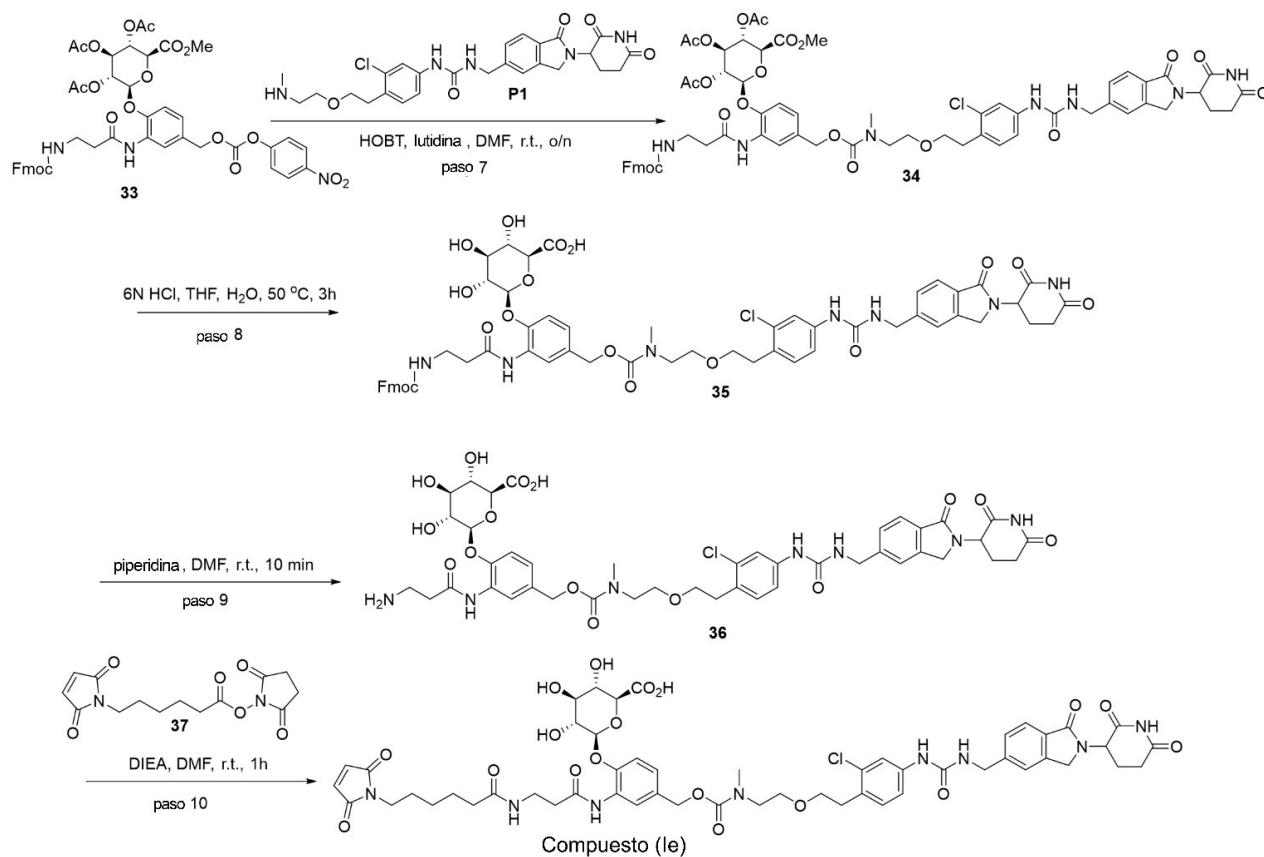
[0217] A una mezcla agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxy)-6-[4-(hidroximetil)-2-nitrofenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 29, 5,50 g, 11,33 mmol, 1,00 eqv.) en EA (60 ml) se añadió Pd/C (1,10 g, 10 %) en porciones a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 16 h a temperatura ambiente bajo una atmósfera de H₂. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se filtró, la torta de filtración se lavó con DCM y MeOH. El filtrado se concentró al vacío para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxy)-6-[2-amino-4-(hidroximetil)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 30, 4,0 g, 77 %) como un sólido. El producto bruto se usó en el siguiente paso directamente sin mayor purificación. LCMS (ES, m/z): 456 [M+H]⁺.

Paso 5. Síntesis del Compuesto 31

[0218] A una solución agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxy)-6-[2-amino-4-(hidroximetil)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 30, 1,00 g, 2,19 mmol, 1,00 eqv.) y NaHCO₃ (0,20 g, 2,40 mmol, 1,1 eqv.) en THF (10 ml) se añadió el compuesto 25 (0,87 g, 2,62 mmol, 1,20 eqv.) en porciones a 0 °C bajo una atmósfera de N₂. La mezcla resultante se agitó durante 6 h a 0 °C bajo una atmósfera de N₂. LCMS indicó que la reacción se había completado. La reacción se apagó con agua a temperatura ambiente. La mezcla resultante se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se eluyó con PE/EA (EA = 100 %) para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxy)-6-[2-(3-[[9H-fluoren-9-ylmetoxi]carbonil]amino)propanamido)-4-(hidroximetil)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 31, 1,1 g, 66 %) como un amarillo claro sólido. LCMS (ES, m/z): 749 [M+H]⁺.

Paso 6. Compuesto de síntesis 33

[0219] A una mezcla agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-(3-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)-4-(hidroximetil)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 31, 1,50 g, 2,00 mmol, 1,00 eqv.) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (Compuesto 32, 0,68 g, 2,24 mmol, 1,12 eqv.) en DMF (15 ml) se añadió DIEA (0,52 g, 4,01 mmol, 2,00 eqv.) en porciones a 0 °C bajo una atmósfera de N₂. La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía flash inversa con las siguientes condiciones: columna, gel de sílice C18; fase móvil, ACN en agua (0,1 % de FA), gradiente del 10 % al 90 % en 40 min; detector, UV 254 nm. La fracción recolectada se concentró hasta sequedad al vacío para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-(3-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)-4-[[[(4-nitrofenoxicarbonil)oxi]metil]fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 33, 1,4 g, 48 %) como un sólido amarillo. LCMS (ES, m/z):914 [M+H]⁺.



Esquema 5B: Síntesis del complejo de neodegradador P1-enlazador β -glucurónico

Paso 7. Compuesto de síntesis 34

[0220] A una mezcla agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-(3-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)-4-[[[(4-nitrofenoxicarbonil)oxi]metil]fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 33, 1,00 g, 1,09 mmol, 1,00 eqv.) y 1-(3-cloro-4-[2-[2-(metilamin)etoxi]etil]fenil)-3-[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]urea (neodegradador P1, 0,58 g, 1,09 mmol, 1,00 eqv.) en DMF (10 ml) se añadieron HOBT (1,18 g, 8,72 mmol, 8,00 eqv.) y 2,4-dimetilpiridina (1,07 g, 8,72 mmol, 8,00 eqv.) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂. La mezcla resultante se agitó durante 16 h a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se utilizó para purificación adicional. El residuo se purificó mediante cromatografía flash inversa con las siguientes condiciones: columna, gel de sílice C18; fase móvil, ACN en agua (0,1 % de FA), gradiente del 10 % al 80 % en 40 min; detector, UV 254 nm. La fracción recolectada se concentró al vacío para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil]amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]-2-(3-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 34, 800 mg, 56 %) como un sólido. LCMS (ES, m/z): 1302 [M+H]⁺.

Paso 8. Compuesto de síntesis 35

[0221] A una mezcla agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil]amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]-2-(3-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 34, 800,00 mg, 0,61 mmol, 1,00 eqv.) en THF (80 ml) se añadió HCl (6 N, 80 ml) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂. La mezcla resultante se agitó durante 3 h a 50 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash inversa con las siguientes condiciones: columna, gel de sílice C18; fase móvil, ACN en agua (0,1 % de FA), gradiente del 0 % al 80 % en 40 min; detector, UV 254 nm. La fracción recolectada se liofilizó para obtener ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil]amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]-2-(3-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)fenoxi]-3,4,5-trihidroxioxan-2-

carboxílico (Compuesto 35, 230 mg, 32 %) como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): 1162 [M+H]⁺.

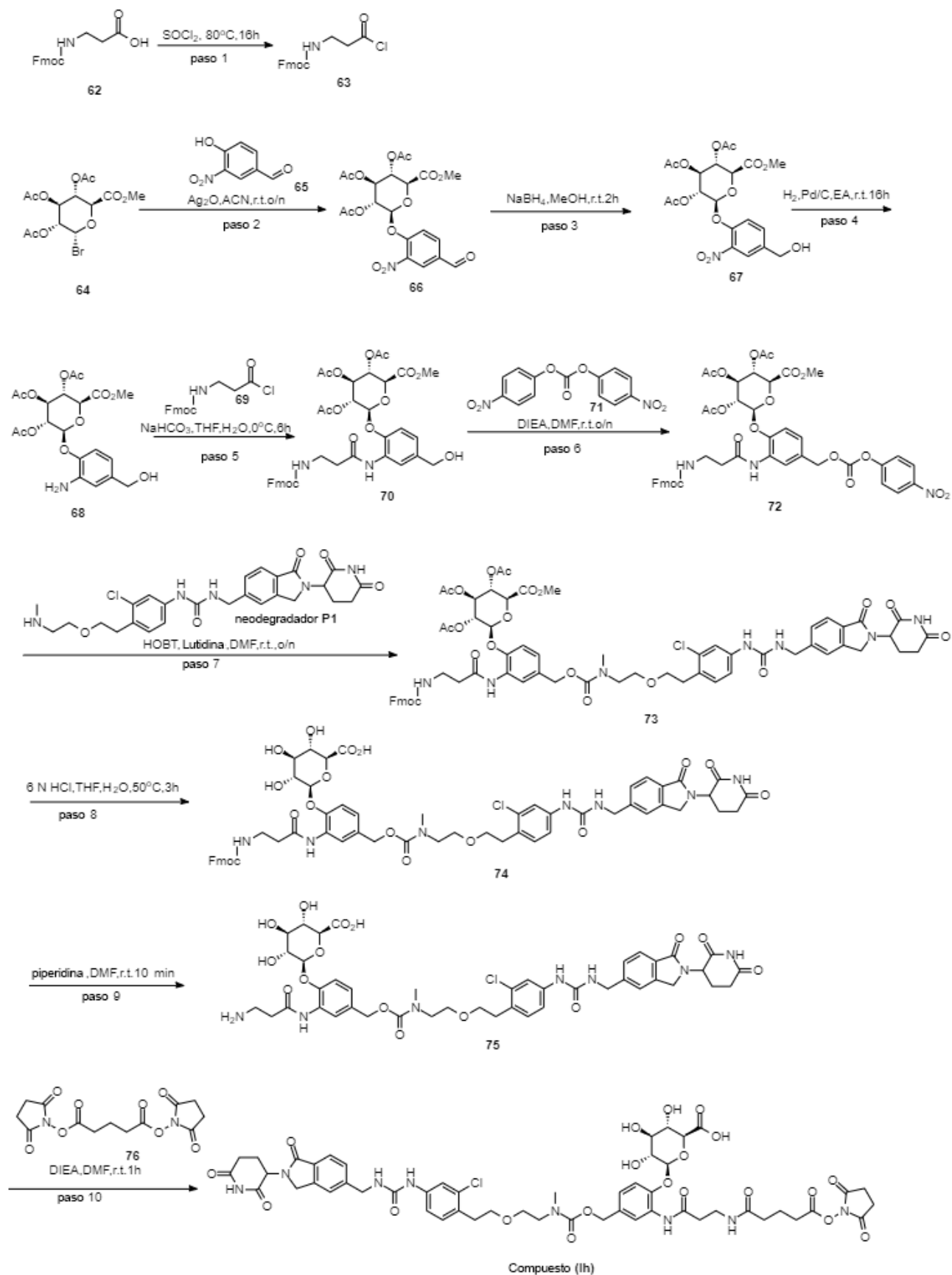
Paso 9. Síntesis del Compuesto 36

[0222] A una solución agitada de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]-2-(3-[[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]propanamido)fenoxi]-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico (Compuesto 35, 230 mg, 0,2 mmol, 1,00 eqv.) en DMF (2 ml) se añadió piperidina (0,4 ml) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 10 min a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se usó directamente para una purificación adicional mediante HPLC preparativa con las siguientes condiciones (columna: columna XSelect CSH Prep C18 OBD, 19 x 250 mm, 5 µm; fase móvil A: agua (0,05 % de TFA), fase móvil B: ACN; velocidad de flujo: 25 ml/min; gradiente: 20 B a 40 B en 7 min; 220 nm; RT 1:5,78 min) para obtener ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-aminopropanamido)-4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]fenoxi]-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico (Compuesto 36, 35 mg, 18 %) como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): 940[M+H]⁺.

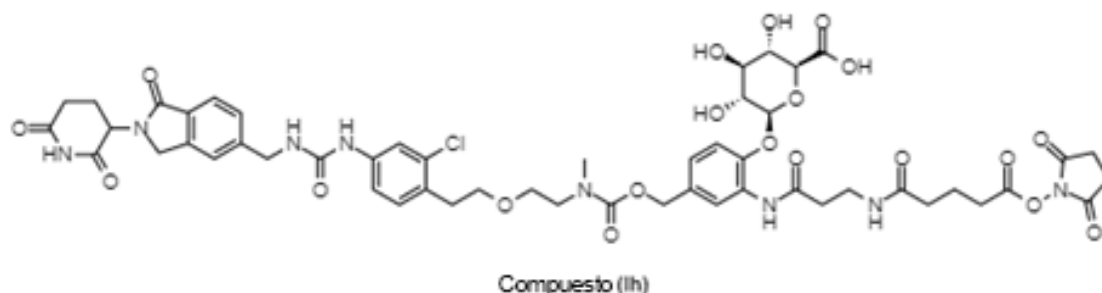
Paso 10. Síntesis del Compuesto (Ie)

[0223] A una solución agitada de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-aminopropanamido)-4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]fenoxi]-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico (Compuesto 36, 30 mg, 0,03 mmol, 1,00 eqv.) en DMF (3 ml) se añadieron DIEA (13 mg, 0,10 mmol, 3,00 eqv.) y el compuesto 37 (30 mg, 0,10 mmol, 3,00 eqv.) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se purificó mediante HPLC preparativa con las siguientes condiciones (columna: columna Xselect CSH OBD 30 x 150 mm, 5 µm, fase móvil A: agua (0,1 % de FA), fase móvil B: ACN; velocidad de flujo: 60 ml/min; gradiente: 21 B a 36 B en 10 min; 220 nm; RT 1:11,15 min). La fracción recolectada se liofilizó para obtener ácido

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil]-(metil)carbamoil]oxi)metil]-2-[3-[6-(2,5-dioxopirrol-1-il)hexanamido]propanamido]fenoxi]-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico (Compuesto (Ie), 10,5 mg, 28 %) como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): 1133 [M+H]⁺. RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10,9 (s, 1H), 9,13 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,92-7,68 (m, 4H), 7,52 (s, 1H), 7,44 (d, J=3,0 Hz, 1H), 7,18-6,99 (m, 7H), 5,76 (s, 1H), 5,20-5,10 (m, 2H), 4,98 (br s, 2H), 4,76-4,74 (m, 1H), 4,42-4,33 (m, 4H), 3,65 (br s, 1H), 3,58-3,54 (m, 5H), 3,35 (d, J=6 Hz, 2H), 2,90-2,83 (m, 7H), 2,57-2,55 (m, 3H), 2,45-2,30 (m, 1H), 2,02-1,98 (m, 4H), 1,48-1,42 (m, 5H), 1,40-1,20 (m, 3H).



Esquema 6: *Síntesis del complejo de neodegradador PI-enlazador β -glucurónido (Compuesto (Ih))*



EJEMPLO 6: Síntesis del Compuesto (Ih)

Paso 1. Síntesis del Compuesto 63

[0224] A una mezcla agitada de ácido 3-[[9H-fluorene-9-yl(methoxy)carbonyl]amino]propanoico, (Compuesto 62, 5,00 g, 16,06 mmol, 1,00 eqv.), se añadió SOCl_2 (25 ml) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 16 h a 80 °C. El producto deseado se pudo detectar mediante LCMS (derivado con MeOH MS=326). LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se concentró al vacío para obtener N-(3-cloro-3-oxopropil)carbamato de 9H-fluorene-9-ylmetilo (Compuesto 63, 7,5 g, bruto) como un aceite amarillo. El producto bruto se usó directamente en el siguiente paso sin purificación adicional. El análisis de RMN de ^1H indicó que era el producto deseado (derivado con MeOH). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,81-7,77 (m, 2H), 7,63-7,59 (m, 2H), 7,46-7,40 (m, 2H), 7,40-7,31 (m, 2H), 5,33 (s, 1H), 4,42 (d, $J=3,0$ Hz, 2H), 4,24 (t, $J=6,0$ Hz, 1H), 3,74-3,67 (m, 3H), 3,50 (d, $J=3,0$ Hz, 2H), 2,59 (t, $J=6,0$ Hz, 2H).

Paso 2. Síntesis del Compuesto 66

[0225] A una solución agitada de 4-formil-2-nitrofenol (Compuesto 65, 4,21 g, 25,19 mmol, 1,00 eqv.) y Ag_2O (7,00 g, 30,20 mmol, 1,20 eqv.) en ACN (100 ml, 190,24 mmol, 75,00 eqv.) se añadió (2S,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-bromooxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 64, 10,00 g, 25,17 mmol, 1,00 eqv.) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N_2 . La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N_2 . LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se filtró y la torta de filtración se lavó con DCM (50 ml x 3). El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se eluyó con PE/EA (PE:EA=1:2) para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-(4-formil-2-nitrofenoxi)oxan-

2-carboxilato de metilo (Compuesto 66, 10,5 g, 86 %) como un sólido blanco. El análisis RMN de ^1H indicó que era el producto deseado. LCMS (ES, m/z):484 $[\text{M}+1]^+$. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 10,00 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,13-8,09 (m, 1H), 7,52 (d, $J=3,0$ Hz, 1H), 5,47-5,29 (m, 4H), 4,37-4,35 (m, 1H), 3,75-3,73 (m, 3H), 2,17-2,06 (m, 9H).

Paso 3. Síntesis del Compuesto 67

[0226] A una solución agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-(4-formil-2-nitrofenoxi)oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 66, 6,00 g, 12,41 mmol, 1,00 eqv.) en MeOH (50 ml) se añadió NaBH_4 (0,47 g, 12,42 mmol, 1,00 eqv.) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N_2 . La mezcla resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. bajo una atmósfera de N_2 . LCMS indicó que la reacción se había completado. La reacción se apagó con agua a temperatura ambiente. El resultado se secó con Na_2SO_4 . La mezcla resultante se filtró y la torta de filtración se lavó con DCM. La mezcla resultante se concentró al vacío para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[4-(hidroximetil)-2-nitrofenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo, (Compuesto 67, 5,5 g, 91 %) como un sólido. LCMS (ES, m/z):486 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Paso 4. Síntesis del Compuesto 68

[0227] A una mezcla agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[4-(hidroximetil)-2-nitrofenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 67, 5,50 g, 11,33 mmol, 1,00 eqv.) en EA (60 ml) se añadió Pd/C (1,10 g, 10 %) en porciones a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 16 h a temperatura ambiente bajo una atmósfera de H_2 . LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se filtró, la torta de filtración se lavó con DCM y MeOH. El filtrado se concentró al vacío para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-amino-4-(hidroximetil)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 68, 4,0 g, 77 %) como un sólido. El producto bruto se usó en el siguiente paso directamente sin mayor purificación. LCMS (ES, m/z):456 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Paso 5. Síntesis del Compuesto 70

[0228] A una solución agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-amino-4-(hidroximetil)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 68, 1,00 g, 2,19 mmol, 1,00 eqv.) y NaHCO_3 (0,20 g, 2,40 mmol, 1,1 eqv.) en THF (10 ml) se añadió N-(3-cloro-3-oxopropil)carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (Compuesto 69, 0,87 g, 2,62 mmol, 1,20 eqv.) en

porciones a 0 °C bajo una atmósfera de N₂. La mezcla resultante se agitó durante 6 h a 0 °C bajo una atmósfera de N₂. LCMS indicó que la reacción se había completado. La reacción se apagó con agua a temperatura ambiente. La mezcla resultante se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se eluyó con PE/EA (EA = 100 %) para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-(3-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)-4-(hidroximetil)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 70, 1,1 g, 66 %) como un sólido amarillo claro. LCMS (ES, m/z): 749 [M+H]⁺.

Paso 6. Síntesis del Compuesto 72

[0229] A una mezcla agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-(3-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)-4-(hidroximetil)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 70, 1,50 g, 2,00 mmol, 1,00 eqv.) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (Compuesto 71, 0,68 g, 2,24 mmol, 1,12 eqv.) en DMF (15 ml) se añadió DIEA (0,52 g, 4,01 mmol, 2,00 eqv.) en porciones a 0 °C bajo una atmósfera de N₂. La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía flash inversa con las siguientes condiciones: columna, gel de sílice C18; fase móvil, ACN en agua (0,1 % de FA), gradiente del 10 % al 90 % en 40 min; detector, UV 254 nm. La fracción recolectada se concentró hasta sequedad al vacío para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-(3-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)-4-[[[(4-nitrofenoxicarbonil)oxi]metil]fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 72, 1,4 g, 48 %) como un sólido amarillo. LCMS (ES, m/z): 914 [M+H]⁺.

Paso 7. Síntesis del Compuesto 73

[0230] A una mezcla agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[2-(3-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)-4-[[[(4-nitrofenoxicarbonil)oxi]metil]fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 72, 1,00 g, 1,09 mmol, 1,00 eqv.) y 1-(3-cloro-4-[2-[2-(metilamin)etoxi]etil]fenil)-3-[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]urea (neodegradador P1, 0,58 g, 1,09 mmol, 1,00 eqv.) en DMF (10 ml) se añadieron HOBT (1,18 g, 8,72 mmol, 8,00 eqv.) y 2,4-dimetilpiridina (1,07 g, 8,72 mmol, 8,00 eqv.) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂. La mezcla resultante se

agitó durante 16 h a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se utilizó para purificación adicional. El residuo se purificó mediante cromatografía flash inversa con las siguientes condiciones: columna, gel de sílice C18; fase móvil, ACN en agua (0,1 % de FA), gradiente del 10 % al 80 % en 40 min; detector, UV 254 nm. La fracción recolectada se concentró al vacío para obtener (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]-2-(3-[[9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 73 (800 mg, 56 %) como un sólido. LCMS (ES, m/z):1302 [M+H]⁺.

Paso 8. Síntesis del Compuesto 74

[0231] A una mezcla agitada de (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-[4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]-2-(3-[[9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)fenoxi]oxan-2-carboxilato de metilo (Compuesto 73 (800,00 mg, 0,61 mmol, 1,00 eqv.) en THF (80 ml) se añadió HCl (6 N, 80 ml) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂. La mezcla resultante se agitó durante 3 h a 50 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash inversa con las siguientes condiciones: columna, gel de sílice C18; fase móvil, ACN en agua (0,1 % de FA), gradiente del 0 % al 80 % en 40 min; detector, UV 254 nm. La fracción recolectada se liofilizó para obtener ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6 -dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]-2-(3-[[9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)fenoxi]-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico (Compuesto 74, 230 mg, 32 %) como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z):1162 [M+H]⁺.

Paso 9. Síntesis del Compuesto 75

[0232] A una solución agitada de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]-2-(3-[[9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]propanamido)fenoxi]-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico, **74** (230 mg, 0,2 mmol, 1,00 eqv.) en DMF (2 ml) se añadió piperidina (0,4 ml) en porciones a temperatura

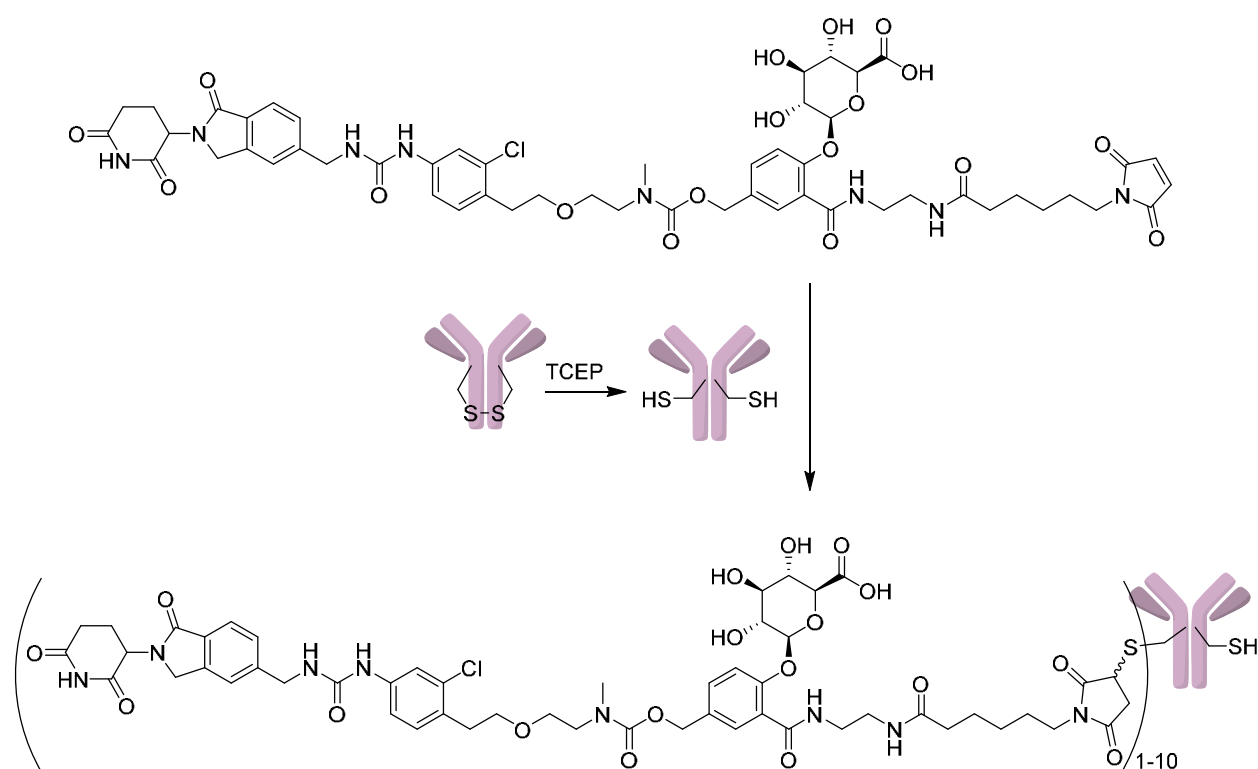
ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 10 min. en temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla resultante se usó directamente para una purificación adicional mediante HPLC preparativa con las siguientes condiciones (columna: columna XSelect CSH Prep C18 OBD, 19 x 250 mm, 5 µm; fase móvil A: agua (0,05 % de TFA), fase móvil B: ACN; velocidad de flujo: 25 ml/min; gradiente: 20 B a 40 B en 7 min; 220 nm; RT1: 5,78 min) para obtener ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-aminopropanamido)-4-[[[2-(2-[2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil]carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]fenoxi]-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico (Compuesto 75, 35 mg, 18 %) como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): 940[M+H]⁺.

Paso 10. Síntesis del Compuesto (Ih)

[0233] A una solución agitada de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-aminopropanamido)-4-[[[2-(2-{2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil}carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]fenoxi]-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico (Compuesto 75, 110 mg, 0,12 mmol, 1,00 eqv.) y pentanodioato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (Compuesto 76, 46 mg, 0,14 mmol, 1,2 eqv.) en DMF (2,0 ml) se añadió DIEA (30 mg, 0,23 mmol, 2,0 eqv.) en porciones a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa con las siguientes condiciones (columna: Kinetex EVO prep C18, 30 x 150, 5 µm; fase móvil A: agua (TFA al 0,05 %), fase móvil B: ACN; velocidad de flujo: 60 ml/min; gradiente: 21 % de B a 41 % de B en 7 min, 41 % de B; longitud de onda: 254 nm; RT1 (min): 5,8. La fracción recolectada se liofilizó para obtener ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-{4-[[[2-(2-{2-cloro-4-[[[2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxo-3H-isoindol-5-il]metil}carbamoil)amino]fenil]etoxi)etil](metil)carbamoil]oxi)metil]-2-(3-{5-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-5-oxopentanamido}propanamido)fenoxi}]-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico (Compuesto (Ih), 48 mg, 34 % como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): 1151 [M+H]⁺, 1173 [M+Na]⁺. RMN de ¹H (300MHz, DMSO-d₆): 12,80 (br s, 1H), 10,98 (s, 1H), 9,08 (s, 1H), 8,79 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,68-7,66 (m, 2H), 7,51 (s, 1H), 7,44 (d, J=8,1 Hz, 1H), 7,25-7,00 (m, 4H), 6,82-6,80 (m, 1H), 5,86 (s, 1H), 5,39-5,30 (m, 2H), 5,14-5,07 (m, 1H), 4,97 (s,

2H), 4,84 (d, $J=7,2$ Hz, 1H), 4,47-4,27 (m, 4H), 3,90 (d, $J=9,6$ Hz, 1H), 3,56-3,48 (m, 4H), 3,45-3,36 (m, 6H), 2,95-2,80 (m, 8H), 2,75-2,65 (m, 3H), 2,62-2,55 (m, 2H), 2,49-2,35 (m, 1H), 2,21-2,16 (m, 2H), 2,01-1,95 (m, 1H), 1,85-1,80 (m, 2H).

Ejemplo 7: *Procedimiento general para la preparación y caracterización de conjugados de neodegradadores*

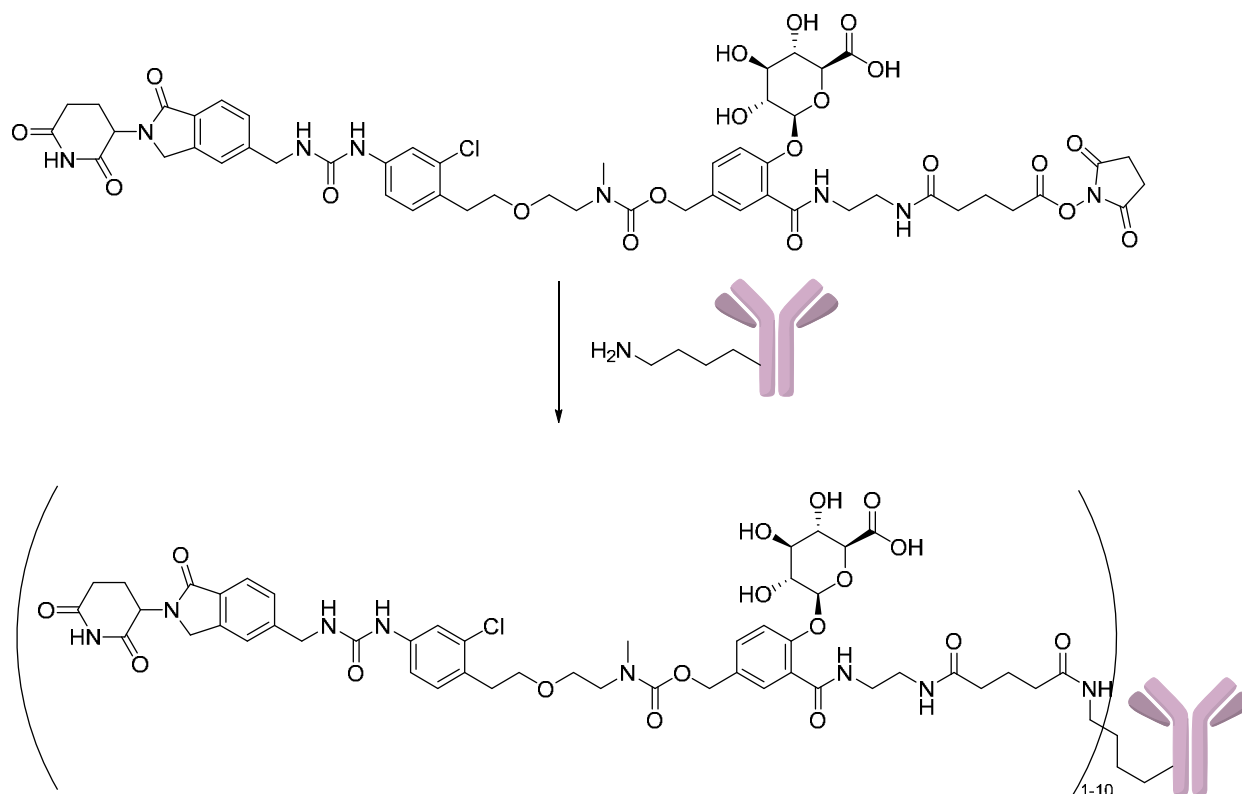


Esquema 7: *Síntesis de CD33AB-Compuesto (Ia)*

Síntesis de CD33AB-Compuesto (Ia)

[0234] Se añadieron 2,25 equivalentes molares de TCEP a una solución de 7,8 mg/ml de CD33AB en 50 mM de EPPS, 5 mM de EDTA pH 7,0 y la mezcla se incubó durante 2 horas a 37 °C. Después de enfriar el anticuerpo parcialmente reducido a temperatura ambiente, se añadieron 8 equivalentes molares del Compuesto (Ia) como stock en solución en DMA de manera que la concentración final de anticuerpo fue 7,0 mg/ml y la concentración final de DMA fue 10 % (v/v). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. El conjugado resultante se purificó en succinato de sodio 20 mM, 8 % de sacarosa, 0,01 % de tampón de formulación Tween-20 pH 5,5 mediante filtración en gel usando columnas de desalinización Zeba 40K seguido de diálisis

usando casetes Slide-a-Lyzer (10 K MWCO). Se encontró que AnDC purificado tenía 100 % de monómero mediante SEC, una carga de fármaco promedio de 3,1 fármacos/anticuerpo mediante la reducción de RPLC-MS, y < 1,5 % del Compuesto (Ia) no conjugado mediante RPLC.



Esquema 8: Síntesis de CD33AB-Compuesto (Ib)

Síntesis de CD33AB-Compuesto (Ib)

[0235] Se añadieron 3,8 equivalentes molares del Compuesto (Ib) como una solución madre en DMA a una solución de CD33AB en tampón de 50 mM de EPPS pH 8,0 de manera que la concentración final de anticuerpo fue de 6,4 mg/ml y la concentración final de DMA fue del 10 % (v/v). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas. El conjugado resultante se purificó en 20 mM de succinato de sodio, 8 % de sacarosa, 0,01 % de tampón de formulación Tween-20 pH 5,5 mediante filtración en gel usando columnas de desalinización Zeba 40K seguido de diálisis usando casetes Slide-a-Lyzer (10 K MWCO). Se encontró que AnDC purificado tenía 100 % de monómero mediante SEC, una carga de fármaco promedio de 3,1 fármacos/anticuerpo mediante RPLC-MS intacta y < 1,5 % del Compuesto (Ib) no conjugado mediante RPLC.

[0236] La concentración y el monómero se determinaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna TSKGel 3000SWXL de 7,8 x 300 mM con partículas

de 5 µm (Tosoh Bioscience), eluyendo isocráticamente con 400 mM de perclorato de sodio, 50 mM de fosfato de sodio y 5 % de fase móvil de isopropanol (v/v) realizándose a 0,5 mg/ml durante 30 min. Los conjugados de neodegradadores se cuantificaron a partir de curvas estándar de anticuerpos, detectando a 214 nm.

[0237] La relación fármaco-anticuerpo (DAR) se determinó mediante cromatografía de interacción hidrófoba utilizando una columna TSKgel Butyl-NPR de 4,6 x 35 mm con partículas de 2,5 µm. La fase móvil A era 1,5 M de sulfato de amonio, 25 mM de fosfato de sodio, pH 7,0. La fase móvil B era 25 mM de fosfato sódico, pH 7,0, 25 % de isopropanol (v/v). Los analitos se eluyeron con un gradiente lineal de 0-100 % de B en 12 min. a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min. La detección fue a 214 nm.

[0238] La carga útil del enlazador libre se determinó mediante cromatografía en modo mixto utilizando una columna HISEP de 4,6 x 250 mm con partículas de 2,5 µm (Supelco). La fase móvil A era 100 mM de acetato de amonio. La fase móvil B era 100 % acetonitrilo. Los analitos se eluyeron con un gradiente de 25-40 % B en 25 min, luego 40-100 % B en 2 min a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min. La temperatura de la columna fue de 35 °C. La carga útil del enlazador libre se cuantificó utilizando una curva estándar externa, detectando a 254 nm.

[0239] Se pueden preparar conjugados de neodegradadores adicionales usando los procedimientos descritos anteriormente, sustituyendo el enlazador-neodegradador apropiado con mangos de conjugación reactivos de lisina o cisteína.

Ejemplo 8: Tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML) con conjugado de anticuerpo anti-CD33-neodegradador

[0240] Los compuestos de CD33AB-neodegradador se probaron en ratones desnudos atímicos (Crl:NU(NCr)-Foxn1^{nu}, Charles River). Se inyectaron 1×10^7 células de leucemia monocítica aguda humana de MV411 (ATCC[®] CRL-5991TM) en 50 % de Matrigel por vía subcutánea en el flanco de los ratones (0,1 ml/ratón). Los ratones recibieron dosis de conjugados de anticuerpo anti-CD33-neodegradador, conjugados de neodegradadores no dirigidos y control de vehículo una vez que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 100 a 150 mm³.

[0241] Las soluciones estándar de CD33AB-Compuesto (Ia), CD33AB-Compuesto (Ib) se diluyeron con un vehículo para obtener soluciones de dosificación de 0,302 y 0,294 mg/ml, que proporcionaron 3,02 y 2,94 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 ml/kg (0,2 ml por 20 g de ratón), ajustado al peso corporal de cada animal. Esta estrategia de dosificación aseguró la entrega

de la misma cantidad de cargas útiles a cada grupo de prueba. Mylotarg se diluyó en una solución de 0,9 % de cloruro de sodio hasta 0,01 mg/ml, lo que proporcionó 3 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 ml/kg (0,2 ml por ratón de 20 g). Venetoclax se formuló en un disolvente compuesto por 60 % de PG, 30 % de PEG400 y 10 % de etanol sometándose a ultrasonido para obtener una suspensión dosificadora de 5 mg/ml, que suministró 50 mg/kg cuando se administró en un volumen de 10 ml/kg. Se centrifugó CC-90009 para recolectar el polvo en el fondo; luego se añadieron N-metil-2-pirrolidinona (NMP), PEG400 y una solución salina, y se mezclaron bien uno por uno para obtener una solución dosificadora de 0,5 mg/ml en 5 % de NMP, 45 % de PEG400 y 50 % de solución salina, que suministró 5 mg/kg cuando se administró en un volumen de 10 ml/kg.

[0242] Los ratones se dividieron en 6 grupos de tratamiento (N=9/grupo), de la siguiente manera: 1) vehículo; 2) CD33AB-Compuesto (Ia) (3,02 mg/kg, iv, una vez al día x 1); 3) CD33AB-Compuesto (Ib) (2,94 mg/kg, iv, una vez al día x 1); 4) Mylotarg (0,1 mg/kg, iv, una vez al día x 1); 5) Venetoclax (50 mg/kg, po, una vez al día x 21); 6) CC-90009 (5 mg/kg, ip, dos veces al día x 10). Los artículos de prueba para los grupos 1-4 se administraron por vía intravenosa (iv) como una dosis única (una vez al día x 1) en volúmenes ajustados al peso corporal (0,200 ml/20 g de ratón). Venetoclax se administró por vía oral (po), mientras que CC-90009 se administró por vía intraperitoneal (ip) en un volumen de dosificación de 10 ml/kg (0,2 ml por 20 g de ratón) ajustado al peso corporal de cada animal.

[0243] Los tumores se midieron usando calibradores dos veces por semana, y cada animal fue sacrificado cuando su tumor alcanzó el volumen del criterio de valoración (2000 mm³) o el último día (día 45) del estudio, lo que ocurra primero. MTV(n) se definió como la mediana del volumen tumoral en el último día del estudio en el número de animales restantes (n) cuyos tumores no habían alcanzado el volumen del criterio de valoración.

[0244] Como se muestra en la Figura 1A, ambos conjugados de neodegradadores proporcionaron un crecimiento tumoral más lento a lo largo del tiempo en comparación con el vehículo.

[0245] Para confirmar aún más la actividad y evaluar modalidades alternativas de conjugación y liberación de enlazadores, se probó un panel de conjugados basados en CD33AB y se comparó con Mylotarg, un ADC dirigido a CD33 clínicamente aprobado, y CC-90009, un degradador de GSPT1 de molécula pequeña en ensayos clínicos en los niveles de dosificación clínica, respectivamente. Como se muestra en la Figura 1B, y de acuerdo con las observaciones *in vitro*, el tratamiento *in vivo* de un tumor modelo de AML positivo para CD33 (MV4-11) con

conjugados basados en CD33AB, liberando neodegradadores P1, dio como resultado regresiones tumorales y los efectos más sólidos se observaron con un conjugado que contiene un activador de liberación de beta-glucurónido y conjugación de cisteína. La comparación de dos variantes del enlazador beta-glu (Compuesto (Ie) vs. Compuesto (Ia)) mostró que el conjugado del Compuesto (Ia) presentó una respuesta con mayor durabilidad en comparación con el Compuesto (Ie).

Ejemplo 9: Tratamiento de modelos de leucemia humana con conjugado de anticuerpo anti-CD33-neodegradador

[0246] Para confirmar la actividad en un espectro de modelos positivos para CD33 y negativos para CD33, se evaluó la eficacia del conjugado de CD33AB-Compuesto (Ia) para inducir la destrucción de células tumorales en un panel *in vitro* de modelos de leucemia humana (incluyendo AML positivo para CD33 y neoplasias malignas negativas para CD33). Las citotoxicidades de los artículos de prueba (TA) se midieron utilizando un panel de líneas celulares de leucemia mieloide aguda positivas para CD33 y un panel de células no de AML negativas para CD33. Las células, a una concentración predeterminada, se sembraron en placas de 96 pocillos y, después de una incubación durante la noche a 37 °C/5 % de CO₂, se añadieron a las células diluciones en serie de cada artículo de prueba (TA). Las células se incubaron con artículos de prueba durante 72 horas y se detectó la viabilidad con el reactivo CellTiter-Glo® (Promega). Los valores luminiscentes se normalizaron para cada línea celular y las IC₅₀ se calcularon utilizando el software Prism. Los resultados se muestran en la Figura 2. Si bien el conjugado mostró buena actividad en varias células CD33+, ventajosamente, el conjugado fue inactivo en modelos de células negativas para CD33.

Ejemplo 10: Citotoxicidad del conjugado de anticuerpo anti-CD33-neodegradador

[0247] La citotoxicidad del conjugado se midió utilizando células de leucemia mieloide aguda de MV4-11 positivas para CD33. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos en medios de ensayo y se añadieron a las células las diluciones en serie preparadas en medio del ensayo del conjugado de CD33AB-Compuesto I(a), Venetoclax, Mylotarg, CC-885, CC-90009, CD33AB (anticuerpo no conjugado) o control de AnDC sin unión. Las células se incubaron durante 72 horas y luego se detectó la viabilidad celular con el Cell Counting kit-8 (Dojindo) o el reactivo CellTiter-Glo® (Promega). Como se muestra en la Figura 3, los resultados indicaron que el

conjugado presentó una eficacia global *in vitro* comparable con la de CC885 o Mylotarg en las células de AML positivas para CD33, con algunos casos de eficacia superior.

Ejemplo 11: *Actividad del conjugado de anticuerpo anti-CD33-neodegradador en células derivadas de pacientes con AML*

[0248] Se evaluó el conjugado de CD33AB-Compuesto (Ia) *in vitro* en varias células blásticas primarias de pacientes con AML. Las muestras congeladas de médula ósea de pacientes adultos con leucemia mieloide aguda, recolectadas después de su último tratamiento, se descongelaron y se colocaron en placas de 96 pocillos que contenían diluciones en serie del conjugado, Mylotarg o CC-90009. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C/5 % de CO₂ y luego se realizó la lisis de los glóbulos rojos de cada pocillo y las células restantes se tiñeron con un anticuerpo marcador blástico (el mejor anticuerpo blástico para cada donante se determinó previamente) junto con Anexina V. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. La supervivencia de las células tumorales se determinó mediante el recuento absoluto de células tumorales supervivientes en cada muestra y se normalizó mediante los recuentos en los pocillos no tratados. Como se muestra en la Figura 4, el conjugado de anticuerpo anti-CD33-neodegradador presentó una actividad superior, según lo medido por citotoxicidad, en células derivadas de pacientes en comparación con un tratamiento estándar (Mylotarg) o un degradador exploratorio de GSPT1 de molécula pequeña (CC-90009).

Ejemplo 12: *Actividad del conjugado de anticuerpo anti-CD33-neodegradador sobre la proliferación de CFC progenitoras humanas*

[0249] Como CD33 se expresa en poblaciones de células progenitoras normales de la médula ósea y la mielosupresión de células normales es un acontecimiento adverso (AE) observado para Mylotarg, las actividades del conjugado de CD33AB-Compuesto (Ia), Mylotarg y CC-90009 en eritroides normales, se midieron progenitores mieloides y megacariocitos en ensayos de formación de colonias. Se descongelaron células de densidad ligera de médula ósea humana normal el día del experimento, se lavaron y se sembraron en placas de 24 pocillos en medio XVivo 15 complementado con rhIL-3 (10 ng/ml), rhGMCSF (10 ng/ml) y rhSCF (50 ng/ml). Se añadieron a los pocillos el conjugado de CD33AB-Compuesto I(a), Mylotarg y CC-90009, y las células se incubaron durante 72 horas. Después de la incubación, se añadieron 400 ul de cada suspensión celular a los tubos que contenían medio a base de metilcelulosa complementado con rhIL-3 (10

ng/ml), rh SCF (50 ng/ml), rhGM-CSF (10 ng/ml), y rhEpo (3 U/ml) para progenitores mieloides y eritroides. Para los progenitores de megacariocitos, las células se añadieron a placas de 35 mm que contenían una matriz semisólida a base de colágeno, complementada con rhIL-3 (10 ng/ml), rhIL-6 (10 ng/ml) y rhTpo (50 ng/ml). Después de 14 días de incubación, se evaluaron microscópicamente las colonias de progenitoras mieloides y eritroides. Las colonias se dividieron por tamaño en varias categorías: Progenitoras eritroides CFU-E (unidad formadora de colonias de eritroides; esta célula formadora de colonias genera pequeñas colonias que contienen menos de 200 eritroblastos) y BFU-E (unidad formadora de erupciones de eritroides; esta es una célula formadora de colonias más primitiva, y genera colonias más grandes que contienen más de 200 eritroblastos), progenitoras de granulocitos y monocitos CFU-GM (unidad formadora de colonias de granulocitos, macrófagos; esta célula mieloide formadora de colonias es capaz de producir colonias con 40 o más granulocitos y monocitos y/o o células de macrófagos) y progenitoras multipotenciales CFU-GEMM (unidad formadora de colonias: granulocitos, eritroides, macrófagos, megacariocitos; esta célula primitiva formadora de colonias es capaz de producir colonias que contienen células eritroides, así como 20 o más granulocitos, macrófagos y megacariocitos).

[0250] Para los megacariocitos, después de 14 días de incubación, las células se transfirieron a láminas de vidrio, se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo CD41 y un sistema de detección de fosfato alcalino. Las colonias se dividieron en tres categorías según su tamaño: CFU-Mk (3-20), CFU-Mk (21-49), CFU-Mk (≥ 50). Los resultados se normalizaron según el número de colonias en muestras no tratadas y las IC50 se calcularon utilizando el software Prism. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 13: *Actividad del conjugado de anticuerpo anti-CD33-neodegradador en tumores de AML en comparación con el estándar de atención actual*

[0251] Las células de leucemia mielocítica aguda humana del modelo tumoral subcutáneo de MV4-11 (1×10^6 células en 0,1 ml) se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones hembra atímicos desnudos. Los ratones fueron tratados con TA mediante inyección intravenosa en una vena lateral de la cola, inyección intraperitoneal, sonda oral o combinaciones de las mismas comenzando cuando los tumores alcanzaron 150 mm^3 de tamaño. El tamaño del tumor y el peso corporal del ratón se midieron dos veces por semana. Como se muestra en la Figura

6, el conjugado de CD33AB-Compuesto (Ia) mostró una eficacia superior a las mejores opciones de atención disponibles.

Ejemplo 14: *Actividad del conjugado de anticuerpo anti-CD33-neodegradador en modelos de AML diseminada*

[0252] Como la AML es una enfermedad que frecuentemente se disemina por todo el paciente, con lesiones en múltiples nichos de la médula ósea y que circulan en el torrente sanguíneo, se estudió la actividad del conjugado de CD33AB-Compuesto (Ia) en los modelos de AML diseminada *in vivo*.

[0253] Células diseminadas del modelo de MV4-11 (3×10^6 células en 0,2 ml) se inyectaron por vía intravenosa en la vena lateral de la cola de ratones hembra NCG. El tratamiento se inició trece días después de la inyección de células tumorales. Los ratones fueron controlados diariamente para determinar la morbilidad, la mortalidad y las observaciones clínicas. El peso corporal se midió dos veces por semana. El análisis de imágenes del desarrollo del tumor se realizó una vez por semana bajo anestesia mediante inyección de 5 μ l/g de D-luciferina, 10 minutos antes de la obtención de imágenes bioluminiscentes.

[0254] Células diseminadas de leucemia mielocítica aguda humana modelo OCI-AML2 (1×10^7 células en 0,2 ml) se inyectaron por vía intravenosa en la vena lateral de la cola de ratones hembra NOG. Nueve días después de la inyección de células tumorales, se inició el tratamiento. Los ratones fueron controlados diariamente para determinar la morbilidad, la mortalidad y las observaciones clínicas. El peso corporal se midió dos veces por semana. El análisis de imágenes del desarrollo del tumor se realizó una vez por semana bajo anestesia mediante inyección de 5 μ l/g de D-luciferina, 10 minutos antes de la obtención de imágenes bioluminiscentes.

[0255] Como se muestra en la Figura 7, se observó una respuesta sólida a una dosis única en ambos modelos (MV4-11 y OCI-AML2), con una regresión duradera de la señal de luciferina, un marcador de la destrucción de las células tumorales.

Ejemplo 15: *Degradación de GSPT1 por el conjugado de CD33AB-Compuesto (Ia)*

[0256] El mecanismo de acción del conjugado de CD33AB-Compuesto (Ia) se confirmó mediante el seguimiento de la degradación de GSPT1 mediante western blot. Se prepararon lisados de células completas a partir de células de AML positivas para CD33 de MV4-11 tratadas con el conjugado de CD33AB-Compuesto (Ia), neodegradador P1, CC-90009 o Mylotarg durante 6, 12 y

18 horas, y luego se separaron las proteínas mediante electroforesis y se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). GSPT1 se probó con un anticuerpo anti-GSPT1 de conejo disponible comercialmente (Abcam), seguido de un anticuerpo secundario anticonejo conjugado con HRP (Cell Signaling Technology) y se detectó mediante un sustrato quimioluminiscente (ThermoFisher). Luego se quitó la membrana de PVDF y se volvió a sondear con el anticuerpo conjugado con beta-actina-HRP (Cell Signaling Technology). Los resultados se muestran en la Figura 8. Estos datos respaldan que la conjugación de neodegradador P1 con CD33AB mejora la exposición intracelular para impulsar la degradación selectiva de GSPT1. Se observaron disminuciones similares dependientes de la dosis en los niveles de GSPT1 para el conjugado y las moléculas pequeñas, neodegradador P1 y CC-90009, en tan solo 6 horas después de la dosificación. En contraste con el agotamiento transitorio observado con neodegradador P1 y CC-90009, que muestra un rebote en los niveles de GSPT1 a las 12 horas, el tratamiento con el conjugado mostró un agotamiento duradero hasta 18 horas después de la dosificación. Estos datos respaldan la posibilidad de una exposición prolongada de la carga útil activa después de la dosificación, de acuerdo con la posibilidad de una duración más profunda de la respuesta y una dosificación menos frecuente.

Ejemplo 16: Eficacia farmacocinética y farmacodinámica del conjugado de anticuerpo anti-CD33-neodegradador

[0257] Se evaluó la exposición y actividad farmacodinámica del conjugado de CD33AB-Compuesto (Ia) en relación con dosis que se había observado previamente que establecían la regresión del tumor. Las células de leucemia mielocítica aguda humana del modelo tumoral subcutáneo de MV4-11 (1×10^6 células en 0,1 ml) se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones hembra atímicos desnudos. Los ratones se trataron con inyección intravenosa en la vena lateral de la cola con CD33AB-Compuesto (Ia) a 0,5 mg/kg, 1 mg/kg y 3 mg/kg. Se recolectaron tumores y sangre de punción cardíaca terminal de ratones del modelo de tumor subcutáneo de MV4-11 en puntos de tiempo previos a la dosis, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 24 horas, 72 horas y 120 horas después de la dosificación. La sangre se procesó hasta obtener plasma con EDTA y los tumores se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido.

[0258] Análisis farmacocinético: Los niveles de carga útil del conjugado se cuantificaron en las muestras de plasma mediante LC-MS/MS. El proceso comprendió digestión con b-glucuronidasa para liberar la carga útil del neodegradador P1 del conjugado, seguida de extracción

por precipitación de proteínas para recolectar las cargas libres y liberadas, y análisis LC-MS/MS mediante adquisición MRM. El método fue calificado y cumplió con los criterios de aceptación de LC-MS/MS de cuantificación bioanalítica sin GLP para análisis de moléculas pequeñas de acuerdo con la linealidad, especificidad, arrastre, exactitud y precisión. Los parámetros farmacocinéticos relevantes se calcularon utilizando WinNonLin (V8.3).

[0259] Análisis farmacodinámico: el tejido tumoral se homogeneizó utilizando tampón de lisis RIPA con inhibidores de proteasa y fosfatasa, y se realizó western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-GSPT1 de conejo (Abcam ab126090). De acuerdo con el agotamiento duradero de GSPT1 observado *in vitro*, una sola dosis *in vivo* del conjugado fue suficiente para mantener niveles reducidos de GSPT1 durante hasta 120 horas (Figura 9, arriba). Además, la conjugación de neodegradador P1 con CD33AB dio como resultado una vida media duradera de P1 superior a 64 horas (Figura 9, abajo), lo que respalda una exposición duradera de la carga útil y la posibilidad de una dosificación menos frecuente.

Ejemplo 17: *Actividad de los conjugados de antiCD33-neodegradadores contra líneas celulares insensibles a Mylotarg*

[0260] La citotoxicidad *in vitro* de los artículos de prueba (TA) se midió utilizando un panel de líneas celulares de leucemia mieloide aguda positivas para CD33 que se sabe que son insensibles a Mylotarg (AML193 y Kasumi-6). Las células, a una concentración predeterminada, se sembraron en placas de 96 pocillos y, después de una incubación durante la noche a 37 °C/5 % de CO₂, se añadieron diluciones en serie de cada artículo de prueba (TA) a las células. Las células se incubaron con artículos de prueba durante 72 horas y se detectó la viabilidad con el reactivo CellTiter-Glo® (Promega). Los valores luminiscentes se normalizaron para cada línea celular y las IC₅₀ se calcularon utilizando el software Prism.

[0261] Como se muestra en las Figuras 10A y 10B, el conjugado tuvo una buena actividad contra ambas líneas celulares.

[0262] Debe apreciarse que la sección Descripción Detallada, y no las secciones Breve Descripción de la Invención y Resumen, está destinada a interpretar las reivindicaciones. Las secciones Breve Descripción de la Invención y Resumen pueden describir uno o más aspectos ejemplares de la presente invención, pero no todos, tal como lo contemplan los inventores y, por consiguiente, no pretenden limitar la presente invención y las reivindicaciones adjuntas de ninguna manera.

[0263] La presente invención se ha descrito anteriormente con la ayuda de bloques de construcción funcionales que ilustran la implementación de funciones específicas y sus relaciones. Los límites de estos bloques de construcción funcionales se han definido arbitrariamente en el presente documento para facilitar la descripción. Se pueden definir límites alternativos, siempre que las funciones y relaciones especificadas de los mismos se realicen adecuadamente.

[0264] La descripción anterior de los aspectos específicos revelará de manera tan completa la naturaleza general de la invención que otros podrán modificar y/o adaptar fácilmente dichos aspectos específicos para diversas aplicaciones, sin experimentación indebida, sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, se pretende que dichas adaptaciones y modificaciones estén dentro del significado y rango de equivalentes de los aspectos divulgados, con base en las enseñanzas y guías presentadas en el presente documento. Debe entenderse que la fraseología o terminología del presente documento tiene fines de descripción y no de limitación, de manera que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva debe ser interpretada por la persona con conocimientos básicos en la materia a la luz de las enseñanzas y directrices.

[0265] La amplitud y alcance de la presente invención no deben limitarse por ninguno de los aspectos ejemplares descritos anteriormente, sino que deben definirse únicamente de acuerdo con las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.