

ENLAZADORES NOVEDOSOS PARA EL SUMINISTRO SOSTENIDO DE TERAPÉUTICOS

LISTADO DE SECUENCIAS

5 La presente solicitud se presenta junto con un listado de secuencias en
formato XML ST.26. El listado de secuencias se proporciona como un archivo
titulado “30359 Sequence Listing.xml” creado el 9 de diciembre de 2022 y tiene un
tamaño de 14,6 kilobytes. La información del listado de secuencias en el formato
XML ST.26 se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

10

CAMPO

La presente invención se relaciona con nuevos compuestos que
comprenden enlazadores novedosos para la mejora de la duración de acción de
los terapéuticos, tales como péptidos. La presente invención también se relaciona
15 con nuevos medios conjugados que comprenden un enlazador, una región Fc y,
opcionalmente un terapéutico. La presente invención también se relaciona con
nuevos compuestos que comprenden dos o más grupos funcionales maleimida
que pueden ser útiles para conectarse a regiones con dos o más nucleófilos, tales
como regiones Fc de un anticuerpo.

20

ANTECEDENTES

Los péptidos terapéuticos, como la insulina, se han utilizado anteriormente para tratar enfermedades como la diabetes. Sin embargo, la duración de la acción de muchos péptidos puede ser bastante corta. Por lo tanto, se requiere que los
5 pacientes se dosifiquen cada pocas horas, típicamente por inyección, lo que puede ser pesado y llevar mucho tiempo para el paciente.

Una estrategia para aumentar la duración de la acción es usar conjugados de anticuerpos y fármacos (ADC, por sus siglas en inglés) en los que el componente farmacológico es el péptido terapéutico. Sin embargo, tales ADC son frecuentemente
10 difíciles de producir y los métodos de producción pueden requerir que el péptido terapéutico esté expuesto a condiciones duras y degradantes. Una manera de proteger un péptido terapéutico durante la formación de ADC es modificar y/o proteger el péptido terapéutico, pero tales modificaciones pueden afectar la eficacia del péptido terapéutico. Los métodos de producción de ADC conocidos tampoco han
15 sido capaces de usar péptidos terapéuticos que incorporen aminoácidos sintéticos.

En consecuencia, existe una necesidad de ADC que puedan incorporar péptidos terapéuticos no protegidos/no modificados con o sin aminoácidos no nativos.

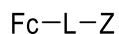
La identidad del enlazador puede influir en las condiciones de reacción que el terapéutico debe experimentar durante la producción del ADC. En consecuencia,
20 existe también una necesidad de enlazadores mejorados que puedan incorporar péptidos terapéuticos no protegidos/no modificados con o sin aminoácidos no nativos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se relaciona con enlazadores novedosos, incluyendo conjugados novedosos que comprenden los enlazadores novedosos, para el suministro de un terapéutico a un animal. Los conjugados novedosos también
 5 pueden incluir una región Fc y un terapéutico, tal como un péptido terapéutico.

Sorprendentemente, se ha descubierto que al unir un terapéutico con uno de los enlazadores novedosos descritos y otro medio, tal como una región Fc de un anticuerpo, la duración de acción del terapéutico puede mejorarse y/o alargarse. Si bien no desea limitarse por teoría, se cree que la unión del
 10 terapéutico con el enlazador y la región Fc puede aumentar la duración de la acción del terapéutico al alargar el medio general y evitar la interrupción del terapéutico. Las condiciones de reacción para la reacción de conjugación entre los enlazadores novedosos y la región Fc son relativamente suaves, por lo que no es necesario modificar la carga útil o terapéutico para protegerse durante la reacción.

15 También se ha descubierto sorprendentemente que los enlazadores novedosos descritos pueden producir un ADC que puede incorporar péptidos terapéuticos no protegidos/no modificados con o sin aminoácidos no nativos.



20

Fórmula I-A.

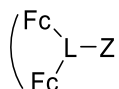
En la presente se describen compuestos conjugados novedosos de la
 Fórmula I-A, en donde Fc comprende una región Fc, tal como una región Fc de un
 anticuerpo, L comprende un enlazador, y Z comprende un terapéutico, un grupo
 funcional adecuado para la unión posterior de un terapéutico, o un grupo funcional
 5 adecuado para que el compuesto conjugado exista sin unirse a un terapéutico.



Fórmula I-B.

10 En la presente también se describen compuestos conjugados novedosos de
 la Fórmula I-B, en donde Fc comprende una o más regiones Fc, L comprende un
 enlazador, y Z comprende un terapéutico, un grupo funcional adecuado para la
 unión posterior de un terapéutico, o un grupo funcional adecuado para que el
 compuesto conjugado exista sin unirse a un terapéutico.

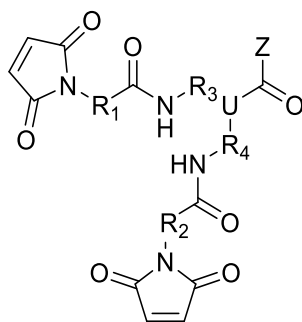
15



Fórmula I-C.

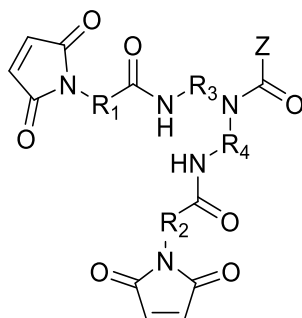
En la presente también se describen compuestos conjugados novedosos de
 20 la Fórmula I-C, en donde Fc comprende una sola región Fc, tal como una región Fc
 de un anticuerpo, L comprende un enlazador, y Z comprende un terapéutico, un

grupo funcional adecuado para la unión posterior de un terapéutico, o un grupo funcional adecuado para que el compuesto conjugado exista sin unir un terapéutico.



Fórmula II-A.

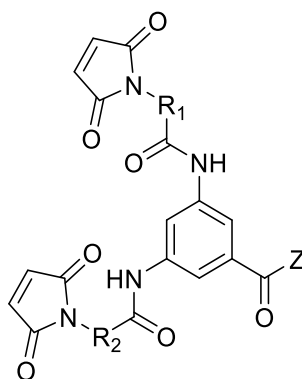
En la presente también se describen compuestos novedosos de la Fórmula II-A, en donde R_1 y R_2 son independientemente alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$ y $-CH_2CH_2NH_2$; R_3 y R_4 son independientemente alquilo C_1 a C_5 o están ausentes; U es amina terciaria o fenilo 1,3,5-sustituido; Z comprende H, OH, NH_2 , NH, un terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30; y sales farmacéuticamente aceptables de este.



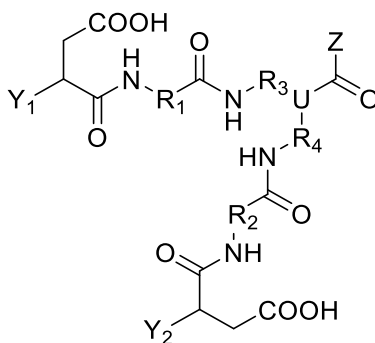
Fórmula II-B.

- En la presente también se describen compuestos novedosos de la Fórmula
- 5 II-B, en donde R_1 y R_2 son independientemente alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$ o $-CH_2CH_2NH_2$; R_3 y R_4 son independientemente alquilo C_1 a C_5 ; Z comprende H, OH, NH_2 , NH, un terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30; y sales farmacéuticamente aceptables de este.

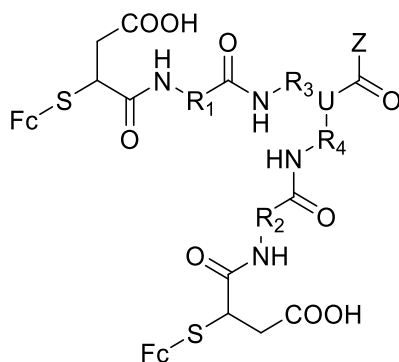
10



Fórmula II-C.



En la presente también se describen compuestos novedosos de la Fórmula III-A, en donde R₁ y R₂ son independientemente alquilo C₁ a C₅, opcionalmente sustituido con uno o más de NH₂, CH₂NH₂ y CH₂CH₂NH₂; R₃ y R₄ son independientemente alquilo C₁ a C₅ o están ausentes; U es amina terciaria o fenilo 1,3,5-sustituido; Y₁ e Y₂ comprenden independientemente una amida, amina, imina, sulfonamida, tiourea, urea, tioéter o combinaciones de estas; Z comprende H, OH, NH₂, NH, un terapéutico, alquilo C₁ a C₃₀, (OCH₂CH₂)_m, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30; y sales farmacéuticamente aceptables de este.

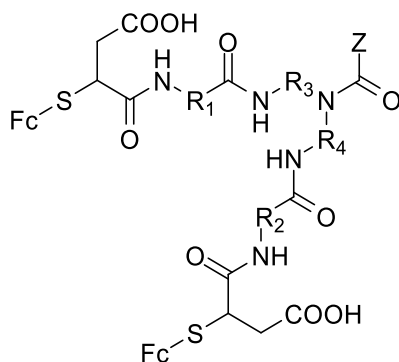


Fórmula III-B.

En la presente también se describen compuestos novedosos de la Fórmula

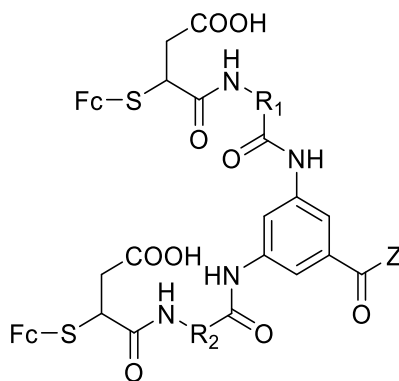
5 III-B, en donde R_1 y R_2 son independientemente alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de NH_2 , CH_2NH_2 y $CH_2CH_2NH_2$; R_3 y R_4 son independientemente alquilo C_1 a C_5 o están ausentes; U es amina terciaria o fenilo 1,3,5-sustituido; Z comprende H, OH, NH_2 , NH, un terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total

10 de 1 a 30; Fc comprende una región Fc; S es un átomo de azufre de la región Fc; y sales farmacéuticamente aceptables de este.



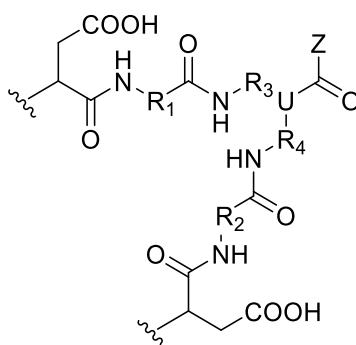
Fórmula III-C.

- En la presente también se describen compuestos novedosos de la Fórmula
- 5 III-C, en donde R_1 y R_2 son independientemente alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de NH_2 , CH_2NH_2 y $CH_2CH_2NH_2$; R_3 y R_4 son independientemente alquilo C_1 a C_5 o están ausentes; Z comprende H , OH , NH_2 , NH , un terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30; Fc comprende una región Fc ; S es un
- 10 átomo de azufre de la región Fc ; y sales farmacéuticamente aceptables de este.



Fórmula III-D

En la presente también se describen los compuestos novedosos de la Fórmula III-D, en donde R_1 y R_2 son independientemente alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de NH_2 , CH_2NH_2 y $CH_2CH_2NH_2$; Z comprende H, OH, NH_2 , NH, un terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30; Fc comprende una región Fc; S es un átomo de azufre de la región Fc; y sales farmacéuticamente aceptables de este.

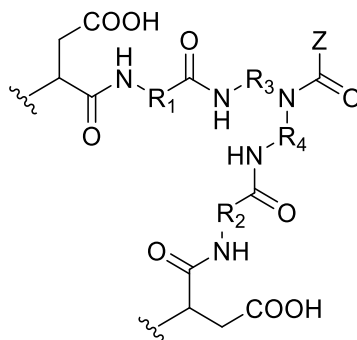


Fórmula IV-A.

10

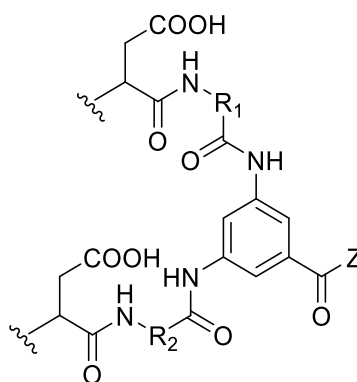
En la presente también se describen los compuestos novedosos de la Fórmula IV-A, en donde: R_1 y R_2 son independientemente alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, y $-CH_2CH_2NH_2$; R_3 y R_4 son independientemente alquilo C_1 a C_5 o están ausentes; U es amina terciaria o fenilo 1,3,5-sustituido; Z comprende H, OH, NH_2 , NH, un terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30; y sales farmacéuticamente aceptables de este.

15



Fórmula IV-B.

5 En la presente también se describen los compuestos novedosos de la
 Fórmula IV-B, en donde: R_1 y R_2 son independientemente alquilo C_1 a C_5 ,
 opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$ y $-CH_2CH_2NH_2$; R_3 y R_4
 es alquilo C_1 a C_5 ; y Z comprende H, OH, NH_2 , NH, un terapéutico, alquilo C_1 a
 C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero
 10 total de 1 a 30; y sales farmacéuticamente aceptables de este.



Fórmula IV-C.

En la presente también se describen compuestos novedosos de la Fórmula IV-C, en donde R_1 y R_2 son independientemente alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, o $-CH_2CH_2NH_2$; Z comprende H, OH, NH_2 , NH, un
 5 terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30; y sales farmacéuticamente aceptables de este.

Enlazador

La presente invención incluye un enlazador L, para conectar Z, *a través de*
 10 una reacción por adición conjugada nucleofílica, a otra porción, tal como uno o más aminoácidos de cisteína en una región Fc de un anticuerpo, como se muestra en la Fórmula I-A, I-B y/o I-C, o a otro nucleófilo adecuado, tal como una amida, amina, imina, sulfonamida, tiourea, urea, tioéter, tiol, cisteína, o combinaciones de estos, como se muestra en la Fórmula III-A, III-B y/o III-C.

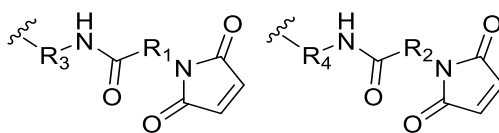
15 El enlazador puede incluir una unidad de enlace trivalente central, U, como se muestra en la Fórmula II-A, III-A y IV-A. Una de las porciones del enlazador puede unirse a Z. Las otras dos porciones de los enlazadores comprenden un grupo funcional maleimida, un electrófilo, que puede usarse para conectar selectivamente Z a dos nucleófilos en una reacción por adición conjugada nucleofílica.

20 Como tal, como se describe en la presente, el enlazador de la presente invención comprende dos o más grupos funcionales maleimida, preferentemente dos grupos funcionales maleimida, antes de la reacción por adición conjugada nucleofílica.

Las unidades de enlace trivalente adecuadas pueden incluir cualquier átomo o moléculas que pueden trisustituirse, tales como arilo C5 a C8 trisustituido, heteroarilo C5 a C8 trisustituido con 1 a 3 heteroátomos en el sistema de anillos, cicloalquilo C5 a C8 trisustituido, heterociclo C5 a C8 trisustituido con 1 a 3 heteroátomos en el sistema de anillos, amina terciaria, fosfina terciaria, o combinaciones de estos.

Preferentemente, U es fenilo trisustituido en 1,3,5 o amina terciaria.

Cada brazo que está unido a U y el grupo funcional maleimida puede representarse mediante la Fórmula V.



Fórmula V.

En el primero de los dos brazos representados por la Fórmula V, R_1 puede ser alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, y $-CH_2CH_2NH_2$ y R_3 puede ser alquilo C_1 a C_5 o estar ausente. En el segundo de los dos brazos representados por la Fórmula V, R_2 puede ser alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$ y $-CH_2CH_2NH_2$; y R_4 puede ser alquilo C_1 a C_5 o estar ausente.

R_1 y/o R_2 pueden ser preferentemente alquilo C_2 , opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$ o $-CH_2CH_2NH_2$. R_3 y/o R_4 pueden ser

preferentemente alquilo C_2 cuando U es una amina terciaria y está ausente cuando U es fenilo trisustituido en 1,3,5.

Cuando ambos brazos se unen a U, R_1 y R_2 pueden ser idénticos o pueden ser independientemente alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$ y $-CH_2CH_2NH_2$. Cuando ambos brazos se unen a U, R_3 y R_4 pueden ser idénticos, o pueden ser independientemente alquilo C_1 a C_5 o estar ausentes. Cuando R_3 y/o R_4 están ausentes, el nitrógeno amida en la Fórmula V se conecta directamente a U, tal como cuando U es fenilo 1,3,5-trisustituido como en la Fórmula IV-C.

El tercero de los tres brazos unidos a U incluye Z. Z puede comprender H, OH, NH_2 , NH, un terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30. Z se puede conectar directamente a U o Z se puede conectar a un grupo funcional carbonilo. El átomo de carbono del grupo funcional carbonilo puede estar unido directamente a U y Z, como se muestra en la Fórmula II-IV.

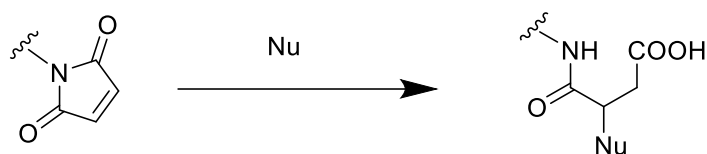
Por consiguiente, en la presente se describen enlazadores novedosos, como se muestra en la Fórmula II-A, Fórmula II-B y Fórmula II-C, con dos grupos funcionales maleimida antes de cualquier reacción por adición conjugada nucleofílica.

Reacciones de adición conjugada nucleofílica con grupos funcionales maleimida

Como se describe en la presente, un enlazador L, puede unirse a Z, para producir una carga útil vinculada, o si Z comprende un terapéutico, un terapéutico vinculado. El enlazador, como se describe en la presente, comprende dos o más, o preferentemente dos, grupos funcionales maleimida, como se muestra en la Fórmula V.

Los grupos funcionales maleimida pueden usarse para unir Z a una porción diferente, tal como una región Fc, a través de una reacción por adición conjugada nucleofílica.

En la reacción por adición conjugada nucleofílica, la maleimida actúa como un electrófilo y reacciona con un nucleófilo para formar un nuevo enlace covalente entre el
 5 átomo nucleofílico y un átomo de carbono electrofílico, lo que puede conducir a una apertura del grupo funcional maleimida, como se muestra en la Fórmula VI.

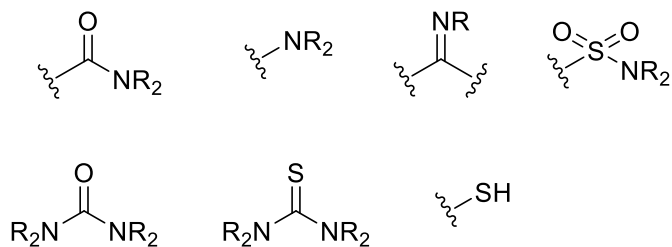


Fórmula VI.

10

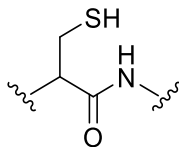
Se puede usar una variedad de nucleófilos para reaccionar con el grupo funcional maleimida electrofílico. Los nucleófilos adecuados incluyen porciones que comprenden uno o más átomos de nitrógeno y/o azufre en un grupo funcional donde el átomo de nitrógeno y/o azufre puede servir como un nucleófilo rico en electrones.

15 Los ejemplos adecuados de nucleófilos incluyen porciones que comprenden uno o más de los siguientes grupos funcionales: amida, amina, imina, sulfonamida, tiol, tiourea, urea, o combinaciones de estos, que también se muestran en la Fórmula VII.



Fórmula VII.

En particular, el aminoácido cisteína, que se encuentra en muchas secuencias
 5 de aminoácidos en péptidos, anticuerpos, proteínas o lo similar, como se muestra en
 la Fórmula VIII dentro de una cadena peptídica, incluye un grupo funcional tiol, que
 puede usarse como un nucleófilo para formar un tioéter entre la secuencia de
 aminoácidos y el enlazador, la carga útil vinculada, y/o el terapéutico vinculado.



Fórmula VIII.

Las condiciones específicas para las reacciones de adición conjugada
 nucleofílica conjugadas, son bien conocidas por un experto en la técnica. Las
 15 condiciones específicas pueden variar según el nucleófilo y electrófilo utilizado. En
 consecuencia, en la presente se describen compuestos novedosos y/o
 compuestos conjugados que comprenden una carga útil vinculada que se ha unido
 a otra porción a través de una reacción por adición conjugada nucleofílica, como

se muestra en la Fórmula III-A, Fórmula III-B, Fórmula III-C, Fórmula III-D, Fórmula IV-A, Fórmula IV-B y/o Fórmula IV-C.

Adicionalmente, el uso de los enlazadores novedosos descritos en la presente puede ser ventajoso ya que las condiciones de reacción son leves en relación con otras reacciones de adición conjugada nucleofílica que se han descrito con otros enlazadores. Por ejemplo, los enlazadores descritos pueden combinarse con la región Fc de un anticuerpo con muy poco calentamiento. Específicamente, los enlazadores descritos pueden conjugarse con la región Fc de un anticuerpo al mezclar el terapéutico vinculado y una región Fc reducida durante no más de 2 horas, a no más de 30 °C o no más de 25 °C para producir un conjugado.

Como las condiciones de reacción para la conjugación son relativamente suaves, la carga útil o terapéutica no necesita modificarse para protegerse durante la reacción. Otros enlazadores han requerido que el péptido terapéutico, tal como insulina, se modifique con una extensión recombinante. Los compuestos conjugados descritos son aún eficaces con una mayor duración de acción sin tener que modificar el terapéutico.

Región Fc

En algunas modificaciones, el nucleófilo que puede reaccionar con los dos o más grupos funcionales maleimida en el enlazador, es una región Fc. Una región Fc también se puede conocer como una región cristalizable de fragmentos. La región Fc es la región de la cola de un anticuerpo que interactúa con algunos receptores

de la superficie celular llamados receptores Fc. La región Fc puede incluir un péptido, proteína o porción de un anticuerpo, o un anticuerpo monoclonal completo con la capacidad de reaccionar con los receptores Fc. En particular, la región Fc de ciertos anticuerpos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, o combinaciones de estos, puede tener dos o más aminoácidos de cisteína que forman un puente disulfuro.

En algunas modificaciones, la región Fc de un anticuerpo puede modificarse antes de la unión al enlazador a través de una reacción por adición conjugada nucleofílica. Las modificaciones adecuadas pueden incluir modificaciones al anticuerpo para minimizar la reactividad entre el anticuerpo y el enlazador distinta de la reacción de adición de conjugación nucleofílica deseada, como se describe además en la presente.

En algunas modificaciones, la región Fc puede ser una región Fc modificada de un anticuerpo. Las modificaciones adecuadas incluyen la amortiguación y/o eliminación de ciertas porciones de la región Fc, tales como regiones bisagra.

El puente disulfuro presente en regiones Fc adecuadas puede reducirse y los dos tioles reducidos pueden ser nucleófilos adecuados que pueden sufrir reacciones de adición conjugada nucleofílica con los dos grupos funcionales maleimida de los enlazadores de la Fórmula II-A, Fórmula II-B y/o Fórmula II-C para dar como resultado los compuestos de la Fórmula IV-A, Fórmula IV-B y/o Fórmula IV-C.

Terapéutico

En algunas modalidades, Z puede comprender un terapéutico. Un terapéutico es un fármaco o agente activo que puede tratar una enfermedad dirigida si se administra en un paciente con la enfermedad dirigida.

- 5 Los tratamientos terapéuticos adecuados pueden comprender uno o más aminoácidos o un péptido con de 2 a aproximadamente 500 aminoácidos, de 2 a aproximadamente 250 aminoácidos, o de 2 a aproximadamente 100 aminoácidos.

Los tratamientos terapéuticos adecuados pueden comprender hormonas peptídicas, tales como hormona adrenocorticotrópica (ACTH, por sus siglas en inglés), adropina, amilina, angiotensina, péptido natriurético auricular (ANP, por sus siglas en inglés), calcitonina, colecistoquinina (CCK, por sus siglas en inglés), gastrina, grelina, glucagón, hormona de crecimiento, hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés), insulina, leptina, hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés), hormona estimulante de melanocitos (MSH, por sus siglas en inglés), oxintomodulina, oxitocina, hormona paratiroidea (PTH, por sus siglas en inglés), prolactina, renina, somatostatina, hormona estimulante de la tiroides (TSH, por sus siglas en inglés), hormona liberadora de tirotrópina (TRH, por sus siglas en inglés), vasopresina, también llamada arginina vasopresina (AVP) u hormona antidiurética (ADH, por sus siglas en inglés), péptido intestinal vasoactivo (PIV),
10 combinaciones de estos y/o análogos de estos. En algunas modalidades, el terapéutico puede ser insulina, oxintomodulina y/o análogos de estas.
15
20

Otros tratamientos terapéuticos adecuados incluyen un anticuerpo monoclonal, una interleucina, un interferón, un inhibidor de proteína quinasa, un factor de crecimiento hematopoyético, una proteína, una proteína fusionada, oligonucleótido, o combinaciones de estos.

5

Conjugado

En algunas modalidades, los compuestos novedosos pueden ser un conjugado y/o un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) cuando Z comprende un terapéutico y el enlazador se conjuga con una región Fc de al menos una porción de un anticuerpo. Como se describe en la presente, se descubrió sorprendentemente que cuando un terapéutico, tal como oxintomodulina, se unía a una región Fc de un anticuerpo a través de los enlazadores novedosos descritos aquí, el terapéutico tenía una duración de acción mejorada en relación con el terapéutico solo.

10

15

Método de tratamiento

También se describen en la presente métodos para aumentar la duración de acción de un terapéutico. El método puede comprender la etapa de unir el terapéutico a un enlazador trivalente para producir un enlazador terapéutico, tal como los compuestos de la Fórmula II-A, Fórmula II-B y/o Fórmula II-C, en donde Z comprende el terapéutico.

20

El método también puede comprender la etapa de unión del terapéutico vinculado a una región Fc de al menos una porción de un anticuerpo, tal como

IgG, a través de una reacción por adición conjugada nucleofílica entre el terapéutico vinculado y dos nucleófilos en la región Fc, tal como dos átomos y/o aniones de azufre, para producir un compuesto conjugado.

El compuesto conjugado puede comprender un terapéutico unido a los
5 enlazadores novedosos descritos en la presente, que a su vez se conjuga con la región Fc de al menos una porción del anticuerpo. El compuesto conjugado puede tener una duración de acción que sea más larga que el terapéutico que está libre. La duración de acción del compuesto conjugado puede ser de al menos 12 horas, 1 día, 2 días, o 3 días mayor que la duración de acción del terapéutico.

10 Adicionalmente, el uso de los enlazadores novedosos descritos en la presente puede ser ventajoso ya que las condiciones de reacción son leves en relación con otras reacciones de adición conjugada nucleofílica que se han descrito con otros enlazadores. Por ejemplo, los enlazadores descritos pueden combinarse con la región Fc de un anticuerpo con muy poco calentamiento. Específicamente,
15 los enlazadores descritos pueden conjugarse con la región Fc de un anticuerpo al mezclar el terapéutico vinculado y una región Fc reducida durante no más de 2 horas, a no más de 30 °C o no más de 25 °C para producir un conjugado.

Formulación

20 Los compuestos descritos en la presente pueden incluirse en una formulación farmacéutica. La formulación farmacéutica puede comprender uno o más portadores, diluyentes y excipientes que son compatibles con los compuestos y

otros componentes de la composición o formulación y que no son perjudiciales para el paciente. Pueden encontrarse ejemplos de composiciones farmacéuticas y procesos para su preparación en “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, Loyd, V., *et al.* Eds., 22^{da} edic., Mack Publishing Co., 2012.

5

Definiciones

Como se usa en la presente descripción, los términos “un”, “una”, “el/la” y términos similares usados en el contexto de la presente descripción (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse como

10 que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción o se contradiga claramente por el contexto.

Como se usa en la presente, el término “alquilo” significa un radical hidrocarbonado monovalente o bivalente saturado de cadena lineal o ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, “alquilo C₁-

15 C₂₀” significa un radical que tiene de 1 a 20 átomos de carbono en una disposición lineal o ramificada.

Ciertas abreviaturas usadas en la presente descripción se definen como sigue: “BEA” se refiere a 5-metil-1,2,4-triazolo[3,4-b]benzotiazol; “Boc” se refiere a *tert*-butoxicarbonilo; “DABA” se refiere a ácido 3,5-diaminobenzoico; “DCM” se

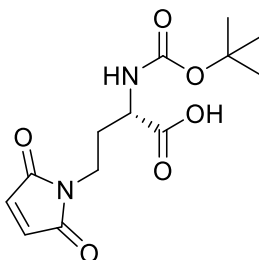
20 refiere a diclorometano; “DIC” se refiere a diisopropilcarbodiimida; “DIEA” se refiere a diisopropiletilamina; “DMAP” se refiere a 4-dimetilaminopiridina; “EtOAc” se refiere a acetato de etilo; “Fmoc” se refiere a fluorilmetiloxycarbonilo; “h/hs” se

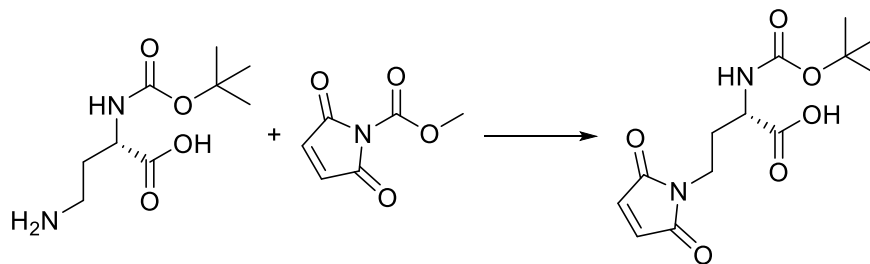
refiere a hora/s; “FPLC” se refiere a cromatografía líquida de proteína rápida; “MalDab” se refiere a ácido (S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanoico; “Maldap” se refiere a ácido (S)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico; Beta-MalDap se refiere a ácido (S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico; “MeOH” se refiere a metanol; “Min” se refiere a minuto o minutos; “MTT” se refiere a metiltiazol tetrazolio; “OXM” se refiere a oxintomodulina; “Oxyma” se refiere a cianohidroxiiminoacetato de etilo; “PEG” se refiere a polietilenglicol; “PyBOP” se refiere hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio; “t-Bu” se refiere a butilo terciario; “TCEP” se refiere a clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; “THF” se refiere a tetrahidrofurano;

PREPARACIONES

Preparación 1

15 Ácido (S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanoico

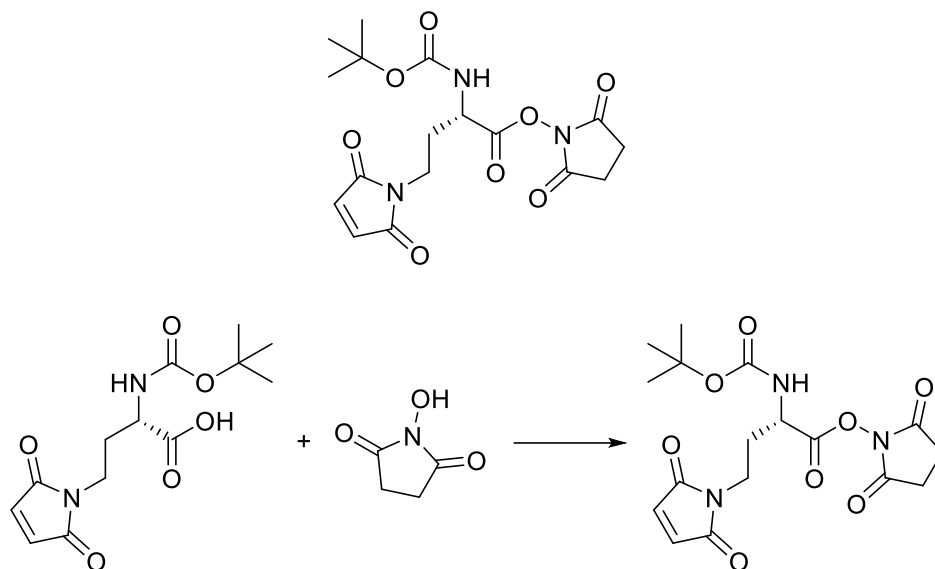




Se añadió trietilamina (1 ml, 7,17 mmol) a una mezcla de ácido (2S)-4-amino-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)butanoico (500 mg, 2,29 mmol) en 1,4-dioxano
 5 (10 ml), THF (5 ml) y agua (5 ml). Se agitó hasta obtener una mezcla homogénea, después se añadió 2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxilato de metilo (370 mg, 2,31 mmol). Se mezcló a temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluyó con 50 ml de agua, se ajustó el pH a ~6 al añadir HCl 5N. Se extrajo la solución acuosa con EtOAc (30 ml) y cloroformo/iso-propanol (3 x 30 ml). Las capas
 10 orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo resultante a través de cromatografía de columna en gel de sílice que eluye con 0-30 % de MeOH/DCM para dar el compuesto del título (580 mg, 81 %). ES/MS *m/z*: 199 (M- tBu).

Preparación 2

(S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanoato
 de 2,5-dioxopirrolidin-1-il

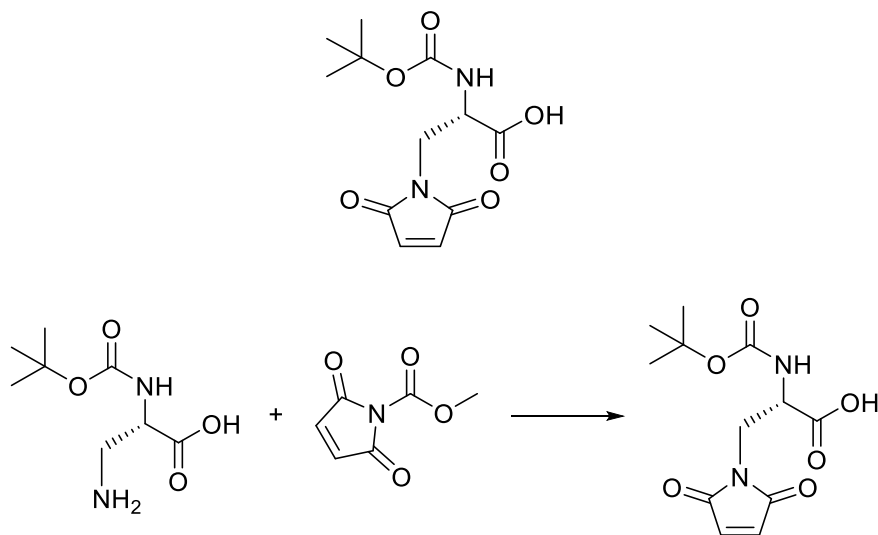


- Se añadió dicitlohexilcarbodiimida (320 mg, 1,53 mmol) a una solución de ácido
- 5 (S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanoico (400 mg, 1,27 mmol) y N-hidroxisuccinimida (180 mg, 1,53 mmol) en THF (6 ml). Se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se filtró para eliminar sólidos, después se concentró el filtrado a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (605 mg, 84 %) el cual se usó sin purificación. ES/MS *m/z*: 296 (M-tBu).

10

Preparación 3

Ácido (S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico



Se mezcló ácido (2S)-3-amino-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoico

5 (5,00 g, 24,5 mmol) con solución acuosa 1M de bicarbonato de sodio (130 ml, 130 mmol). Se agitó a temperatura ambiente durante 10 min hasta que se formó una solución transparente. Se enfrió la solución en un baño de agua helada, y se

añadió 2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrólo-1-carboxilato de metilo (4,00 g, 25,0 mmol) como en tres porciones durante 15 min. Se continuó con la agitación a 0 °C

10 durante 3 horas. Se añadió 100 ml de EtOAc y se agitó bajo enfriamiento, después se añadió HCl concentrado para ajustar el pH a 1. Se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa con DCM (4 x 50 ml). Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con NaCl acuoso saturado y se secaron sobre sulfato de sodio.

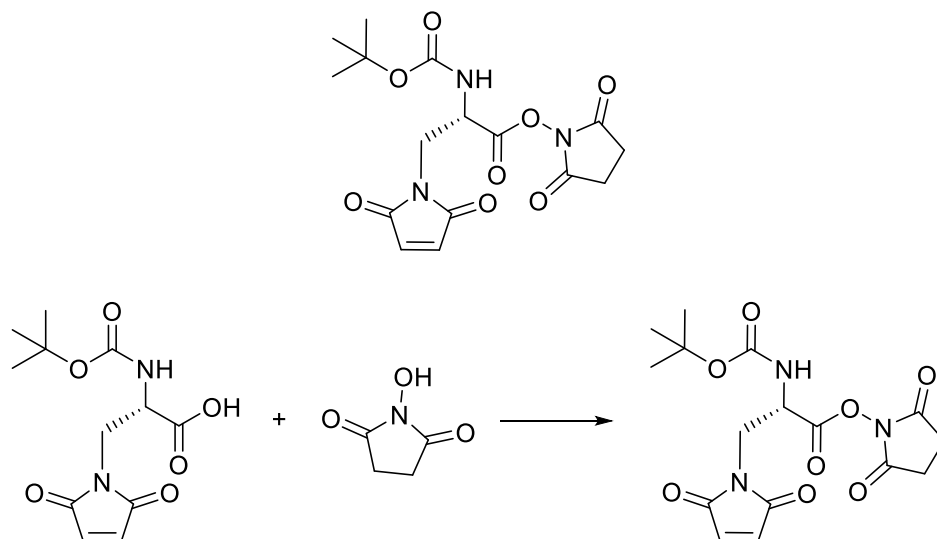
Eliminar el solvente a presión reducida. Se purificó a través de cromatografía de

15 columna en gel de sílice que eluye con 0-40 % de MeOH en DCM para dar el compuesto del título (5,70 g, 66 %). ES/MS *m/z*: 185 (M-*t*Bu).

Preparación 4

(S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoato
de 2,5-dioxopirrolidin-1-il

5

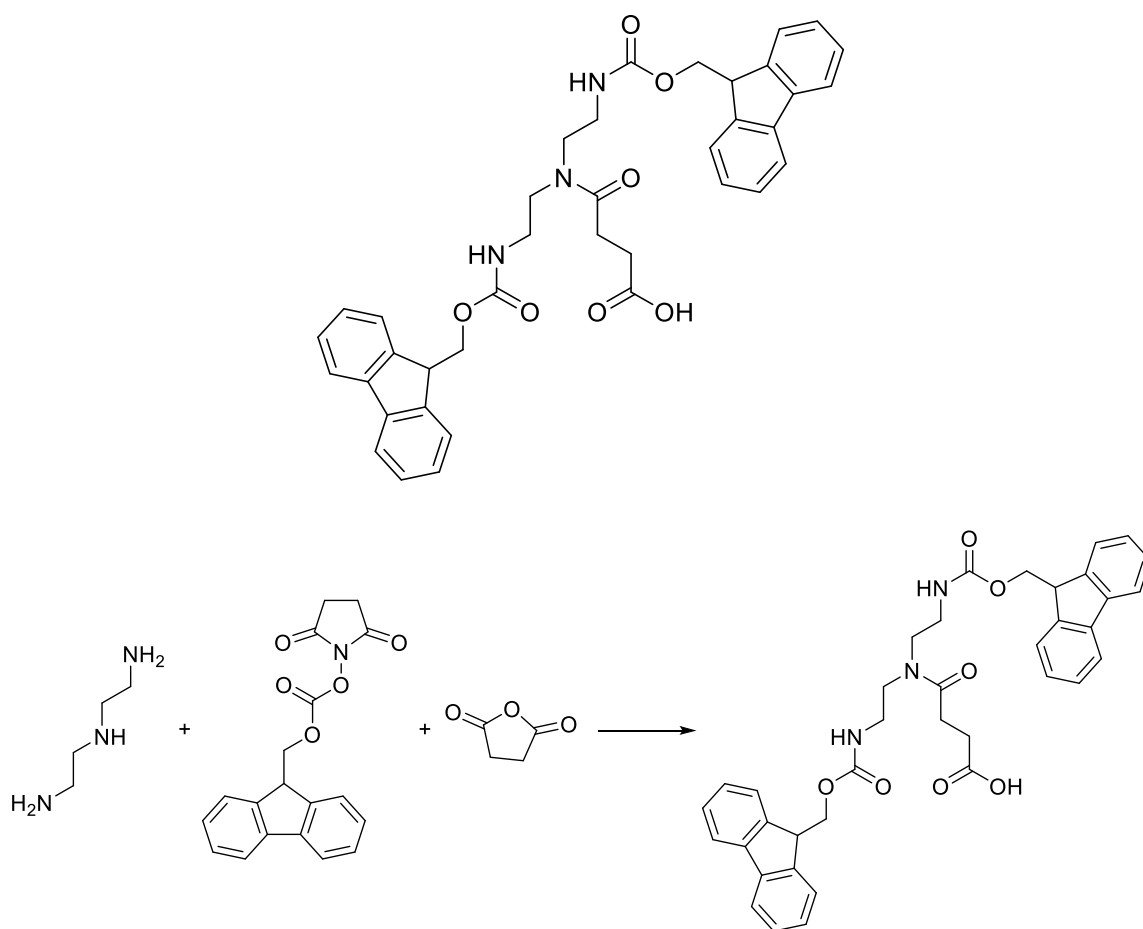


Se añadió diciohexilcarbodiimida (484 mg, 2,32 mmol) a una mezcla de ácido
10 (S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico
(550 mg, 1,54 mmol) y N-hidroxisuccinimida (272 mg, 2,31 mmol) en THF (5 ml). Se
agitó a temperatura ambiente hasta que apareció un precipitado. Los sólidos se
eliminaron mediante filtración y se lavaron con DCM. El filtrado se concentró a presión
reducida para dar el compuesto del título (1,18 g, 85 %). ES/MS m/z: 282 (M+H-Boc).

15

Preparación 5

Ácido 4-(bis(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)etil)amino)-4-oxobutanoico



5

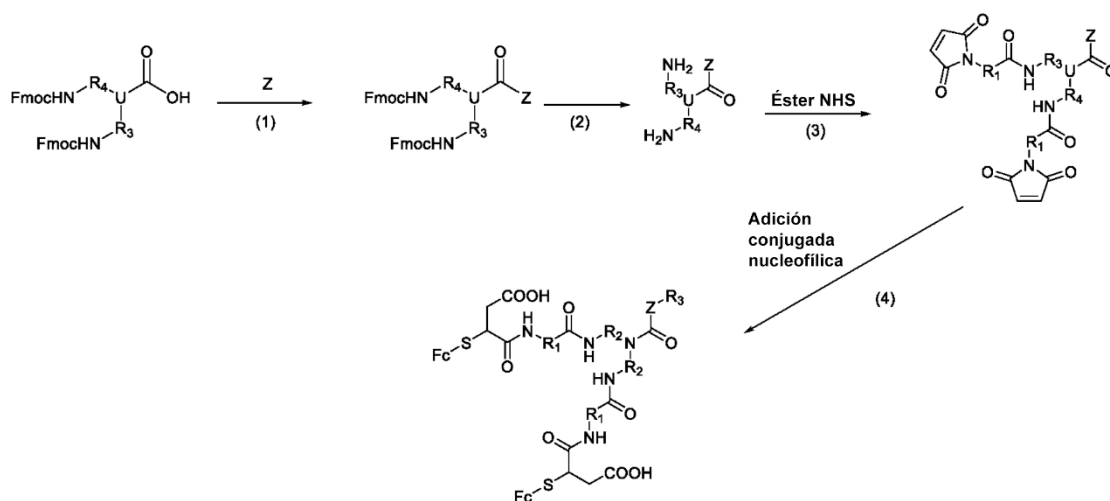
Se añadió una solución de N-(9-fluorenilmetoxycarbonilo) succinimida (19,4 g, 56,4 mmol) en DCM (80 ml) durante 45 min a una solución de dietilentriamina (3,1 ml, 28 mmol) en DCM (30 ml) enfriada a -78 °C. Después de 2 horas, se calentó la mezcla a temperatura ambiente, y se añadió anhídrido succínico (9,91 g, 98 mmol) y DMAP (691 mg, 5,60 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15

10

horas. Se ajustó el pH a 5 por adición lenta de HCl 1N (20 ml). Se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con DCM (2 x 100 ml). Se combinaron las capas orgánicas y se lavaron con NaCl acuoso saturado, se secaron sobre sulfato de magnesio concentrado a presión reducida, y se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice que eluye con MeOH 0-10 % en DCM para dar el compuesto del título (911,84 g, 65 %) como un polvo blanco. ES/MS m/z : 648 (M+1).

Ejemplos

Esquema 1



Síntesis genérica del conjugado que incluye la región Fc, el enlazador y el péptido

15

En el Esquema 1 se proporciona un resumen de la síntesis general del péptido enlazador. En cada caso, el núcleo trivalente (en dos de los tres brazos

disponibles) protegido con Fmoc de fenilo trisustituido en 1,3,5 (disponible
comercialmente) o amina terciaria (Preparación 5) se hizo reaccionar inicialmente
con un péptido sobre una resina en reacción (1). Los grupos Fmoc se retiraron en la
reacción (2). En la reacción (3), los grupos funcionales amina primarios que resultan
5 de la eliminación de los grupos protectores Fmoc reaccionaron con ésteres de NHS
que incluyen el MalDap (disponible comercialmente), MapDab (Preparación 2), o
Beta-MalDap (Preparación 4) y el péptido se liberó de la resina. En la reacción (4),
los grupos funcionales bismaleimida reaccionaron con dos grupos funcionales tiol
reducidos en una región Fc en una reacción por adición conjugada nucleofílica para
10 producir el conjugado que incluye la región Fc, el enlazador y el terapéutico.

El péptido enlazador se genera por síntesis de péptidos en fase sólida
usando la estrategia Fmoc/t-Bu en un sintetizador de péptidos automatizado
SymphonyX (PTI Protein Technologies Inc.) que inicia de la resina de amida RAPP
AM-Rink (Poliestireno H40023 AM RAM, polímero Rapp GmbH). Los
15 acoplamientos de aminoácidos se realizan usando 5 equivalentes de aminoácido,
1,2 M DIC y Oxyma 0,9 M en DMF durante 2 horas, a 25 °C. Las desprotecciones
se realizan usando 25 % de soluciones de piperidina en DMF.

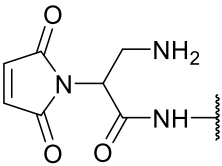
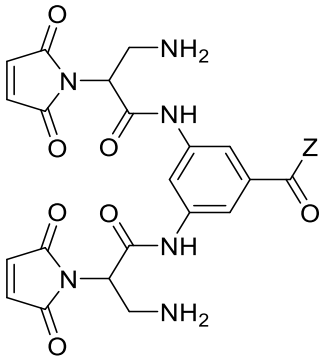
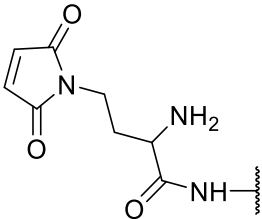
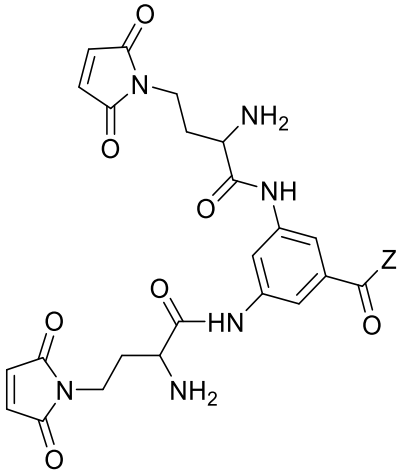
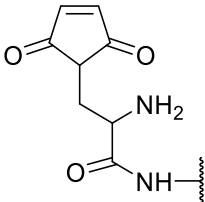
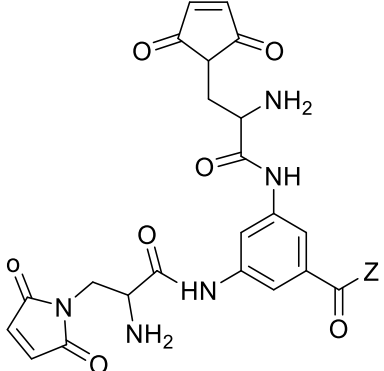
El aminoácido N terminal es una prolina protegida con boc para permitir que la
química de Fmoc se realice en la K ϵ -amina C terminal. El grupo protector MTT
20 presente en K en el terminal C se elimina usando 30 % de hexafluoroisopropanol
(HFIP) en DCM. Los ciclos de acoplamiento/desprotección adicionales que usan una
estrategia Fmoc/T-Bu para extender la cadena lateral involucran Fmoc-Peg24-OH

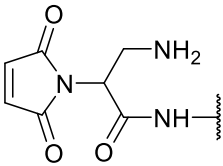
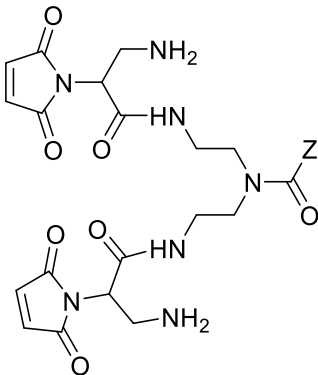
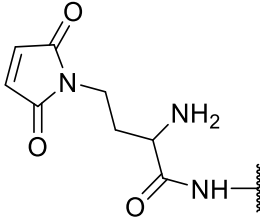
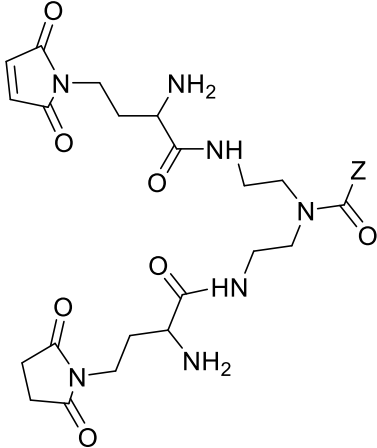
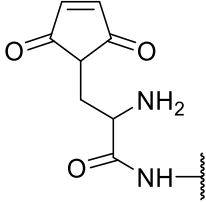
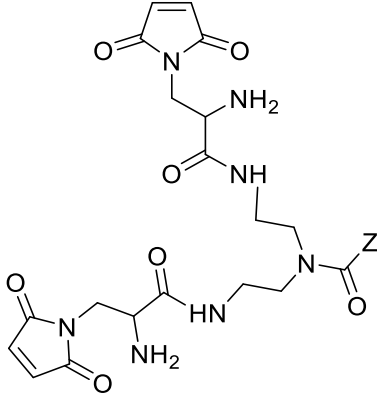
(Broadpharm, catálogo núm. BP -22036), enlazador alifático de BEA (bisetilamina) protegido con Fmoc y Boc-Maldap (CAS núm. 1491152-23-8). Para el acoplamiento Peg, se acoplaron 2 equivalentes de Fmoc-Peg24-OH, 2 equivalentes de PyBOP y 4 equivalentes de DIEA durante 2 horas a 37 °C. BEA se acopló usando 3 equivalentes de BEA con 3 equivalentes de PyBop y 6 equivalentes de DIEA durante 3 horas a 37 °C. Boc-Maldap se acopló a cada una de las aminas libres de BEA usando 5 equivalentes de Boc-Maldap, Oxyma 0,9 M y 1,2 M DIC en DMF durante 6 horas a 25 °C. Las desprotecciones de PEG y BEA se realizan usando 25 % de soluciones de piperidina en DMF. La escisión concomitante de la resina y la eliminación del grupo protector de cadena lateral se realizan en una solución que contiene ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés): triisopropilsilano: MilliQ H₂O: tioanisol 85:5:5:5 (v/v) durante 2 horas a 25 °C seguido de precipitación con éter frío. El péptido crudo se purifica por HPLC de fase inversa en una columna Waters Symmetry Prep C18 (19 x 250 mm 100A, 5µm), donde las fracciones adecuadas se agrupan y liofilizan.

Una vez que el enlazador terapéutico se escinde de la resina, puede hacerse reaccionar con una región Fc reducida para formar el conjugado, que incluye la región Fc, el enlazador y el terapéutico. En la Tabla 1 se proporciona un resumen de los conjugados posibles.

Los siguientes enlazadores se sintetizaron a través del proceso descrito anteriormente:

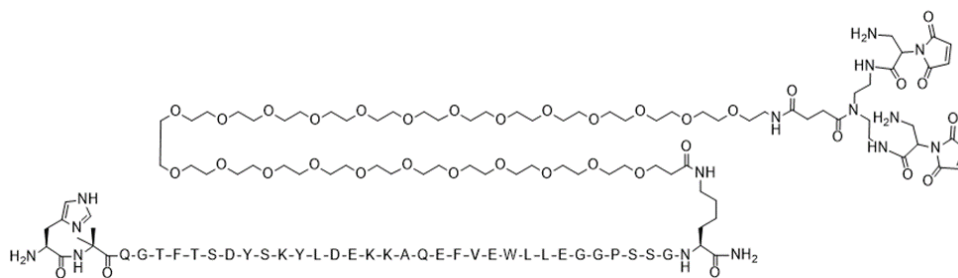
Tabla 1. Conjugados

Ejemplo	Núcleo trivalente	Amina	Enlazador
A	1,3,5-fenilo		
B	1,3,5-fenilo		
C	1,3,5-fenilo		

D	Amine terciaria	 <chem>NC(=O)C1C=CC(=O)N1</chem>	 <chem>NC(=O)C1C=CC(=O)N1</chem>
E	Amine terciaria	 <chem>NC(=O)CC1CCC(=O)N1</chem>	 <chem>NC(=O)CC1CCC(=O)N1</chem>
F	Amine terciaria	 <chem>NC(=O)C1C=CC(=O)N1</chem>	 <chem>NC(=O)C1C=CC(=O)N1</chem>

Sec. con núm. de ident.: 7: H-Aib-

QGTFTSDYSKYLDEKKAQEFVEWLLEGGPSSGK(Peg24-BEA-Maldap2)-NH₂

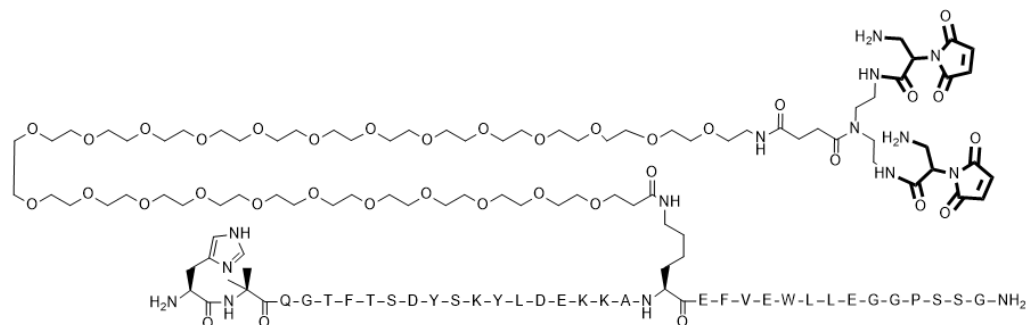


5

En esta secuencia el terminal N es libre, y el terminal C se amida como amida primaria. La K en el terminal C se modifica químicamente a través de la conjugación con el grupo ϵ -amino de la cadena lateral K con Peg24-BEA-Maldap2. Esta se sintetizó usando la síntesis general anterior, la amina fue MalDap, el núcleo terciario fue amina terciaria, y el puente entre el péptido y el enlazador fue PEG24.

10

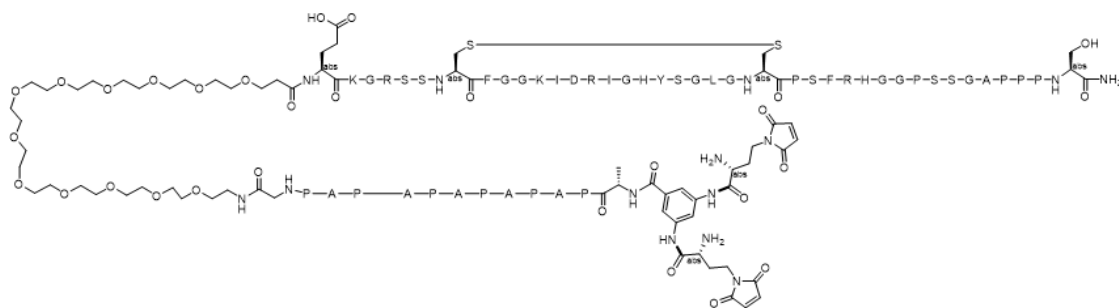
Sec. con núm. de ident.: 8: H-Aib-QGTFTSDYSKYLDEKKAK(Peg24-BEA-Maldap2)EFVEWLLEGGPSSG-NH₂



En esta secuencia el terminal N es libre, y el terminal C se amida como amida primaria. La K en la posición 20 se modifica químicamente a través de la conjugación con el grupo ϵ -amino de la cadena lateral K con Peg24-BEA-Maldap2. Esta se sintetizó usando la síntesis general anterior, la amina fue MalDap, el núcleo terciario fue amina terciaria, y el puente entre el péptido y el enlazador fue PEG24.

Sec. con núm. de ident.: 9: NH₂-SPPPAGSSPPGG-H-

RFSPCGLGSYHGIRDIKGGFCSSRGKE-(PEG12-G-PAPAPAPAPAPA)-DABA-(Maldab)2

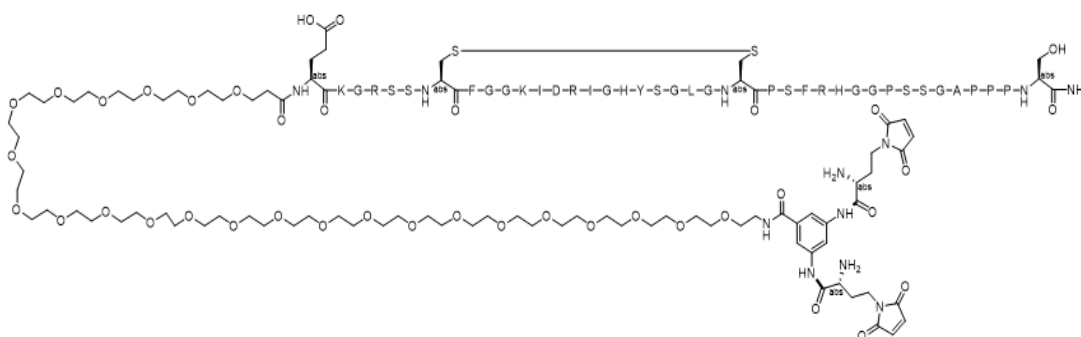


La sec. con núm. de ident. 9 se preparó usando la síntesis general
similarmenete a las secuencias 7, 8 y 9, la amina fue MalDab, el núcleo terciario fue
1,3,5-fenilo, y el puente entre el péptido y el enlazador fue PEG12.

5

Sec. con núm. de ident.: 10: NH₂-SPPAGSSPPGG-H-

RFSPCGLGSYHGIKGGFCSSRGKE-(PEG24-DABA-(Maldab)2



10

La sec. con núm. de ident. 10 se preparó usando la síntesis general
similarmenete a las secuencias 7, 8 y 9, la amina fue MalDab, el núcleo terciario fue
1,3,5-fenil, y el puente entre el péptido y el enlazador fue PEG24.

15

Los péptidos de la sec. con núm. de ident. 7-12 se generaron por síntesis de
péptidos en fase sólida usando la estrategia Fmoc/t-Bu en un sintetizador de
péptidos automatizado SymphonyX (PTI Protein Technologies Inc.) que inicia de la
resina RAPP AM-Rink Amida (Poliestireno H40023 AM RAM, polímero Rapp
GmbH). Los acoplamientos de aminoácidos se realizaron usando 5 equivalentes de

aminoácido, 1,2 M DIC y Oxyma 0,9 M en DMF durante 2 horas, a 25 °C. Las desprotecciones se realizan usando 25 % de soluciones de piperidina en DMF.

El aminoácido N terminal es una prolina protegida con boc para permitir que la química de fmoc se realice en la K ϵ -amina. El grupo protector MTT presente en K en la posición 20 se elimina usando 30 % de hexafluoroisopropanol (HFIP) en DCM. Los ciclos de acoplamiento/desprotección adicionales que usan una estrategia Fmoc/T-Bu para extender la cadena lateral involucran Fmoc-Peg24-OH (Broadpharm, catálogo núm. BP -22036), enlazador alifático de BEA (bisetilamina) protegido con Fmoc y Boc-Maldap (CAS núm. 1491152-23-8). Para el acoplamiento Peg, se acoplaron 2 equivalentes de Fmoc-Peg24-OH, 2 equivalentes de PyBOP y 4 equivalentes de DIEA durante 2 horas a 37 °C. BEA se acopló usando 3 equivalentes de BEA con 3 equivalentes de PyBop y 6 equivalentes de DIEA durante 3 horas a 37 °C. Boc-Maldap se acopló a cada una de las aminas libres de BEA usando 5 equivalentes de Boc-Maldap, Oxyma 0,9 M y 1,2 M DIC en DMF durante 6 horas a 25 °C. Las desprotecciones de Peg y BEA se realizan usando 25 % de soluciones de piperidina en DMF.

Región Fc de IgG4

La región Fc IgG4 humana se preparó y purificó por métodos bien conocidos. Las células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) se transfectaron transitoria o establemente con un sistema de expresión para secretar el Fc usando un solo vector que codifica la secuencia de nucleótidos de

cadena pesada de Fc amortiguada. Los medios clarificados, en los que se ha secretado el Fc amortiguado, se purificaron usando las técnicas comúnmente usadas conocidas por un experto en la técnica.

La región Fc de IgG4 incluyó una región Fc de IgG4 humana con una bisagra amortiguada. Para mejorar la expresión y minimizar el potencial de un péptido no estructurado que pueda interferir con el proceso de conjugación, se incorporó un dipéptido muy corto compuesto por alanina y glicina corriente arriba de la cisteína 229 (numeración del índice de la UE). La bisagra de IgG4 humana tradicional (sec. con núm. de ident. 1), se amortiguó, eliminando la cisteína en la posición 226 (numeración del índice de la UE), se involucró en el enlace disulfuro de bisagra superior, y se reemplazó con una bisagra acortada compuesta por un dipéptido n-terminal alanina-glicina seguido del disulfuro único de la cisteína nativa en la posición 229 (sec. con núm. de ident. 2). Eliminar el disulfuro de bisagra superior simplifica el proceso de conjugación al eliminar especies de conjugación mixta potenciales al limitar los tioles de cisteína disponibles que pueden reaccionar con las maleimidias. El Fc de IgG4 humana completo que contiene una bisagra amortiguada con un solo disulfuro se muestra en la sec. con núm. de ident. 3.

Se han explorado dos variantes de Fc amortiguadas de IgG4 humana y la combinación de estas: 1) mutaciones enfocadas en aumentar el punto isoeléctrico (pI) del Fc para mejorar potencialmente las propiedades biofísicas del conjugado final, incluidas las mutaciones Q274K, Q355R y E419Q (numeración del índice de la UE) (sec. con núm. de ident. 4) para mejorar potencialmente la vida media del

conjugado que incluía M252Y, S254T y T256E, que se sabe mejoran la unión del receptor Fc neonatal (FcRn, por sus siglas en inglés) a pH bajo, lo que a su vez resulta en mayores niveles de reciclaje de anticuerpos (sec. con núm. de ident. 5). La sec. con núm. de ident. 6 es una combinación de las mutaciones tanto Q274K, Q355R, E419Q como M252Y, S254T, T256E.

Unión del péptido enlazador a la región Fc

El enlace disulfuro en la bisagra del Fc se redujo al añadir 2 equivalentes de TCEP preparados en PBS al Fc e incubarlos a 37 °C durante 1 hora. La reducción se rastreó usando una LCMS-TOF usando una columna analítica Zorbax 300 SB-C3, RRHD, 2,1 x 100 mm y se analizó usando el software MassHunter. Una vez que el pico de ~52kD se redujo completamente a un pico de ~26kD, el Fc estaba listo para reconectarse.

La reacción de reconexión se realizó al diluir el Fc reducido cinco veces en un regulador de acetato de sodio 50 mM a pH 5,5 que contenía 20 % de acetonitrilo. Se disolvieron 2 equivalentes de péptido en H₂O MilliQ fría que contenía 20 % de acetonitrilo y después se añadió 0,1 % de TFA inmediatamente a la solución de Fc regulada. La reacción se monitoriza vía LCMS-TOF. El pico de ~26kD se convirtió en un pico de ~58kD a medida que cada una de las maleimidas peptídicas reconecta la cisteína reducida.

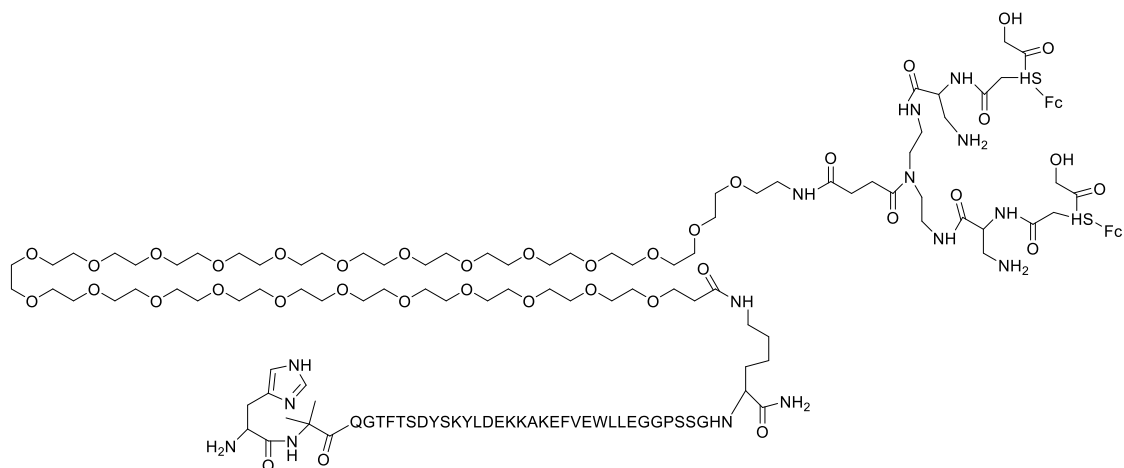
El conjugado reconectado de péptido Fc se purificó en dos etapas usando una AKTA FPLC. Primero la reacción se cargó sobre una columna de proteína A HiTrap™

MabSelect Xtra™ (Cytiva) en una purificación de dos etapas. La mezcla de reacción se cargó al sistema equilibrado en PBS pH7,2 para unir el producto que contenía Fc y eliminar el péptido. Una vez que se eliminó el péptido, se recolectó el material que contenía Fc al cambiar la fase móvil a 20 mM de citrato pH3, que interrumpe la
5 interacción de Fc con la columna. Se añadió 1M T8 para elevar el pH de las fracciones tras la elución, y se realizó un intercambio de reguladores en 20 mM de Tris pH8 mediante centrifugación usando viales amicon ultra de corte de 10.000 mw.

Si es necesario, se realizó una segunda etapa de purificación. Eliminar los componentes Fc no conjugados a través de un fuerte intercambio aniónico con un
10 Mono-Q 5/50 GL (Cytiva). La muestra se cargó usando 20 mM de T8 y se eluyó sobre un gradiente creciente con 20 mM de T8 + NaCl 1M. Se usó LCMS-TOF para determinar fracciones con el material deseado, las cuales después se intercambiaron nuevamente con regulador para eliminar el NaCl y tener una solución final de 20 mM de T8.

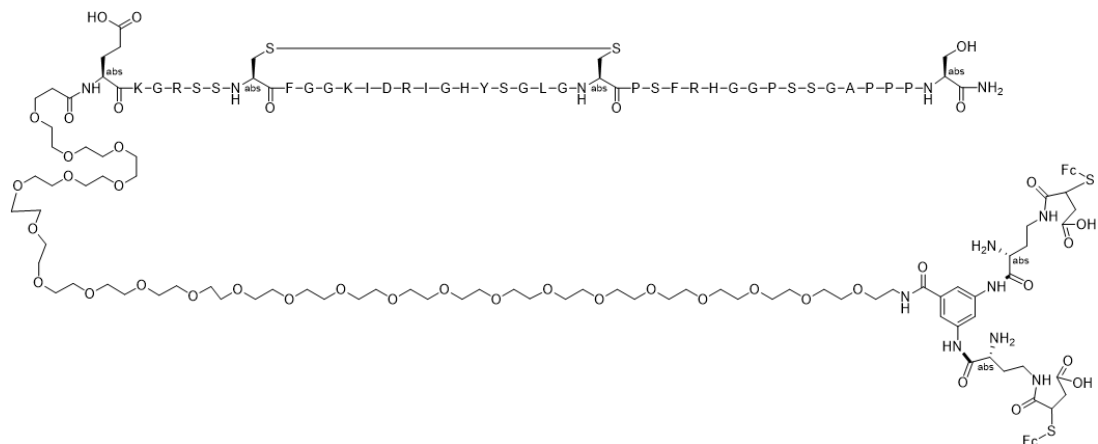
15

Ejemplo 1: OXMP-2Fc



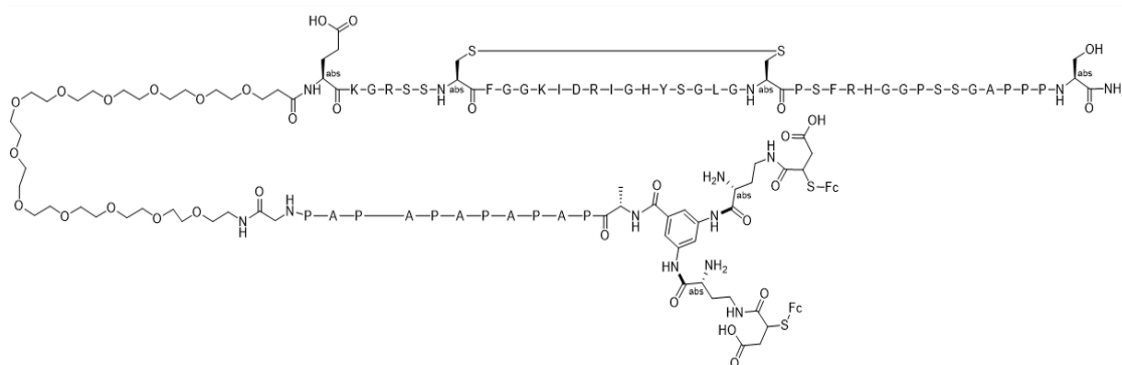
- El Ejemplo 1 se sintetizó usando el procedimiento descrito anteriormente para unir un péptido a un enlazador y después conjugar el péptido-enlazador a una región Fc. El Ejemplo 1 es un conjugado que incluye el péptido de la sec. con núm. de ident. 11 y la región Fc de sec. con núm. de ident. 6. El enlazador usado para conectar la sec. con núm. de ident. 11 a la sec. con núm. de ident. 6 fue el Ejemplo D de la Tabla 1.

Ejemplo 2: Péptido natriurético



El Ejemplo 2 se sintetizó usando el procedimiento descrito anteriormente para unir un péptido a un enlazador y después conjugar el péptido-enlazador a una región Fc. El Ejemplo 2 es un conjugado que incluye el péptido-enlazador de la sec. con núm. de ident. 10 a la región Fc de la sec. con núm. de ident. 6.

Ejemplo 3: Péptido natriurético



El Ejemplo 3 se sintetizó usando el procedimiento descrito anteriormente para unir un péptido a un enlazador y después conjugar el péptido-enlazador a una región Fc. El Ejemplo 3 es un conjugado que incluye el péptido-enlazador de la sec. con núm. de ident. 9 unido a la región Fc de la sec. con núm. de ident. 6.

Ejemplo 4

El Ejemplo 4 se sintetizó usando el procedimiento descrito anteriormente para unir un péptido a un enlazador y después conjugar el péptido-enlazador a una región

Fc. El Ejemplo 4 es un conjugado que incluye el péptido de la sec. con núm. de ident. 12 y la región Fc de sec. con núm. de ident. 6. El enlazador usado para conectar la sec. con núm. de ident. 12 a la sec. con núm. de ident. 6 fue el Ejemplo E de la Tabla 1.

5

Ejemplo 5

El Ejemplo 5 se sintetizó usando el procedimiento descrito anteriormente para unir un péptido a un enlazador y después conjugarlo el péptido-enlazador a una región Fc. El Ejemplo 3 es un conjugado que incluye el péptido de la sec. con núm. de ident. 12 y la región Fc de sec. con núm. de ident. 6. El enlazador usado para conectar la sec. con núm. de ident. 12 a la sec. con núm. de ident. 6 fue el Ejemplo F de la Tabla 1.

10

Hidrolisis de grupos funcionales de maleimida

La hidrólisis de maleimida ocurre en estos constructos cuando el pH ≥ 8 y provoca que el anillo de maleimida se abra, lo que representa un aumento de masa de 18 dalton. Cada uno de los constructos reconectados tiene 2 maleimidias, que representan un desplazamiento de masa total de 36 dalton. La apertura del anillo (hidrólisis) se rastrea por masa usando una LCMS-TOF. Autohidrólisis de enlazadores

15

La autohidrólisis de los enlazadores se evaluó incubando los enlazadores en un regulador de fosfato triple con un pH correspondiente de 5,0, 6,0, 7,0, 7,5 y 8,0. Los polvos enlazadores liofilizados se solubilizaron en DMSO al 100 % para preparar una solución madre de 80 mM. Cada uno de los enlazadores se incubaron en el regulador a una concentración final del enlazador de 1,5 mM para determinar

20

la hidrólisis de succinimida a temperatura ambiente durante 1 hora. El efecto del pH sobre la autohidrólisis del enlazador se evaluó a intervalos particulares mediante un análisis por espectrometría de masas con HPLC de fase inversa. Las Tablas 2A y 2B muestran el efecto del pH sobre conjugados particulares.

5 Sorprendentemente, las Tablas 2A y 2B muestran que los enlazadores que incluyen Maldap β fueron más estables a mayores condiciones de pH. El Ejemplo 4 incluyó un conjugado que comprende péptido natriurético (sec. con núm. de ident. 12) conectado a una región Fc (sec. con núm. de ident. 6) a través del enlazador Maldap del Ejemplo E de la Tabla 1. El Ejemplo 5 incluyó un conjugado que comprende

10 péptido natriurético (sec. con núm. de ident. 12) conectado a una región Fc (sec. con núm. de ident. 6) a través del enlazador Maldap del Ejemplo F de la Tabla 1.

TABLA 2A. Estabilidad del pH del Ejemplo 4

Tiempo (min)	pH 5 (% de hidrolizado)	pH 6 (% de hidrolizado)	pH 7 (% de hidrolizado)
5	16	27	100
20	28	51	100
60	40	81	100
120	65	100	100

TABLA 2B. Estabilidad del pH del Ejemplo 5

Tiempo (min)	pH 5 (% de hidrolizado)	pH 6 (% de hidrolizado)	pH 7 (% de hidrolizado)	pH 8 (% de hidrolizado)
1	13	13	13	18
10	13	17	33	70
30	17	55	83	88
60	33	65	95	100

90	60	90	100	100
180	70	100	100	100

Duración de la acción del terapéutico

Los ratones DIO se pesaron y se les dio una dieta TD95217 fresca y se aclimataron al manejo y peso corporal diario y a la ingesta de alimentos antes del inicio del estudio. Los animales fueron aleatorizados por orden de bloque por BW. Para el estudio agudo, se administró una sola inyección de cada péptido/conjugado mostrado en la Tabla 3 a 10 nmol/kg. Se rastreó la ingesta diaria de alimentos y el peso corporal durante 15 días después de la inyección. Para el estudio crónico, se administró una inyección cada semana durante 4 semanas a cada grupo de dosis (0,3 nmol/kg, 1 nmol/kg, 3 nmol/kg, 10 nmol/kg y 30 nmol/kg), se rastreó la ingesta de alimentos y el peso corporal hasta 3 semanas después de la inyección final. QNMR se midió cada 2 semanas.

La Tabla 3 muestra el impacto de la conjugación de un terapéutico a una región Fc a través de los enlazadores descritos. Se administraron dos inyecciones diferentes a dos poblaciones de ratones DIO aleatorizados. Al primer grupo se administró una inyección de control sin terapéutico. Al segundo grupo se inyectó un análogo de oxintomodulina que se une a una región Fc amortiguada de IgG4 (Ejemplo 1).

La ingesta diaria de alimentos de ratones DIO a los que se administró la dosis de control no se modificó con el tiempo (2,7-3,1 g de alimento por día).

Sorprendentemente, la ingesta diaria de alimentos de ratones DIO que se inyectaron con el Ejemplo 1 (análogo de oxintomodulina unido a la región Fc de

IgG4 a través de un enlazador) se redujo a 0,94 g el día 2 y permaneció a 1 g o menos hasta el día 5. Para el día 7, la ingesta de alimentos de los ratones DIO inyectados con el Ejemplo 1 había vuelto a niveles equivalentes a los ratones a los que se administró una inyección del control.

5 Notablemente, es muy conocido para un experto en la técnica, que un análogo de oxintomodulina equivalente del Ejemplo 1 que no se limita a una región Fc y/o los enlazadores descritos, no tendría casi ninguna duración prolongada de acción más allá de la acción inicial inmediatamente después de la administración. Ver, por ejemplo, Camacho *et al.* Conjugation of a peptide to an antibody engineered with free cysteines
10 dramatically improves half-life and activity. *Mabs.* 2020 Jan-Dec;12(1):1794687. doi: 10.1080/19420862.2020.1794687, que indicó, “las hormonas peptídicas endógenas tienen vidas medias muy cortas, lo que las hace poco prácticas como terapéutico”. En consecuencia, sin querer limitarse por teoría, se cree que la unión del análogo de oxintomodulina con la región Fc a través de los enlazadores descritos prolongó la
15 duración de acción del análogo de oxintomodulina en casi 7 días.

Como tal, la conjugación con una región Fc a través de uno de los enlazadores descritos condujo a un aumento en la duración de acción de un terapéutico en una semana.

20 TABLA 3. Impacto de la conjugación con la región Fc a través del enlazador

	Ingesta diaria de alimentos posterior a la inyección (g)													
Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	2,84	2,58	2,74	2,96	2,76	2,96	2,76	2,94	2,88	3,1	2,7	2,7	2,7	2,78

Ej. 1	2,9	0,94	0,42	0,78	1,04	2,26	3,06	3,98	3,98	3,98	3,66	3,48	3,48	3,2
-------	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-----

SECUENCIAS

Sec. con núm. de ident.: 1:

ESKYGPPCPSCP

Sec. con núm. de ident.: 2:

5 AGCP

Sec. con núm. de ident.: 3: Fc de IgG4 humana amortiguada con disulfuro de bisagra simple

AGCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG

VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS

10 KAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK

TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

Sec. con núm. de ident.: 4: Fc de IgG4 humana amortiguada con disulfuro de bisagra simple (mutante Q274K, Q355R y E419Q)

AGCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVKFNWYVDG

15 VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK

TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

Sec. con núm. de ident.: 5: Fc de IgG4 humana amortiguada con disulfuro de bisagra simple (mutante M252Y, S254T y T256E)

20 AGCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG

VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK

TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

Sec. con núm. de ident.: 6: Fc de IgG4 humana amortiguada con disulfuro de bisagra simple (combinación mutante Q274K, Q355R, E419Q y M252Y, S254T, T256E)

5 AGCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVWVDVSQEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

10 Sec. con núm. de ident.: 7: H-Aib-

QGTFTSDYSKYLDEKKAQEFVEWLLEGGPSSGK(Peg24-BEA-Maldap2)-NH₂

Sec. con núm. de ident.: 8: H-Aib-QGTFTSDYSKYLDEKKAK(Peg24-BEA
Maldap2) EFVEWLLEGGPSSG-NH₂

15

Sec. con núm. de ident.: 9: NH₂-SPPPAGSSPGG-H-

RFSPCGLGSYHGIRDIKGGFCSSRGKE-(PEG12-G-PAPAPAPAPAPA)-DABA-
(Maldab)₂

20 Sec. con núm. de ident. 10 NH₂-SPPPAGSSPGG-H-

RFSPCGLGSYHGIRDIKGGFCSSRGKE-(PEG24-DABA-(Maldab)₂

Sec. con núm. de ident. 11 OXMP-2

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDEKKAQEFVEWLLEGGPSSGK

Sec. con núm. de ident. 12 Péptido natriurético

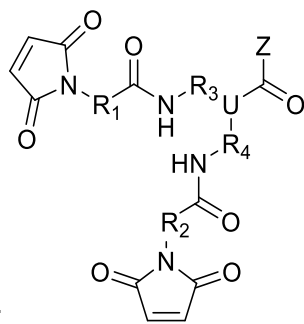
5 EKGRSSCFGGKIDRIGHYSGLGCPSFR-H-GGPSSGAPPPS

|-----|

forma un enlace intramolecular con cisteína en la posición 33

REIVINDICACIONES

Se reivindica:



1. Un compuesto de la fórmula:

5 en donde:

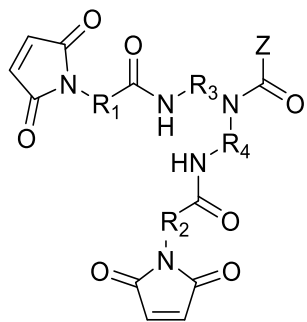
R_1 y R_2 son independientemente alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, y $-CH_2CH_2NH_2$;

R_3 y R_4 son independientemente alquilo C_1 a C_5 o están ausentes;

U es amina terciaria o fenilo 1,3,5-sustituido;

10 Z comprende H, OH, NH_2 , NH, un terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30; y sales farmacéuticamente aceptables de este.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es de la fórmula:



en donde:

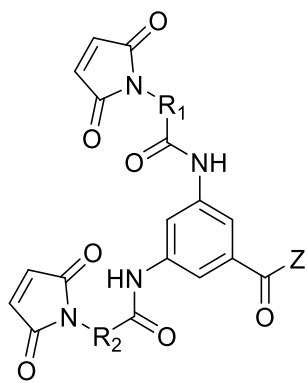
R₁ y R₂ son independientemente alquilo C₁ a C₅, opcionalmente sustituido con uno o más de -NH₂, -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂;

R₃ y R₄ son alquilo C₁ a C₅;

Z comprende H, OH, NH₂, NH, un terapéutico, alquilo C₁ a C₃₀, (OCH₂CH₂)_m, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30; y sales farmacéuticamente aceptables de este.

10

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es de la fórmula:



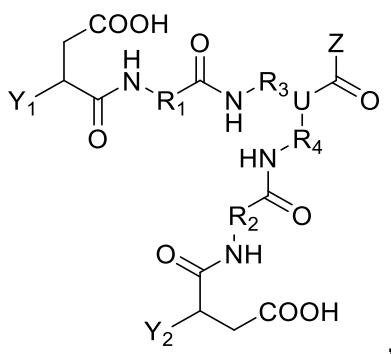
en donde:

R_1 y R_2 son independientemente alquilo lineal C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, o $-CH_2CH_2NH_2$;

- 5 Z comprende H, OH, NH_2 , NH, un terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30; y sales farmacéuticamente aceptables de este.

4. Un compuesto de la fórmula:

10



en donde:

R_1 y R_2 son independientemente alquilo C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno

- 15 o más de NH_2 , CH_2NH_2 , y $CH_2CH_2NH_2$;

R_3 y R_4 son independientemente alquilo C_1 a C_5 o están ausentes;

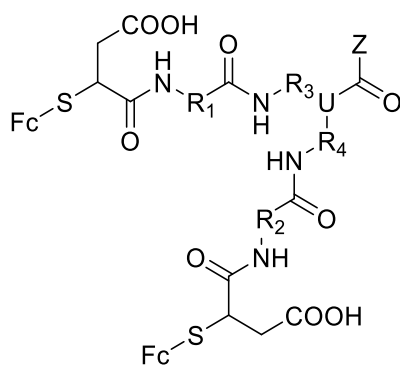
U es amina terciaria o fenilo 1,3,5-sustituido;

Y_1 e Y_2 comprenden independientemente una amida, amina, imina, sulfonamida, tiourea, urea, o tioéter;

Z comprende H, OH, NH_2 , NH, un terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30; y

5 sales farmacéuticamente aceptables de este.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en donde el compuesto es de la fórmula:



10

en donde:

R_1 y R_2 son independientemente alquilo lineal C_1 a C_5 , opcionalmente sustituido con uno o más de NH_2 , CH_2NH_2 , y $CH_2CH_2NH_2$;

R_3 y R_4 son independientemente alquilo lineal C_1 a C_5 o están ausentes;

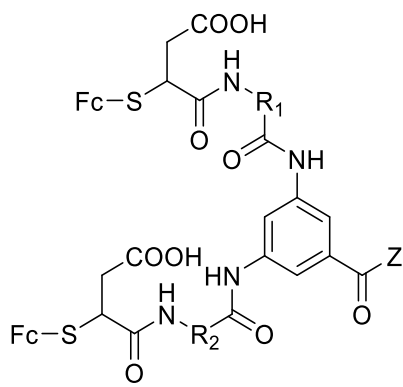
15 U es amina terciaria o fenilo 1,3,5-sustituido;

Z comprende H, OH, NH_2 , NH, un terapéutico, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30;

Fc comprende una región Fc;

S es un átomo de azufre de la región Fc; y

6. El compuesto de la reivindicación 4, en donde el compuesto es de la fórmula:



5

en donde:

R₁ y R₂ son independientemente alquilo lineal C₁ a C₅, opcionalmente sustituido con uno o más de -NH₂, -CH₂NH₂, y -CH₂CH₂NH₂;

10 Z comprende H, OH, NH₂, NH, un terapéutico, alquilo C₁ a C₃₀, (OCH₂CH₂)_m, o combinaciones de estos, y en donde m es un número entero total de 1 a 30;

Fc comprende una región Fc;

S es un átomo de azufre de la región Fc; y

sales farmacéuticamente aceptables de este.

15

7. El compuesto de la reivindicación 1 a 6, en donde R_1 y R_2 son independientemente alquilo C_2 , opcionalmente sustituido con uno o más de $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, o $-CH_2CH_2NH_2$, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

5 8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde R_1 y R_2 son idénticos, o sales farmacéuticamente aceptable de este.

9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 7 u 8, en donde R_3 y R_4 son idénticos, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

10

10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5, o 7 a 9, en donde R_3 y R_4 son alquilo C_2 , o sales farmacéuticamente aceptables de este.

11. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde Z
15 comprende NH, alquilo C_1 a C_{30} , $(OCH_2CH_2)_m$, o combinaciones de estos, y un terapéutico, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

12. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde Z es H, OH, NH_2 , un terapéutico, o alquilo C_1 - C_{30} , o sales farmacéuticamente

20

aceptables de este.

13. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde Z comprende un terapéutico.

14. El compuesto de la reivindicación 13, en donde el terapéutico comprende un
5 aminoácido o un péptido, o sales farmacéuticas aceptables de este.

15. El compuesto de la reivindicación 14, en donde el péptido comprende de 2 a 100 aminoácidos, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

10 16. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde el terapéutico adecuado comprende hormona adrenocorticotrópica (ACTH), adropina, amilina, angiotensina, péptido natriurético auricular (ANP), calcitonina, colecistoquinina (CCK), gastrina, grelina, glucagón, hormona de crecimiento, hormona folículo estimulante (FSH), insulina, leptina, hormona luteinizante (LH),
15 hormona estimulante de melanocitos (MSH), péptido natriurético, oxintomodulina, oxitocina, hormona paratiroidea (PTH), prolactina, renina, somatostatina, hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona liberadora de tiotropina (TRH), vasopresina, también llamada arginina vasopresina (AVP) u hormona antidiurética (ADH), péptido intestinal vasoactivo (PIV), análogos de estos, o combinaciones de
20 estos, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

17. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde el terapéutico comprende oxintomodulina, péptido natriurético, análogos de estos, o combinaciones de estos, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

5 18. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde el terapéutico comprende la sec. con núm. de ident. 11 o la sec. con núm. de ident. 12, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

10 19. El compuesto de la reivindicación 13, en donde el terapéutico comprende un anticuerpo monoclonal, una interleucina, un interferón, un inhibidor de proteína quinasa, un factor de crecimiento hematopoyético, una proteína, una proteína fusionada, oligonucleótido, o combinaciones de estos, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

15 20. El compuesto de la reivindicación 4, en donde Y_1 e Y_2 comprenden una región Fc.

20 21. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 20, en donde el compuesto se conecta a una región Fc única, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

22. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 21, en donde la región Fc comprende una región Fc de un anticuerpo monoclonal, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

5 23. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 22, en donde la región Fc comprende al menos una porción de IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, o combinaciones de estas, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

24. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 23, en donde la
10 región Fc comprende la sec. con núm. de ident. 3, la sec. con núm. de ident. 4, la sec. con núm. de ident. 5 o la sec. con núm. de ident. 6, o sales farmacéuticamente aceptables de este.

25. El compuesto de la reivindicación 24, en donde la región Fc comprende la sec.
15 con núm. de ident. 6.

26. El compuesto de la reivindicación 25, en donde Z comprende la sec. con núm. de ident. 11 o la sec. con núm. de ident. 12.

RESUMEN

Enlazadores para la conexión de un terapéutico a otro medio, tal como una región Fc de un anticuerpo. Enlazadores con dos o más grupos funcionales maleimida que pueden sufrir reacciones de adiciones conjugadas nucleofílicas.

- 5 Métodos para aumentar la duración de acción de un terapéutico al unirse a un enlazador novedoso y una región Fc de un anticuerpo. Conjugados anticuerpo-fármaco, que tienen mayor duración de acción sobre el fármaco solo.