

CONJUGADOS DE PROTEÍNAS-COMPUESTOS ANTIVIRALES

DERECHOS DE LICENCIA DEL GOBIERNO

[0001] Esta invención se llevó a cabo con el apoyo del
5 gobierno bajo el Acuerdo HHSO100201700020C, otorgado por el
Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados
Unidos. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

10 [0002] Esta solicitud reclama el beneficio bajo 35 U.S.C.
§ 119 de la solicitud provisional de EE. UU. No. 62/965,735,
presentada el 24 de enero de 2020; y la solicitud provisional
de EE. UU. No. 63/094,285, presentada el 20 de octubre de
2020, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su
15 totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] En el presente documento se proporcionan compuestos
antivirales y conjugados de proteínas de los mismos, y
métodos para tratar una variedad de enfermedades, trastornos
20 y afecciones, incluida la administración de compuestos
antivirales y conjugados de proteínas de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] La influenza es una enfermedad altamente

contagiosa, que tiene una larga historia caracterizada por oleadas de pandemias, epidemias, rebrotes y brotes. A pesar de los esfuerzos anuales de vacunación, las infecciones gripales provocan una morbilidad y mortalidad considerables.

5 [0005] Los virus de influenza consisten en tres tipos principales, A, B y C. Los virus de influenza A pueden clasificarse en subtipos con base en variaciones alélicas en regiones antigénicas de dos genes que codifican para las glicoproteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y
10 neuraminidasa (NA), que son necesarias para la unión viral y la entrada en la célula hospedera.

[0006] La hemaglutinina es una glicoproteína trimérica que contiene dos dominios estructurales, un dominio de cabeza globular que consiste en el sitio de unión al receptor (que
15 está sujeto a una deriva antigénica frecuente) y la región del tallo (más conservada entre varias cepas del virus de la influenza). La proteína HA se sintetiza como un precursor (HA0), que se somete a un procesamiento proteolítico para producir dos subunidades (HA1 y HA2), que se asocian entre sí
20 para formar la estructura de tallo/cabeza globular. El péptido HA1 es responsable de la unión del virus a la superficie celular. El péptido HA2 forma una estructura similar a un tallo que media en la fusión de las membranas viral y celular en los endosomas, lo que permite la
25 liberación del complejo de ribonucleoproteína en el

citoplasma.

[0007] Actualmente, existen dieciocho subtipos definidos por sus proteínas hemaglutininas (H1 -H18). Las dieciocho HAS se pueden clasificar en dos grupos. El grupo 1 consta de los
5 subtipos H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 y H18, y el grupo 2 incluye los subtipos H3, H4, H7, H10, H14 y H15.

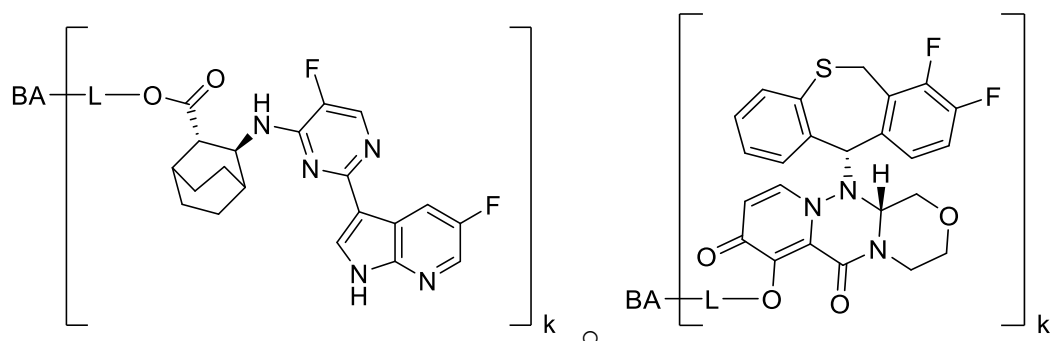
[0008] A pesar de décadas de investigación, no hay anticuerpos comercializados o conjugados de anticuerpo-
10 fármaco (ADCs) que neutralicen o inhiban ampliamente la infección por el virus de la influenza A o atenúen la enfermedad causada por el virus de la influenza A. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar nuevos anticuerpos y ADCs que neutralicen múltiples subtipos del virus de la
15 influenza A y puedan usarse como medicamentos para la prevención o terapia de la infección por influenza A.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0009] En el presente documento se proporcionan compuestos
20 útiles, por ejemplo, en tratamientos antivirales. En ciertas modalidades, los compuestos incluyen VX-787 y derivados del mismo, baloxavir y derivados del mismo y/o baloxavir marboxil y derivados del mismo. En una modalidad, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que incluye un anticuerpo
25 anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo

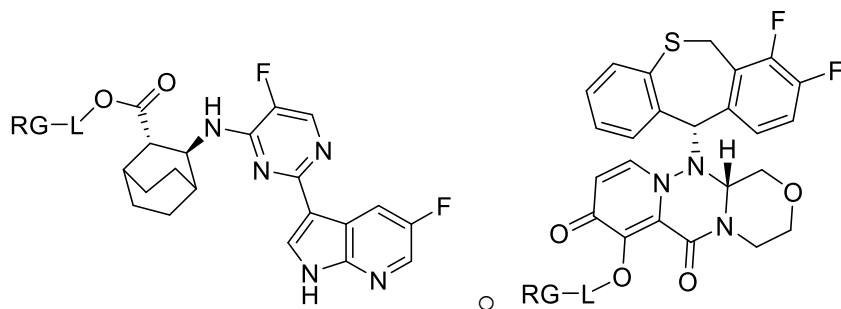
conjugado con una carga útil (por ejemplo, un compuesto antiviral), enlazador-carga útil (por ejemplo, enlazador-compuesto antiviral) y/o compuesto como se describe en este documento.

- 5 [0010] En ciertas modalidades, se proporcionan compuestos que tienen la siguiente estructura



en donde **L** es un enlazador; **BA** es un agente de unión; y **k** es un número entero de uno a treinta.

- 10 [0011] En ciertas modalidades, se proporcionan enlazador-cargas útiles (por ejemplo, enlazador-compuestos antivirales) que tienen la siguiente estructura



- o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde **L** es un enlazador; y **RG** es un resto reactivo.

[0012] En otra modalidad, en el presente documento se exponen métodos para preparar las cargas útiles o los compuestos, enlazador-cargas útiles o los conjugados de anticuerpo-fármaco y las composiciones descritas en el presente documento.

[0013] En otra modalidad, en el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento, la profilaxis, la reducción o la inhibición de una enfermedad, trastorno o afección asociada con una infección, tal como se describe en el presente documento, en un sujeto que incluye la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una carga útil (por ejemplo, compuesto antiviral), enlazador-carga útil (por ejemplo, enlazador-compuesto antiviral), conjugado de anticuerpo-fármaco o composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0000] La figura 1A muestra las cargas de enlazador-carga útil promedio ponderadas por intensidad (por ejemplo, enlazador-compuesto antiviral) medidas por LC-MS para 11729-Q295-**11**. La figura 1B muestra las cargas de enlazador-carga útil promedio ponderadas por intensidad (por ejemplo, enlazador-compuesto antiviral) medidas por LC-MS para Control de isotipo-Q295-**11**.

[0015] La figura 2A muestra las cargas de enlazador-carga

útil promedio ponderadas por intensidad (por ejemplo, enlazador-compuesto antiviral) medidas por LC-MS para **11729-HC-Cterm-11**. La figura 2B muestra las cargas de enlazador-carga útil promedio ponderadas por intensidad (por ejemplo, enlazador-compuesto antiviral) medidas por LC-MS para Control de isotipo-HC-Cterm-**11**.

[0016] La figura 3 muestra la unión específica subnanomolar ELISA de 11729-HC-Cterm-**11**, 11729-HC-Nterm-**11**, 11729-LC-Cterm-**11** y 11729-LC-Nterm-**11** a células infectadas con influenza A. La conjugación de LP a Cterm de HO y LC y Nterm de LC retiene la unión a las células infectadas con influenza A/NH1N1/PR8. La conjugación de LP a Nterm de HO da como resultado la pérdida de unión a las células infectadas con influenza A/H1N1/PR8.

[0017] La figura 4 muestra la eficacia antiviral comparativa contra la infección por influenza A entre 11729-HC-Cterm-**11**, 11729-LC-Cterm-**11**, 11729-LC-Nterm-**11**, mAb11729 y un anticuerpo de control de isotipo y Control de isotipo-HC-Cterm-**11**. La conjugación de LP a Cterm de HO y LO y Nterm de LC mejoró la actividad antiviral de los ADCs sobre el anticuerpo progenitor contra el virus de la influenza NH1/N1/PR8 de 3 a 163 veces.

[0018] La figura 5 muestra la estabilidad *in vitro* (es decir, la ausencia de pérdida del enlazador-carga útil (por ejemplo, compuesto antiviral enlazador); o la falta de

reducción de DAR) de 11729-HC-Cterm-**11** en plasma humano y plasma de mono después de 72 horas.

[0019] La figura 6 muestra la eficacia antiviral comparativa contra la infección por influenza A entre 11729-HC-Cterm-**11** y un anticuerpo de control de isotipo y Control de isotipo-HC-Cterm-**11**. La conjugación de LP a Cterm de HC aumentó 10 veces la actividad antiviral de los ADCs sobre los anticuerpos progenitores contra el virus de la influenza A/H1/N1/Ca109.

10 [0020] La figura 7 muestra la eficacia antiviral comparativa contra la infección por influenza A entre 11729-HC-Cterm-**6**, 11729-LC-Cterm-**6**, mAb11729 y un anticuerpo de control de isotipo, un anticuerpo de control de isotipo-HC-Cterm-6 y un anticuerpo de Control de isotipo-LC-Cterm-**6**. La
15 conjugación de LP a Cterm de HO aumentó la actividad antiviral de los ADCs sobre el anticuerpo progenitor contra el virus de la influenza A/H1/N1/PR8 en 51 veces. La conjugación de LP a Cterm de LC no aumentó la actividad antiviral sobre el mAb progenitor.

20 [0021] La figura 8 muestra la eficacia antiviral comparativa contra la infección por influenza A entre 11729-HC-Cterm-**45a**, 11729-LC-Cterm-**45a**, 11729-HC-Cterm-**34**, 11729-LC-Cterm-**34**, mAb11729 y un anticuerpo de control de isotipo y control de isotipo-conjugados de anticuerpo-fármaco. La
25 conjugación de LP a Cterm de HO aumentó la actividad

antiviral de los ADCs sobre el anticuerpo parental contra el virus de la influenza A/H1/N1/PR8 en 7 y 31 veces. La conjugación de LP a Cterm de LC no aumentó la actividad antiviral sobre el mAb progenitor.

5 [0022] La figura 9 muestra la eficacia antiviral comparativa contra la infección por influenza A entre 5385-HC-Cterm-**11**, 5385-LC-Cterm-**11**, mAb11729 y un anticuerpo de control de isotipo y control de isotipo-conjugados de anticuerpo-fármaco. La conjugación de LP a Cterm de LO y HO
10 aumentó la actividad antiviral de los ADCs sobre el anticuerpo progenitor contra el virus de la influenza A/H3/N2/HK68X3-1 de 3 a 10 veces.

[0023] La figura 10 muestra la eficacia antiviral comparativa contra la infección por influenza A entre 11729-HC-Cterm-**45d**, mAb11729, un anticuerpo de control de isotipo y
15 Control de isotipo-HC-Cterm-**45d**. La conjugación de LP a Cterm de HO aumentó la actividad antiviral de los ADCs sobre el anticuerpo progenitor contra el virus de la influenza A/H1/N11/PR8 en 71 veces.

20 [0024] La figura 11 muestra la unión específica de 11729-HC-Cterm-**45d** a células infectadas con influenza A. La conjugación de LP a Cterm de HO retiene la unión a las células infectadas con influenza A/H1/N1/PR8.

[0025] En el presente documento se proporcionan compuestos, composiciones y métodos útiles para tratar, por ejemplo, infecciones de influenza en un sujeto.

Definiciones

- 5 [0026] Cuando se hace referencia a los compuestos proporcionados en el presente documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el
- 10 presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia. En el caso de que exista una pluralidad de definiciones para un término provisto en este documento, estas Definiciones prevalecerán a menos que se indique lo contrario.
- 15 [0027] La frase "hemaglutinina de influenza", también llamada "HA de influenza" es una glicoproteína trimérica que se encuentra en la superficie de los viriones de influenza, que media la unión viral (a través de la unión de HA1 a ácidos a-2,3- y a-2,6-siálicos) y la entrada (a través de un
- 20 cambio conformacional) en las células hospederas. La HA se compone de dos dominios estructurales: un dominio de cabeza globular que contiene el sitio de unión del receptor (sujeto a una alta frecuencia de mutaciones antigénicas) y la región del tallo (más conservada entre varias cepas del virus de la
- 25 influenza). La influenza HA se sintetiza como un precursor

(HA0) que se somete a un procesamiento proteolítico para producir dos subunidades (HA1 y HA2) que se asocian entre sí para formar la estructura de tallo/cabeza globular. La HA viral es el antígeno más variable del virus (se pueden
5 clasificar dieciocho subtipos en dos grupos), pero el tallo (HA2) está muy conservado dentro de cada grupo.

[0028] La secuencia de aminoácidos de influenza HA de longitud completa se ejemplifica mediante la secuencia de aminoácidos del aislado de influenza H1 N1
10 A/California/04/2009 proporcionada en GenBank como número de registro FJ966082.1. La frase "influenza-HA" también incluye variantes de proteínas de influenza HA aisladas de diferentes aislados de influenza, por ejemplo, GQ149237.1, NC_002017, KM972981.1, etc. La frase "influenza-HA" también incluye
15 influenza HA recombinante o un fragmento de la misma. La frase también abarca influenza HA o un fragmento de la misma acoplado a, por ejemplo, etiqueta de histidina, Fc de ratón o humano, o una secuencia señal.

[0029] La frase "infección por influenza", tal como se usa
20 en este documento, también caracterizada como "gripe" se refiere a la enfermedad respiratoria aguda grave causada por el virus de la influenza. La frase incluye infección del tracto respiratorio y los síntomas que incluyen fiebre alta, dolor de cabeza, dolores y molestias generales, fatiga y
25 debilidad, en algunos casos agotamiento extremo, congestión

nasal, estornudos, dolor de garganta, malestar en el pecho, tos, dificultad para respirar, bronquitis, neumonía y muerte en casos graves.

[0030] Como se usa en el presente documento, "alquilo" se
5 refiere a un radical hidrocarbonado monovalente y saturado. El alquilo está opcionalmente sustituido y puede ser lineal, ramificado o cíclico, es decir, cicloalquilo. Alquilo incluye, pero no se limita a, aquellos radicales que tienen 1-20 átomos de carbono, es decir, alquilo de C₁₋₂₀; 1-12
10 átomos de carbono, es decir, alquilo de C₁₋₁₂; 1-8 átomos de carbono, es decir, alquilo de C₁₋₈; 1-6 átomos de carbono, es decir, alquilo de C₁₋₆; y 1-3 átomos de carbono, es decir, alquilo de C₁₋₃. Los ejemplos de restos alquilo incluyen, entre otros, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo,
15 *s*-butilo, *t*-butilo, *i*-butilo, un resto pentilo, un resto hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Un resto de pentilo incluye, pero no se limita a, *n*-pentilo e *i*-pentilo. Un resto hexilo incluye, pero no se limita a, *n*-hexilo.

20 [0031] Como se usa en el presente documento, "alquilenos" se refiere a un grupo alquilo divalente. A menos que se especifique lo contrario, el alquilenos incluye, pero no se limita a, 1-20 átomos de carbono. El grupo alquilenos está opcionalmente sustituido como se describe aquí por alquilo.
25 En algunas modalidades, el alquilenos no está sustituido.

[0032] La designación de un aminoácido o residuo de aminoácido sin especificar su estereoquímica pretende abarcar la forma L del aminoácido, la forma D del aminoácido o una mezcla racémica de las mismas.

5 [0033] Como se usa en el presente documento, "haloalquilo" se refiere a alquilo, tal como se definió anteriormente, en donde el alquilo incluye al menos un sustituyente seleccionado de un halógeno, por ejemplo, flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) o yodo (I). Los ejemplos de haloalquilo
10 incluyen, entre otros, $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CCl}_2\text{F}$ y $-\text{CCl}_3$.

[0034] Como se usa en el presente documento, "alquenilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente que contiene al menos dos átomos de carbono y uno o más enlaces
15 dobles carbono-carbono no aromáticos. El alquenilo está opcionalmente sustituido y puede ser lineal, ramificado o cíclico. Alquenilo incluye, pero no se limita a, aquellos radicales que tienen 2-20 átomos de carbono, es decir, alquenilo de C_{2-20} ; 2-12 átomos de carbono, es decir, alquenilo de C_{2-12} ; 2-8 átomos de carbono, es decir, alquenilo
20 de C_{2-8} ; 2-6 átomos de carbono, es decir, alquenilo de C_{2-6} ; y 2-4 átomos de carbono, es decir, alquenilo de C_{2-4} . Los ejemplos de restos alquenilo incluyen, entre otros, vinilo, propenilo, butenilo y ciclohexenilo.

[0035] Como se usa en el presente documento, "alquinilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente que
25

contiene al menos dos átomos de carbono y uno o más enlaces triples carbono-carbono. El alquinilo está opcionalmente sustituido y puede ser lineal, ramificado o cíclico. Alquinilo incluye, pero no se limita a, aquellos radicales

5 que tienen 2-20 átomos de carbono, es decir, alquinilo de C_{2-20} ; 2-12 átomos de carbono, es decir, alquinilo de C_{2-12} ; 2-8 átomos de carbono, es decir, alquinilo de C_{2-8} ; 2-6 átomos de carbono, es decir, alquinilo de C_{2-6} ; y 2-4 átomos de carbono, es decir, alquinilo de C_{2-4} . Los ejemplos de restos alquinilo

10 incluyen, entre otros, etinilo, propinilo y butinilo.

[0036] Como se usa en el presente documento, "alcoxi" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente y saturado en donde el hidrocarburo incluye un enlace sencillo a un átomo de oxígeno y en donde el radical está localizado en el átomo

15 de oxígeno, por ejemplo, CH_3CH_2-O- para etoxi. Los sustituyentes alcoxi se unen al compuesto al que sustituyen a través de este átomo de oxígeno del sustituyente alcoxi. El alcoxi está opcionalmente sustituido y puede ser lineal, ramificado o cíclico, es decir, cicloalcoxi. Alcoxi incluye,

20 pero no se limita a, aquellos que tienen 1-20 átomos de carbono, es decir, alcoxi de C_{1-20} ; 1-12 átomos de carbono, es decir, alcoxi de C_{1-12} ; 1-8 átomos de carbono, es decir, alcoxi de C_{1-8} ; 1-6 átomos de carbono, es decir, alcoxi de C_{1-6} ; y 1-3 átomos de carbono, es decir, alcoxi de C_{1-3} . Los

25 ejemplos de restos alcoxi incluyen, entre otros, metoxi,

etoxi, *n*-propoxi, *i*-propoxi, *n*-butoxi, *s*-butoxi, *t*-butoxi, *i*-butoxi, un resto pentoxi, un resto hexoxi, ciclopropoxi, ciclobutoxi, ciclopentoxi y ciclohexoxi.

[0037] Como se usa en el presente documento, "haloalcoxi" se refiere a alcoxi, tal como se define anteriormente, en donde el alcoxi incluye al menos un sustituyente seleccionado de un halógeno, por ejemplo, F, Cl, Br o I.

[0038] Como se usa en el presente documento, "arilo" se refiere a un resto monovalente que es un radical de un compuesto aromático en donde los átomos del anillo son átomos de carbono. El arilo está opcionalmente sustituido y puede ser monocíclico o policíclico, por ejemplo, bicíclico o tricíclico. Los ejemplos de restos arilo incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen de 6 a 20 átomos de carbono en el anillo, es decir, arilo de C₆₋₂₀; 6 a 15 átomos de carbono en el anillo, es decir, arilo de C₆₋₁₅, y 6 a 10 átomos de carbono en el anillo, es decir, arilo de C₆₋₁₀. Los ejemplos de restos arilo incluyen, pero se limitan a, fenilo, naftilo, fluorenilo, azuleno, antrilo, fenantrilo y pirenilo.

[0039] Como se usa en el presente documento, "arilalquilo" se refiere a un resto monovalente que es un radical de un compuesto de alquilo, en donde el compuesto de alquilo está sustituido con un sustituyente aromático, es decir, el compuesto aromático incluye un enlace sencillo a un grupo de

alquilo y en donde el radical está localizado en el grupo alquilo. Un grupo arilalquilo se une a la estructura química ilustrada a través del grupo alquilo. Un arilalquilo se puede representar mediante la estructura, por ejemplo, $\text{B}-\dot{\text{C}}\text{H}_2$, $\text{B}-\dot{\text{C}}\text{H}_2$

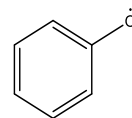
5 , $\text{B}-\text{CH}_2-\dot{\text{C}}\text{H}$, $\text{B}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\dot{\text{C}}\text{H}_2$, o $\text{B}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\dot{\text{C}}\text{H}_2$, en donde B es un resto aromático, por ejemplo, arilo o fenilo. El arilalquilo está opcionalmente sustituido, es decir, el grupo arilo y/o el grupo alquilo pueden estar sustituidos como se describe en el presente documento. Los ejemplos de arilalquilo incluyen, pero no se limitan a, bencilo.

[0040] Como se usa en el presente documento, "alquilarilo" se refiere a un resto monovalente que es un radical de un compuesto arilo, en donde el compuesto arilo está sustituido con un sustituyente alquilo, es decir, el compuesto arilo incluye un enlace sencillo a un grupo alquilo y en donde el radical se localiza en el grupo arilo. Un grupo alquilarilo se une a la estructura química ilustrada a través del grupo arilo. Un alquilarilo puede estar representado por la

estructura, por ejemplo, $\dot{\text{B}}$, $\dot{\text{B}}-\text{CH}_2$, $\dot{\text{B}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\dot{\text{B}}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2$, or
 20 $\dot{\text{B}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, en donde B es un resto aromático, por ejemplo, fenilo. El alquilarilo está opcionalmente sustituido, es

decir, el grupo arilo y/o el grupo alquilo pueden estar sustituidos como se describe en el presente documento. Los ejemplos de alquilarilo incluyen, pero no se limitan a, toluilo.

- 5 [0041] Como se usa en el presente documento, "ariloxi" se refiere a un resto monovalente que es un radical de un compuesto aromático en donde los átomos del anillo son átomos de carbono y en donde el anillo está sustituido con un radical de oxígeno, es decir, el compuesto aromático incluye
- 10 un enlace sencillo a un átomo de oxígeno y donde el radical



- está localizado en el átomo de oxígeno, por ejemplo,
- para fenoxi. Los sustituyentes ariloxi se unen al compuesto al que sustituyen a través de este átomo de oxígeno. El ariloxi está opcionalmente sustituido. Ariloxi incluye, pero
- 15 no se limita a, aquellos radicales que tienen de 6 a 20 átomos de carbono en el anillo, es decir, ariloxi de C₆₋₂₀; 6 a 15 átomos de carbono en el anillo, es decir, ariloxi de C₆₋₁₅ y de 6 a 10 átomos de carbono en el anillo, es decir, ariloxi de C₆₋₁₀. Los ejemplos de restos ariloxi incluyen,
- 20 pero no se limitan a, fenoxi, naftoxi y antroxí.

[0042] Como se usa en el presente documento, "arileno" se

refiere a un resto divalente de un compuesto aromático en donde los átomos del anillo son solo átomos de carbono. El arileno está opcionalmente sustituido y puede ser monocíclico o policíclico, por ejemplo, bicíclico o tricíclico. Los ejemplos de fracciones de arileno incluyen, entre otros, aquellos que tienen de 6 a 20 átomos de carbono en el anillo, es decir, arileno de C₆₋₂₀; 6 a 15 átomos de carbono en el anillo, es decir, arileno de C₆₋₁₅, y 6 a 10 átomos de carbono en el anillo, es decir, arileno de C₆₋₁₀.

- 10 [0043] Como se usa en el presente documento, "heteroalquilo" se refiere a un alquilo en donde uno o más átomos de carbono están reemplazados por heteroátomos. Como se usa aquí, "heteroalquenilo" se refiere a un alquenilo en donde uno o más átomos de carbono están reemplazados por heteroátomos.
- 15 heteroátomos. Como se usa en el presente documento, "heteroalquinilo" se refiere a un alquinilo en donde uno o más átomos de carbono están reemplazados por heteroátomos. Los heteroátomos adecuados incluyen, pero no se limitan a, átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre. Heteroalquilo, heteroalquenilo y heteroalquinilo están opcionalmente
- 20 sustituidos. Los ejemplos de restos heteroalquilo incluyen, entre otros, aminoalquilo, sulfonilalquilo y sulfinilalquilo. Los ejemplos de restos heteroalquilo también incluyen, pero no se limitan a, metilamino, metilsulfonilo y metilsulfinilo.
- 25 [0044] Como se usa en el presente documento, "heteroarilo"

se refiere a un resto monovalente que es un radical de un compuesto aromático en donde los átomos del anillo contienen átomos de carbono y al menos un átomo de oxígeno, azufre, nitrógeno o fósforo. Los ejemplos de restos heteroarilo
5 incluyen, entre otros, aquellos que tienen de 5 a 20 átomos en el anillo; 5 a 15 átomos en el anillo; y de 5 a 10 átomos en el anillo. El heteroarilo está opcionalmente sustituido.

[0045] Como se usa en el presente documento, "heteroarileno" se refiere a un heteroarilo divalente en
10 donde uno o más átomos del anillo aromático se reemplazan con un átomo de oxígeno, azufre, nitrógeno o fósforo. El heteroarileno está opcionalmente sustituido.

[0046] Como se usa en el presente documento, "heterocicloalquilo" se refiere a un cicloalquilo en donde
15 uno o más átomos de carbono están reemplazados por heteroátomos. Los heteroátomos adecuados incluyen, pero no se limitan a, átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre. El heterocicloalquilo está opcionalmente sustituido. Los ejemplos de restos heterocicloalquilo incluyen, entre otros,
20 morfolinilo, piperidinilo, tetrahidropiranilo, pirrolidinilo, imidazolidinilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, dioxolanilo, ditiolanilo, oxanilo o tianilo.

[0047] Como se usa en este documento, "ácido de Lewis" se refiere a una molécula o ion que acepta un par de electrones
25 solitario. Los ácidos de Lewis usados en los métodos

descritos en el presente documento son distintos de los protones. Los ácidos de Lewis incluyen, pero no se limitan a, ácidos no metálicos, ácidos metálicos, ácidos de Lewis duros y ácidos de Lewis blandos. Los ácidos de Lewis incluyen, pero

5 no se limitan a, ácidos de Lewis de aluminio, boro, hierro, estaño, titanio, magnesio, cobre, antimonio, fósforo, plata, iterbio, escandio, níquel y zinc. Los ácidos de Lewis ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, AlBr_3 , AlCl_3 , BCl_3 , tricloruro de boro metilsulfuro, BF_3 , trifluoruro de

10 boro metil eterato, trifluoruro de boro metil sulfuro, trifluoruro de boro tetrahidrofurano, diciclohexilboro trifluorometanosulfonato, hierro (III) bromuro, hierro (III), cloruro de estaño (IV), cloruro de titanio (IV), isopropóxido de titanio (IV), $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, CuCl_2 , CuBr_2 , cloruro de zinc,

15 haluros de alquilaluminio ($\text{R}_n\text{AlX}_{3-n}$, en donde R es hidrocarbilo), $\text{Zn}(\text{OTf})_2$, ZnCl_2 , $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, MgBr_2 , NiCl_2 , $\text{Sn}(\text{OTf})_2$, $\text{Ni}(\text{OTf})_2$ y $\text{Mg}(\text{OTf})_2$.

[0048] Como se usa en el presente documento, "heterocicloalquilo que contiene N" se refiere a un

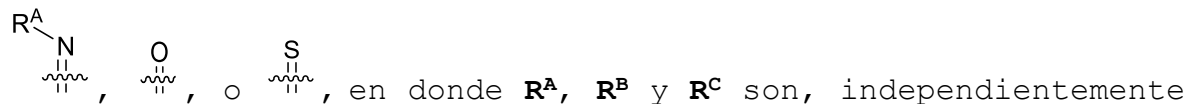
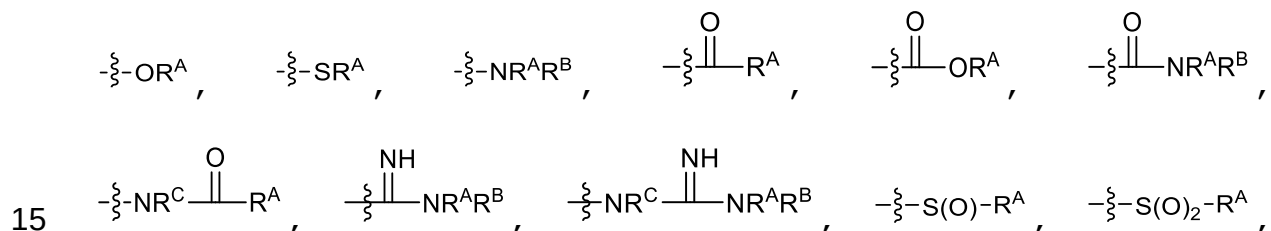
20 cicloalquilo en donde uno o más átomos de carbono están reemplazados por heteroátomos y en donde al menos un heteroátomo de reemplazo es un átomo de nitrógeno. Los heteroátomos adecuados además del nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, átomos de oxígeno y azufre. El

25 heterocicloalquilo que contiene N está opcionalmente

sustituido. Los ejemplos de restos heterocicloalquilo que contienen N incluyen, pero no se limitan a, morfolinilo, piperidinilo, pirrolidinilo, imidazolidinilo, oxazolidinilo o tiazolidinilo.

5 [0049] Como se usa en el presente documento, "opcionalmente sustituido", cuando se usa para describir un resto radical, por ejemplo, alquilo opcionalmente sustituido, significa que dicho resto está opcionalmente unido a uno o más sustituyentes. Los ejemplos de dichos sustituyentes

10 incluyen, entre otros, halo, ciano, nitro, amino, hidroxilo, haloalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo, hidroxialquilo, azido, epoxi, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido,



cada vez que aparecen, un átomo de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heteroarilo o heterocicloalquilo, o R^A y R^B

20 junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo carbocíclico saturado o insaturado, en donde el anillo está

opcionalmente sustituido y en donde uno o más átomos del anillo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo. En ciertas modalidades, cuando un resto radical está opcionalmente sustituido con un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o un anillo carbocíclico saturado o insaturado opcionalmente sustituido, los sustituyentes en el heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o anillo carbocíclico saturado o insaturado opcionalmente sustituido, si están sustituidos, no están sustituidos con sustituyentes que además están opcionalmente sustituidos con sustituyentes adicionales. En algunas modalidades, cuando un grupo descrito en el presente documento está opcionalmente sustituido, el sustituyente unido al grupo no está sustituido a menos que se especifique lo contrario.

[0050] Como se usa en el presente documento, "agente de unión" se refiere a cualquier molécula, por ejemplo, proteína, anticuerpo o fragmento del mismo, capaz de unirse con especificidad a un socio de unión dado, por ejemplo, antígeno.

[0051] Como se usa en el presente documento, "enlazador" se refiere a un resto divalente, trivalente o multivalente que enlaza covalentemente, o es capaz de enlazar

covalentemente (por ejemplo, a través de un grupo reactivo), el agente de unión a uno o más compuestos descritos en el presente documento, por ejemplo, compuestos de carga útil o antivirales y agentes de mejora.

- 5 [0052] Como se usa en el presente documento, "condiciones de síntesis de amida" se refiere a las condiciones de reacción adecuadas para efectuar la formación de una amida, por ejemplo, mediante la reacción de un ácido carboxílico, ácido carboxílico activado o haluro de acilo con una amina.
- 10 En algunos ejemplos, las condiciones de síntesis de amida se refieren a condiciones de reacción adecuadas para efectuar la formación de un enlace amida entre un ácido carboxílico y una amina. En algunos de estos ejemplos, el ácido carboxílico se convierte primero en un ácido carboxílico activado antes de
- 15 que el ácido carboxílico activado reaccione con una amina para formar una amida. Las condiciones adecuadas para efectuar la formación de una amida incluyen, entre otras, las que usan reactivos para efectuar la reacción entre un ácido carboxílico y una amina, incluidas, entre otras,
- 20 diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidino fosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidino fosfonio (PyAOP), hexafluorofosfato de
- 25

bromotripirrolidinofosfonio (PyBrOP), hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU)), hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-
 5 [bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU), N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ), N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio (CIP), 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT),
 10 carbonildiimidazol (CDI) y hexafluorofosfato de 1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU). En algunos ejemplos, un ácido carboxílico se convierte primero en un éster carboxílico activado antes de tratar el éster carboxílico activado con una amina para
 15 formar un enlace de amida. En determinadas modalidades, el ácido carboxílico se trata con un reactivo. El reactivo activa el ácido carboxílico desprotonando el ácido carboxílico y luego forma un producto complejo con el ácido carboxílico desprotonado como resultado del ataque
 20 nucleofílico del ácido carboxílico desprotonado sobre el reactivo protonado. Los ésteres carboxílicos activados de ciertos ácidos carboxílicos son posteriormente más susceptibles al ataque nucleofílico por una amina que el ácido carboxílico antes de que se active. Esto da como
 25 resultado la formación de enlaces amida. Como tal, el ácido

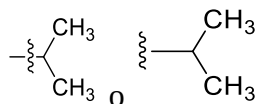
carboxílico se describe como activado. Los ejemplos de reactivos incluyen DCC y DIC.

[0053] Como se usa en este documento, el término "residuo" se refiere al resto químico dentro de un compuesto que permanece después de una reacción química. Por ejemplo, el término "residuo de aminoácido" o "residuo de *N*-alquilaminoácido" se refiere al producto de un acoplamiento de amida o acoplamiento peptídico de un aminoácido o un *N*-alquilaminoácido con un socio de acoplamiento adecuado; en donde, por ejemplo, se expulsa una molécula de agua después del acoplamiento de amida o péptido del aminoácido o el *N*-alquilaminoácido, lo que da como resultado que el producto tenga el residuo de aminoácido o el residuo de *N*-alquilaminoácido incorporado en el mismo.

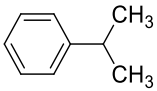
[0054] Como se usa en el presente documento, "isómeros constitucionales" se refiere a compuestos que tienen la misma fórmula molecular, pero diferentes estructuras químicas que resultan de la forma en que están dispuestos los átomos. Los isómeros constitucionales ejemplares incluyen *n*-propilo e isopropilo; *n*-butilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo; y *n*-pentilo, isopentilo y neopentilo, y similares.

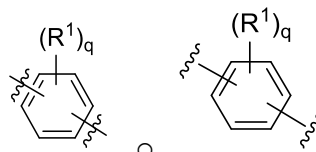
[0055] Ciertos grupos, fracciones, sustituyentes y átomos se representan con una línea ondulada que corta un enlace o enlaces para indicar el átomo a través del cual se unen los grupos, fracciones, sustituyentes y átomos. Por ejemplo, un

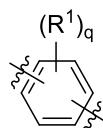
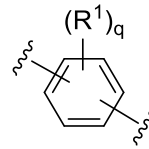
grupo fenilo que está sustituido con un grupo isopropilo representado como:



tiene la siguiente estructura:

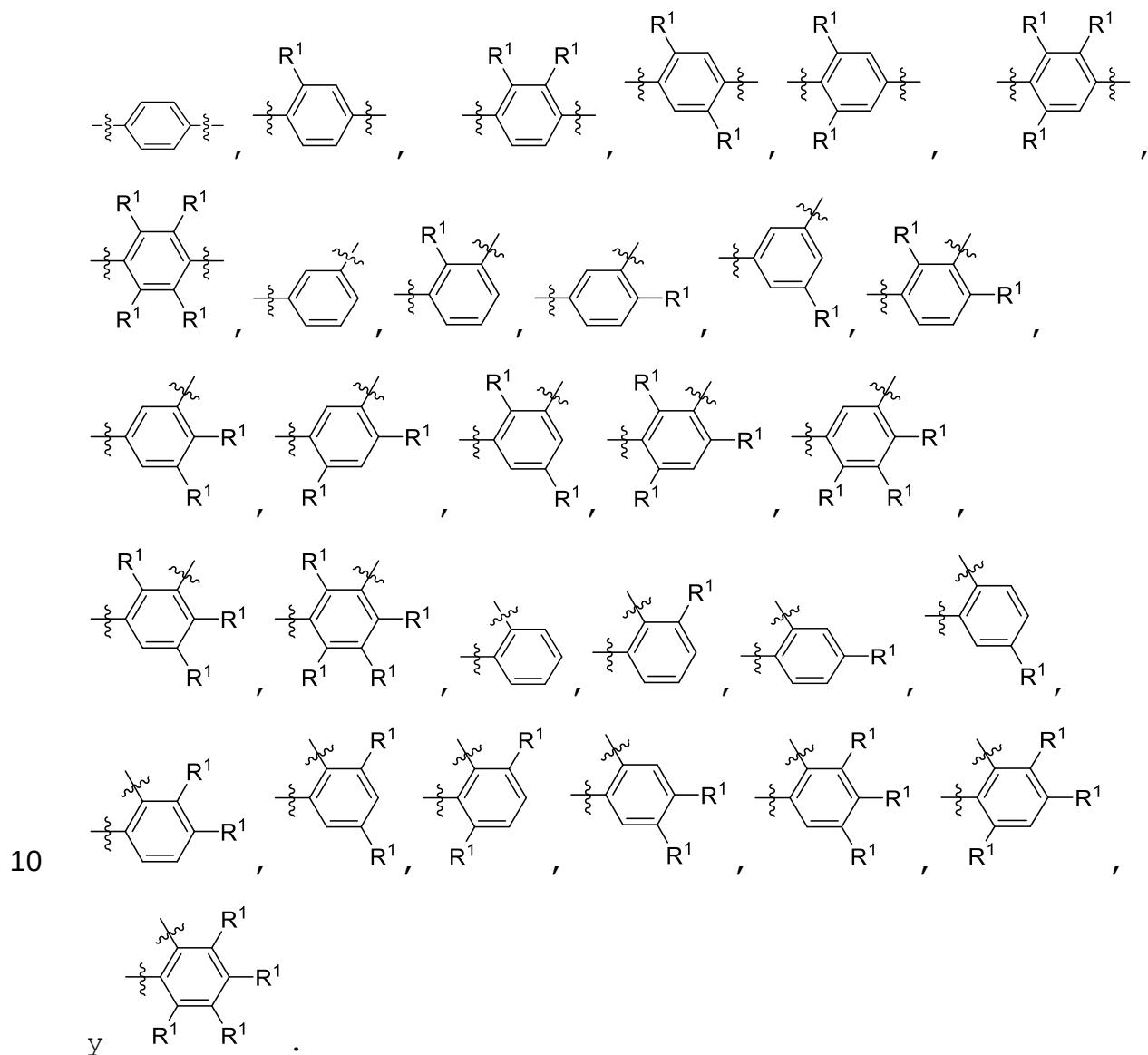
- 5 . Como se usa en este documento, las ilustraciones que muestran sustituyentes unidos a un grupo cíclico (por ejemplo, aromático, heteroaromático, de anillo condensado y cicloalquilo o heterocicloalquilo saturado o insaturado) a través de un enlace entre los átomos del anillo pretenden
- 10 indicar, a menos que se especifique lo contrario, que el grupo cíclico puede estar sustituido con ese sustituyente en cualquier posición del anillo en el grupo cíclico o en cualquier anillo en el grupo de anillos fusionados, de acuerdo con las técnicas establecidas en este documento o que
- 15 son conocidas en el campo al que pertenece la presente



invención. Por ejemplo, el grupo,  o , en donde el subíndice **q** es un número entero de 0 a 4 y en donde las posiciones del sustituyente **R¹** se describen de forma genérica, es decir, no están directamente unidas a ningún

vértice de la estructura de la línea de enlace, es decir, un átomo de carbono específico del anillo, incluye los siguientes ejemplos no limitativos de grupos en los que el sustituyente R^1 está unido a un átomo de carbono de anillo

5 específico:



[0056] Como se usa en el presente documento, la frase "enlazador reactivo" o la abreviatura "RL" se refiere a un

grupo monovalente que incluye un grupo reactivo ("RG") y un grupo separador ("SP"), representado por ejemplo como $RG-SP-\{$, en donde RG es el grupo reactivo y SP es el grupo separador. Como se describe aquí, un enlazador reactivo puede

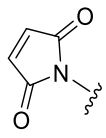
5 incluir más de un grupo reactivo y más de un grupo separador. El grupo separador es cualquier resto divalente que une el grupo reactivo con otro grupo, tal como una carga útil (por ejemplo, un compuesto antiviral). Los enlazadores reactivos (RLs), junto con las cargas útiles (por ejemplo, compuestos

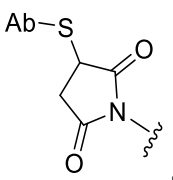
10 antivirales) a los que están unidos, proporcionan intermediarios ("enlazador-cargas útiles" (LPs) (por ejemplo, enlazador-compuestos antivirales)) útiles como precursores sintéticos para la preparación de los conjugados de anticuerpos descritos en este documento. Como se usa en el

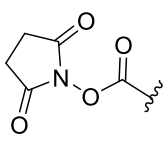
15 presente documento, las cargas útiles pueden ser compuestos antivirales, y las enlazador-cargas útiles que incorporan esos compuestos antivirales pueden denominarse "enlazador-compuestos antivirales". El enlazador reactivo incluye un grupo reactivo, que es un grupo funcional o resto que es

20 capaz de reaccionar con una parte reactiva de otro grupo, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo modificado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El resto que resulta de la reacción del grupo reactivo con el anticuerpo, el

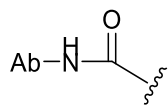
anticuerpo modificado o el fragmento de unión a antígeno del mismo, junto con el grupo de enlace, incluye la parte del conjugado del "enlazador del agente de unión" ("BL"), descrito en este documento. En ciertas modalidades, el "grupo reactivo" es un grupo o resto funcional (por ejemplo, éster de maleimida o *N*-hidroxisuccinimida (NHS)) que reacciona con un residuo de cisteína o lisina de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos ejemplos, el grupo

reactivo es un grupo funcional, por ejemplo, , que reacciona con un residuo de cisteína en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, para formar un

enlace de carbono-azufre con el mismo, por ejemplo, , en donde Ab se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y S se refiere al átomo S en un residuo de cisteína a través del cual el grupo funcional se une al Ab. En algunos ejemplos, el grupo reactivo es un grupo funcional,

por ejemplo, , que reacciona con un residuo de lisina en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo,

para formar un enlace amida con el mismo, por ejemplo,



, en donde **Ab** se refiere a un anticuerpo o antígeno-fragmento de unión del mismo y NH se refiere al átomo de NH en un residuo de la cadena lateral de lisina a través del cual el grupo funcional se une al Ab.

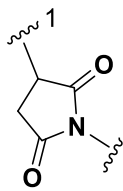
[0057] Como se usa en el presente documento, la frase "resto biodegradable" se refiere a una fracción que se degrada *in vivo* en componentes biocompatibles no tóxicos que pueden eliminarse del cuerpo mediante procesos biológicos ordinarios. En algunas modalidades, un resto biodegradable se degrada total o sustancialmente *in vivo* en el transcurso de aproximadamente 90 días o menos, aproximadamente 60 días o menos, o aproximadamente 30 días o menos, en donde el grado de degradación se basa en el porcentaje de pérdida de masa del resto biodegradable, y en donde la degradación completa corresponde al 100% de pérdida de masa. Ejemplos de restos biodegradables incluyen, sin limitación, poliésteres alifáticos tales como poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(3-hidroxibutirato) (PHB), ácido poli(glicólico) (PGA), ácido poli(láctico) (PLA) y sus copolímeros con ácido glicólico (es decir, poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLGA) (Vert M, Schwach G, Engel R y Coudane J (1998) J Control Release 53(1-3):85-92; Jain R A (2000) Biomateriales 21 (23): 2475-2490; Uhrich

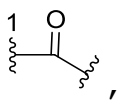
K E, Cannizzaro SM, Langer R S y Shakesheff K M (1999) Chemical Reviews 99(11): 3181-3198; y Park T G (1995) Biomaterials 16 (15): 1123-1130, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad).

- 5 [0058] Como se usa en el presente documento, la frase "enlazador de agente de unión" o "BL" se refiere a cualquier grupo o resto divalente, trivalente o multivalente que une, conecta o une un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) con un
- 10 compuesto de carga útil establecido en el presente documento (por ejemplo, VX-787 y derivados del mismo, y/o baloxavir y derivados del mismo (tal como baloxavir marboxilo)) y, opcionalmente, con uno o más compuestos de cadena lateral. En general, los enlazadores de agentes de unión adecuados para
- 15 los conjugados de anticuerpos descritos en este documento son los que son lo suficientemente estables para aprovechar la vida media circulante de los conjugados de anticuerpos y, al mismo tiempo, capaces de liberar su carga útil después de la internalización del conjugado mediada por antígeno. Los
- 20 enlazadores pueden ser escindibles o no escindibles. Los enlazadores escindibles son enlazadores que se escinden mediante el metabolismo intracelular después de la internalización, por ejemplo, escisión mediante hidrólisis, reducción o reacción enzimática. Los enlazadores no
- 25 escindibles son enlazadores que liberan una carga útil

adjunta a través de la degradación lisosomal del anticuerpo después de la internalización. Los enlazadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, enlazadores lábiles a los ácidos, enlazadores hidrolíticamente lábiles, enlazadores 5 escindibles enzimáticamente, enlazadores lábiles por reducción, enlazadores autoinmolables y enlazadores no escindibles. Los enlazadores adecuados también incluyen, entre otros, aquellos que son o comprenden péptidos, glucurónidos, succinimida-tioéteres, unidades de 10 polietilenglicol (PEG), hidrazonas, unidades de mal-caproilo, unidades de dipéptidos, unidades de valina-citrulina y unidades de para-aminobenciloxycarbonilo (PAB) y para-aminobencilo (PAB). En algunas modalidades, el enlazador del agente de unión (BL) incluye un resto que se forma por la 15 reacción del grupo reactivo (RG) de un enlazador reactivo (RL) y la porción reactiva del agente de unión, por ejemplo, anticuerpo, anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0059] En algunos ejemplos, el BL incluye el siguiente

20 resto: , en donde  es el enlace a la cisteína del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. En

algunos ejemplos, el BL incluye el siguiente resto: ,

en donde  es el enlace a la lisina del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

[0060] En algunas modalidades, el agente de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo puede estar en cualquier forma conocida por los expertos en la técnica.

[0061] El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula de unión a antígeno o complejo molecular que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente o interactúa con un antígeno particular. El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro (es decir, moléculas de anticuerpo completas), así como sus multímeros (por ejemplo, IgM) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o V_L) y una región

constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (C_L1). Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FRs). Cada V_H y V_L se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes modalidades descritas en el presente documento, las FR de los anticuerpos (o la porción de unión a antígeno de los mismos) adecuadas para los compuestos del presente documento pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse de forma natural o artificial. Una secuencia de consenso de aminoácidos puede definirse con base en un análisis en paralelo de dos o más CDRs. El término "anticuerpo", tal como se usa en este documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Los términos "dominio de unión a antígeno" o "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, tal como se usan en este documento, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. En ciertas modalidades, el término

"fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una molécula de unión a antígeno multiespecífica. Los términos "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, o "fragmento de anticuerpo", tal como se
5 usan en el presente documento, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a un antígeno tal como influenza HA. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, dominios constantes. Tal ADN es conocido y/o está
10 fácilmente disponible de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, bibliotecas de fago-anticuerpo), o puede sintetizarse. El ADN puede ser secuenciado y manipulado químicamente o usando técnicas de biología molecular, por ejemplo, para organizar uno o más
15 dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc. Los ejemplos no limitativos de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos $F(ab')_2$; (iii)
20 fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades mínimas de reconocimiento que consisten en residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento que contiene una CDR o
25 una CDR aislada como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-

FR4 restringido. Otras moléculas modificadas, tal como anticuerpos de dominio específico, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), los inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) y los dominios IgNAR variables de tiburón también se incluyen dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno", tal como se usa en este documento. Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que es adyacente o está en fase con una o más secuencias flanqueantes. En los fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L , los dominios V_H y V_L pueden estar situados entre sí en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros V_H - V_H , V_H - V_L o V_L - V_L . Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio monomérico V_H o V_L . En ciertas modalidades, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones ejemplares no limitativas de dominios

variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de esta invención incluyen: (i) V_H-C_{H1} ; (ii) V_H-C_{H2} ; (iii) V_H-C_{H3} ; (iv) $V_H-C_{H1}-C_{H2}$; (v) $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (vi) $V_H-C_{H2}-C_{H3}$; (vii) V_H-C_L ; 5 (viii) V_L-C_{H1} ; (ix) V_L-C_{H2} ; (x) V_L-C_{H3} ; (xi) $V_L-C_{H1}-C_{H2}$; (xii) $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (xiii) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$; y (xiv) V_L-C_L . En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluida cualquiera de las configuraciones ejemplares enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden 10 estar directamente enlazados entre sí o pueden estar enlazados por una región de enlace o bisagra total o parcial. Una región bisagra puede constar de al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre dominios 15 variables y/o constantes adyacentes en un solo molécula polipeptídica. Además, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo del presente documento puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante 20 enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominio V_H o V_L monomérico (por ejemplo, por enlace(s) disulfuro). Al igual que con las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, 25 biespecíficos). Un fragmento de unión a antígeno

multiespecífico de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítopo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluidos los formatos de anticuerpos biespecíficos ejemplares descritos en el presente documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención usando técnicas de rutina disponibles en la técnica. En ciertas modalidades descritas en este documento, los anticuerpos descritos en este documento son anticuerpos humanos.

[0062] También es posible la sustitución de uno o más residuos de CDR o la omisión de una o más CDRs. Se han descrito anticuerpos en la literatura científica en los que se puede prescindir de una o dos CDRs para la unión. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) analizaron las regiones de contacto entre los anticuerpos y sus antígenos, basándose en estructuras cristalinas publicadas, y concluyeron que sólo alrededor de una quinta a una tercera parte de los residuos de CDR contactan realmente con el antígeno. Padlan *et al.* también encontraron muchos anticuerpos en los que una o dos CDR no tenían aminoácidos en contacto con un antígeno (ver también, Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428).

[0063] Los residuos de CDR que no contactan con el

antígeno pueden identificarse con base en estudios previos (por ejemplo, los residuos H60-H65 en CDRH2 a menudo no son necesarios), de CDRs de regiones de Kabat que se encuentran fuera de CDRs de Chothia, mediante modelado molecular y/o empíricamente. Si se omite una CDR o resto(s) de la misma, normalmente se sustituye con un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en otra secuencia de anticuerpo humano o un consenso de tales secuencias. Las posiciones para la sustitución dentro de las CDRs y los aminoácidos para sustituir también pueden seleccionarse empíricamente. Las sustituciones empíricas pueden ser sustituciones conservadoras o no conservadoras.

[0064] Los anticuerpos monoclonales anti-influenza-HA totalmente humanos descritos en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena ligera y pesada en comparación con los secuencias germinales correspondientes. Dichas mutaciones se pueden determinar fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos descritas en este documento con secuencias de línea germinal disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. Esta descripción incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento,

en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones
flanqueantes y/o CDR están mutados en los residuos
correspondientes de la secuencia de la línea germinal a
partir de la cual se derivó el anticuerpo, o al(los)
5 residuo(s) correspondiente(s) de otra secuencia de la línea
germinal humana, o a una sustitución de aminoácido
conservadora del(los) residuo(s) de la línea germinal
correspondiente (dichos cambios de secuencia se denominan
aquí colectivamente como "mutaciones de la línea germinal").
10 Un experto en la materia, a partir de las secuencias de
región variable de cadena ligera y pesada descritas en el
presente documento, puede producir fácilmente numerosos
anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden
una o más mutaciones de línea germinal individuales o
15 combinaciones de las mismas. En ciertas modalidades, todos
los residuos de marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L
se mutan de nuevo a los residuos que se encuentran en la
secuencia original de la línea germinal de la que se deriva
el anticuerpo. En otras modalidades, solo ciertos residuos se
20 vuelven a mutar a la secuencia de línea germinal original,
por ejemplo, solo los residuos mutados que se encuentran
dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los
últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados que
se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras
25 modalidades, uno o más de la estructura y/o residuos de CDR

están mutados en los residuos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal a partir de la cual se derivó originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos de esta invención pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones de marco y/o CDR, por ejemplo, en donde ciertos residuos individuales están mutados al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular, mientras que otros residuos que difieren de la secuencia de línea germinal original se mantiene o se muta al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea germinal se pueden analizar fácilmente para determinar una o más propiedades deseadas, tal como una especificidad de unión mejorada, una mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagónicas o agonistas mejoradas o mejoradas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc.

Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígenos obtenidos de esta manera general están incluidos en esta invención.

[0065] Esta invención también incluye anticuerpos monoclonales anti-influenza-HA completamente humanos que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de

aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en este documento que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, esta invención incluye anticuerpos anti-influenza-HA que tienen secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR y/o CDR con,
5 por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones de aminoácidos conservadoras en relación con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en el presente documento.

[0066] El término "anticuerpo humano", tal como se usa en
10 este documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los mAbs humanos de esta invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea
15 germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDRs y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", tal como se usa en este documento, no pretende incluir mAbs
20 en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (por ejemplo, ratón) se han injertado en secuencias de FR humanas. El término incluye anticuerpos producidos de forma recombinante en un mamífero no humano o en células de un mamífero no humano. El término
25 no pretende incluir anticuerpos aislados o generados en un

sujeto humano. El término no incluye anticuerpos de origen natural que normalmente existen sin modificación o intervención/manipulación humana, en un organismo vivo no modificado de origen natural.

- 5 [0067] El término "recombinante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, creados, expresados, aislados u obtenidos mediante tecnologías o métodos conocidos en la técnica como tecnología de ADN recombinante que incluyen, por
- 10 ejemplo, corte y empalme de ADN y expresión transgénica. El término se refiere a anticuerpos expresados en un mamífero no humano (incluidos mamíferos no humanos transgénicos (por ejemplo, ratones transgénicos), o un sistema de expresión de células (por ejemplo, células CHO), o aislados de una
- 15 biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes. La frase "anticuerpo humano recombinante", tal como se usa en este documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tal como anticuerpos expresados
- 20 usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedera, anticuerpos aislados de un biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase,
- 25 por ejemplo, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-

6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes

5 tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana,

10 mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L del anticuerpo recombinante los anticuerpos son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con las secuencias de V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente

15 dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*. Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que están asociadas con la heterogeneidad bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción estable de cuatro cadenas de aproximadamente

20 150-160 kDa en donde los dímeros se mantienen unidos por un enlace disulfuro de cadena pesada entre cadenas. En una segunda forma, los dímeros no están unidos a través de enlaces disulfuro entre cadenas y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta por una cadena ligera y

25 una cadena pesada acopladas covalentemente (medio

anticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de la purificación por afinidad. La frecuencia de aparición de la segunda forma en varios isotipos de IgG intactos se debe, entre otros, a diferencias

5 estructurales asociadas con el isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una sustitución de un solo aminoácido en la región bisagra de la bisagra IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) a los niveles

10 típicamente observados usando una bisagra IgG1 humana. La presente invención abarca anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la región bisagra, C_H2 o C_H3 que pueden ser deseables, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

15 [0068] Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos (Abs) que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a la influenza-

20 HA, o un fragmento del mismo, está sustancialmente libre de Abs que se unen específicamente a antígenos distintos de influenza-HA). Los anticuerpos descritos en este documento pueden ser anticuerpos aislados. Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en este documento, se refiere además a un

25 anticuerpo que ha sido identificado y separado y/o recuperado

de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha separado o eliminado de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en donde el anticuerpo existe o se produce de forma natural, es un

5 "anticuerpo aislado" para los fines de la presente invención. Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se han sometido al menos a un paso de purificación o aislamiento. De acuerdo con ciertas

10 modalidades, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos. Los anticuerpos usados aquí pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en el marco y/o regiones CDR de los dominios variables de cadena

15 ligera y pesada en comparación con las secuencias de línea germinal correspondientes de las que se derivaron los anticuerpos. Dichas mutaciones se pueden determinar fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos descritas en este documento con secuencias de línea germinal

20 disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, en donde uno o más

25 aminoácidos dentro de una o más regiones flanqueantes y/o CDR

están mutados en los residuos correspondientes.) de la secuencia de la línea germinal a partir de la cual se derivó el anticuerpo, o al(los) residuo(s) correspondiente(s) de otra secuencia de la línea germinal humana, o a una
5 sustitución de aminoácidos conservadora del(los) residuo(s) de la línea germinal correspondiente (dichos cambios de secuencia se denominan aquí colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la materia, a partir de las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada
10 descritas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más mutaciones de línea germinal individuales o combinaciones de las mismas.

[0069] Un "anticuerpo bloqueante", "anticuerpo
15 neutralizante" o "anticuerpo antagonista", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo cuya unión a un antígeno da como resultado la inhibición de al menos una actividad biológica asociada con el antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo o un conjugado de anticuerpo y fármaco de esta
20 invención puede prevenir o bloquear la unión o entrada de influenza a una célula hospedera. Además, un "anticuerpo neutralizante" es aquel que puede neutralizar, es decir, prevenir, inhibir, reducir, impedir o interferir con la capacidad de un patógeno para iniciar y/o perpetuar una
25 infección en un anfitrión. Tal anticuerpo o conjugado de

anticuerpo y fármaco, cuando posee la capacidad de neutralizar a través de la unión a influenza HA, puede denominarse "anticuerpo que neutraliza la actividad de influenza-HA". Los términos "anticuerpo neutralizante" y "un
5 anticuerpo que neutraliza" o "anticuerpos que neutralizan" se usan indistintamente en este documento. Estos anticuerpos se pueden usar, solos o en combinación, tal como agentes profilácticos o terapéuticos con otros agentes antivirales con una formulación adecuada, o en asociación con vacunación
10 activa, o como herramienta de diagnóstico. Como se usa aquí, un "anticuerpo anti-influenza" puede referirse a un anticuerpo cuya unión a un antígeno (por ejemplo, HA) da como resultado la inhibición de al menos una actividad biológica asociada con el virus de la influenza.

15 [0070] El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Un solo antígeno puede tener más de un epítipo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos
20 pueden unirse a diferentes áreas de un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. El término "epítipo" también se refiere a un sitio en un antígeno al que responden las células B y/o T. También se refiere a una región de un antígeno que se une a un anticuerpo. Los epítipos de células
25 B pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos

como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se retienen con la exposición a solventes desnaturizantes, mientras que los

5 epítomos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden con el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítomo normalmente incluye al menos 3, y más normalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los epítomos pueden definirse como estructurales o

10 funcionales. Los epítomos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítomos estructurales y tienen aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítomos también pueden ser conformacionales, es decir, compuestos de aminoácidos no

15 lineales. En ciertas modalidades, los epítomos pueden incluir determinantes que son agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en ciertas modalidades, pueden tener características

20 estructurales tridimensionales específicas y/o características específicas de carga.

[0071] El término "resonancia de plasmones superficiales" se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biomoleculares en tiempo real mediante la

25 detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas

dentro de una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J).

[0072] La interferometría de bio-capa es una tecnología
5 sin etiquetas para medir interacciones biomoleculares. Es una técnica analítica óptica que analiza el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada desde dos superficies: una capa de proteína inmovilizada en la punta del biosensor y una capa de referencia interna. Cualquier
10 cambio en la cantidad de moléculas unidas a la punta del biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia que se puede medir en tiempo real (Abdiche, Y.N., et al. Analytical Biochemistry, (2008), 377(2), 209-217). En ciertas modalidades, se usó un "biosensor con base en interferómetro
15 de bio-capa en tiempo real (ensayo Octet HTX)" para evaluar las características de unión de ciertos anticuerpos anti-influenza HA.

[0073] El término "KD", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación de
20 equilibrio de una interacción antígeno-anticuerpo particular.

[0074] La frase "competencia cruzada", tal como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno e inhibe o bloquea la unión de otro anticuerpo o fragmento de unión a
25 antígeno del mismo. La frase también incluye la competencia

entre dos anticuerpos en ambas orientaciones, es decir, un primer anticuerpo que se une y bloquea la unión del segundo anticuerpo y viceversa. En determinadas modalidades, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo pueden unirse al mismo epítipo. Como alternativa, el primer y segundo anticuerpos pueden unirse a epítopos diferentes, pero superpuestos, de modo que la unión de uno inhiba o bloquee la unión del segundo anticuerpo, por ejemplo, por impedimento estérico. La competencia cruzada entre anticuerpos puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un ensayo de interferometría de bio-capas sin marcador en tiempo real. La competencia cruzada entre dos anticuerpos puede expresarse como la unión del segundo anticuerpo que es menor que la señal de fondo debido a la auto-unión (en donde el primer y el segundo anticuerpo son el mismo anticuerpo). La competencia cruzada entre dos anticuerpos puede expresarse, por ejemplo, tal como % de unión del segundo anticuerpo que es menor que la unión de fondo propia de la línea de base (donde el primer y el segundo anticuerpo son el mismo anticuerpo).

[0075] El término "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinea de manera óptima con inserciones o eliminaciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena

complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente el 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las bases de nucleótidos, medida mediante cualquier algoritmo conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o GAP, tal como se analiza en WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos igual o sustancialmente similar a la del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

[0076] Tal como se aplica a los polipéptidos, la frase "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están alineadas de manera óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de brecha predeterminados, comparten al menos 90% de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente al menos 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de los residuos, que no son idénticas, difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en donde un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral

(grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los

5 que dos o más secuencias de aminoácidos difieran entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje o grado de similitud puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en

10 la técnica. (Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331). Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales de

15 hidroxilo alifático: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato; y 7) cadenas

20 laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, un reemplazo

25 conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo

en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

[0077] La similitud de secuencia para los polipéptidos se mide típicamente usando software de análisis de secuencias. El software de análisis de proteínas compara secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a varias sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluidas las sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, el software GCG contiene programas como GAP y BESTFIT que se pueden usar con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tal como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo salvaje y un mutante de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptidos también se pueden comparar usando FASTA con parámetros predeterminados o recomendados; un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Las secuencias también se pueden comparar usando el algoritmo de

búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de espacios afines con una penalización por espacio abierto de 12 y una penalización por extensión de espacio de 2, y una matriz BLOSUM de 62. Otro algoritmo preferido cuando se
5 compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros predeterminados. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-
10 410 y (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

[0078] La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que produce el efecto deseado para el cual se administra. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento, y un experto en la materia podrá
15 determinarla usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

[0079] Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero,
20 más preferiblemente un ser humano, que necesita mejorar, prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno tal como una infección viral. El sujeto puede tener una infección por influenza o estar predispuesto a desarrollar una infección por el virus de la influenza. Los sujetos "predispuestos a
25 desarrollar una infección por el virus de la influenza" o

sujetos "que pueden tener un riesgo elevado de contraer una infección por el virus de la influenza" son aquellos sujetos con sistemas inmunitarios comprometidos debido a una enfermedad autoinmune, aquellas personas que reciben terapia
5 inmunosupresora (por ejemplo, trasplante), aquellas personas que padecen el síndrome de inmunodeficiencia humana (VIH) o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), ciertas formas de anemia que depletan o destruyen los glóbulos blancos, aquellas personas que reciben radiación o
10 quimioterapia, o aquellas personas que padecen un trastorno inflamatorio. Además, los sujetos de extrema juventud o vejez corren un mayor riesgo. Cualquier persona que entre en contacto físico o se aproxime físicamente a una persona infectada tiene un mayor riesgo de contraer una infección por
15 el virus de la influenza. Además, un sujeto corre el riesgo de contraer una infección de influenza debido a la proximidad a un brote de la enfermedad, por ejemplo, el sujeto reside en una ciudad densamente poblada o muy cerca de sujetos que tienen infecciones confirmadas o sospechadas del virus de la
20 influenza, o elección de empleo, por ejemplo, trabajador de hospital, investigador farmacéutico, viajero al área infectada o viajero frecuente.

[0080] Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refieren a la
25 reducción o mejora de la gravedad de al menos un síntoma o

indicación de infección por influenza debido a la administración de un agente terapéutico como un anticuerpo descrito a un sujeto que lo necesite. Los términos incluyen la inhibición de la progresión de la enfermedad o del empeoramiento de la infección. Los términos también incluyen un pronóstico positivo de la enfermedad, es decir, el sujeto puede estar libre de infección o puede tener títulos virales reducidos o nulos tras la administración de un agente terapéutico tal como un anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco dado a conocer. El agente terapéutico se puede administrar a una dosis terapéutica al sujeto.

[0081] Los términos "prevenir", "previniendo" o "prevención" se refieren a la inhibición de la manifestación de la infección por influenza o cualquier síntoma o indicación de infección por influenza luego de la administración de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco dado a conocer. El término incluye la prevención de la propagación de la infección en un sujeto expuesto al virus o en riesgo de contraer una infección por influenza.

[0082] Como se usa aquí, un "efecto protector" puede demostrarse mediante cualquier procedimiento estándar conocido en la técnica para determinar si un agente como un agente antiviral, o un anticuerpo como un anticuerpo anti-influenza-HA, o un El conjugado de anticuerpo y fármaco descrito en el presente documento puede demostrar uno o más

de los siguientes: por ejemplo, un aumento en la supervivencia después de la exposición a un agente infeccioso, una disminución en la carga viral o una mejora de al menos un síntoma asociado con el agente infeccioso.

- 5 [0083] Como se usa en el presente documento, las frases "fármaco antiviral", "antiviral", "compuesto antiviral" y "compuesto antivirico" se aplican a un fármaco antiinfeccioso o terapia usada para tratar, prevenir o mejorar una infección viral (por ejemplo, infección por influenza) en un sujeto. El
- 10 término "medicamento antiviral" (o sus sinónimos "medicamento antiviral", "compuesto antiviral" y "compuesto antiviral") incluye, entre otros, TAMIFLU® (Oseltamivir), RELENZA® (Zanamivir), ribavirina o interferón-alfa2b. Los medicamentos antivirales incluyen inhibidores de la influenza. Como se usa
- 15 en el presente documento, un "inhibidor de la influenza" se refiere a un fármaco que se usa para inhibir la infección por el virus de la influenza e incluye, entre otros, oseltamivir. Como se usa en el presente documento, un inhibidor de la polimerasa puede referirse a un inhibidor de una polimerasa
- 20 de ácido nucleico, tal como la polimerasa de influenza. Un ejemplo de inhibidor de polimerasa es VX-787. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, los inhibidores de la influenza pueden funcionar dirigiéndose al propio virus de la influenza o dirigiéndose a una célula hospedera que puede
- 25 ser el objetivo de un virus de la influenza. Por ejemplo, un

inhibidor de la influenza que se dirige a una célula hospedera puede inhibir la traducción en la célula, reduciendo así la replicación viral.

[0084] La frase "se une específicamente" o "se une específicamente a" o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se puede caracterizar por una constante de disociación en equilibrio de al menos aproximadamente 1×10^{-8} M o menos (por ejemplo, una K_D más pequeña indica una unión más fuerte). Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmones superficiales y similares. Tal como se describe en el presente documento, los anticuerpos se han identificado mediante un ensayo de interferometría de bio-capa sin etiquetas en tiempo real en un biosensor Octet® HTX, que se une específicamente a influenza-HA. Además, los anticuerpos multiespecíficos que se unen a un dominio en influenza-HA y uno o más antígenos adicionales o biespecíficos que se unen a dos regiones diferentes de influenza-HA se consideran, no obstante, anticuerpos que "se unen específicamente", tal como se usa en el presente documento. Además de los anticuerpos neutralizantes, los anticuerpos que se unen específicamente a

HA, pero que no son neutralizantes, también se pueden usar dentro del alcance de la presente invención para generar conjugados de anticuerpo-fármaco. Dichos anticuerpos pueden funcionar, por ejemplo, para entregar una carga útil a las
5 células infectadas con influenza.

[0085] El término anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a aquellos mAbs que tienen una afinidad de unión a influenza-HA, expresada como K_D , de al menos 10^{-8} M; preferiblemente 10^{-9} M; más preferiblemente 10^{-10} M, incluso más preferiblemente
10 10^{-11} M, incluso más preferiblemente 10^{-12} M, medido por ensayo de interferometría de bio-capa libre de etiquetas en tiempo real, por ejemplo, un biosensor Octet® HTX, o por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™, o por ELISA de afinidad de solución.

15 [0086] La frase o término "velocidad de ralentización", " K_{off} " o " k_d " se refiere a un anticuerpo que se disocia de influenza-HA, con una constante de velocidad de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, preferiblemente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, de acuerdo con lo determinado por un ensayo de interferometría de bio-capa
20 libre de etiquetas en tiempo real, por ejemplo, un biosensor Octet® HTX, o por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, BIACORE™.

[0087] La frase "dominio de unión a antígeno" o "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a
25 antígeno" de un anticuerpo, y similares, tal como se usa en

el presente documento, incluye cualquier origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético, o polipéptido o glicoproteína modificados genéticamente que se unen específicamente a un antígeno para formar un complejo.

5 [0088] En modalidades específicas, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de esta descripción se pueden conjugar con un resto como un ligando o un resto terapéutico ("conjugado de fármaco-anticuerpo" o "inmunoconjugado"), tal como un fármaco antiviral, un enlazador-carga útil que
10 incluye un fármaco antiviral, un segundo anticuerpo anti-influenza o cualquier otro resto terapéutico útil para tratar una infección causada por influenza-HA.

[0089] Como se usa en el presente documento, "administrar secuencialmente" significa que cada dosis del compuesto se
15 administra al sujeto en un momento diferente, por ejemplo, en días diferentes separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses).

[0090] Las frases "dosis inicial", "dosis secundarias" y "dosis terciarias" se refieren a la secuencia temporal de
20 administración de los compuestos descritos en el presente documento. Por lo tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (también denominada "dosis de referencia"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial;
25 y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran

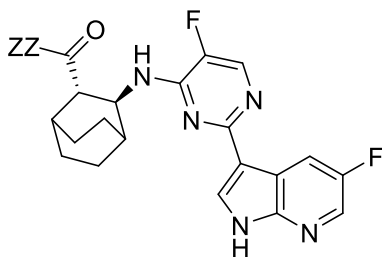
después de las dosis secundarias. Las dosis inicial, secundaria y terciaria pueden incluir todas la misma cantidad del compuesto descrito en este documento, pero generalmente pueden diferir entre sí en términos de frecuencia de
5 administración.

[0091] La frase "la dosis inmediatamente anterior", tal como se usa en el presente documento, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la dosis del compuesto que se administra a un paciente antes de la
10 administración de la siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

[0092] Como se usa en el presente documento, el término "carga útil" se refiere a un ingrediente activo de molécula pequeña (por ejemplo, un compuesto antiviral), opcionalmente
15 conjugado con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, directamente o a través de un enlazador, que proporciona un efecto biológico deseado (por ejemplo, la inhibición de la infección o replicación del virus de la influenza). Una carga útil puede ser menor o igual a 2000 Da,
20 menor o igual a 1500 Da, o menor o igual a 900 Da.

Compuestos o cargas útiles

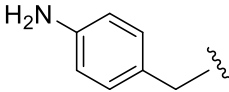
- [0093] En este documento se proporcionan compuestos antivirales o cargas útiles. Sin estar ligados a ninguna teoría particular de funcionamiento, los compuestos antivirales incluyen (1) VX-787 y derivados del mismo; y (2) baloxavir y derivados del mismo (por ejemplo, baloxavir marboxilo). En ciertas modalidades, los compuestos antivirales se pueden administrar a las células como parte de un conjugado. En ciertas modalidades, los compuestos antivirales son capaces de llevar a cabo cualquier actividad de VX-787, baloxavir y/o baloxavir marboxilo y cada uno de sus derivados en o en un objetivo, por ejemplo, una célula objetivo. Ciertos compuestos antivirales pueden tener una o más actividades adicionales.
- [0094] En ciertas modalidades, aquí se establece un compuesto que tiene la estructura de la fórmula I:

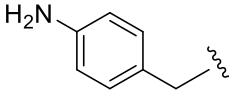


Fórmula I

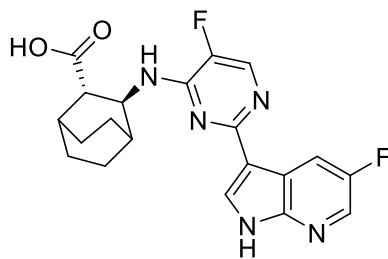
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En la Fórmula I, en ciertas modalidades, **ZZ** es $-OR^1$ o $-NHOH$. En una modalidad, **ZZ** es $-NHOH$. En una modalidad, **ZZ** es $-OR^1$. En la

Fórmula I, cuando **ZZ** es $-\text{OR}^1$, los grupos **R**¹ útiles incluyen

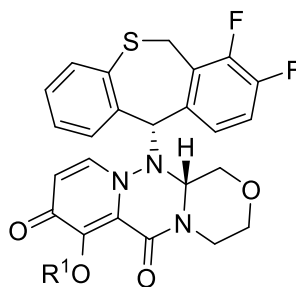
hidrógeno y . En una modalidad, **R**¹ es hidrógeno.

En una modalidad, **R**¹ es . En una modalidad, el

compuesto es VX-787 o

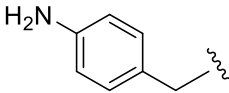


- 5 [0095] En ciertas modalidades, se establece en este documento un compuesto que tiene la estructura de la fórmula II:

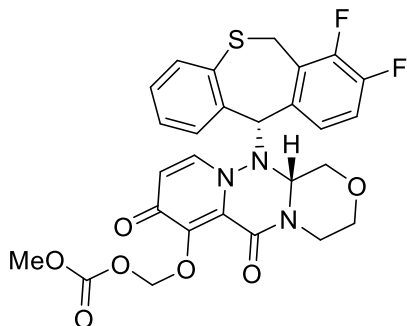


Fórmula II

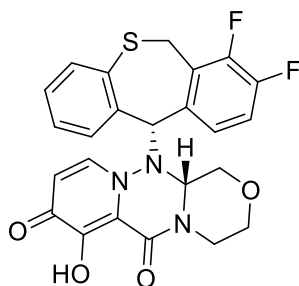
- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una modalidad, **R**¹ es hidrógeno. En una modalidad, **R**¹ es -

$\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OCH}_3$. En una modalidad, **R**¹ es . En una

modalidad, el compuesto es baloxavir marboxilo o



. En una modalidad, el compuesto es



baloxavir o

.

Agentes de unión

5 [0096] Los agentes de unión adecuados para cualquiera de los conjugados proporcionados en la presente invención incluyen, entre otros, anticuerpos, receptores virales o cualquier otra molécula o sustancia de unión a células o péptidos. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de
10 un ejemplo de influenza HA se muestra en GenBank como número de registro ACP44150.1.

[0097] Los agentes de unión adecuados incluyen anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos totalmente humanos) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a
15 las proteínas del virus de la influenza, tal como las proteínas de superficie hemaglutinina (HA), neuraminidasa

(NA) y Matrix-2 (M2).). En algunas modalidades, estos agentes de unión modulan la interacción del virus de la influenza con las células hospederas. En algunas modalidades, los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno se unen a la hemagglutinina madura. En algunas modalidades, los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno se unen a una proteína precursora de hemagglutinina HA0. Los anticuerpos anti-influenza HA pueden unirse al virus de la influenza HA con alta afinidad. En determinadas modalidades, los anticuerpos del presente documento son anticuerpos bloqueantes en los que los anticuerpos pueden unirse a la influenza HA y bloquear la unión y/o la entrada del virus en las células hospederas. En algunas modalidades, los anticuerpos bloqueantes del presente documento pueden bloquear la unión del virus de la influenza a las células y, tal como tales, pueden inhibir o neutralizar la infectividad viral de las células hospederas. En algunas modalidades, los anticuerpos bloqueantes pueden ser útiles para tratar a un sujeto que padece una infección por el virus de la influenza. Los anticuerpos, cuando se administran a un sujeto que los necesita, pueden reducir la infección por un virus como el de la influenza en el sujeto. Pueden usarse para disminuir las cargas virales en un sujeto. Pueden usarse solos o como terapia adjunta con otras fracciones o modalidades terapéuticas conocidas en la técnica para tratar una

infección viral. En ciertas modalidades, estos anticuerpos pueden unirse a un epítipo en la región del tallo de la HA viral, la región de la cabeza de la HA viral o ambas. Además, los anticuerpos identificados pueden usarse profilácticamente
5 (antes de la infección) para proteger a un mamífero de la infección, o pueden usarse terapéuticamente (después de que se establezca la infección) para mejorar una infección previamente establecida, o para mejorar al menos un síntoma asociado con la infección.

10 [0098] En ciertas modalidades, los anticuerpos se obtienen de ratones inmunizados con un inmunógeno primario, tal como un HA de influenza de longitud completa o con una forma recombinante de HA de influenza o fragmentos del mismo, seguido de inmunización con un inmunógeno secundario, o con
15 un fragmento de influenza HA inmunogénicamente activo. En determinadas modalidades, los anticuerpos se obtienen de ratones inmunizados con una composición de vacuna contra la influenza seguida de una inmunización de refuerzo con uno o más péptidos HA producidos de forma recombinante. En ciertas
20 modalidades, los anticuerpos se obtienen de seres humanos. En ciertas modalidades, los anticuerpos se obtienen de mamíferos (por ejemplo, mamíferos no humanos). En ciertas modalidades, los anticuerpos se obtienen de primates no humanos.

[0099] El inmunógeno puede ser un fragmento biológicamente
25 activo y/o inmunogénico de HA de influenza o ADN que

codifique para el fragmento activo del mismo. El fragmento puede derivar de la región del tallo de la proteína HA. (Véase, Sui *et al.* Nature Struct, and Mol. Biol. Publicado en línea el 22 de febrero de 2009; páginas 1 - 9), la región principal de la proteína HA, o una combinación de las mismas.

5 [00100] Los péptidos pueden modificarse para incluir la adición o sustitución de ciertos residuos para marcar o para fines de conjugación con moléculas portadoras, tales como hemocianina de lapa californiana (KLH). Por ejemplo, se puede
10 añadir una cisteína en el extremo N-terminal o C-terminal de un péptido, o se puede añadir una secuencia conectora para preparar el péptido para la conjugación, por ejemplo, con KLH para la inmunización.

[00101] Ciertos anticuerpos anti-influenza, anticuerpos
15 anti-influenza-HA o ADC aquí tienen actividad antiviral, tal como ser capaces de unirse y neutralizar la actividad de influenza-HA, de acuerdo con lo determinado por ensayos *in vitro* o *in vivo*. Ciertos anticuerpos anti-influenza, anticuerpos anti-influenza-HA o ADC aquí pueden unirse a HA
20 pero no tienen actividad neutralizante, de acuerdo con lo determinado por ensayos *in vitro* o *in vivo*. La capacidad de los anticuerpos o ADC del presente documento para unirse y neutralizar la actividad de influenza-HA y, por lo tanto, la unión y/o entrada del virus en una célula hospedera seguida
25 de la infección viral resultante, puede medirse usando

cualquier método estándar conocido para los expertos en la técnica, incluidos los ensayos de unión o los ensayos de actividad, tal como se describe en el presente documento.

[00102] Los anticuerpos o ADCs específicos para influenza-
5 HA pueden no contener marcas o restos adicionales, o pueden
contener una marca o resto N-terminal o C-terminal. En una
modalidad, el marcador o resto es biotina. En un ensayo de
unión, la ubicación de un marcador (si lo hay) puede
10 determinar la orientación del péptido con respecto a la
superficie sobre la que se une el péptido. Por ejemplo, si
una superficie está recubierta con avidina, un péptido que
contiene una biotina N-terminal se orientará de manera que la
porción C-terminal del péptido estará distal a la superficie.
En una modalidad, el marcador puede ser un radionúclido, un
15 colorante fluorescente o un marcador detectable por MRI. En
ciertas modalidades, dichos anticuerpos marcados pueden
usarse en ensayos de diagnóstico que incluyen ensayos de
imagenología. En una modalidad, el resto adicional es una
etiqueta peptídica. En una modalidad, un ADC incluye una
20 cadena pesada de anticuerpo y además incluye una etiqueta
peptídica en el extremo C-terminal de la cadena pesada de
anticuerpo. En una modalidad, un ADC incluye una cadena
pesada de anticuerpo y además incluye una etiqueta de péptido
(por ejemplo, un pentapéptido) en el extremo C-terminal de la
25 cadena pesada de anticuerpo, en donde la etiqueta de péptido

es la secuencia de pentapéptido LLQGA (SEQ ID NO: 297) (por ejemplo, para usarse en la conjugación de un enlazador-carga útil a través de transglutaminasa). En una modalidad, un ADC incluye dos cadenas pesadas de anticuerpos y además incluye una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de cada cadena pesada de anticuerpos. En una modalidad, un ADC incluye dos cadenas pesadas de anticuerpo e incluye además una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de cada cadena pesada de anticuerpo, en donde la etiqueta peptídica es la secuencia pentapeptídica LLQGA (SEQ ID NO: 297).

[00103] En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena ligera. En ciertas modalidades, la cadena ligera es una cadena ligera kappa. En ciertas modalidades, la cadena ligera es una cadena ligera lambda. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada. En algunas modalidades, la cadena pesada es una IgA. En algunas modalidades, la cadena pesada es una IgD. En algunas modalidades, la cadena pesada es una IgE. En algunas modalidades, la cadena pesada es una IgG. En algunas modalidades, la cadena pesada es una IgM. En algunas modalidades, la cadena pesada es una IgG1. En algunas modalidades, la cadena pesada es una IgG2. En algunas modalidades, la cadena pesada es una IgG3. En algunas modalidades, la cadena pesada es una IgG4. En algunas modalidades, la cadena pesada es una IgA1. En algunas

modalidades, la cadena pesada es una IgA2.

[00104] En algunas modalidades, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fv. En algunas modalidades, el
5 fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo es un fragmento F(ab')₂. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab'. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo es un fragmento scFv (sFv). En algunas
10 modalidades, el fragmento de anticuerpo es un fragmento scFv-Fc.

[00105] En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas modalidades, el
15 anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que incluye un primer dominio de unión a antígeno y un segundo dominio de unión a antígeno.

[00106] En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas modalidades, el anticuerpo
20 es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

[00107] En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende un residuo de glutamina en una o más posiciones de la cadena pesada numeradas 295 en el sistema de numeración EU. En la
25 presente invención, esta posición se denomina glutamina 295,

Gln295 o Q295. Los expertos reconocerán que se trata de un residuo de glutamina conservado en la secuencia de tipo salvaje de muchos anticuerpos. La identificación del residuo Q295 se puede lograr fácilmente con herramientas estándar de

5 alineación de secuencias, incluidas las descritas en este documento. En otras modalidades útiles, el anticuerpo puede diseñarse para que comprenda un residuo de glutamina. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una o más mutaciones N297Q. Las técnicas para modificar una secuencia

10 de anticuerpo para incluir un residuo de glutamina están dentro del conocimiento de los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* *Current Protoc. Mol. Biol.*). En una modalidad, el anticuerpo incluye una cadena pesada de anticuerpo y además incluye una etiqueta peptídica en el

15 extremo C-terminal de la cadena pesada de anticuerpo. En una modalidad, el anticuerpo incluye una cadena pesada de anticuerpo y además incluye una etiqueta peptídica, por ejemplo, secuencia de reconocimiento de transglutaminasa o etiqueta pentapeptídica, en el extremo C-terminal de la

20 cadena pesada del anticuerpo, en donde la etiqueta peptídica es la secuencia pentapeptídica LLQGA (SEQ ID NO: 297).

Preparación de anticuerpos humanos

[00108] Los métodos para generar anticuerpos humanos en

25 ratones transgénicos son conocidos en la técnica. Cualquier

método conocido de este tipo puede usarse en el contexto de esta invención para producir anticuerpos humanos que se unan específicamente a Influenza-HA. Se puede usar un inmunógeno que comprenda cualquiera de los siguientes para generar

5 anticuerpos contra la influenza HA. En determinadas modalidades, los anticuerpos del presente documento se obtienen de ratones inmunizados con un HA de influenza nativo de longitud completa (véase, por ejemplo, el número de registro de GenBank FJ966082.1), o con un virus vivo atenuado

10 o inactivado, o con ADN que codifica la proteína o el fragmento del mismo. Como alternativa, la proteína influenza-HA o un fragmento de la misma puede producirse usando técnicas bioquímicas estándar y modificarse y usarse como inmunógeno. En una modalidad, el inmunógeno es una proteína

15 influenza-HA producida de forma recombinante o un fragmento de la misma. En determinadas modalidades del presente documento, el inmunógeno puede ser una vacuna contra el virus de la influenza. En ciertas modalidades, se pueden administrar una o más inyecciones de refuerzo. En

20 determinadas modalidades, las inyecciones de refuerzo pueden comprender una o más cepas del virus de la influenza o hemagglutininas derivadas de estas cepas, por ejemplo, véase Protein Sciences H1 A/Nueva Caledonia/20/1999, H5 A/Indonesia/05/2005, H3 A/ Victoria/361/2011, H7 A/Países

25 Bajos/219/2003, o H9 A/Hong Kong/1073/1988, o las cepas del

virus de influenza B B/Victoria/2/87, B/Nanchang/3451/93, B/Singapur/11/1994, B/Florida/4/2006 o B/Yamagata/16/88. En ciertas modalidades, las inyecciones de refuerzo pueden contener una mezcla 1:1 de las cepas de influenza, o una
5 mezcla 1:1 de las hemagglutininas derivadas de las cepas. En determinadas modalidades, el inmunógeno puede ser un péptido HA de la influenza recombinante expresado en *E. coli* o en cualquier otra célula eucariótica o de mamífero, tal como células de ovario de hámster chino (CHO) o el propio virus de
10 la influenza.

[00109] Usando la tecnología VELOCIMMUNE® (ver, por ejemplo, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o cualquier otro método conocido para generar anticuerpos monoclonales, se aíslan inicialmente anticuerpos
15 quiméricos de alta afinidad contra influenza-HA que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. La tecnología VELOCIMMUNE® implica la generación de un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera humana unidas
20 operativamente a loci endógenos de región constante de ratón, de modo que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta a la estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del
25 anticuerpo se aísla y se une operativamente al ADN que

codifica las regiones constantes de la cadena pesada y ligera humana. A continuación, el ADN se expresa en una célula capaz de expresar el anticuerpo completamente humano.

[00110] Generalmente, un ratón VELOCIMMUNE® se expone al
5 antígeno de interés, y las células linfáticas (tal como las células B) se recuperan de los ratones que expresan anticuerpos. Las células linfáticas pueden fusionarse con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales, y tales líneas celulares de hibridoma
10 se exploran y seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. El ADN que codifica para las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera puede aislarse y unirse a regiones constantes isotípicas deseables
15 de la cadena pesada y la cadena ligera. Dicha proteína de anticuerpo se puede producir en una célula, tal como una célula CHO. Como alternativa, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o los dominios variables de las cadenas ligera y pesada se pueden aislar
20 directamente de los linfocitos específicos de antígeno.

[00111] Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como se describe en los documentos WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1, cada uno de los cuales
25 se incorpora por referencia en su totalidad, los anticuerpos

se caracterizan y seleccionan de acuerdo con las características deseables, incluida la afinidad, la selectividad, el epítopo, etc. Las regiones constantes del ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo completamente humano de este documento, por ejemplo, IgG1 o IgG4 de tipo salvaje o modificado. Si bien la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de alta afinidad de unión al antígeno y especificidad de la objetivo residen en la región variable.

Bioequivalentes

[00112] Los anticuerpos anti-influenza-HA y los fragmentos de anticuerpos del presente documento abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de los anticuerpos descritos, pero que retienen la capacidad de unirse a Influenza HA. Dichas variantes de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia original, pero exhiben una actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Asimismo, las secuencias de ADN que codifican para anticuerpos de la presente invención abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos en comparación

con la secuencia divulgada, pero que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo en este documento. Otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos anti-influenza-
5 HA bioequivalentes son los descritos en WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

Características biológicas de los anticuerpos

10 [00113] En general, los anticuerpos de este documento funcionan uniéndose a Influenza HA. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos que se unen a HA de influenza (por ejemplo, a 25 °C o a 37 °C) con una K_D de
15 menos de 10 nM, medida por un interferómetro de bio-capa en tiempo real a base de biosensores (ensayo Octet HTX), o por resonancia de plasmón de superficie. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen a influenza-HA con una K_D de menos de
20 aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 2 nM, menos de aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 500 pM, menos de 250 pM, o menos de 100 pM, medido por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando el formato de ensayo como el descrito en WO 2016/100807 o US 2016/0176953
25 A1, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su

totalidad, o un ensayo sustancialmente similar.

[00114] Los ensayos *in vitro* ejemplares no limitantes para medir la actividad de unión se ilustran en el Ejemplo 3 de WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1, cada uno de los cuales se
5 incorpora aquí como referencia en su totalidad. En el ejemplo 3 de WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1, la afinidad de unión y las constantes de disociación de los anticuerpos anti-influenza-HA para influenza-HA se determinaron mediante un biosensor con base en interferómetro de bio-capa en tiempo
10 real (ensayo Octet HTX). En los ejemplos 4 y 5 de WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1, se usaron ensayos de neutralización para determinar la infectividad de diversas cepas del grupo 1 del virus de la influenza. En el ejemplo 6 de WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1, se demostró que
15 ciertos anticuerpos median la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de células infectadas por virus *in vitro*. Los ejemplos 7 y 10 de WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1 demuestran que ciertos anticuerpos de la invención son capaces de neutralizar una infección de influenza A *in vivo*
20 cuando se administran de forma profiláctica o terapéutica.

[00115] También se proporcionan en este documento anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a influenza HA con una vida media disociativa ($t_{1/2}$) de más de aproximadamente 100 minutos, medido por
25 resonancia de plasmón superficial a 25 °C, por ejemplo,

usando un formato de ensayo como se define en WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad, o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno en el presente documento se unen a Influenza HA con una $t_{1/2}$ mayor de aproximadamente 200 minutos, mayor de aproximadamente 300 minutos, mayor de aproximadamente 400 minutos, mayor de aproximadamente 500 minutos, mayor de aproximadamente 600 minutos, mayor de aproximadamente 700 minutos, mayor de aproximadamente 800 minutos, mayor de aproximadamente 900 minutos o mayor de aproximadamente 1000 minutos, medido por resonancia de plasmón superficial a 25 °C, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en WO 2016/100807 o US 2016 /0176953 A1, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad (por ejemplo, formato de captura de imAb o captura de antígeno), o un ensayo sustancialmente similar. En una modalidad, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno del presente documento se unen a la influenza HA con una vida media disociativa ($t_{1/2}$) de más de 300 minutos. En una modalidad, un anticuerpo del presente documento proporciona un aumento de aproximadamente 1.5 a 2 veces en la vida media disociativa en comparación con un anticuerpo de comparación denominado Control I mAb, cuando se prueba en monos y ratones.

[00116] También se proporcionan aquí anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que neutralizan la infectividad del virus de la influenza para sus células hospederas. En algunas modalidades, los anticuerpos exhiben una potencia de neutralización contra varios virus de influenza representativos del grupo 1 (H1N1 A/Puerto Rico/08/1934; H5N1 A/Vietnam/1203/2004; H1N1 A/California/07/2009; H1N1 A/Wisconsin/1933; H1N1 A/Brisbane/59/1997, H9N2 A Hong Kong/33982/2009, H13N6 a/gaviota/Maryland/704/1977 y H16N3 A/ave playera/Delaware/172/2006) con una IC_{50} que oscila entre aproximadamente 1.6 nM a aproximadamente 130 nM en un ensayo de microneutralización, por ejemplo, tal como se muestra en los Ejemplos 4 y 5 de WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad, o un ensayo sustancialmente similar. En una modalidad, los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno que neutralizan la infectividad del virus de la influenza para sus células hospederas lo hacen con una IC_{50} inferior a 130 nM.

[00117] También se proporcionan aquí anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que median la citotoxicidad dependiente del complemento de las células infectadas, con una EC_{50} que varía de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 66 nM (ver el ejemplo 6 en WO 2016/100807 o

US 2016/0176953 A1, cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad). En una modalidad, los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno median la citotoxicidad dependiente del complemento de las células infectadas, con una EC₅₀ inferior a 66 nM.

[00118] En el presente documento se describen anticuerpos anti-influenza-A HA que demuestran un aumento en la protección o neutralización de la infección por influenza A *in vivo*, en comparación con un anticuerpo de control. Ciertos anticuerpos muestran neutralización cuando se administran de forma profiláctica (antes de la infección) o terapéutica (después de la infección); véase el ejemplo 7 en WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[00119] En una modalidad, en el presente documento se proporciona un anticuerpo recombinante aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Influenza HA, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo presenta dos o más de las siguientes características: (a) es un anticuerpo monoclonal completamente humano anticuerpo; (b) se une a influenza HA con una constante de disociación (K_D) de menos de 10^{-9} M, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (c) demuestra una vida media disociativa ($t_{1/2}$) que oscila entre aproximadamente 370 minutos y más de 1000 minutos; (d) demuestra la neutralización de los virus de

- influenza A del grupo 1 seleccionados de H1N1, H5N1, H9N2, H13N6 y H16N3, con una IC₅₀ que oscila entre aproximadamente 1.6 nM y aproximadamente 130 nM; (e) demuestra la lisis mediada por el complemento de las células infectadas por el virus de la influenza con una EC₅₀ de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 66 nM; o (f) demuestra protección, medida por una mayor supervivencia en un modelo animal de infección por el virus de la influenza cuando se administra antes o después de la exposición al virus.
- 10 [00120] Los anticuerpos del presente documento pueden poseer dos o más de las características biológicas antes mencionadas, o cualquier combinación de las mismas. Otras características biológicas de los anticuerpos del presente documento serán evidentes para un experto en la materia a partir de una revisión de la presente invención que incluye los Ejemplos de trabajo del presente documento.
- 15

Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de región variable de las cadenas pesada y ligera

- 20 [00121] En algunas modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, conjugado con el enlazador-carga útil o la carga útil puede ser un anticuerpo que se dirige a la influenza HA. Se pueden encontrar anticuerpos ejemplares contra la influenza HA, por ejemplo, en los documentos WO 2016/100807 o US 2016/0176953 A1, cada uno de
- 25

los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, un anticuerpo contra la influenza HA comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR)-1 que comprende SEQ ID NO: 20; una HCDR2
5 que comprende SEQ ID NO: 22; una HCDR3 que comprende SEQ ID NO: 24; una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR)-1 que comprende SEQ ID NO: 28; una LCDR2 que comprende SEQ ID NO: 30; y una LCDR3 que comprende SEQ ID NO: 32. En algunas modalidades, un anticuerpo contra la
10 influenza HA comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende SEQ ID NO: 18 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende SEQ ID NO: 26. En cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo contra la influenza HA se puede preparar mediante mutagénesis
15 dirigida al sitio para insertar un residuo de glutamina en un sitio sin que resulte en la función o unión del anticuerpo desactivada. Por ejemplo, en cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo contra la influenza HA puede comprender una mutación Asn297Gln (N297Q). Dichos anticuerpos
20 que tienen una mutación N297Q también pueden contener uno o más residuos de glutamina naturales adicionales en sus regiones variables, que pueden ser accesibles para la transglutaminasa y, por lo tanto, capaces de conjugarse con una carga útil o un enlazador-carga útil. En una modalidad,
25 el anticuerpo incluye una HCVR y además incluye una etiqueta

peptídica en el extremo C-terminal de la HCVR. En una modalidad, el anticuerpo incluye una HCVR y además incluye una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de la HCVR, en donde la etiqueta peptídica es la secuencia pentapeptídica LLQGA (SEQ ID NO: 297). En una modalidad, el anticuerpo incluye dos HCVRs y además incluye una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de cada HCVR. En una modalidad, el anticuerpo incluye dos HCVRs e incluye además una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de las HCVRs, en donde la etiqueta peptídica es la secuencia pentapeptídica LLQGA (SEQ ID NO: 297).

[00122] La Tabla 1 establece los identificadores de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada y las CDRs de anticuerpos anti-influenza HA seleccionados. Los identificadores de secuencia de ácido nucleico correspondientes se exponen en la Tabla 2.

Tabla 1: Identificadores de secuencias de aminoácidos

SEQ ID NOS:								
Designación de anticuerpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb11723	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb11729	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb11820	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb11829	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb11829*	50	52	54	56	66	68	70	72

SEQ ID NOS:								
Designación de anticuerpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb11829	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb11830	74	76	78	80	82	84	86	88
mAb11830*	74	76	78	80	66	68	70	72
mAb11903	90	92	94	96	98	100	102	104
mAb14571	106	108	110	112	114	116	118	120
mAb14571	106	108	110	112	114	116	118	120
mAb11704	122	124	126	128	130	132	134	136
mAb11711	138	140	142	144	146	148	150	152
mAb11714	154	156	158	160	162	164	166	168
mAb11717	170	172	174	176	178	180	182	184
mAb11724	186	188	190	192	194	196	198	200
mAb11727	202	204	206	208	210	212	214	216
mAb11730*	218	220	222	224	226	228	230	232
mAb11731*	234	236	238	240	66	68	70	72
mAb11734*	242	244	246	248	66	68	70	72
mAb11736*	250	252	254	256	66	68	70	72
mAb11742*	258	260	262	264	66	68	70	72
mAb11744*	266	268	270	272	66	68	70	72
mAb11745*	274	276	278	280	66	68	70	72
mAb11747*	282	284	286	288	66	68	70	72
mAb11748*	290	292	294	296	66	68	70	72
mAb5385	298	299	300	301	302	303	304	305

* mAb contiene una o más mutaciones en la región constante

Tabla 2: Identificadores de secuencias de ácidos nucleicos

SEQ ID NOS:								
Designación de anticuerpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb11723	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb11729	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb11820	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb11829	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb11829*	49	51	53	55	65	67	69	71
mAb11829	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb11830	73	75	77	79	81	83	85	87
mAb11830*	73	75	77	79	65	67	69	71
mAb11903	89	91	93	95	97	99	101	103
mAb14571	105	107	109	111	113	115	117	119
mAb14571	105	107	109	111	113	115	117	119
mAb11704	121	123	125	127	129	131	133	135
mAb11711	137	139	141	143	145	147	149	151
mAb11714	153	155	157	159	161	163	165	167
mAb11717	169	171	173	175	177	179	181	183
mAb11724	185	187	189	191	193	195	197	199
mAb11727	201	203	205	207	209	211	213	215
mAb11730*	217	219	221	223	225	227	229	231
mAb11731*	233	235	237	239	65	67	69	71
mAb11734*	241	243	245	247	65	67	69	71
mAb11736*	249	251	253	255	65	67	69	71
mAb11742*	257	259	261	263	65	67	69	71
mAb11744*	265	267	269	271	65	67	69	71

SEQ ID NOS:								
Designación de anticuerpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb11745*	273	275	277	279	65	67	69	71
mAb11747*	281	283	285	287	65	67	69	71
mAb11748*	289	291	293	295	65	67	69	71

* mAb contiene una o más mutaciones en la región constante.

[00123] Los enlazadores del agente de unión se pueden unir al agente de unión, por ejemplo, anticuerpo o molécula de unión a antígeno, a través de un enlace en un aminoácido particular dentro del anticuerpo o molécula de unión a antígeno. Los ejemplos de uniones de aminoácidos que se pueden usar en el contexto de esta modalidad de la descripción incluyen, por ejemplo, lisina (ver, por ejemplo, US 5,208,020; US 2010/0129314; Hollander et al., *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358- 361; WO 2005/089808; US 5,714,586; US 2013/0101546; y US 2012/0585592), cisteína (ver, por ejemplo, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 28073/05/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; y US 7,750,116), selenocisteína (ver, por ejemplo, WO 2008/122039; y Hofer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, 105: 12451-12456), formil glicina (ver, por ejemplo, Carrico et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110:46-51, y Rabuka et al., *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), aminoácidos no naturales (ver, por ejemplo, WO 2013/068874 y WO 2012/166559), y aminoácidos

ácidos (ver, por ejemplo, WO 2012/05982). Los enlazadores también se pueden conjugar con una proteína de unión a antígeno mediante la unión a carbohidratos (ver, por ejemplo, US 2008/0305497, WO 2014/065661, Ryan *et al.*, *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127-130, y Jeger *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2010, 49:9995-9997).

[00124] En algunos ejemplos, el agente de unión es un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno, y el anticuerpo se une al enlazador a través de un residuo de lisina. En algunas modalidades, la molécula de unión al anticuerpo o al antígeno se une al enlazador a través de un residuo de cisteína.

[00125] Los enlazadores también se pueden conjugar con uno o más residuos de glutamina a través de la conjugación quimioenzimática a base de transglutaminasa (ver, por ejemplo, Jeger *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2010, 49:9995-9997 y Dennler *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 2014, 25:569-578). Por ejemplo, en presencia de transglutaminasa, uno o más residuos de glutamina de un anticuerpo pueden acoplarse a un compuesto de amina primaria. Los compuestos de amina primaria incluyen, por ejemplo, cargas útiles o enlazador-cargas útiles, que proporcionan directamente conjugados de anticuerpo y fármaco a través del acoplamiento mediado por transglutaminasa. Los compuestos de amina primaria también incluyen enlazadores y separadores que se funcionalizan con

grupos reactivos que pueden reaccionar posteriormente con compuestos adicionales para la síntesis de conjugados de anticuerpo y fármaco. Los anticuerpos que comprenden residuos de glutamina pueden aislarse de fuentes naturales o
5 modificarse para que comprendan uno o más residuos de glutamina. Las técnicas para manipular residuos de glutamina en una cadena polipeptídica de anticuerpo (anticuerpos modificados con glutaminilo o moléculas de unión a antígeno) están dentro de la experiencia de los profesionales en la
10 materia. En ciertas modalidades, el anticuerpo está aglicosilado.

[00126] En ciertas modalidades, el anticuerpo o un anticuerpo modificado con glutaminilo o una molécula de unión a antígeno comprende al menos un residuo de glutamina en al
15 menos una secuencia de cadena polipeptídica. En ciertas modalidades, el anticuerpo o un anticuerpo modificado con glutaminilo o una molécula de unión a antígeno comprende dos polipéptidos de cadena pesada, cada uno con un residuo Gln295 o Q295. En modalidades adicionales, el anticuerpo o un
20 anticuerpo modificado con glutaminilo o una molécula de unión a antígeno comprende uno o más residuos de glutamina en un sitio distinto de una cadena pesada 295. En este documento se incluyen anticuerpos de esta sección que tienen la(s) mutación(es) N297Q descritas en este documento.

25 [00127] En una modalidad, el anticuerpo o un anticuerpo

modificado con glutaminilo o una molécula de unión a antígeno incluye una cadena pesada de anticuerpo e incluye además una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de la cadena pesada de anticuerpo. En una modalidad, el anticuerpo o un
5 anticuerpo modificado con glutaminilo o una molécula de unión a antígeno incluye una cadena pesada de anticuerpo y además incluye una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, en donde la etiqueta peptídica es la secuencia pentapeptídica LLQGA (SEQ ID NO: 297). En una
10 modalidad, el anticuerpo o un anticuerpo modificado con glutaminilo o una molécula de unión a antígeno incluye dos cadenas pesadas de anticuerpo e incluye además una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de cada cadena pesada de anticuerpo. En una modalidad, el anticuerpo o un anticuerpo
15 modificado con glutaminilo o una molécula de unión a antígeno incluye dos cadenas pesadas de anticuerpo y además incluye una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de cada cadena pesada de anticuerpo, en donde la etiqueta peptídica es la secuencia pentapeptídica LLQGA (SEQ ID NO: 297).

20

Enlazadores

[00128] En determinadas modalidades, la porción **L** del enlazador de los conjugados descritos en el presente documento es un resto, por ejemplo, un resto divalente, que
25 une covalentemente un agente de unión a un compuesto de carga

útil descrito en el presente documento. En otros casos, el enlazador **L** es un resto trivalente o multivalente que une covalentemente un agente de unión a un compuesto de carga útil descrito en el presente documento. Pueden encontrarse

5 enlazadores adecuados, por ejemplo, en *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins*; Phillips, G. L., Ed.; Springer Verlag: New York, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry, L., Ed.; Humana Press, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Wang, J., Shen, W.-C., y Zaro, J. L., Eds.; Springer International

10 Publishing, 2015, el contenido de cada uno incorporado aquí en su totalidad como referencia. En ciertas modalidades, la porción **L** del enlazador de las enlazador-carga útil descritas en este documento es un resto unido covalentemente a un compuesto de carga útil descrito en este documento, capaz de

15 enlazar de forma divalente y covalente un agente de unión a un compuesto de carga útil descrito en este documento. En otros casos, la porción **L** del enlazador de los enlazador-cargas útiles descritos en el presente documento es un resto unido covalentemente a un compuesto de carga útil descrito en

20 el presente documento, capaz de enlazar covalentemente, tal como un resto trivalente o multivalente, un agente de unión a un compuesto de carga útil descrito en el presente documento. Los compuestos de carga útil incluyen compuestos de las Fórmulas I y II anteriores, y sus residuos después de la

25 unión o incorporación del enlazador **L** son enlazador-cargas

útiles. Los enlazador-cargas útiles se pueden unir además a agentes de unión tales como anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos para formar conjugados de anticuerpo-fármaco. Los expertos en la técnica reconocerán

5 que ciertos grupos funcionales de fracciones de carga útil son convenientes para enlazar a enlazadores y/o agentes de unión. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el enlazador está ausente y las cargas útiles están unidas directamente a los agentes de unión. En otra modalidad, las cargas útiles

10 incluyen ácidos carboxílicos y los agentes de unión incluyen lisinas, en donde cada ácido carboxílico y lisina participan en la formación de enlaces amida para unir los residuos de la carga útil directamente a los residuos del agente de unión. Los grupos funcionales de carga útil incluyen además

15 hidroxilos (por ejemplo, baloxavir y derivados del mismo, tal como un derivado de baloxavir marboxilo) y ácidos carboxílicos (por ejemplo, en forma de ésteres al unirse a **L**, tal como en VX-787 y derivados del mismo).

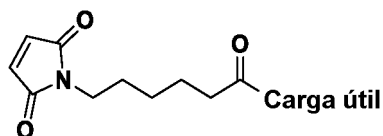
[00129] En ciertas modalidades, los enlazadores son

20 estables en condiciones fisiológicas. En ciertas modalidades, los enlazadores son escindibles, por ejemplo, capaces de liberar al menos la porción de carga útil en presencia de una enzima o en un rango o valor de pH particular. En algunas modalidades, un enlazador comprende un resto escindible por

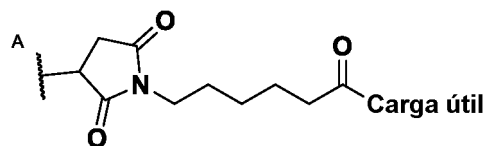
25 enzima. Los restos escindibles por enzimas ilustrativos

incluyen, pero no se limitan a, enlaces peptídicos, enlaces éster, hidrazonas y enlaces disulfuro. En algunas modalidades, el enlazador comprende un enlazador escindible por catepsina.

- 5 [00130] En algunas modalidades, el enlazador comprende un resto no escindible. En algunas modalidades, el enlazador no

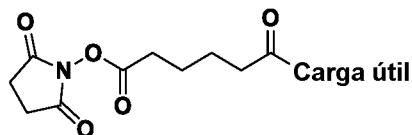


escindible se deriva de o un residuo del mismo. En algunas modalidades, el residuo de enlazador-

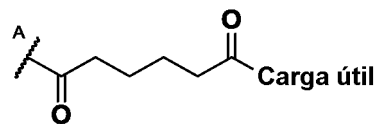


carga útil no escindible es o un

- 10 regioisómero del mismo. En algunas modalidades, el enlazador



no escindible se deriva de , o un residuo del mismo. En algunas modalidades, el residuo de



enlazador-carga útil no escindible es o un regioisómero del mismo. En una modalidad, el enlazador es

- 15 maleimida ciclohexano carboxilato o ácido 4-(N-maleimidometil)ciclohexanocarboxílico (MCC). En las

estructuras, $\overset{A}{\text{---S---}}$ indica un enlace a un agente de unión. En las estructuras, en algunos ejemplos, $\overset{A}{\text{---S---}}$ indica un residuo de química clic que resulta de la reacción de, por ejemplo, un agente de unión que tiene una funcionalidad azida o alquino y un enlazador-carga útil que tiene una funcionalidad alquino o azida complementaria. En las estructuras, en otros ejemplos, $\overset{A}{\text{---S---}}$ indica un sulfuro divalente que resulta de la reacción de, por ejemplo, una o más cisteínas de agentes de unión con uno o más enlazadores o enlazador-cargas útiles que tienen funcionalidad de maleimida a través de reacciones de adición de Michael. En las estructuras, en otros ejemplos, $\overset{A}{\text{---S---}}$ indica un enlace amida que resulta de la reacción de, por ejemplo, una o más lisinas del agente de unión con uno o más enlazadores o enlazador-cargas útiles que tienen funcionalidad carboxilo activada o no activada, tal como sería apreciado por un persona experta en la materia. En una modalidad, $\overset{A}{\text{---S---}}$ indica un enlace amida que resulta de la reacción de, por ejemplo, una o más lisinas del agente de unión con uno o más enlazadores o enlazador-cargas útiles que tienen funcionalidad carboxilo activada, tal como apreciaría un experto en la técnica.

[00131] En algunas modalidades, los enlazadores adecuados incluyen, entre otros, aquellos que están unidos químicamente a dos residuos de cisteína de un solo agente de unión, por ejemplo, un anticuerpo. Dichos enlazadores pueden servir para imitar los enlaces disulfuro del anticuerpo que se interrumpen como resultado del proceso de conjugación.

[00132] En algunas modalidades, el enlazador comprende uno o más aminoácidos. Los aminoácidos adecuados incluyen naturales, no naturales, estándar, no estándar, proteinogénicos, no proteinogénicos y L- o D- α -aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador comprende alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina o citrulina, un derivado de la misma, o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, polipéptidos y similares). En determinadas modalidades, una o más cadenas laterales de los aminoácidos están unidas a un grupo de cadena lateral, lo que se describe más adelante. En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos valina y citrulina (por ejemplo, divalente -Val-Cit- o divalente -VCit-). En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos alanina y alanina, o -AA-

divalente. En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos ácido glutámico y alanina, o -EA-. En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos ácido glutámico y glicina, o -EG-. En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos glicina y glicina, o -GG-. En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos glutamina, valina y citrulina, o -Q-V-Cit- o -QVCit-. En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos ácido glutámico, valina y citrulina, o -E-V-Cit- o -EVCit-. En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos -GGGGS- (SEQ ID NO: 306). En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos -GGGGG- (SEQ ID NO: 307). En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos -GGGGK- (SEQ ID NO: 308). En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos -GFGG- (SEQ ID NO: 309). En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos lisina, valina y citrulina, o -KVCit-. En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos -KVA-. En algunas modalidades, el enlazador es un péptido que comprende o

consiste en los aminoácidos -VA-. En cualquiera de las modalidades de este párrafo, ya lo largo de esta descripción, se usan las designaciones estándar de aminoácidos de tres letras o de una letra, tal como apreciaría un experto en la

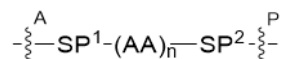
5 técnica. Las designaciones ejemplares de aminoácidos de una sola letra incluyen G para glicina, K para lisina, S para serina, V para valina, A para alanina y F para fenilalanina.

[00133] En algunas modalidades, el enlazador comprende un grupo de autoinmolación. El grupo de autoinmolación puede ser

10 cualquier grupo conocido por los expertos. En modalidades particulares, el grupo de autoinmolación es *p*-aminobencilo (PAB), o un derivado del mismo. Los derivados útiles incluyen *p*-aminobenciloxicarbonilo (PABC). Los expertos reconocerán que un grupo de autoinmolación es capaz de llevar a cabo una

15 reacción química que libera los átomos restantes de un enlazador de una carga útil.

[00134] En algunas modalidades, el enlazador es:



en donde:

20 **SP¹** es un separador;

SP² es un separador;

$\overset{\text{A}}{\underset{\text{A}}{\text{---}}}$ es uno o más enlaces al agente de unión;

$\overset{\text{P}}{\underset{\text{P}}{\text{---}}}$ es uno o más enlaces a la carga útil;

cada **AA** es un residuo de aminoácido; y

25 **n** es un número entero de cero a diez.

[00135] El separador **SP¹** es un resto que conecta el resto o resto **(AA)_n** con el agente de unión **(BA)** o con un resto de grupo reactivo que está unido a **BA**. Los separadores **SP¹** adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos que
 5 comprenden alquileno o poliéter, o ambos. Los extremos de los separadores, por ejemplo, la parte del separador unida al **BA** o a un **AA**, pueden ser fracciones derivadas de fracciones reactivas que se usan para acoplar el anticuerpo o un **AA** al separador durante la síntesis química del conjugado. En
 10 ciertas modalidades, **n** es 0, 1, 2, 3 o 4 (es decir, cuando **n** es 0, **AA** está ausente). En modalidades particulares, **n** es 2. En modalidades particulares, **n** es 3. En modalidades particulares, **n** es 4.

[00136] En algunas modalidades, el separador **SP¹** comprende
 15 un alquileno. En algunas modalidades, el separador **SP¹** comprende un alquileno de C₅₋₇. En algunas modalidades, el separador **SP¹** comprende un poliéter. En algunas modalidades, el separador **SP¹** comprende un polímero de óxido de etileno tal como polietilenglicol (PEG). Las unidades poliméricas de
 20 polietilenglicol se representan comúnmente como $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p-$, en donde **p** podría ser un número entero de uno a cien. Por ejemplo, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2-$ también se puede representar como $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ o PEG₂. En ciertas modalidades, el polietilenglicol es PEG₁. En ciertas modalidades, el
 25 polietilenglicol es PEG₂. En ciertas modalidades, el

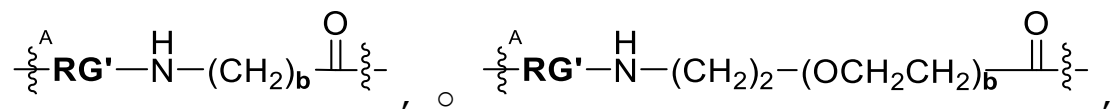
	polietilenglicol	es	PEG ₃ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₄ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₅ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₆ .	En	ciertas	modalidades,	el
5	polietilenglicol	es	PEG ₇ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₈ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₉ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₁₀ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₁₁ .	En	ciertas	modalidades,	el
10	polietilenglicol	es	PEG ₁₂ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₁₃ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₁₄ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₁₅ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₁₆ .	En	ciertas	modalidades,	el
15	polietilenglicol	es	PEG ₁₇ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₁₈ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₁₉ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₂₀ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₂₁ .	En	ciertas	modalidades,	el
20	polietilenglicol	es	PEG ₂₂ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₂₃ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₂₄ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₂₅ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₂₆ .	En	ciertas	modalidades,	el
25	polietilenglicol	es	PEG ₂₇ .	En	ciertas	modalidades,	el

	polietilenglicol	es	PEG ₂₈ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₂₉ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₃₀ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₃₁ .	En	ciertas	modalidades,	el
5	polietilenglicol	es	PEG ₃₂ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₃₃ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₃₄ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₃₅ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₃₆ .	En	ciertas	modalidades,	el
10	polietilenglicol	es	PEG ₃₇ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₃₈ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₃₉ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₄₀ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₄₁ .	En	ciertas	modalidades,	el
15	polietilenglicol	es	PEG ₄₂ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₄₃ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₄₄ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₄₅ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₄₆ .	En	ciertas	modalidades,	el
20	polietilenglicol	es	PEG ₄₇ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₄₈ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₄₉ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₅₀ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₅₁ .	En	ciertas	modalidades,	el
25	polietilenglicol	es	PEG ₅₂ .	En	ciertas	modalidades,	el

	polietilenglicol	es	PEG ₅₃ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₅₄ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₅₅ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₅₆ .	En	ciertas	modalidades,	el
5	polietilenglicol	es	PEG ₅₇ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₅₈ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₅₉ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₆₀ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₆₁ .	En	ciertas	modalidades,	el
10	polietilenglicol	es	PEG ₆₂ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₆₃ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₆₄ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₆₅ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₆₆ .	En	ciertas	modalidades,	el
15	polietilenglicol	es	PEG ₆₇ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₆₈ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₆₉ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₇₀ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₇₁ .	En	ciertas	modalidades,	el
20	polietilenglicol	es	PEG ₇₂ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₇₃ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₇₄ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₇₅ .	En	ciertas	modalidades,	el
	polietilenglicol	es	PEG ₇₆ .	En	ciertas	modalidades,	el
25	polietilenglicol	es	PEG ₇₇ .	En	ciertas	modalidades,	el

- polietilenglicol es PEG₇₈. En ciertas modalidades, el
 polietilenglicol es PEG₇₉. En ciertas modalidades, el
 polietilenglicol es PEG₈₀. En ciertas modalidades, el
 polietilenglicol es PEG₈₁. En ciertas modalidades, el
 5 polietilenglicol es PEG₈₂. En ciertas modalidades, el
 polietilenglicol es PEG₈₃. En ciertas modalidades, el
 polietilenglicol es PEG₈₄. En ciertas modalidades, el
 polietilenglicol es PEG₈₅. En ciertas modalidades, el
 polietilenglicol es PEG₈₆. En ciertas modalidades, el
 10 polietilenglicol es PEG₈₇. En ciertas modalidades, el
 polietilenglicol es PEG₈₈. En ciertas modalidades, el
 polietilenglicol es PEG₈₉. En ciertas modalidades, el
 polietilenglicol es PEG₉₀. En ciertas modalidades, el
 polietilenglicol es PEG₉₁. En ciertas modalidades, el
 15 polietilenglicol es PEG₉₂.

[00137] En algunas modalidades, el separador **SP**¹ es:



en donde:

- RG'** es un resto de grupo reactivo que sigue a la
 20 reacción de un grupo reactivo **RG** con un agente de unión;

$\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{---} \end{array}$ es un enlace al agente de unión;

$\begin{array}{c} \text{---} \end{array}$ es un enlace a **(AA)_n**;

n es un número entero de cero a diez; y

b es, independientemente, un número entero de 1 a 92.

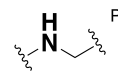
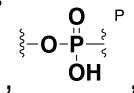
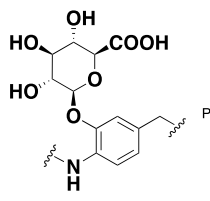
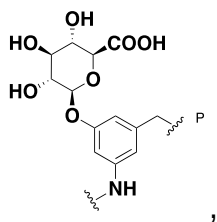
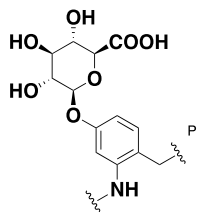
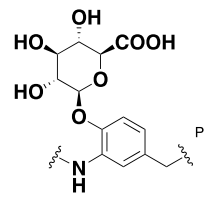
[00138] El grupo reactivo **RG** puede ser cualquier grupo reactivo conocido por los expertos en la técnica por ser capaz de formar uno o más enlaces con el agente de unión. El grupo reactivo **RG** es un resto que comprende una porción en su estructura que es capaz de reaccionar con el agente de unión (por ejemplo, reaccionar con un anticuerpo en sus residuos de cisteína o lisina, o en un resto azida, por ejemplo, un anticuerpo funcionalizado con PEG-N₃ en uno o más residuos de glutamina, o en un resto amino, por ejemplo, un anticuerpo funcionalizado con PEG-NH₂ en uno o más residuos de glutamina) para formar conjugados anticuerpo-fármaco descritos en este documento. Después de la conjugación con el agente de unión, el grupo reactivo se convierte en el residuo del grupo reactivo (**RG'**). Los grupos reactivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que comprenden porciones de haloacetilo, isotiocianato, succinimida, N-hidroxisuccinimida o maleimida que son capaces de reaccionar con el agente de unión.

[00139] El separador **SP²**, cuando está presente, es un resto que conecta el resto (**AA**)_n a la carga útil. Los separadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, los descritos anteriormente como separadores **SP¹**. Los separadores **SP²** adecuados adicionales incluyen, pero no se limitan a,

aquellos que comprenden alquileno o poliéter, o ambos. Los extremos de los separadores **SP²**, por ejemplo, la porción del separador unida directamente a la carga útil o un **AA**, pueden ser fracciones derivadas de fracciones reactivas que se usan para acoplar la carga útil o **AA** al separador **SP²** durante la síntesis química del conjugado. En algunos ejemplos, los extremos de los separadores **SP²**, por ejemplo, la porción del separador **SP²** unida directamente a la carga útil o un **AA**, pueden ser residuos de fracciones reactivas que se usan para acoplar la carga útil o un **AA** al separador durante la síntesis química del conjugado.

[00140] En algunas modalidades, el separador **SP²**, cuando está presente, se selecciona del grupo que consiste en -NH-(p-C₆H₄)-CH₂-, -NH-(p-C₆H₄)-CH₂OC(O)-, un amino ácido, un

dipéptido, un tripéptido, un oligopéptido,



y cualquier

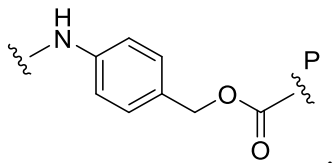
combinación de los mismos. En ciertas modalidades, cada 

es un enlace a la carga útil, y cada  es un enlace a (**AA**)_n

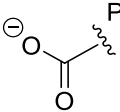
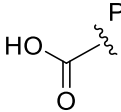
o está ausente si $n = 0$.

[00141] En las fórmulas anteriores, cada $(AA)_n$ es un aminoácido u, opcionalmente, un residuo de *p*-aminobenciloxycarbonilo (PABC). n puede ser 0; si es así, 5 $(AA)_n$ está ausente. Si está presente PABC, preferiblemente solo está presente un PABC. Preferiblemente, el resto de PABC, si está presente, está unido a un **AA** terminal en el grupo $(AA)_n$, cerca de la carga útil. Los aminoácidos adecuados para cada **AA** incluyen aminoácidos naturales, no 10 naturales, estándar, no estándar, proteinogénicos, no proteinogénicos y L- o D- α . En algunas modalidades, el **AA** comprende alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, 15 ácido glutámico, lisina, arginina, histidina o citrulina, un derivado del mismo, o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, dipéptidos, tripéptidos y oligopéptidos, y similares). En ciertas modalidades, una o más cadenas laterales de los aminoácidos están unidas a un grupo de 20 cadena lateral, que se describe a continuación. En algunas modalidades, n es dos. En algunas modalidades, la $(AA)_n$ es valina-citrulina. En algunas modalidades, $(AA)_n$ es citrulina-valina. En algunas modalidades, $(AA)_n$ es valina-alanina. En algunas modalidades, $(AA)_n$ es alanina-valina. En algunas 25 modalidades, $(AA)_n$ es valina-glicina. En algunas modalidades,

(AA)_n es glicina-valina. En algunas modalidades, el (AA)_n es valina-citrulina-PABC. En algunas modalidades, (AA)_n es citrulina-valina-PABC. En algunas modalidades, **n** es tres. En algunas modalidades, (AA)_n es glutamato-valina-citrulina. En algunas modalidades, (AA)_n es glutamina-valina-citrulina. En algunas modalidades, (AA)_n es lisina-valina-alanina. En algunas modalidades, (AA)_n es lisina-valina-citrulina. En algunas modalidades, **n** es cuatro. En algunas modalidades, (AA)_n es glutamato-valina-citrulina-PAB. En algunas modalidades, (AA)_n es glutamina-valina-citrulina-PABC. Los expertos reconocerán PABC como un residuo de *p*-aminobenciloxycarbonilo con la siguiente estructura:

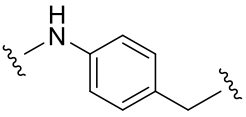


Se ha demostrado que el residuo de PABC facilita la escisión de ciertos enlazadores *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, en determinadas modalidades, tras la escisión de PABC, el resto

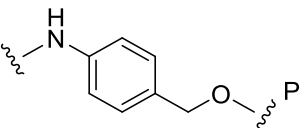
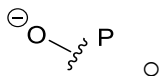
carboxilato o ácido carboxílico (es decir,  o ,

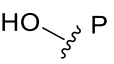
respectivamente) permanece intacto con el resto del compuesto antiviral o la carga útil. En ciertas modalidades, cada  es un enlace al resto del compuesto antiviral (por ejemplo,

la carga útil). Los expertos reconocerán al PAB como un residuo divalente de *p*-aminobencilo (es decir, $-\text{NH}-(p\text{-C}_6\text{H}_4)-$

CH_2- o ). En ciertas modalidades, se ha

demonstrado que el resto de PAB facilita la escisión de
5 ciertos enlazadores *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, en determinadas modalidades, luego de la escisión de

 el alcóxido o hidroxilo (es decir, ) o

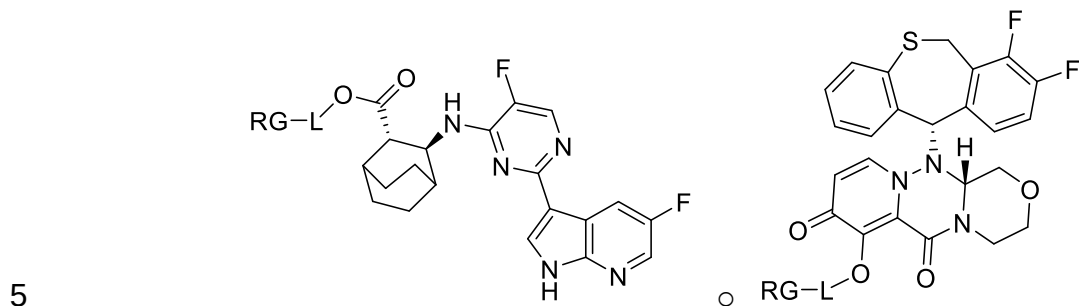
, respectivamente) permanece intacto con el resto del compuesto antiviral (por ejemplo, la carga útil). En ciertas

10 modalidades, cada  es un enlace al resto del compuesto antiviral o carga útil.

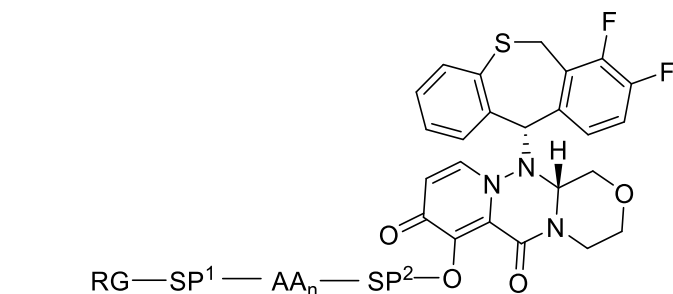
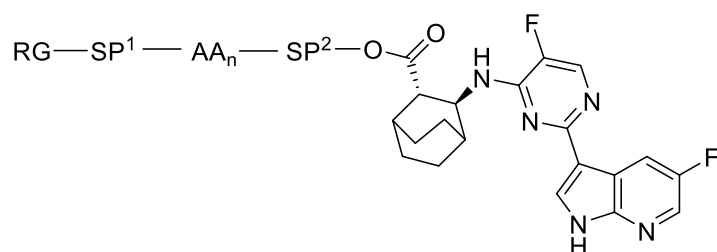
Enlazador-cargas útiles

[00142] En ciertas modalidades, los enlazador-cargas útiles
15 incluyen cualquier compuesto específico o carga útil abarcado por cualquiera o más de las Fórmulas I y II anteriores, unido a un enlazador, en donde el (los) enlazador (es) descrito (s) en el presente documento incluye un resto que es reactivo con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo
20 descrito en el presente documento. En modalidades

particulares, el enlazador está unido al carboxilo o hidroxilo en cualquiera o más de las Fórmulas I y II anteriores. En una modalidad, el enlazador-carga útil tiene la siguiente estructura

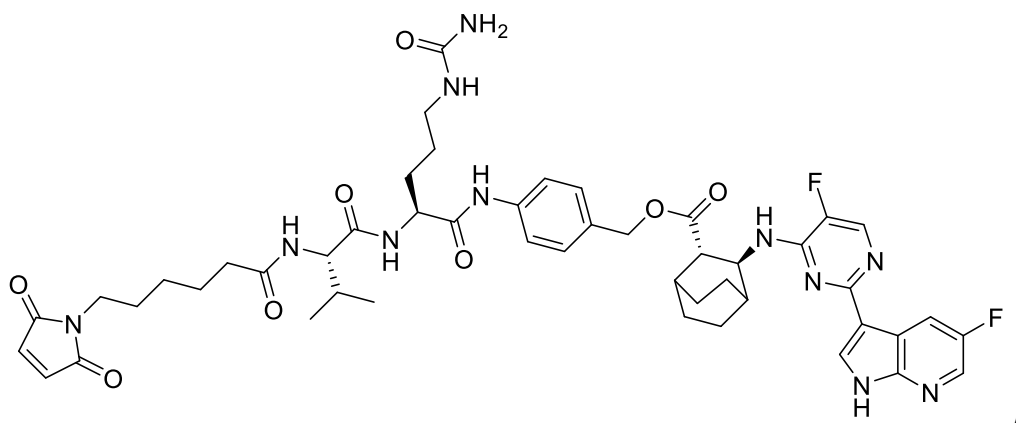


o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, en donde **L** es un enlazador, tal como se describe en cualquiera de las modalidades descritas en el presente documento; y **RG** es un resto reactivo, tal como se describe en cualquiera de las modalidades descritas en el presente documento. En una modalidad, el enlazador-carga útil es:

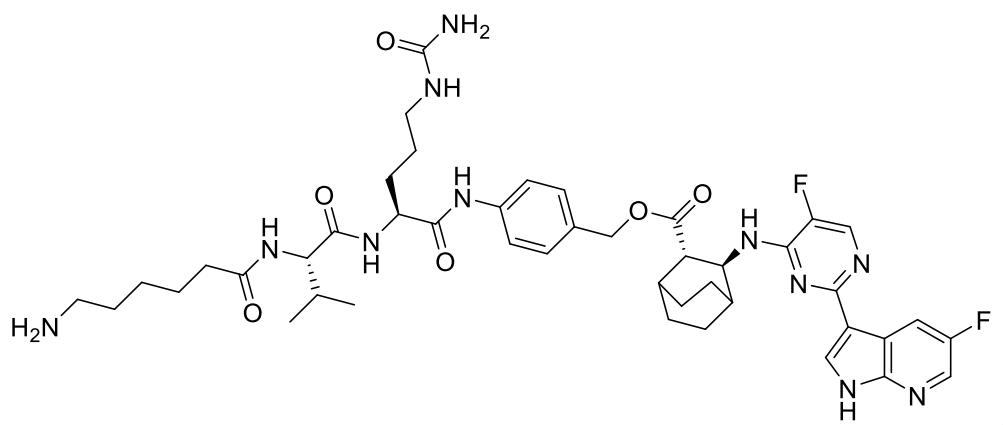


o una de sus sales

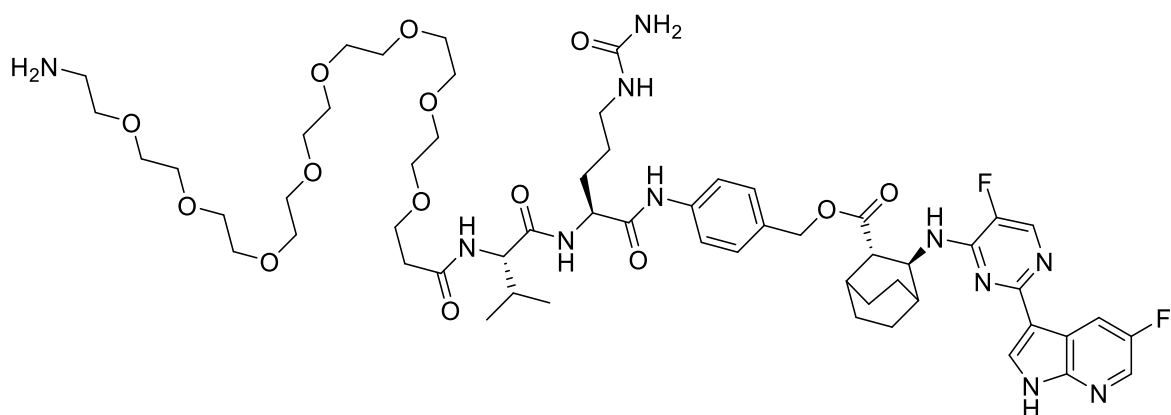
- farmacéuticamente aceptables, en donde **SP¹** y **SP²**, cuando están presentes, son grupos separadores como se describe en cualquiera de las modalidades descritas en el presente documento; **RG** es un resto reactivo con un anticuerpo o un
- 5 fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en cualquiera de las modalidades descritas en el presente documento; cada **AA** es un aminoácido como se describe en cualquiera de las modalidades descritas en el presente documento; y **n** es un número entero de uno a diez.
- 10 [00143] En ciertas modalidades, en el presente documento se proporcionan compuestos (es decir, enlazador-cargas útiles) seleccionados del grupo que consiste en:



109



y



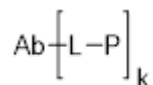
5

*Conjugados/Conjugados de fármaco de anticuerpo
(ADCs)*

[00144] En el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales anti-influenza-HA humanos conjugados con un resto terapéutico, tal como un toxoide o un fármaco antiviral, para tratar la infección por el virus de la influenza (es decir, un ADC). El anticuerpo puede unirse al agente terapéutico en cualquier ubicación a lo largo del anticuerpo siempre que el anticuerpo pueda unirse a su

objetivo. En una modalidad, el agente terapéutico puede ser un segundo anticuerpo diferente contra la influenza-HA o ADC del mismo. En determinadas modalidades, el anticuerpo puede conjugarse con un agente específico para una célula infectada por un virus. El tipo de fracción terapéutica que puede conjugarse con el anticuerpo anti-influenza-HA y tendrá en cuenta la afección a tratar y el efecto terapéutico deseado a lograr. En determinadas modalidades, en la presente se proporcionan anticuerpos, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, en los que el anticuerpo se conjuga con uno o más compuestos de las Fórmulas I y/o II como se describe en la presente. En una modalidad, el anticuerpo anti-influenza o el fragmento de unión a antígeno del mismo se conjuga con una carga útil a través de un enlazador, cada uno como se describe en cualquiera de sus respectivas modalidades descritas en el presente documento.

[00145] En una modalidad, el conjugado de anticuerpo-fármaco tiene la siguiente estructura



en donde **Ab** es un anticuerpo anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo; **L** es un enlazador; y **P** es un compuesto antiviral o carga útil. En una modalidad, **Ab** es un anticuerpo anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y **P** es un inhibidor de la influenza. En una

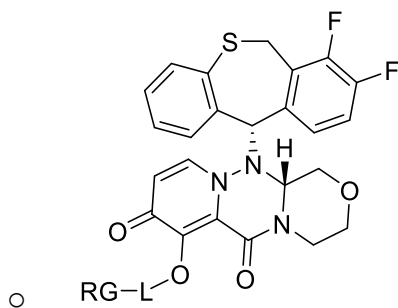
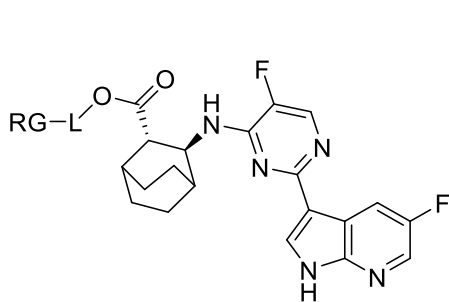
modalidad, **Ab** es un anticuerpo anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y **P** es un inhibidor de la polimerasa. En una modalidad, **Ab** es un anticuerpo anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y **P** es VX-787, un derivado del mismo o un residuo del mismo. En una modalidad, **Ab** es un anticuerpo anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y **P** es baloxavir, un derivado del mismo o un residuo del mismo. En una modalidad, **Ab** es un anticuerpo anti-hemaglutinina o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y **P** es un compuesto antiviral. En una modalidad, **Ab** es un anticuerpo anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y **P** es un compuesto antiviral. En una modalidad, **Ab** es un anticuerpo anti-hemaglutinina o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y **P** es un inhibidor de la influenza. En una modalidad, **Ab** es un anticuerpo anti-hemaglutinina o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y **P** es un inhibidor de la polimerasa. En cualquier modalidad en este párrafo, **Ab** es un anticuerpo anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un anticuerpo anti-hemaglutinina o un fragmento de unión a antígeno del mismo en donde el anticuerpo está conjugado con un compuesto de la Fórmula I, tal como se describió anteriormente. En cualquier modalidad en este párrafo, **Ab** es

un anticuerpo anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un anticuerpo anti-hemaglutinina o un fragmento de unión a antígeno del mismo en donde el anticuerpo está conjugado con un compuesto de la Fórmula II,

5 tal como se describe anteriormente. En una modalidad, **Ab** es un anticuerpo anti-hemaglutinina o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y **P** es VX-787, un derivado del mismo o un residuo del mismo. En una modalidad, **Ab** es un anticuerpo anti-hemaglutinina o un fragmento de unión a antígeno del

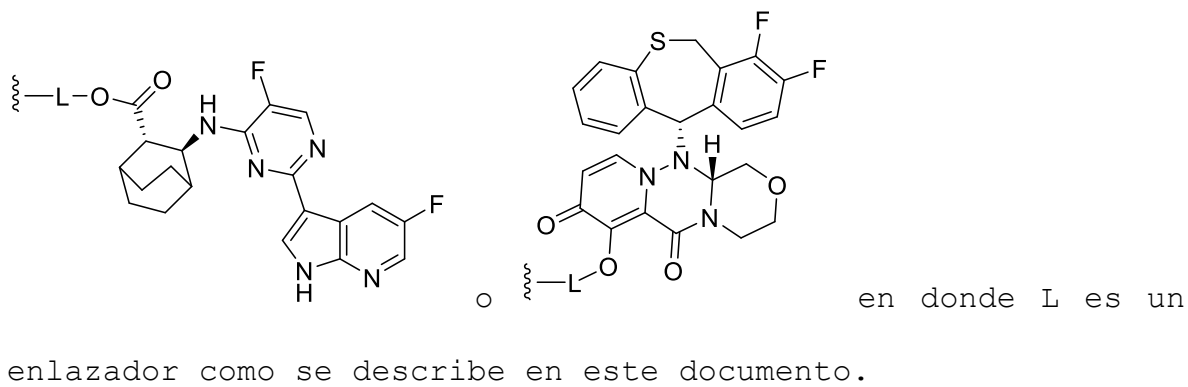
10 mismo; y **P** es baloxavir, un derivado del mismo o un residuo del mismo. En cualquiera de las modalidades de este párrafo, **k** es un número entero de uno a treinta. En ciertas modalidades, en el presente documento se proporcionan ADCs en los que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del

15 mismo está conjugado con un compuesto de



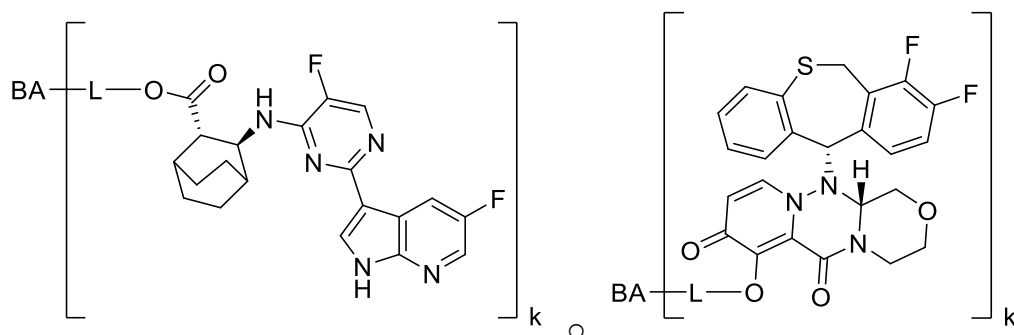
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde **L** es un enlazador descrito en el presente documento; y **RG** es un resto reactivo descrito en el presente documento. En ciertas

modalidades, en el presente documento se proporcionan ADCs en los que el compuesto conjugado se selecciona de



enlazador como se describe en este documento.

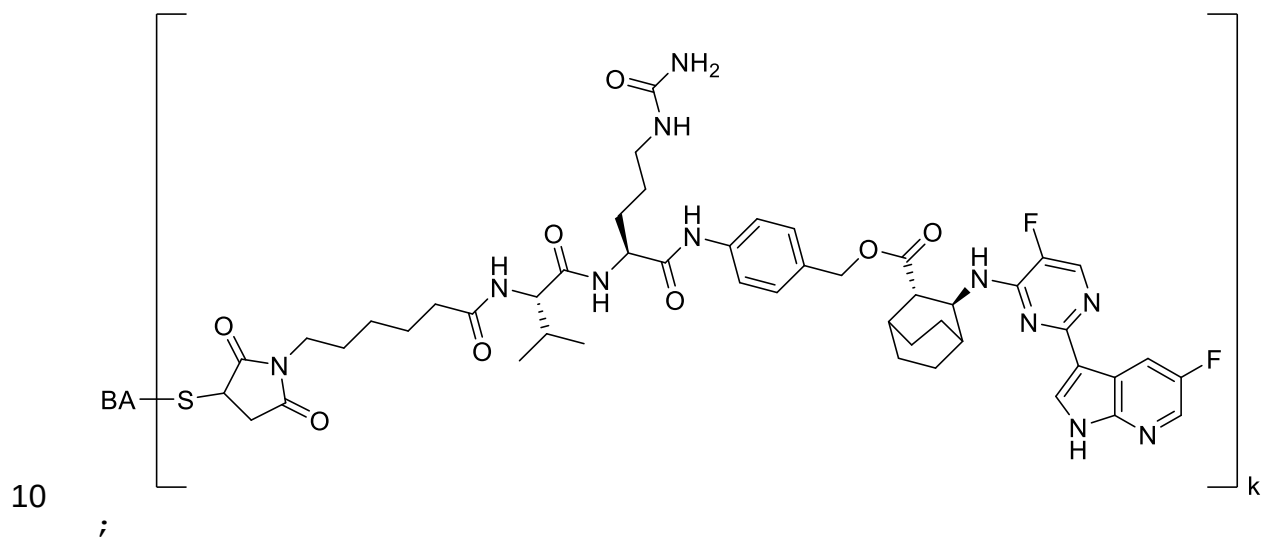
- 5 [00146] En ciertas modalidades, en este documento se proporcionan compuestos ADC que tienen la siguiente estructura:



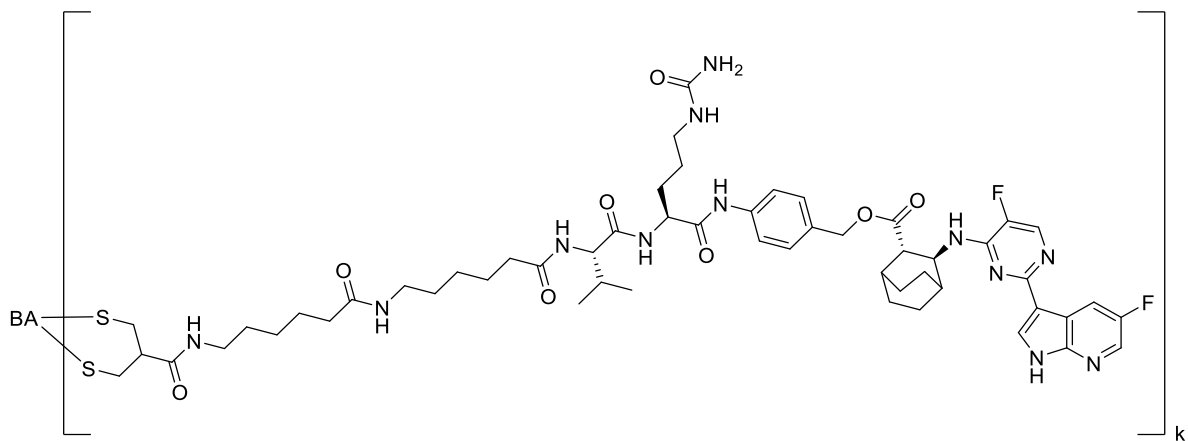
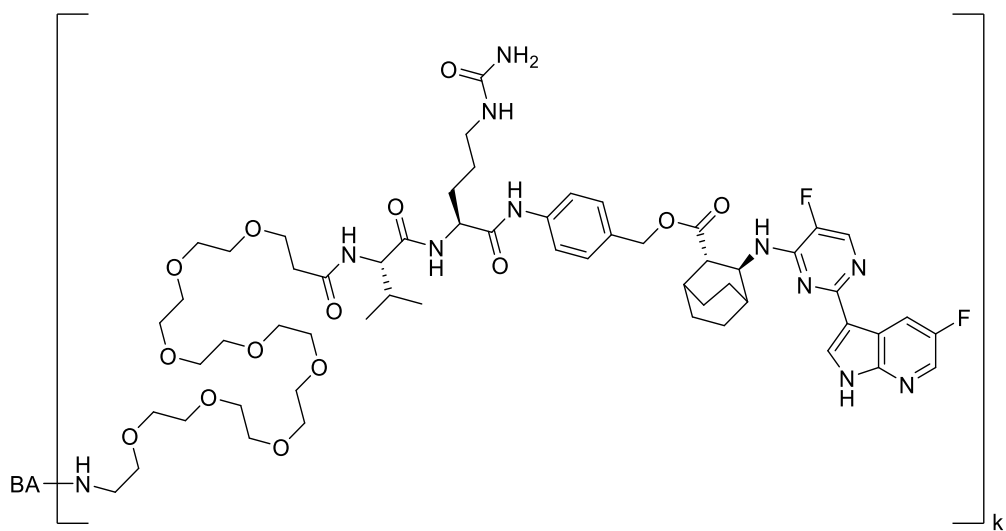
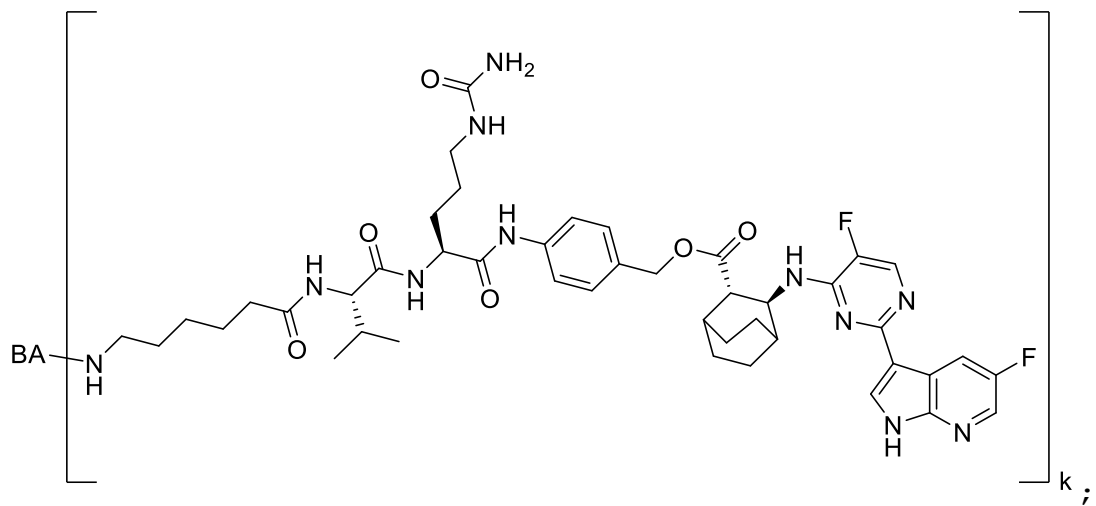
- 10 presente documento, y **k** es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En ciertas modalidades, **k** es un rango de 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 o 1-4. En ciertas modalidades, los compuestos conjugados con -L-BA como se indicó anteriormente incluyen uno o más compuestos de las Fórmulas I y/o II, tal como se describió
- 15 anteriormente, en donde BA es un agente de unión; L es un

enlazador; y **k** es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En ciertas modalidades, en donde los compuestos conjugados a **-L-BA** como arriba incluyen uno o más compuestos de las Fórmulas I y/o II, tal como se describe arriba, en donde **BA** es un agente de
 5 unión y **L** es un enlazador, **k** es un rango de 1-2, 1-3, 2- 3, 2-4, 3-4 o 1-4.

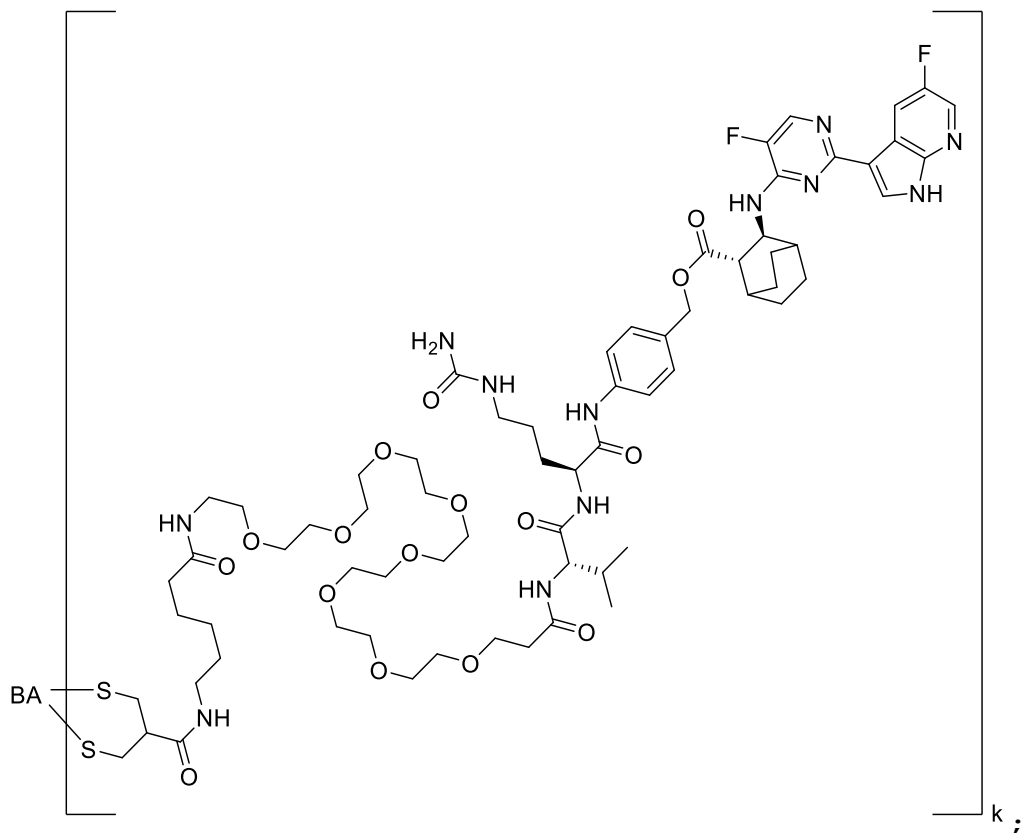
[00147] En una modalidad, en el presente documento se proporcionan compuestos ADC seleccionados del grupo que consiste en



115



5 ; y



en donde **BA** es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y **k** es un número entero de uno a treinta. En ciertas modalidades, **k** es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

- 5 En ciertas modalidades, **k** es un rango de 1-2, 1-3, 1-4, 1- 5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 6-7, 6-8, 6-9, 6-10, 7-8, 7-9, 7-10, 8-9, 8-10 o 9-10. En cualquiera de las
- 10 modalidades de este párrafo, se contempla que **BA** incluya uno o más residuos de cisteína, lisina y/o glutamina para la conjugación a una carga útil y/o enlazador-carga útil, cuando **k** sea mayor que uno. Por ejemplo, las delineaciones de ADC

anteriores contemplan una relación fármaco:anticuerpo (DAR) de uno o más donde uno o más residuos de cisteína, lisina y/o glutamina de **BA** acomodan una carga útil y/o enlazador-carga útil (por ejemplo, cuando **k** es ≥ 1). Los enlaces de **BA** a -S- y/o de **BA** a -NH- indican enlaces del agente de unión (**BA**) a un residuo de cisteína o glutamina transglutaminada de **BA**, respectivamente. Y, los enlaces de **BA-S-** y/o de **BA-NH-** al carbono indican enlace con el (los) enlazador (es) como se muestra o se describe en otra parte del presente documento.

Por lo tanto, el azufre de un residuo de cisteína de **BA**, y/o el nitrógeno de un residuo de glutamina transglutaminada de **BA**, están entre paréntesis como se muestra para mostrar que **BA** se puede conjugar con más de una carga útil y/o enlazador-carga útil (por ejemplo, **BA** que tenga DAR ≥ 1). En una modalidad, **BA** es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento.

[00148] En ciertas modalidades de ADC descritas en el presente documento, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado por transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos un residuo de glutamina usado para la conjugación. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos dos

residuos de glutamina usados para la conjugación. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos tres residuos de glutamina usados para la conjugación. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos cuatro residuos de glutamina usados para la conjugación. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos un residuo de glutamina disponible para la conjugación. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos dos residuos de glutamina disponibles para la conjugación. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos tres residuos de glutamina disponibles para la conjugación. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende al menos cuatro residuos de glutamina disponibles para la conjugación. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la conjugación es en dos residuos Q295; y **k** es 2. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un

anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la conjugación es en dos residuos Q295 en el sistema de numeración EU; y **k** es 2. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada de anticuerpo, en donde la conjugación está en el extremo C-terminal de la cadena pesada; y **k** es 2. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada de anticuerpo, en donde la conjugación se lleva a cabo a través de una glutamina. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada de anticuerpo, en donde la conjugación se lleva a cabo a través de una glutamina; y **k** es 2. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada de anticuerpo, en donde la conjugación se lleva a cabo a través de la glutamina en una secuencia LLQGA (SEQ ID NO: 297) en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada de anticuerpo, en donde la conjugación se lleva a cabo a través de la glutamina en una

secuencia LLQGA (SEQ ID NO: 297) en la cadena pesada del extremo C-terminal del anticuerpo; y **k** es 2. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la conjugación es en dos residuos Q295 y dos residuos N297Q; y **k** es 4. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la conjugación es en dos residuos Q295 en el sistema de numeración EU y dos residuos N297Q; y **k** es 4. En una modalidad, **Ab** o **BA** es mAb11729, tal como se describe en el presente documento.

[00149] En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la conjugación es en dos residuos Q295; y **DAR** es a) aproximadamente 2.0; b) es mayor que 0 hasta aproximadamente 12.0; c) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 8.0; d) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 6.0; e) es de aproximadamente 1.0 a aproximadamente 4.0; f) es aproximadamente 1.0 o aproximadamente 2.0; g) es de aproximadamente 1.0; o h) es aproximadamente 2.0. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la conjugación es en dos residuos Q295 en el sistema de numeración EU; y **DAR** es a) aproximadamente 2.0; b) es mayor que 0 hasta aproximadamente

12.0; c) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 8.0; d) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 6.0; e) es de aproximadamente 1.0 a aproximadamente 4.0; f) es aproximadamente 1.0 o aproximadamente 2.0; g) es de aproximadamente 1.0; o h) es aproximadamente 2.0. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada de anticuerpo, en donde la conjugación es en el extremo C-terminal de la cadena pesada; y **DAR** es a) aproximadamente 2.0; b) es mayor que 0 hasta aproximadamente 12.0; c) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 8.0; d) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 6.0; e) es de aproximadamente 1.0 a aproximadamente 4.0; f) es aproximadamente 1.0 o aproximadamente 2.0; g) es de aproximadamente 1.0; o h) es aproximadamente 2.0. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada de anticuerpo, en donde la conjugación se lleva a cabo a través de una glutamina. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada de anticuerpo, en donde la conjugación se lleva a cabo a través de una glutamina; y **DAR** es a) aproximadamente 2.0; b) es mayor que 0 hasta aproximadamente 12.0; c) es de

aproximadamente 0.5 a aproximadamente 8.0; d) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 6.0; e) es de aproximadamente 1.0 a aproximadamente 4.0; f) es aproximadamente 1.0 o aproximadamente 2.0; g) es de

5 aproximadamente 1.0; o h) es aproximadamente 2.0. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada de anticuerpo, en donde la conjugación se lleva a cabo a través de la glutamina en una

10 secuencia LLQGA (SEQ ID NO: 297) en el extremo C-terminal de la cadena pesada de anticuerpo. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada de anticuerpo, en donde la conjugación se lleva a cabo a

15 través de la glutamina en una secuencia LLQGA (SEQ ID NO: 297) en el extremo C-terminal de la cadena pesada de anticuerpo; y **DAR** es a) aproximadamente 2.0; b) es mayor que 0 hasta aproximadamente 12.0; c) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 8.0; d) es de aproximadamente 0.5 a

20 aproximadamente 6.0; e) es de aproximadamente 1.0 a aproximadamente 4.0; f) es aproximadamente 1.0 o aproximadamente 2.0; g) es de aproximadamente 1.0; o h) es aproximadamente 2.0. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de

25 unión a antígeno del mismo, en donde la conjugación es en dos

residuos Q295 y dos residuos N297Q; y **DAR** es a) aproximadamente 2.0; b) es mayor que 0 hasta aproximadamente 12.0; c) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 8.0; d) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 6.0; e) es de

5 aproximadamente 1.0 a aproximadamente 4.0; f) es aproximadamente 1.0 o aproximadamente 2.0 o aproximadamente 3.0 o aproximadamente 4.0; g) es de aproximadamente 1.0; h) es de aproximadamente 2.0; i) es de aproximadamente 3.0; o j) es de aproximadamente 4.0. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un

10 anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la conjugación es en dos residuos Q295 en el sistema de numeración EU y dos residuos N297Q; y **DAR** es a) aproximadamente 2.0; b) es mayor que 0 hasta aproximadamente 12.0; c) es de aproximadamente 0.5 a

15 aproximadamente 8.0; d) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 6.0; e) es de aproximadamente 1.0 a aproximadamente 4.0; f) es aproximadamente 1.0 o aproximadamente 2.0; g) es de aproximadamente 1.0; o h) es aproximadamente 2.0. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un

20 anticuerpo modificado con transglutaminasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la conjugación es en dos residuos Q295 y dos residuos N297Q; y **DAR** es a) aproximadamente 2.0; b) es mayor que 0 hasta aproximadamente 12.0; c) es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 8.0; d)

25 es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 6.0; e) es de

aproximadamente 1.0 a aproximadamente 4.0; f) es aproximadamente 1.0 o aproximadamente 2.0 o aproximadamente 3.0 o aproximadamente 4.0; g) es de aproximadamente 1.0; h) es de aproximadamente 2.0; i) es de aproximadamente 3.0; o j) es de aproximadamente 4.0. En una modalidad, **Ab** o **BA** es mAb11729, tal como se describe en este documento.

[00150] En determinadas modalidades de ADC descritas en el presente documento, **Ab** o **BA** es un anticuerpo anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo anti-influenza A o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo anti-influenza del Grupo 1A o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo anti-influenza H₁ o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo anti-influenza A del Grupo 2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo anti-influenza H₃ o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una modalidad, **Ab** o **BA** es un anticuerpo anti-influenza B o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una modalidad, un ADC incluye un anticuerpo contra la influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con una carga útil a través de un enlazador, en donde el conjugado de anticuerpo y fármaco se une y/o inhibe la proteína básica de polimerasa 2 (PB2)

(VX-787), proteína ácida de polimerasa (PA) (baloxavir y/o baloxavir marboxilo), y/o proteína básica de polimerasa 1 (PB1). En una modalidad, un ADC incluye un anticuerpo contra la influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con una carga útil a través de un enlazador, en donde el conjugado de anticuerpo y fármaco se une y/o inhibe la proteína básica de polimerasa 2 (PB2) (VX-787) con una afinidad de al menos 4.0×10^{-9} M, al menos 3.5×10^{-9} M o al menos 3.0×10^{-9} M medida por ELISA. En una modalidad, un ADC incluye un anticuerpo anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con una carga útil a través de un enlazador, en donde el conjugado de anticuerpo-fármaco se une y/o inhibe la proteína básica de polimerasa 1 (PB1) con una afinidad de al menos al menos 4.0×10^{-9} M, al menos 3.5×10^{-9} M, o al menos 3.0×10^{-9} M medido por ELISA. En una modalidad, un ADC incluye un anticuerpo contra la influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con una carga útil a través de un enlazador, en donde el conjugado de anticuerpo y fármaco se une y/o inhibe la proteína básica de polimerasa 2 (PB2) (VX-787) con una IC_{50} de al menos 2.5×10^{-9} M, al menos 2.0×10^{-9} M o al menos 1.5×10^{-9} M de acuerdo con lo medido por el análisis ImmunoSpot®. En una modalidad, un ADC incluye un anticuerpo anti-influenza o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con una carga útil a través de un enlazador, en donde el conjugado de anticuerpo-fármaco se

une y/o inhibe la proteína básica de polimerasa 1 (PB1) con una IC_{50} de al menos 2.5×10^{-9} M, al menos 2.0×10^{-9} M, o al menos 1.5×10^{-9} M de acuerdo con lo medido por análisis ImmunoSpot®.

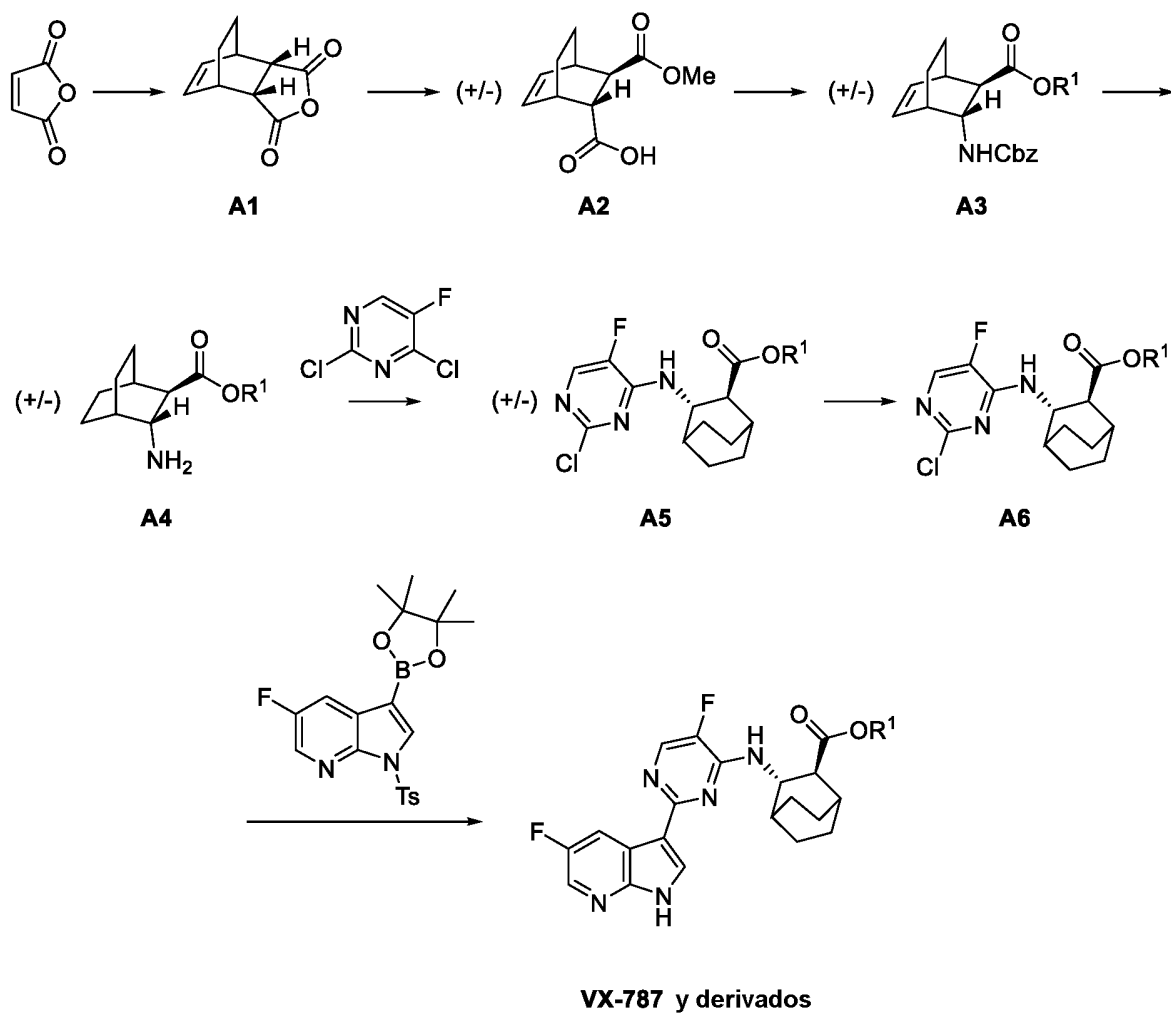
5

Métodos de preparación de compuestos o cargas útiles y enlazador-cargas útiles

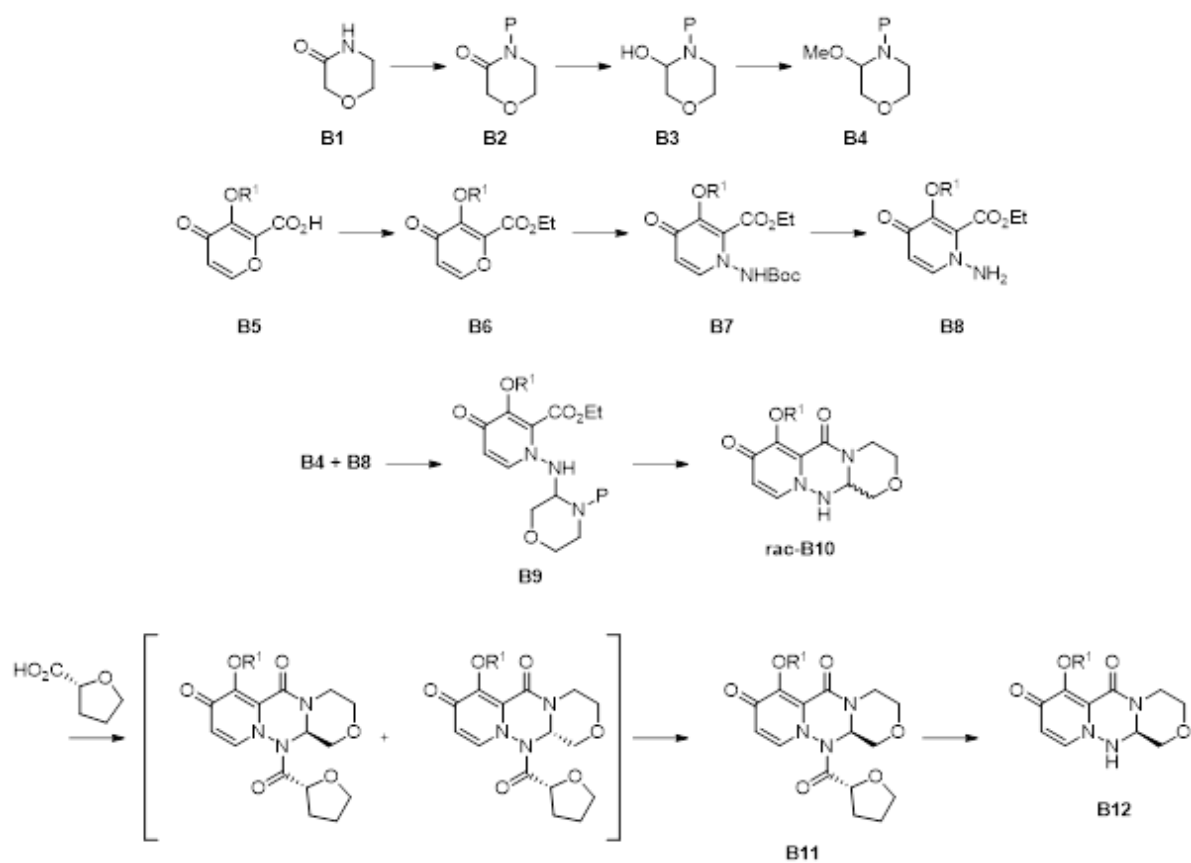
[00151] Los compuestos proporcionados en el presente documento pueden prepararse, aislarse u obtenerse mediante cualquier método evidente para los expertos en la técnica. Los métodos ejemplares de preparación se describen en detalle en los Ejemplos a continuación. En ciertas modalidades, los compuestos proporcionados en el presente documento están disponibles comercialmente o generalmente se pueden preparar de acuerdo con los Esquemas A-C:

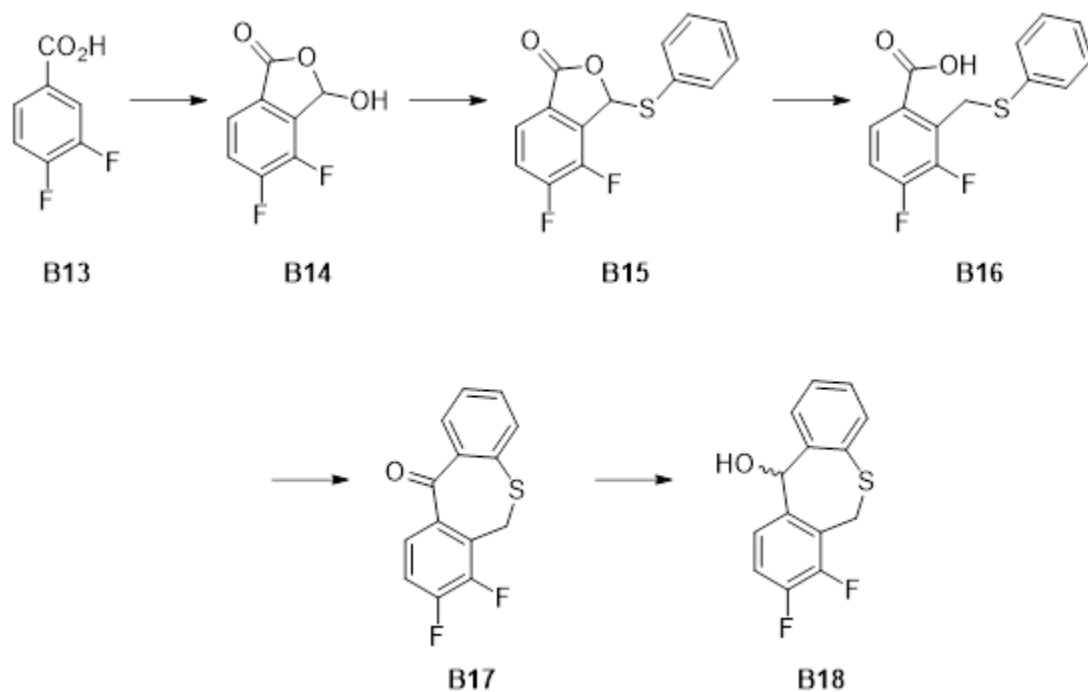
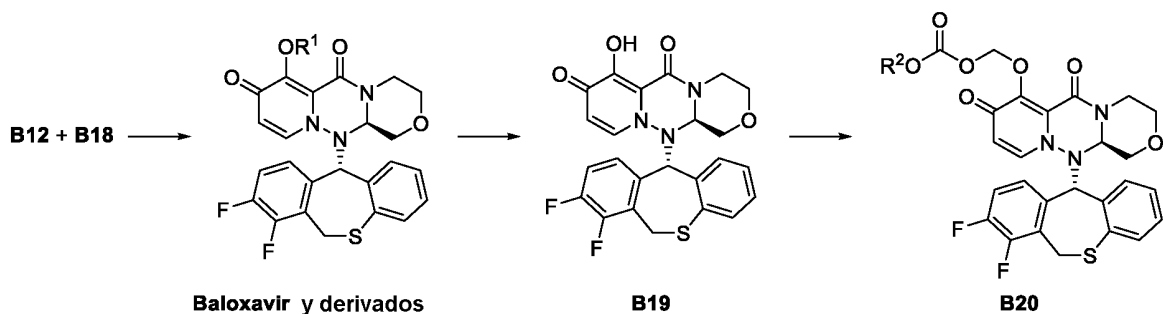
10
15

Esquema A. Esquema de preparación ejemplar



Esquema B1. Esquema de preparación ejemplar



Esquema B2. Esquema de preparación ejemplar**Esquema B3. Esquema de preparación ejemplar**

[00152] En el Esquema de preparación ejemplar A anterior
 5 (véase, *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 6668), **R¹** se describe en el contexto de la Fórmula I. En el Esquema A, después de la cicloadición de Diels-Alder con anhídrido maleico y 1,3-ciclohexadieno, endo-**A1** se puede agitar en condiciones básicas para proporcionar trans-**A2** epimerizado. El

reordenamiento de Curtius y el atrapamiento con alcohol bencílico proporciona **A3**. La hidrogenación proporciona **A4**. El tratamiento con 2,4-dicloropirimidinas y la separación quiral proporciona **A6** a través del intermedio **A5**. El acoplamiento de Suzuki con ésteres de boronato de azaindol sustituidos, seguido de desprotección, produce compuestos de la Fórmula I, que incluyen VX-787 y derivados del mismo.

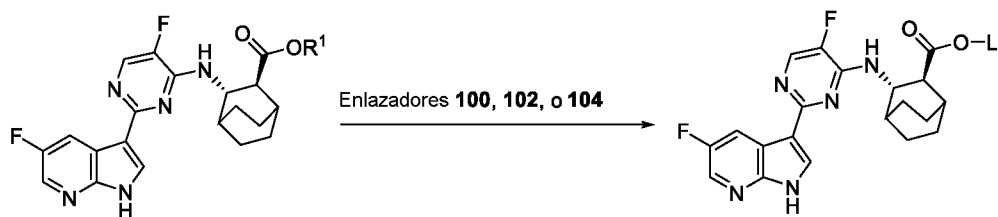
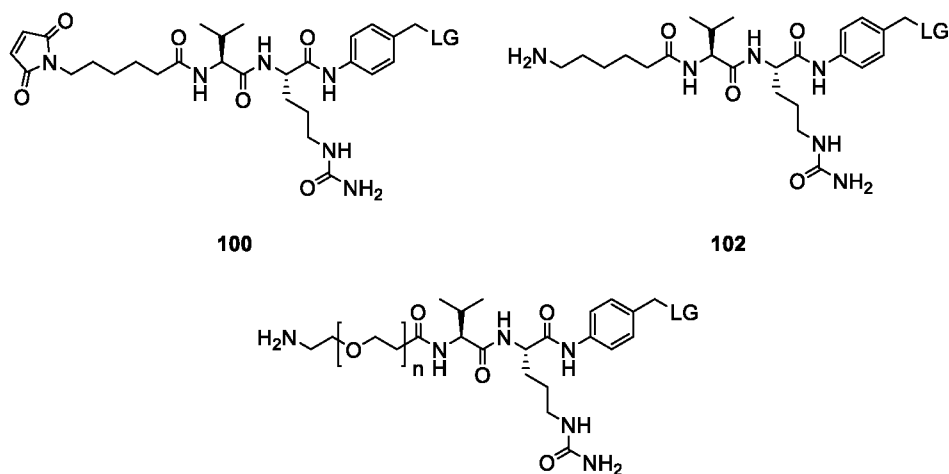
[00153] En los esquemas de preparación ejemplares B1-B3 anteriores (véase, *OPRD 2019*, 23, 1298), **R¹** se describe en el contexto de la Fórmula II. En el Esquema B1, **B1** puede protegerse para proporcionar **B2**. Luego, **B2** se reduce para proporcionar **B3**, seguido de la sustitución de metoxi por hidroxilo para proporcionar **B4**. **B5** se puede esterificar para proporcionar **B6**. **B6** se puede tratar con Boc-hidrazina para producir piridona **B7**, seguido de desprotección en condiciones ácidas para proporcionar **B8**. La combinación de **B4** y **B8** en presencia de un ácido de Lewis proporciona hidrazina **B9** disustituida. La desprotección del nitrógeno y la ciclación mediada por Pd proporciona rac-**B10**. La separación de rac-**B10** mediante la formación de diastereoisómeros de hidrazida, seguida de hidrólisis, produce **B12**.

[00154] En el Esquema B2, **B13** se metaliza en orto y se inactiva con DMF para proporcionar un aldehído que se cicla intramolecularmente con el ácido carboxílico para proporcionar **B14**. **B14** se puede tratar con tiofenol para

proporcionar **B15**. La reducción de **B15** proporciona **B16**. El sulfuro tricíclico **B17** se obtiene mediante el tratamiento de **B16** en condiciones ácidas. La reducción de **B17** proporciona **B18**.

- 5 [00155] En el Esquema B3, la combinación de **B12** con **B18** proporciona baloxavir y derivados del mismo. La desprotección proporciona ácido baloxavir **B19**. El ácido baloxavir **B19** se puede volver a alquilar para proporcionar **B20**.

- 10 [00156] Los enlazador-cargas útiles descritos en este documento generalmente se pueden sintetizar mediante una serie de pasos de acoplamiento como se muestra en el Esquema C:

Esquema C. Esquema de preparación ejemplar**VX-787 y derivados**

[00157] En el esquema de preparación ejemplar C anterior, **R¹** es como se describe en el contexto de la fórmula I. En el esquema C, el VX-787 y sus derivados se tratan con

5 enlazadores que llevan un grupo saliente (LG) para proporcionar enlazador-cargas útiles (p, enlazador-(VX-787)).

[00158] Los conjugados descritos en este documento se pueden sintetizar acoplando las enlazador-carga útil descritas en este documento con un agente de unión, por

10 ejemplo, un anticuerpo descrito en este documento en condiciones de conjugación estándar (ver, por ejemplo,

Doronina *et al.* *Nature Biotechnology* **2003**, 21, 778), que se incorpora aquí como referencia en su totalidad). Cuando el agente de unión es un anticuerpo, el anticuerpo puede acoplarse a un enlazador-carga útil a través de uno o más

5 residuos de cisteína o lisina del anticuerpo. Los enlazador-cargas útiles pueden acoplarse a residuos de cisteína, por ejemplo, sometiendo el anticuerpo a un agente reductor, por ejemplo, ditioneitol, para escindir los enlaces disulfuro del anticuerpo, purificando el anticuerpo reducido, por

10 ejemplo, mediante filtración en gel y, posteriormente, tratar el anticuerpo con un enlazador-carga útil que contiene un resto reactivo adecuado, por ejemplo, un grupo maleimido (véase, por ejemplo, Esquema de preparación ejemplar C). Los solventes adecuados incluyen, entre otros, agua, DMA, DMF y

15 DMSO. Los enlazador-carga útil que contienen un grupo reactivo, por ejemplo, un éster activado o un grupo haluro de ácido, se pueden acoplar a residuos de lisina del anticuerpo. Los solventes adecuados incluyen, entre otros, agua, DMA, DMF y DMSO. Los conjugados se pueden purificar usando técnicas de

20 proteínas conocidas, que incluyen, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, diálisis y ultrafiltración/diafiltración.

[00159] Los agentes de unión, por ejemplo anticuerpos, también se pueden conjugar mediante reacciones químicas de

25 clic. En algunas modalidades de dichas reacciones químicas

clic, el enlazador-carga útil incluye un grupo reactivo, por ejemplo, un alquino que es capaz de sufrir una reacción de 1,3-cicloadición regioisomérica con una azida. Dichos grupos reactivos adecuados se describen anteriormente. El anticuerpo

5 incluye uno o más grupos azida. Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos funcionalizados con, por ejemplo, grupos azido-polietilenglicol. En determinadas modalidades, dicho anticuerpo funcionalizado se deriva del tratamiento de un anticuerpo que tiene al menos un residuo de glutamina, por

10 ejemplo, Gln295 de cadena pesada, con un compuesto de amina primaria en presencia de la enzima transglutaminasa. En determinadas modalidades, dicho anticuerpo funcionalizado se deriva del tratamiento de un anticuerpo que tiene al menos un residuo de glutamina, por ejemplo, Gln297 de cadena pesada,

15 con un compuesto de amina primaria en presencia de la enzima transglutaminasa. Dichos anticuerpos incluyen mutantes Asn297Gln (N297Q). En ciertas modalidades, dicho anticuerpo funcionalizado se deriva del tratamiento de un anticuerpo que tiene al menos dos residuos de glutamina, por ejemplo, Gln295

20 de cadena pesada y Gln297 de cadena pesada, con un compuesto de amina primaria en presencia de la enzima transglutaminasa. Dichos anticuerpos incluyen mutantes Asn297Gln (N297Q). En ciertas modalidades, el anticuerpo tiene dos cadenas pesadas como se describe en este párrafo para un total de dos o un

25 total de cuatro residuos de glutamina.

[00160] En ciertas modalidades, dicho anticuerpo funcionalizado se deriva del tratamiento de un anticuerpo que tiene al menos un residuo de glutamina, por ejemplo, Gln295 de cadena pesada, con un compuesto de amina primaria o
5 etiqueta peptídica en presencia de la enzima transglutaminasa. En determinadas modalidades, dicho anticuerpo funcionalizado se deriva del tratamiento de un anticuerpo que tiene al menos un residuo de glutamina, por ejemplo, Gln297 de cadena pesada, con un compuesto de amina
10 primaria o etiqueta peptídica en presencia de la enzima transglutaminasa. Dichos anticuerpos incluyen mutantes Asn297Gln (N297Q). En determinadas modalidades, dicho anticuerpo funcionalizado se deriva del tratamiento de un anticuerpo que tiene al menos dos residuos de glutamina, por
15 ejemplo, Gln295 de cadena pesada y Gln297 de cadena pesada, con un compuesto de amina primaria o etiqueta peptídica en presencia de la enzima transglutaminasa. Dichos anticuerpos incluyen mutantes Asn297Gln (N297Q). En ciertas modalidades, el anticuerpo tiene dos cadenas pesadas como se describe en
20 este párrafo para un total de dos o un total de cuatro residuos de glutamina.

[00161] En una modalidad, el anticuerpo funcionalizado o la molécula de unión a antígeno incluye una cadena pesada de anticuerpo y además incluye una etiqueta peptídica en el
25 extremo C-terminal de la cadena pesada de anticuerpo. En una

modalidad, el anticuerpo funcionalizado o la molécula de unión a antígeno incluye una cadena pesada de anticuerpo y además incluye una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, en donde la
5 etiqueta peptídica es la secuencia pentapeptídica LLQGA (SEQ ID NO: 297). En una modalidad, el anticuerpo funcionalizado o la molécula de unión a antígeno incluye dos cadenas pesadas de anticuerpo y además incluye una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de cada cadena pesada de anticuerpo. En
10 una modalidad, el anticuerpo funcionalizado o la molécula de unión a antígeno incluye dos cadenas pesadas de anticuerpo e incluye además una etiqueta peptídica en el extremo C-terminal de cada cadena pesada de anticuerpo, en donde la etiqueta peptídica es la secuencia pentapeptídica LLQGA (SEQ
15 ID NO: 297).

[00162] En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende dos residuos de glutamina, uno en cada cadena pesada. En modalidades particulares, el anticuerpo comprende un resto Q295 en cada cadena pesada. En modalidades adicionales, el
20 anticuerpo comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más residuos de glutamina. Estos residuos de glutamina pueden estar en cadenas pesadas, cadenas ligeras o tanto en cadenas pesadas como en cadenas ligeras. Estos residuos de glutamina pueden ser residuos de tipo salvaje o
25 residuos modificados. Los anticuerpos se pueden preparar de

acuerdo con técnicas estándar.

[00163] Los expertos reconocerán que los anticuerpos a menudo se glicosilan en el residuo N297, cerca del residuo Q295 en una secuencia de cadena pesada. La glicosilación en el residuo N297 puede interferir con una transglutaminasa en el residuo Q295 (Dennler *et al.*, *supra*). En consecuencia, en modalidades ventajosas, el anticuerpo no está glicosilado. En ciertas modalidades, el anticuerpo está desglicosilado o aglicosilado. En modalidades particulares, una cadena pesada de anticuerpo tiene una mutación N297. Dicho de forma alternativa, el anticuerpo está mutado para que ya no tenga un residuo de asparagina en la posición 297. En modalidades particulares, una cadena pesada de anticuerpo tiene una mutación N297Q. Dicho anticuerpo se puede preparar mediante mutagénesis dirigida al sitio para eliminar o inhabilitar una secuencia de glicosilación o mediante mutagénesis dirigida al sitio para insertar un residuo de glutamina en un sitio aparte de cualquier sitio de glicosilación que interfiera o cualquier otra estructura que interfiera. Dicho anticuerpo también se puede aislar de fuentes naturales o artificiales.

[00164] A continuación, el anticuerpo sin glicosilación de interferencia se hace reaccionar o se trata con un compuesto de amina primaria. En ciertas modalidades, un anticuerpo aglicosilado se hace reaccionar o se trata con un compuesto de amina primaria para producir un anticuerpo modificado con

glutaminilo. En ciertas modalidades, un anticuerpo desglicosilado se hace reaccionar o se trata con un compuesto de amina primaria para producir un anticuerpo modificado con glutaminilo.

- 5 [00165] La amina primaria puede ser cualquier amina primaria que sea capaz de formar un enlace covalente con un residuo de glutamina en presencia de una transglutaminasa. En el presente documento se describen aminas primarias útiles (véase, por ejemplo, Esquema de preparación ejemplar C). La
- 10 transglutaminasa puede ser cualquier transglutaminasa que los expertos en la materia consideren adecuada. En ciertas modalidades, la transglutaminasa es una enzima que cataliza la formación de un enlace isopeptídico entre un grupo amino libre en el compuesto de amina primaria y el grupo acilo en
- 15 la cadena lateral de un residuo de glutamina. La transglutaminasa también se conoce como proteína-glutamina- γ -glutamilttransferasa. En modalidades particulares, la transglutaminasa se clasifica como EC 2.3.2.13. La transglutaminasa puede ser de cualquier fuente que se
- 20 considere adecuada. En ciertas modalidades, la transglutaminasa es microbiana. Se han aislado transglutaminasas útiles de *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces canineum*, *Streptomyces griseo-carneum*, *Streptomyces lavendulae* y *Bacillus subtilis*. También se
- 25 pueden usar transglutaminasas no microbianas, incluidas las

transglutaminasas de mamíferos, por ejemplo, una transglutaminasa no microbiana en combinación con un cofactor. En determinadas modalidades, la transglutaminasa puede producirse mediante cualquier técnica u obtenerse de cualquier fuente que el experto en la materia considere adecuada. En modalidades particulares, la transglutaminasa se obtiene de una fuente comercial.

[00166] En ciertas modalidades, el anticuerpo modificado con glutaminilo se hace reaccionar o se trata con un enlazador-carga útil reactivo para formar un conjugado de enlazador-carga útil-anticuerpo. La reacción puede proseguir en condiciones consideradas adecuadas por los expertos en la técnica. En determinadas modalidades, el anticuerpo modificado con glutaminilo se pone en contacto con el compuesto de enlazador-carga útil reactivo en condiciones adecuadas para formar un enlace entre el anticuerpo modificado con glutaminilo y el compuesto de enlazador-carga útil. Las condiciones de reacción adecuadas son bien conocidas por los expertos en la técnica.

20

Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

[00167] En este documento se proporcionan métodos para tratar y prevenir enfermedades, afecciones o trastornos que comprenden administrar una cantidad terapéutica o

25

profilácticamente eficaz o uno o más de los compuestos descritos en este documento, por ejemplo, uno o más de los compuestos de una fórmula proporcionada en este documento. Las enfermedades, trastornos y/o condiciones incluyen, pero
5 no se limitan a, aquellas asociadas con infecciones virales como se describe en este documento.

[00168] Los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar solos o junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales (suplementarios). El uno o más
10 agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse justo antes, simultáneamente o poco después de la administración de los compuestos descritos en el presente documento. La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los compuestos
15 descritos en el presente documento en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, y métodos de tratamiento que comprenden la administración de tales combinaciones a sujetos que las necesiten.

[00169] Los agentes terapéuticos adicionales adecuados
20 incluyen, pero no se limitan a: un fármaco antiviral tal como un segundo compuesto antiviral o carga útil, un agente terapéutico autoinmune, una hormona, un anticuerpo biológico o monoclonal. En algunas modalidades, el agente terapéutico complementario se puede seleccionar del grupo que consiste
25 en: un fármaco antiviral, un fármaco antiinflamatorio (por

ejemplo, un corticosteroide o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo), un anticuerpo que se une específicamente a la influenza HA, una vacuna contra la influenza, un suplemento dietético (por ejemplo, un antioxidante) y una terapia

5 paliativa para tratar una infección por influenza. En una modalidad, el fármaco antiinflamatorio se selecciona del grupo que consiste en corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos. En una modalidad, el suplemento dietético es un antioxidante. Los agentes

10 terapéuticos adecuados también incluyen, pero no se limitan a, cualquier sal o derivado farmacéuticamente aceptable de un compuesto antiviral o carga útil expuesto en el presente documento. En algunas modalidades, el agente terapéutico suplementario se administra a través de una ruta de

15 administración diferente como un conjugado de anticuerpo-fármaco, compuesto o composición farmacéutica descritos en el presente documento. Por ejemplo, un agente terapéutico suplementario se puede administrar por vía oral. Un fármaco antiviral ejemplar para administrar como agente terapéutico

20 suplementario es oseltamivir. En algunas modalidades, el oseltamivir se administra antes de la administración del conjugado de anticuerpo-fármaco, compuesto o composición farmacéutica. En algunas modalidades, el oseltamivir se administra simultáneamente con el conjugado, compuesto o

25 composición farmacéutica de anticuerpo-fármaco. En algunas

modalidades, el oseltamivir se administra después de la administración del conjugado de anticuerpo-fármaco, compuesto o composición farmacéutica. En algunas modalidades, el medicamento antiviral es un medicamento contra la influenza A
5 o un medicamento contra la influenza B (por ejemplo, que se une específicamente a influenza B HA.

[00170] En algunas modalidades de los métodos descritos en este documento, se pueden administrar a un sujeto varias dosis de un compuesto descrito en este documento (o una
10 composición farmacéutica que comprende una combinación de un compuesto descrito en este documento y cualquiera de los agentes terapéuticos adicionales mencionados en este documento) durante un curso de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con esta modalidad de la invención comprenden la
15 administración secuencial a un sujeto de varias dosis de un compuesto descrito en el presente documento. La presente invención incluye métodos que comprenden la administración secuencial al paciente de una dosis inicial única de un compuesto descrito en el presente documento, seguida de una o
20 más dosis secundarias del compuesto y, opcionalmente, seguida de una o más dosis terciarias del compuesto. Las dosis ejemplares de un compuesto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, 50 mg/kg, 49 mg/kg, 48 mg/kg, 47 mg/kg, 46 mg/kg, 45 mg/kg, 44 mg/kg, 43 mg/kg, 42 mg/kg, 41 mg/kg,
25 40 mg/kg, 39 mg/kg, 38 mg/kg, 37 mg/kg, 36 mg/kg, 35 mg/kg,

34 mg/ kg, 33 mg/kg, 32 mg/kg, 31 mg/kg, 30 mg/kg, 29 mg/kg, 28 mg/kg, 27 mg/kg, 26 mg/kg, 25 mg/kg, 24 mg/ kg, 23 mg/kg, 22 mg/kg, 21 mg/kg, 20 mg/kg, 19 mg/kg, 18 mg/kg, 17 mg/kg, 16 mg/kg, 15 mg/kg, 14 mg/ kg, 13 mg/kg, 12 mg/kg, 11 mg/kg, 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg, 0.9 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.3 mg/ kg, 0.2 mg/kg, 0.1 mg/kg y 0.05 mg/kg.

[00171] En ciertas modalidades, la cantidad del compuesto incluido en las dosis inicial, secundaria y/o terciaria varía entre sí (por ejemplo, se ajusta hacia arriba o hacia abajo de acuerdo con corresponda) durante el curso del tratamiento. En determinadas modalidades, se administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) dosis al comienzo del régimen de tratamiento como "dosis de carga" seguidas de dosis posteriores que se administran con menor frecuencia (por ejemplo, " dosis de mantenimiento").

[00172] En ciertas modalidades ejemplares de la presente invención, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra de 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior.

[00173] Los métodos de acuerdo con esta modalidad de la

descripción pueden comprender administrar a un paciente cualquier número de dosis secundarias y/o terciarias del compuesto. Por ejemplo, en ciertas modalidades, solo se administra al paciente una única dosis secundaria. En otras

5 modalidades, se administran al paciente dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias. Asimismo, en ciertas modalidades, solo se administra al paciente una sola dosis terciaria. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5,

10 6, 7, 8 o más) dosis terciarias. El régimen de administración puede llevarse a cabo indefinidamente durante la vida de un sujeto particular, o hasta que dicho tratamiento ya no sea necesario o beneficioso desde el punto de vista terapéutico.

[00174] En modalidades que involucran varias dosis

15 secundarias, cada dosis secundaria puede administrarse con la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria puede administrarse al paciente de 1 a 2 semanas o de 1 a 2 meses después de la dosis inmediatamente anterior. De manera similar, en

20 modalidades que involucran varias dosis terciarias, cada dosis terciaria puede administrarse con la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria se puede administrar al paciente de 2 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En determinadas

25 modalidades de la invención, la frecuencia con la que se

administrar las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar a lo largo del régimen de tratamiento. La frecuencia de administración también puede ser ajustada durante el curso del tratamiento por un médico dependiendo de las necesidades del paciente individual luego del examen clínico.

[00175] La presente invención incluye regímenes de administración en los que se administran de 2 a 6 dosis de carga a un paciente con una primera frecuencia (por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, etc.), seguido de la administración de dos o más dosis de mantenimiento al paciente de forma menos frecuente. Por ejemplo, de acuerdo con esta modalidad de la invención, si las dosis de carga se administran con una frecuencia de una vez al mes, entonces las dosis de mantenimiento se pueden administrar al paciente una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, etc.

[00176] La presente invención incluye composiciones farmacéuticas de los compuestos y/o conjugados descritos en el presente documento, por ejemplo, conjugados de anticuerpo-fármaco de los compuestos de las Fórmulas I y II, por ejemplo, composiciones que comprenden un compuesto descrito en el presente documento, una sal, un estereoisómero, un regioisómero, un polimorfo del mismo, y un portador,

diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de portadores, diluyentes y excipientes adecuados incluyen, entre otros, reguladores de pH para mantener el pH de la composición adecuada (por ejemplo, reguladores de pH de citrato, reguladores de pH de succinato, reguladores de pH de acetato, reguladores de pH de fosfato, reguladores de pH de lactato, reguladores de pH de oxalato y similares), proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humano), solución salina, polioles (por ejemplo, trehalosa, sacarosa, xilitol, sorbitol y similares), tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, polioxolato y similares), antimicrobianos y antioxidantes.

[00177] En ciertas modalidades, los compuestos o cargas útiles, enlazador-cargas útiles, ADC o composiciones de los mismos pueden proporcionarse a través de vías alternativas de administración. En determinadas modalidades, la vía de administración de la(s) composición(es) se selecciona del grupo subcutáneo, intradérmico, intramuscular, oral, intravenoso, intraperitoneal, por inhalación e intranasal. En una modalidad, la vía de administración de la(s) composición(es) es oral. En una modalidad, la vía de administración de la(s) composición(es) es intravenosa. En una modalidad, la vía de administración de la(s) composición(es) es intraperitoneal. En una modalidad, la vía de administración de la(s) composición(es) es la inhalación.

En una modalidad, la vía de administración de la(s) composición(es) es intranasal.

[00178] En algunos ejemplos, se exponen en este documento métodos para el tratamiento, profilaxis, reducción o

5 inhibición de una enfermedad, trastorno o afección asociada con una infección en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de las Fórmulas I y/o II, un enlazador-carga útil descrita en este documento, y/o un ADC

10 descrito en este documento, combinaciones de los mismos, o una composición farmacéutica de los mismos. En algunas modalidades, la infección es una infección viral. En algunas modalidades, la infección es una infección por el virus de la influenza. En algunas modalidades, la infección es una

15 infección por el virus de la influenza A. En algunas modalidades, la infección es el virus de la influenza B. En algunas modalidades, la infección es una infección por el virus de la influenza A y una infección por el virus de la influenza B. En ciertas modalidades, los efectos secundarios

20 asociados con la administración de una carga útil no conjugada al sujeto se reducen en comparación con la administración de la carga útil conjugada o ADC a un sujeto comparable.

[00179] Los compuestos descritos en el presente documento

25 también se pueden usar para el tratamiento, la profilaxis, la

reducción o la inhibición de una infección gripal en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un conjugado de anticuerpo-fármaco, compuesto o composición farmacéutica descritos en el presente documento.

- 5 En algunas modalidades, la infección por influenza es provocada por una infección por el virus de la influenza A. En algunas modalidades, la infección por influenza es causada por el virus influenza A Grupo 1. En algunas modalidades, la infección por influenza está provocada por el virus de la
- 10 influenza A H1. En algunas modalidades, la infección por influenza es causada por el virus influenza A del Grupo 2. En algunas modalidades, la infección por influenza es causada por el virus influenza A H3. En algunas modalidades, la infección por influenza está provocada por un virus de la
- 15 influenza desconocido o indeterminado. En algunas modalidades, la infección por influenza está provocada por la infección por el virus de la influenza B. En algunas modalidades, la infección por influenza es causada por la infección por el virus de la influenza A y la infección por
- 20 el virus de la influenza B. En algunas modalidades, la infección por influenza es causada por una infección por el virus de influenza A, infección por influenza A del Grupo 1, infección por influenza A H₁, infección por influenza A del Grupo 2, infección por influenza A H3, un virus de influenza
- 25 desconocido o indeterminado, infección por el virus de

influenza B o cualquier combinación de los mismos.

EJEMPLOS

[00180] En el presente documento se proporcionan VX-787 y
5 derivados del mismo, baloxavir y derivados del mismo,
baloxavir marboxilo y derivados del mismo, conjugados de
proteína del mismo y métodos para tratar enfermedades,
trastornos y afecciones que incluyen la administración de VX-
787, baloxavir y baloxavir marboxilo y conjugados de los
10 mismos.

Ejemplo 1: Síntesis de enlazador-carga útil

[00181] VX-787 y baloxavir se usaron como cargas útiles
para la administración mediante un anticuerpo anti-
15 hemaglutinina. Para probar los efectos de diferentes
enlazadores en combinación con VX-787 o baloxavir, los
enlazador-cargas útiles se sintetizaron como se indica a
continuación (enlazador-(VX-787)): Compuesto **6** y Compuesto
11; enlazador-baloxavir: Compuesto **15**). Todos los solventes
20 usados se usaron tal cual y se compraron a Sigma Aldrich o
Fisher Scientific. Los espectros de ^1H se registraron en
instrumentos de RMN Varian Inova de 300 MHz y 500 MHz. Los
desplazamientos químicos (δ) se reportaron en ppm con
respecto a los solventes de RMN usados para el análisis y se
25 reportaron como s - singlete, d - doblete, t - triplete, q -

cuarteto, dd - doblete de dobletes, dt - doblete de tripletes, dq - doblete de cuartetos, y m - multiplete. Las constantes de acoplamiento (J) se reportaron en hercios (Hz). Las purezas cromatográficas se determinaron en un sistema

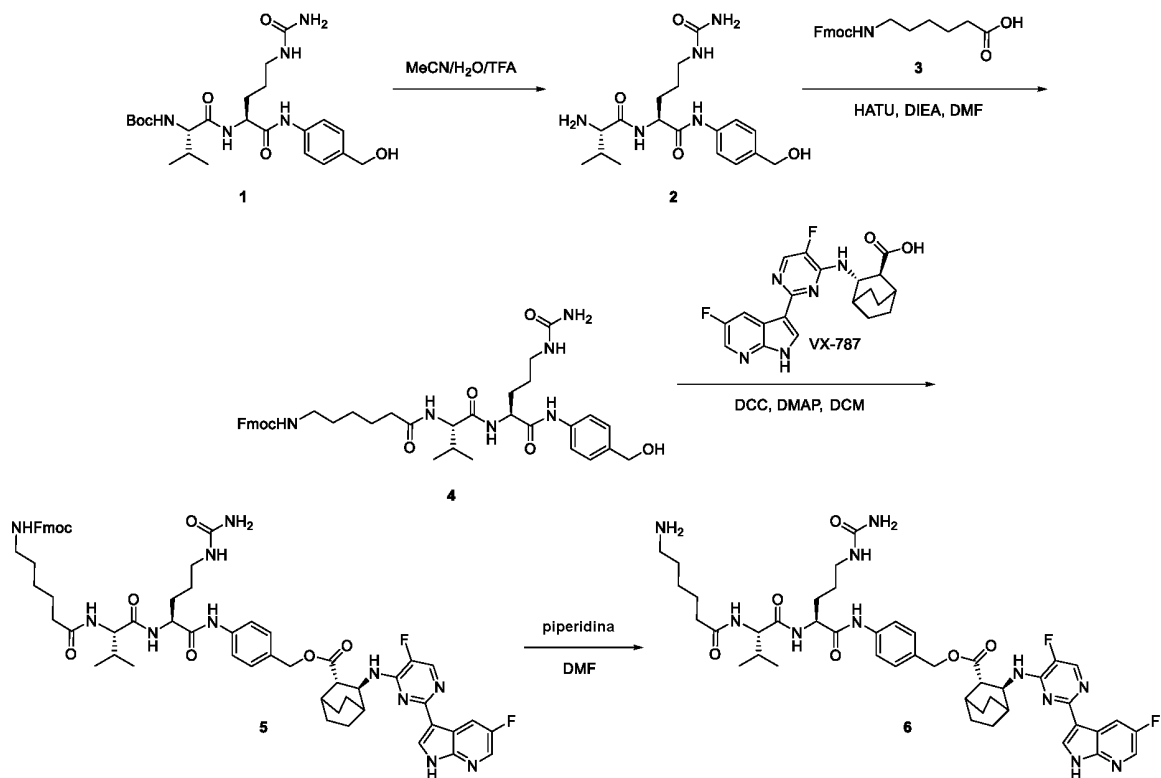
5 Agilent 1100, 1260 Infinity con LC/MS de cuadrupolo 6130 o LC/MS de la serie 1200 usando columnas analíticas Chromolith® FastGradient RP-18e (50 × 2 mm, Merck KGaA, P/N 1.52007.0001) y el siguiente método HPLC analítico: volumen de inyección 2-10 μ L; velocidad de flujo 1 mL/min; 5-95% de acetonitrilo en

10 agua durante 4 min; detector de matriz de diodos de Agilent a $\lambda = 254$ nm; temperatura ambiente. La espectrometría de masas de baja resolución se llevó a cabo en sistemas Agilent usando fuentes de ionización por electroaspersión y se analizó con detectores de masas de trampa de iones o de cuadrupolo

15 simple.

[00182] El Compuesto **6** se sintetizó a partir de VX-787 como se describe a continuación en el Esquema 1.

Esquema 1



[00183] Compuesto **2**: el Compuesto **2** se preparó usando la solicitud internacional de PCT, 2014145090. ((*S*)-1-(((*S*)-1-((4-(hidroximetil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *terc*-butilo **1** (700 mg, 1.46 mmol) se disolvió en una mezcla de CH₃CN/H₂O/TFA (3:1:1 = v/v/v, 6 mL/2 mL/2mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 19 h y se controló mediante LCMS. Después de la concentración al vacío, el producto bruto **2** (0.5 g de sal) se usó directamente en el siguiente paso sin purificación adicional. MS (ESI, pos.): calculado para C₁₈H₂₉N₅O₄, 379.2; encontrado 380.2 (M+H).

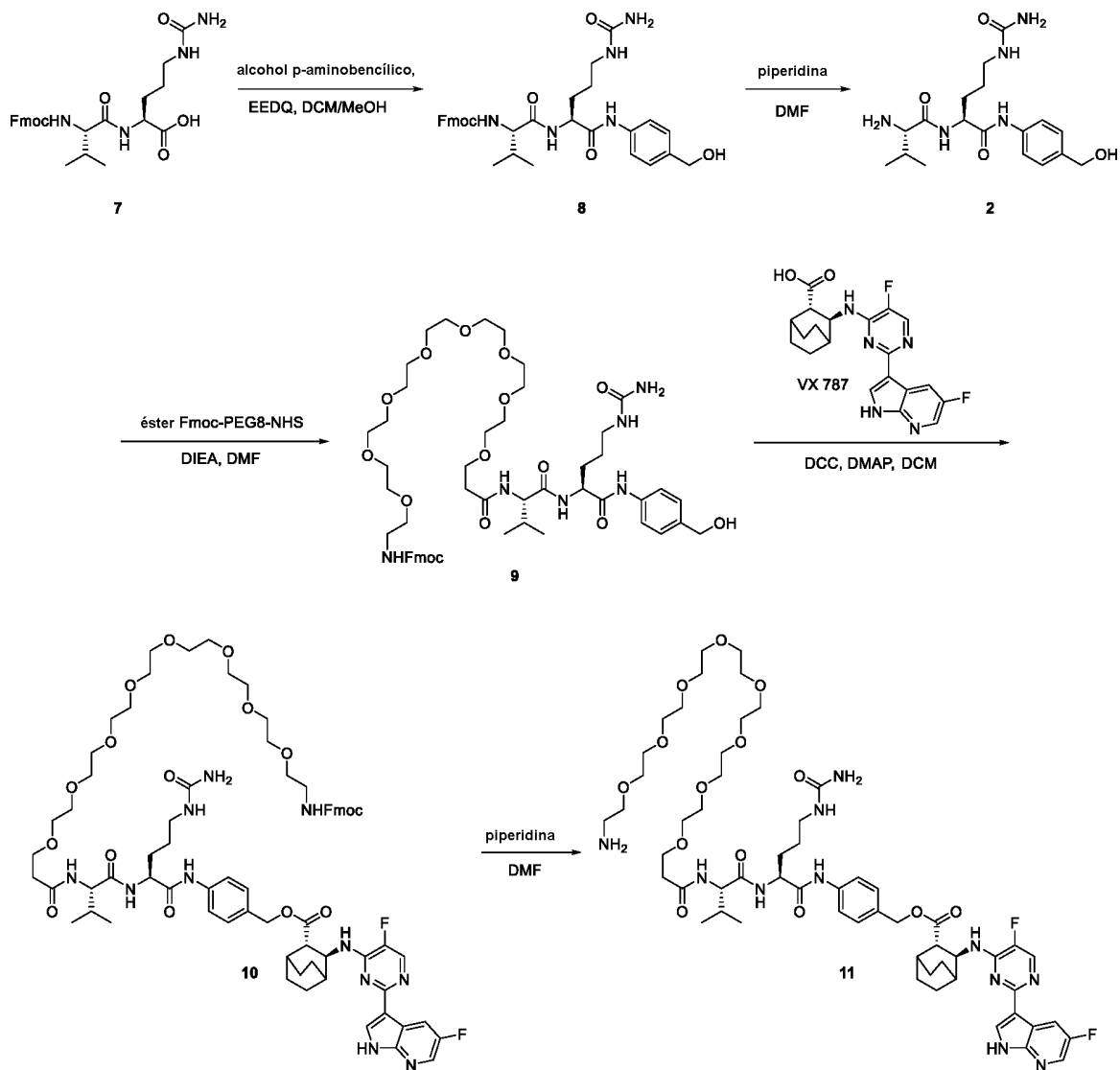
- [00184] Compuesto **4**: Compuesto **2** (100 mg, 0.263 mmol), ácido 6-(Fmoc-amino) caproico **3** (93 mg, 0.263 mmol), hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU, 200 mg, 0.526 mmol) y 1-hidroxí-7-azabenzotriazol (HOAt, 35 mg, 0.263 mmol) se cargaron en un 2 frasco de dram. Luego se añadió DMF anhidra (2 mL) y la mezcla de reacción se envejeció durante 5 min a temperatura ambiente, seguido de la adición por goteo de *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA, 137 µL, 0.789 mmol) mediante una jeringa. La solución amarilla homogénea se agitó durante 2 h a temperatura ambiente bajo nitrógeno y la reacción se controló mediante LC/MS hasta que se completó. La mezcla de reacción se purificó en una columna C18 Aq Gold de 50 g (gradiente de elución: 10-95% de MeCN en agua, ambos con 0.05% de ácido acético) durante 20 min. Las fracciones puras se combinaron, se congelaron en hielo seco y se liofilizaron dando el compuesto del título **4** como un sólido blanco (120 mg, 65%). MS: calculado para C₃₉H₅₀N₆O₇, 714.3; encontrado 715.3 (M+H), 737.3 (M+Na).
- [00185] Compuesto **5**: se añadieron el compuesto **4** (39.4 mg, 0.055 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 5 mg, 0.039 mmol) a una suspensión en agitación bajo argón de VX-787 (22 mg, 0.055 mmol) en THF anhidro (6 mL) a temperatura ambiente. Luego se añadió por goteo a la mezcla de reacción una solución de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 17 mg, 0.083

- mmol) en THF anhidro (2 mL). Después de agitar durante 16 h, la mezcla se evaporó hasta sequedad y el residuo se disolvió en 3 mL de DMSO. El material bruto se purificó en una columna C18 Aq Gold de 50 g (gradiente de elución: 10-95% de MeCN en
- 5 agua, 0.05% de AcOH en ambos). Las fracciones del producto se combinaron, se congelaron en hielo seco y se liofilizaron dando el compuesto del título 5 como un sólido blanco (38 mg, 63%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{59}H_{67}F_2N_{11}O_8$, 1095.5; encontrado 1096.4 (M+H).
- 10 [00186] Compuesto **6**: se añadió piperidina al 5% (0.8 mL) en DMF a una solución agitada del compuesto 5 (33 mg, 0.0301 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (DMF, 1 mL) bajo argón a temperatura ambiente durante 30 min, y la solución resultante se agitó. La LC/MS confirmó la finalización de la reacción.
- 15 La reacción se purificó directamente en columna 30 g C18 Aq. Gold mediante sistema ISCO (elución en gradiente: MeCN al 10-95% en agua, ácido acético al 0.05% en ambos, durante 30 min). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se congelaron en hielo seco y se liofilizaron durante la
- 20 noche dando el compuesto del título 6 como un sólido blanquecino (22 mg, 85%). MS: calculado para $C_{44}H_{57}F_2N_{11}O_6$, 873.4; encontrado 874.4 (M+H). 1H -RMN (500 MHz; DMSO- d_6): δ 9.97 (s, 1H), 8.50 (dd, J = 9.8, 2.8 Hz, 1H), 8.28 (dd, J = 2.5, 1.2 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.16 (d, J = 3.9 Hz, 1H),
- 25 8.11-8.09 (m, 1H), 7.84 (dd, J = 1.6, 0.9 Hz, 1H), 7.62 (d, J

= 6.9 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.02-6.00 (m, 1H), 5.43 (d, J = 0.3 Hz, 2H), 5.09 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 4.77-4.74 (m, 1H), 4.38-4.36 (m, 1H), 4.19 (dd, J = 8.5, 7.2 Hz, 1H), 3.03-2.94
 5 (m, 4H), 2.17 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 1.99-1.95 (m, 3H), 1.85 (s, 2H), 1.81-1.78 (m, 2H), 1.73 -1.71 (m, 4H), 1.50-1.47 (m, 8H), 1.39-1.34 (m, 4H), 1.26-1.23 (m, 2H), 0.85 (dd, J = 12.7, 6.8 Hz, 6H).

[00187] El Compuesto **11** se sintetizó a partir de VX-787
 10 como se describe a continuación en el Esquema 2.

Esquema 2



[00188] Compuesto **8**: *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ, 1.99 g, 8.05 mmol) se añadió a una solución de alcohol *p*-aminobencílico (0.99 g, 8.05 mmol) en 5 diclorometano (19 mL) y metanol (7.6 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 5 min, se añadió en una porción Fmoc-Valina-Citrulina **7** (2.0 g, 4.03 mmol) y la solución resultante se agitó durante 18 horas. Los volátiles

se eliminaron al vacío y el residuo se trituro con éter (20 mL) y se lavó secuencialmente con éter (20 mL), acetato de etilo (20 mL) y éter (20 mL) para obtener el compuesto del título **8** (2.2 g, 98% de rendimiento) como un sólido amarillento claro. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{33}H_{39}N_5O_6$, 601.29; encontrado 602.3 (M+H).

[00189] Compuesto **2**: en un vial de 20 mL, se disolvió Fmoc-valina-citrulina-PAB(OH) **8** (2.0 g, 3.33 mmol) en piperidina al 5% en DMF (10 mL) y se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Los precipitados se eliminaron por filtración y el filtrado se purificó en una columna de 100 g C18 Aq usando una elución en gradiente de MeCN al 5-95%/H₂O (ambos con TFA al 0.05%). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron. Se repitió la purificación en el sólido liofilizado para obtener el compuesto del título **2** (0.98 g, 61% de rendimiento) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{18}H_{29}N_5O_4$, 379.22; encontrado 380.2 (M+H).

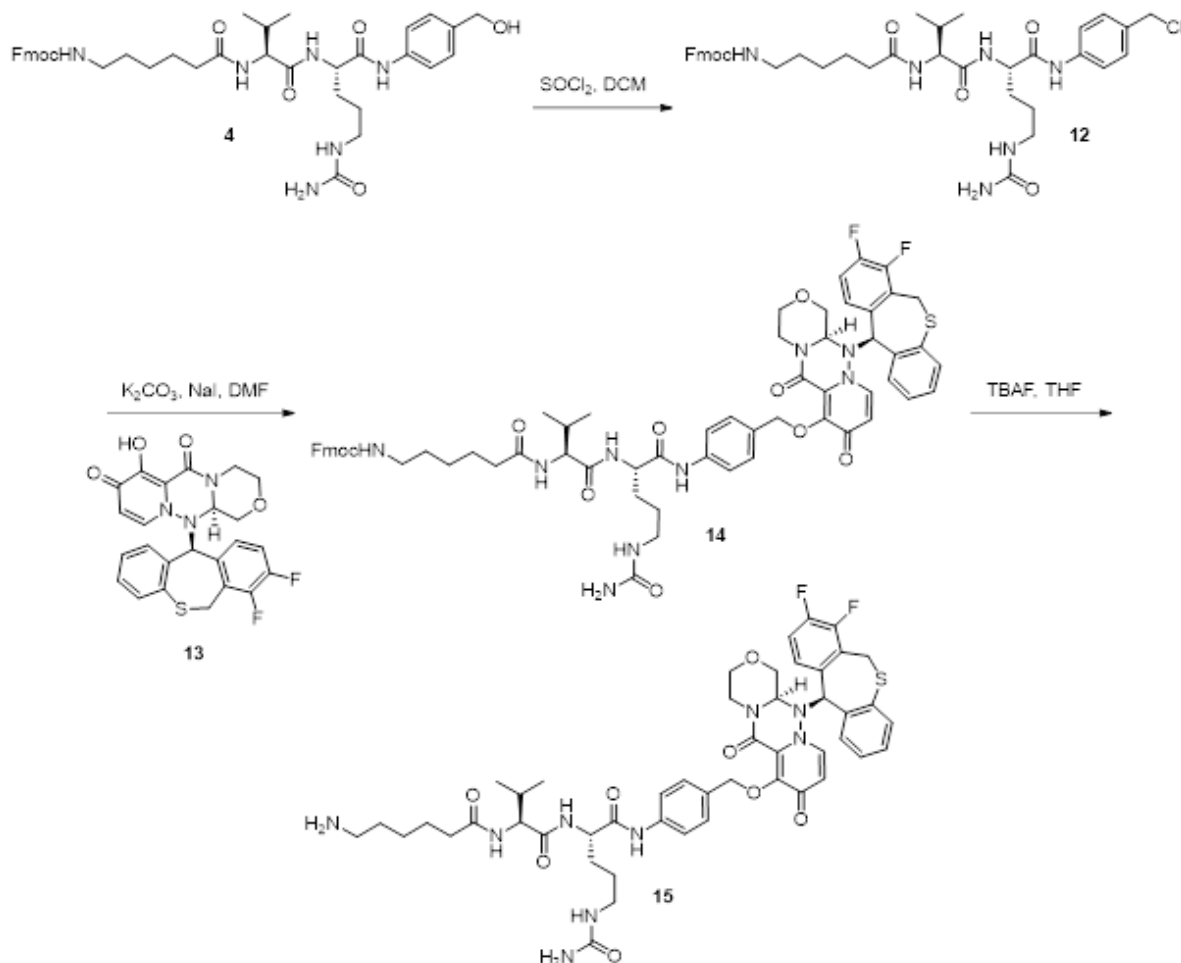
[00190] Compuesto **9**: se añadió DIEA (40 µL, 0.22 mmol) a una solución de sal de valina-citrulina-PAB(OH)*TFA **2** (100 mg, 0.2 mmol) y éster de Fmoc-PEG8-NHS (167 mg, 0.22 mmol) en DMF anhidro (2 mL) y se agitó durante 45 min. La reacción se controló por LC/MS, y se purificó en una columna de 100 g C18 Aq usando una elución en gradiente de MeCN al 5-95%/H₂O (ambos con AcOH al 0.05%). Las fracciones puras se

combinaron, congelaron y liofilizaron para obtener el compuesto del título **8** (145 mg, 71%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{52}H_{76}N_6O_{15}$, 1024.54; encontrado 1025.5 (M+H).

- 5 [00191] Compuesto **10**: se añadió por goteo una solución a temperatura ambiente de DCC (18.6 mg, 0.09 mmol) en diclorometano (3 mL) a una suspensión de Fmoc-PEG8-valina-citrulina-PAB(OH) **9** (61.8 mg, 0.06 mmol), VX-787 (24 mg, 0.06 mmol) y DMAP (7.2 mg, 0.06 mmol) en diclorometano anhidro (12
- 10 mL) a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. Los volátiles se eliminaron al vacío y el residuo se purificó en una columna de 50 g C18 Aq usando elución en gradiente de MeCN al 5-95%/H₂O (ambos con AcOH al 0.05%). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir
- 15 el compuesto del título **10** como un sólido blanquecino esponjoso (50 mg, 51% de rendimiento). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{72}H_{93}F_2N_{11}O_{16}$, 1405.68; encontrado 1406.6 (M+H).
- [00192] Compuesto **11**: piperidina al 5% en DMF (0.8 mL) se añadió a una solución del compuesto **10** (50 mg, 0.035 mmol) en
- 20 DMF anhidra (1.6 mL) y se agitó durante 40 min antes de la purificación en una columna C18 Aq de 50 g usando elución en gradiente 5-95% de MeCN/H₂O (ambos con 0.05% de AcOH). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para obtener el compuesto del título **11** (43 mg, 95% de
- 25 rendimiento) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI,

pos.): calculado para $C_{57}H_{83}F_2N_{11}O_{14}$, 1183.61; encontrado 1184.6 (M+H). 1H -RMN (500 MHz; DMSO- d_6): δ 9.95 (s, 1H), 8.48 (dd, J = 9.6, 2.1 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.15 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 6.7, 0.5 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.97 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.08 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 4.99 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 4.75 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 4.36 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 4.22 (t, J = 7.9 Hz, 1H), δ 3.59 (q, J = 5.6 Hz, 2H), 3.5 (s, 30H), 3.35 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 3.01-3.00 (m, 1H), 2.96-2.92 (m, 2H), 2.64 (dt, J = 9.4, 4.4 Hz, 2H), 2.39-2.35 (m, 1H), 1.97-1.94 (m, 2H), 1.88 (s, 1H), 1.81-1.57 (m, 6H), 1.50 - 1.35 (m, 6H), 0.84 (dd, J = 15.4, 6.7 Hz, 6H).

[00193] La síntesis del Compuesto **15** a partir de (R)-12-((S)-7,8-difluoro-6,11-dihidrodibenzo[b,e]tiepin-11-il)-7-hidroxi-3,4,12,12a-tetrahidro-1H-[1.4]oxazino[3.4-c]pirido[2,1-f][1,2,4]triazino-6,8-diona **13** se describe en el esquema 3 a continuación.

Esquema 3

[00194] Compuesto **12**: se añadió cloruro de tionilo (11.8 mg, 0.1 mmol) a una solución agitada de Fmoc-Cap-valina-citrulina-PAB(OH) **4** (61.2 mg, 0.086 mmol) en diclorometano anhidro (1 mL), a temperatura ambiente, y se agitó durante 1 h. Después de consumir el material de partida, los volátiles se eliminaron al vacío y el residuo se purificó en una columna C18 Aq de 30 g usando elución en gradiente 5-95% MeCN/H₂O (ambos con 0.05% AcOH). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir el

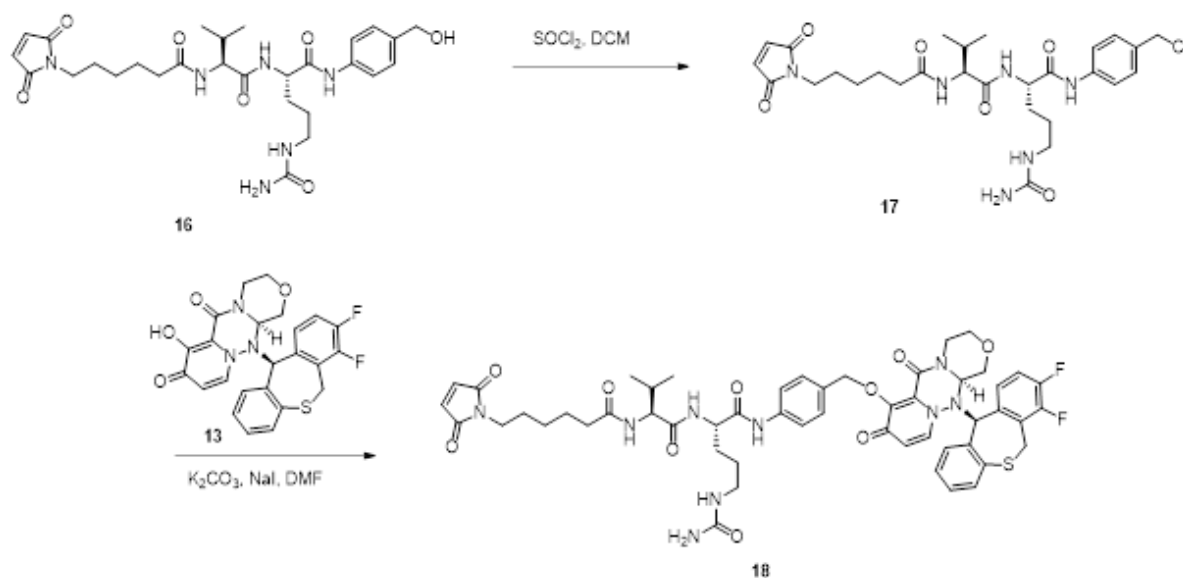
compuesto del título 12 como un sólido blanquecino esponjoso (38 mg, 60% de rendimiento). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{39}H_{49}ClN_6O_6$, 732.3; encontrado 733.3 (M+H).

[00195] Compuesto **14**: se añadieron K_2CO_3 (28 mg, 0.20 mmol) y NaI (6 mg, 0.041 mmol) a una solución en DMF (1 mL) de (R)-12-((S)-7,8-difluoro-6,11-dihidrodibenzo[b,e]tiepin-11-il)-7-hidroxi-3,4,12,12a-tetrahidro-1H-[1,4]oxazino[3,4-c]pirido[2,1-f][1,2,4]triazino-6,8-diona **13** (20 mg, 0.041 mmol) y Fmoc-Cap-valina-citrulina-PAB-Cl (40 mg, 0.052 mmol), y la mezcla se calentó a 65 °C durante 40 minutos. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se purificó en una columna C18 Aq de 30 g usando MeCN al 5-60%/H₂O (ambos con ácido acético al 0.05%). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir el compuesto del título **14** como un sólido blanquecino esponjoso (40 mg, 83% de rendimiento). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{63}H_{67}F_2N_9O_{10}S$, 1179.5; encontrado 1180.3 (M+H).

[00196] Compuesto **15**: Se añadió por goteo una solución 1 M de TBAF en THF (21 µL, 0.021 mmol) a una solución en THF (1.5 mL) del compuesto **14** (25 mg, 0.021 mmol) y se agitó durante 1.5 h a temperatura ambiente. Los volátiles se eliminaron al vacío y el residuo se purificó en una columna C18 Aq de 30 g usando MeCN al 5-60%/H₂O (ambos con ácido acético al 0.05%). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para obtener el compuesto del título 15 (14 mg, 70%) como un

sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{48}H_{57}F_2N_9O_8S$, 957.4; encontrado 958.3 (M+H). 1H -RMN (500 MHz; $DMSO-d_6$): δ 10.04 (s, 1H), 8.14 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.14-7.12 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.75 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 6.02 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 5.71 (s, 1H), 5.67 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 5.46-5.40 (m, 3H), 5.23 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 5.05 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 4.47-4.37 (m, 3H), 4.20-4.17 (m, 1H), 4.05 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H), 3.96-3.94 (m, 1H), 3.66-3.63 (m, 1H), 3.21-3.15 (m, 2H), 3.03-2.88 (m, 4H), 2.20-2.09 (m, 2H), 2.00-1.96 (m, 1H), 1.72 (s, 3H), 1.62-1.54 (m, 3H), 1.51-1.41 (m, 3H), 1.38-1.27 (m, 5H), 1.26-1.21 (m, 3H), 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 0.84 (dd, $J = 14.1, 6.7$ Hz, 6H).

[00197] La síntesis del Compuesto **18** a partir de (R)-12-((S)-7,8-difluoro-6,11-dihidrodibenzo[b,e]tiepin-11-il)-7-hidroxi-3,4,12,12a-tetrahidro-1H-[1,4]oxazino[3,4-c]pirido[2,1-f][1,2,4]triazino-6,8-diona (**13**) se describe en el Esquema 4 a continuación.

Esquema 4

[00198] Compuesto **17**: Se añadió cloruro de tionilo (9 μL , 0.122 mmol) a una suspensión de Mal-cap-Val-Cit-PAB-OH (**16**) (35 mg, 0.061 mmol) en DCM anhidro (3 mL), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se concentró al vacío y se secó azeotrópicamente con tolueno (4 mL), luego se usó en el siguiente paso sin más purificación. MS (ESI, pos.): calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{ClN}_6\text{O}_6$, 590.3; encontrado 591.3 $\text{M}+\text{H}$).

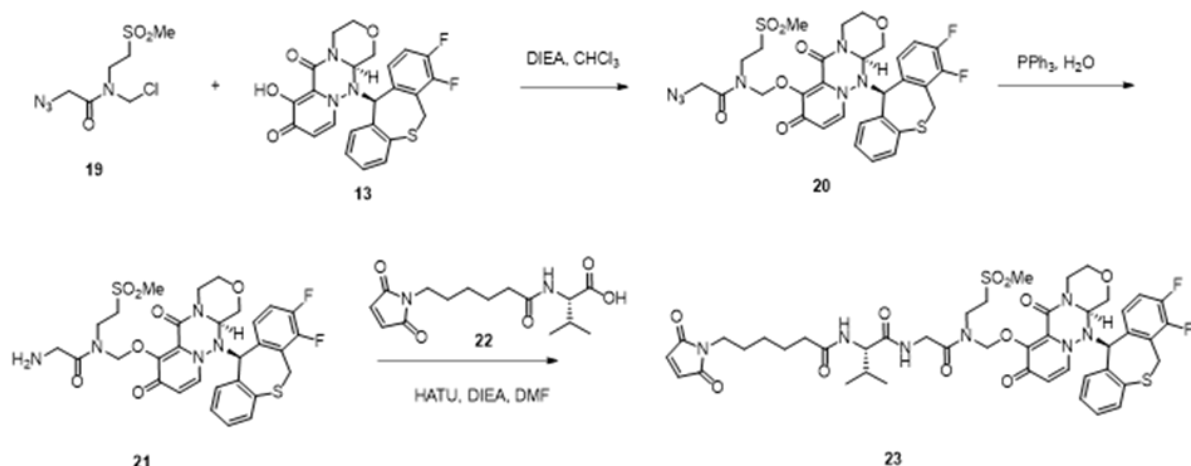
10 [00199] Compuesto **18**: se añadieron K_2CO_3 (41.5 mg, 0.3 mmol) y yoduro de sodio (9 mg, 0.06 mmol) a una solución de (R)-12-((S)-7,8-difluoro-6,11-dihidrodibenzo[b,e]tiepin-11-il)-7-hidroxi-3,4,12,12a-tetrahidro-1H-[1,4]oxazino[3,4-c]pirido[2,1-f][1,2,4]triazino-6,8-diona (**13**) (23 mg, 0.048 mmol) y Mal-cap-Val-Cit-PAB-Cl (**17**) (35 mg, 0.06 mmol) en DMF (2 mL). La reacción se calentó a 60 °C durante 1 h, luego se

15

enfrió a temperatura ambiente y se purificó en una columna C18 Aq de 30 g usando MeCN al 5-95%/H₂O (ambos con AcOH al 0.05%). Las fracciones puras se combinaron y liofilizaron para proporcionar el compuesto **18** (28 mg, 57%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₅₂H₅₇F₂N₉O₁₀S, 1037.4; encontrado 1038.3 (M+H). ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 10.00 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.43-7.39 (m, 2H), 7.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.13-7.06 (m, 2H), 7.01 (s, 2H), 6.87 (dd, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 6.76 (td, *J* = 7.2, 1.5 Hz, 1H), 5.97 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.72 (s, 1H), 5.68 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.45-5.42 (m, 3H), 5.24 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.49-4.39 (m, 3H), 4.20 (dd, *J* = 8.5, 6.8 Hz, 1H), 4.06 (d, *J* = 14.3 Hz, 1H), 3.96 (dd, *J* = 10.7, 2.5 Hz, 1H), 3.66 (dd, *J* = 11.3, 2.6 Hz, 1H), 3.04-2.89 (m, 3H), 2.15 (dt, *J* = 10.1, 7.3 Hz, 2H), 1.97 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.70-1.58 (m, 2H), 1.53-1.44 (m, 5H), 1.22 (m, 3H), 0.87-0.81 (m, 6H).

[00200] La síntesis del Compuesto **23** a partir de (R)-12-((S)-7,8-difluoro-6,11-dihidrodibenzo[b,e]tiepin-11-il)-7-hidroxi-3,4,12,12a-tetrahidro-1H-[1,4]oxazino[3,4-c]pirido[2,1-f][1,2,4]triazino-6,8-diona (**13**) se muestra en el Esquema 5 a continuación.

Esquema 5



[00201] Compuesto **20**: se añadió DIEA (41 μ L, 0.236 mmol) a una solución en cloroformo (0.5 mL) de (R)-12-((S)-7,8-difluoro-6,11-dihidrodibenzo[b,e]tiepin-11-il)-7-hidrox-

5 3,4,12,12a-tetrahidro-1H-[1,4]oxazino[3,4-c]pirido[2,1-f][1,2,4]triazino-6,8-diona (**13**) (30 mg, 0.044 mmol) y compuesto **19** (28.5 mg, 0.059 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 0.5 h, luego se purificó en una

10 columna de oro de sílice de 4 g usando 0-5% de MeOH/DCM para obtener el compuesto 20 (31 mg, 75%) como un sólido incoloro. MS (ESI, pos.): calculado para C₃₀H₂₉F₂N₇O₇S₂, 701.2; encontrado 702.1 (M+H).

[00202] Compuesto **21**: se añadió trifenilfosfina (28.8 mg, 0.11 mmol) a una solución del compuesto **20** (31 mg, 0.044

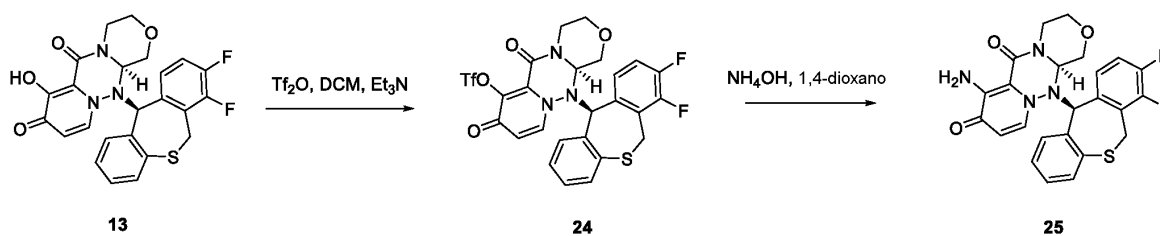
15 mmol) en THF/H₂O 10:1 (0.88 mL). Después de agitar durante 24 h a temperatura ambiente, la reacción se concentró a sequedad y se purificó en una columna C18 Aq de 5.5 g usando 5-95% de

MeCN/H₂O (ambos con 0.05% de AcOH) para obtener el compuesto **21** (20 mg, 68%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₃₀H₃₁F₂N₅O₇S₂, 675.2; encontrado 676.1 (M+H).

- 5 Compuesto **23**: se añadieron HATU (28.5 mg, 0.075 mmol) y DIEA (13 µL, 0.075 mmol) a una solución en DMF (1.0 mL) del compuesto **21** (20 mg, 0.030 mmol) y Mal-cap-Val-OH (**22**) (27.5 mg, 0.089 mmol). Después de agitar durante 1 h, la reacción se purificó en una columna C18 Aq de 30 g usando
- 10 MeCN al 5-95%/H₂O (ambos con AcOH al 0.05%). Las fracciones puras se combinaron y liofilizaron para obtener el compuesto **23** (4.5 mg, 16%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₄₅H₅₁F₂N₇O₁₁S₂, 967.3; encontrado 968.2 (M+H). ¹H-RMN (500 MHz; acetona-*d*₆): δ 7.63 (d, *J* = 5.0
- 15 Hz, 1H), 7.53-7.51 (m, 1H), 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 8.9, 8.5 Hz, 1H), 7.19 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.14 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 6.94 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.86 (s, 2H), 5.88 (s, 1H), 5.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.67-5.64 (m, 1H), 5.58 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 5.36 (d, *J*
- 20 = 10.3 Hz, 1H), 4.70 (dd, *J* = 9.5, 1.8 Hz, 1H), 4.63-4.61 (m, 1H), 4.52 (dd, *J* = 14.5, 5.1 Hz), 2H), 4.42-4.41 (m, 1H), 4.17-4.12 (m, 2H), 4.08-4.06 (m, 2H), 3.71 (t, *J* = 10.2 Hz, 2H), 3.61-3.59 (m, 1H), 3.54-3.42 (m, 5H), 3.05 (s, 3H), 3.02-3.01 (m, 1H), 2.29 (q, *J* = 6.7 Hz, 3H), 2.19 (m, *J* = 6.3
- 25 Hz, 1H), 1.67-1.57 (m, 4H), 1.31 (m, 5H), 0.97 (dd, *J* = 14.5,

6.7 Hz, 6H).

Esquema 6

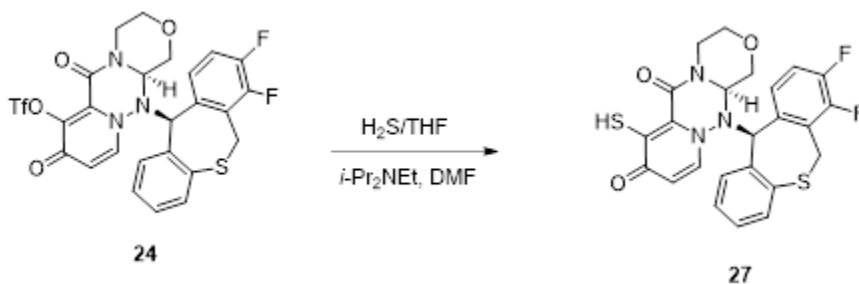


- [00203] Compuesto **24**: se añadieron trietilamina (17 μL , 0.12 mmol), anhídrido triflico (20 μL , 0.12 mmol) y DMAP (0.7 mg, 0.006 mmol) a una solución en DCM (2 mL) de (R)-12-((S)-7,8-difluoro-6,11-dihidrodibenzo[b,e]tiepin-11-il)-7-hidroxi-3,4,12,12a-tetrahidro-1H-[1,4]oxazino[3,4-c]pirido[2,1-f][1,2,4]triazino-6,8-diona (**13**) (29 mg, 0.06 mmol) a 0 °C. Después de agitar durante 1 h, la reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó en una columna de oro de sílice de 4 g usando acetato de etilo/hexanos para obtener el compuesto **24** (24 mg, 66%) como un sólido amarillento. MS (ESI, pos.): calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{F}_5\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$, 615.1; encontrado 616.0 (M+H).
- [00204] Compuesto **25**: se cargó un tubo de microondas con triflato **24** (24 mg, 0.04 mmol) en 1,4-dioxano anhidro (1 mL) y se añadió hidróxido de amonio acuoso (0.4 mL). La reacción se calentó a 80 °C durante 48 h. Los solventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se purificó en una columna C18 Aq de 15.5 g usando MeCN al 5-95%/agua (ambos con AcOH al 0.05%). Las fracciones puras se combinaron y liofilizaron

[00205] Compuesto **26**: se cargó un vial con triflato **24**
 15 (24.4 mg, 0.04 mmol) en DMF anhidro (1 mL) bajo argón y LiCl
 (5.2 mg, 0.12 mmol), Pd(PPh₃)₄ (2.3 mg, 0.002 mmol)), y se
 añadió Et₃SiH (19 µL, 0.12 mmol). La reacción se calentó a 65
 °C durante 2 h. La purificación en una columna C18 Aq de 15.5
 g usando MeCN al 5-95%/H₂O (ambos con AcOH al 0.05%)
 20 proporcionó el compuesto del título 26 (4.6 mg, 25%) como un
 sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para

$C_{24}H_{19}F_2N_3O_3S$, 467.1; encontrado 468.1 (M+H). 1H -RMN (500 MHz; $CDCl_3$): δ 7.30 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.18-7.10 (m, 3H), 7.06 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.02 (dd, $J = 7.6, 4.5$ Hz, 1H), 6.89 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.71-6.69 (m, 1H), 5.83 (dd, $J = 7.8, 3.0$ Hz, 1H), 5.34-5.30 (m, 2H), 4.68 (dd, $J = 13.5, 2.1$ Hz, 1H), 4.62 (dd, $J = 10.0, 3.0$ Hz, 1H), 4.09 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 3.98 (dd, $J = 11.0, 2.9$ Hz, 1H), 3.81 (dd, $J = 12.0, 3.2$ Hz, 1H), 3.56 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H), 3.44 (td, $J = 11.9, 2.6$ Hz, 1H), 3.01 (ddd, $J = 13.4, 12.0, 3.4$ Hz, 1H).

10

Esquema 8

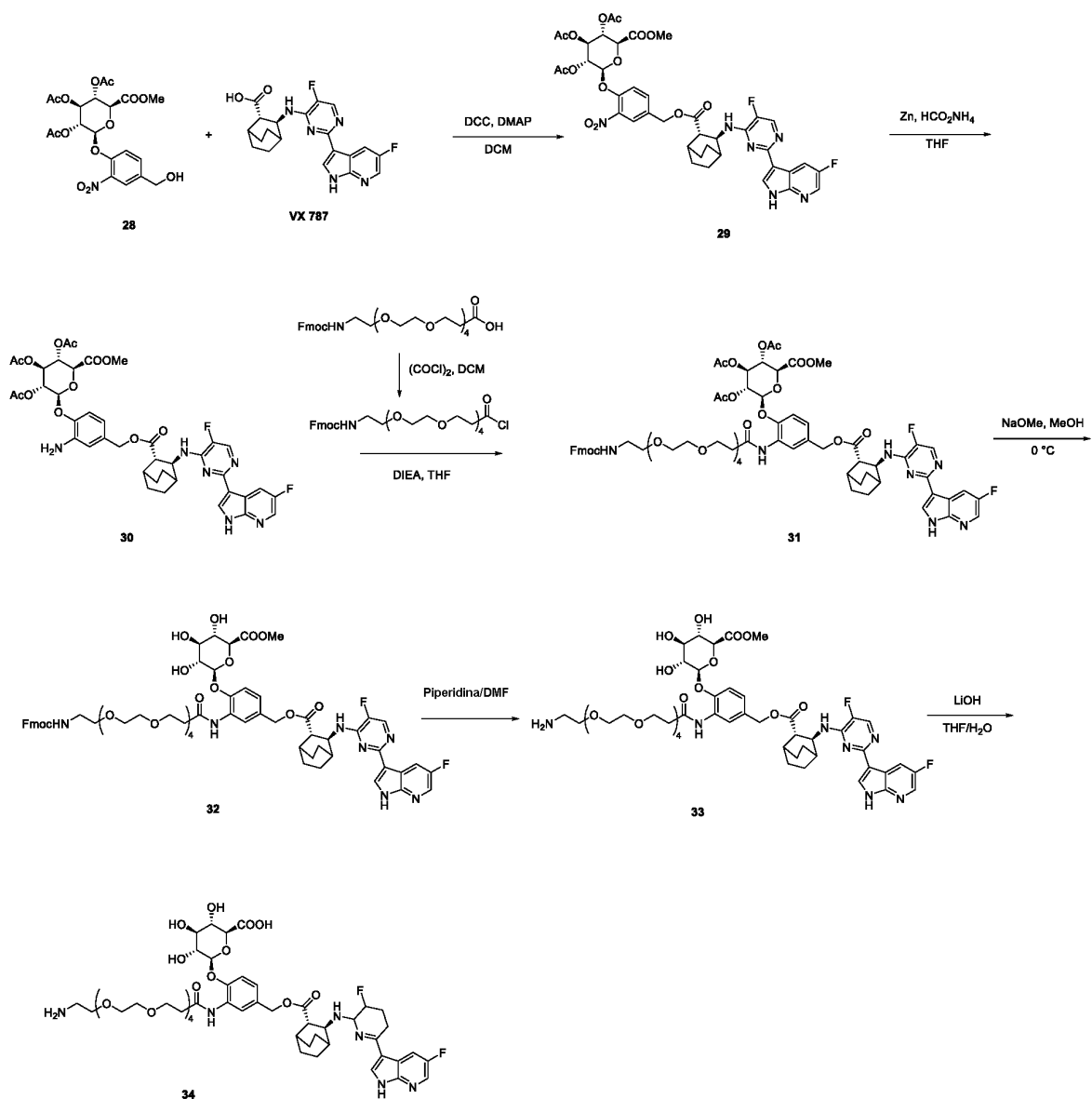
[00206] Compuesto **27**: se añadieron DIEA y solución de H_2S 0.8 M en THF (90 μ L, 0.072 mmol) a una solución de triflato **24** (15 mg, 0.024 mmol) en DMF (1 mL). Después de agitar durante 1 h, los volátiles se eliminaron al vacío y el residuo se purificó en una columna C18 Aq de 5.5 g usando MeCN al 5-95%/H₂O (ambos con AcOH al 0.05%). Las fracciones puras se combinaron y liofilizaron para obtener el compuesto del título **27** (7.0 mg, 58%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{24}H_{19}F_2N_3O_3S_2$, 499.1;

20

encontrado 500.1 (M+H). ^1H -RMN (500 MHz; CDCl_3): δ 7.17-7.11 (m, 4H), 7.01 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.88-6.83 (m, 1H), 6.65 (dd, $J = 28.7, 7.9$ Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.81 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.36 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.29 (dd, $J = 28.4, 14.0$ Hz, 1H), 4.74 (dd, $J = 12.8, 6.9$ Hz, 1H), 4.65-4.60 (m, 1H), 4.11 (dd, $J = 13.9, 7.8$ Hz, 1H), 3.99-3.96 (m, 1H), 3.81 (t, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.56 (td, $J = 10.7, 4.4$ Hz, 1H), 3.50-3.44 (m, 1H), 3.01 (t, $J = 12.7$ Hz, 1H).

Esquema 9

10



[00207] El Compuesto **28** se preparó siguiendo el procedimiento de la bibliografía de Bioconjugate Chemistry (2016), 27(10), 2549-2557.

[00208] Compuesto **29**: se añadió DCC (57 mg, 0.227 mmol) a
5 una solución del compuesto **28** (90 mg, 0.185 mmol), VX-787 (74 mg, 0.185 mmol) y DMAP (22 mg, 0.185 mmol) en DCM anhidro (8 mL). La mezcla se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. Los sólidos se filtraron y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó en Teledyne ISCO con 100 g de C18 Aq
10 usando 5-95% de MeCN/H₂O (ambos con 0.05% de AcOH). Las fracciones puras se combinaron y liofilizaron para proporcionar el compuesto del título **29** (120 mg, 75%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₄₀H₄₀F₂N₆O₁₄, 866.3; encontrado 867.3 (M+H).

15 [00208] Compuesto **30**: una solución en THF (10 mL) del compuesto **29** (120 mg, 0.138 mmol) se desoxigenó burbujeando nitrógeno durante 10 min. Se añadieron a esta solución polvo de zinc (180 mg, 2.76 mmol) y formiato de amonio (26 mg, 0.414 mmol). La reacción se desoxigenó nuevamente durante 5
20 min y se calentó a 60 °C durante 3.5 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, los sólidos se eliminaron por filtración y el filtrado se concentró al vacío para obtener el compuesto del título **30** (110 mg, 100%), que se usó en el siguiente paso sin más purificación. MS (ESI, pos.):
25 calculado para C₄₀H₄₂F₂N₆O₁₂, 836.3; encontrado 837.3 (M+H).

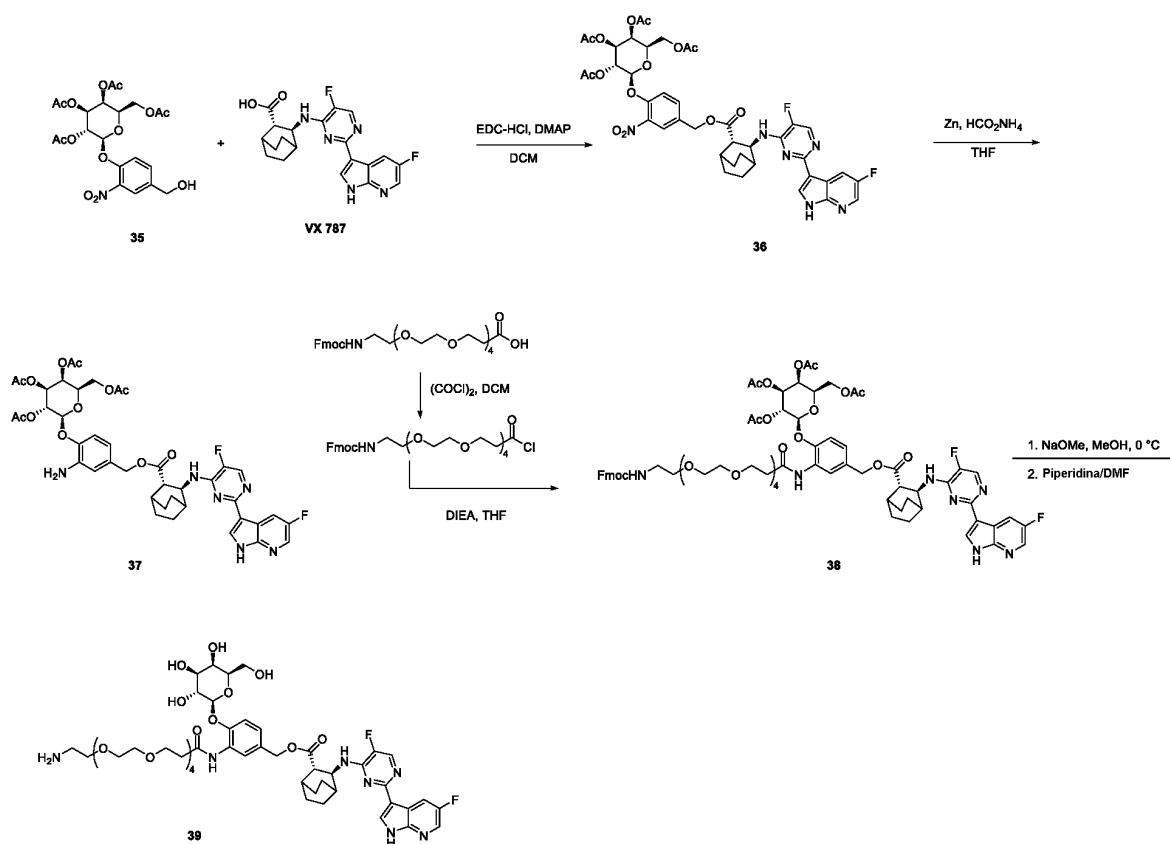
- [00210] Compuesto **31**: se añadieron cloruro de oxalilo (26 μ L, 0.304 mmol) y DMF (2 μ L) a una solución de ácido Fmoc-N-amido-PEG8 (100 mg, 0.152 mmol) en DCM anhidro (5 mL). Después de agitar durante 30 minutos, los volátiles se
- 5 eliminaron al vacío para obtener Fmoc-N-amido-PEG8-COCl. En un vial separado, el compuesto 30 (110 mg, 0.138 mmol) se disolvió en THF anhidro (3 mL) y se añadió DIEA (53 μ L, 0.304 mmol) seguido de una solución en THF (4 mL) de Fmoc-N-amido-PEG8-COCl. Después de 1 h, los solventes se eliminaron a
- 10 presión reducida y el residuo se purificó en Teledyne ISCO con 100 g de C18 Aq usando 5-95% de MeCN/H₂O (ambos con 0.05% de AcOH). Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron, congelaron y liofilizaron para obtener el compuesto del título **31** (86 mg, 53% de rendimiento con base
- 15 en el material de partida recuperado) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₇₄H₈₉F₂N₇O₂₃, 1481.6; encontrado 1482.6 (M+H).
- [00211] Compuesto **32**: a una solución del compuesto 31 (86 mg, 0.058 mmol) en MeOH (12 mL) a 0 °C, se le añadió una
- 20 solución 0.1 M de NaOMe en MeOH (1.16 mL, 0.116 mmol) y la reacción se agitó a 0 °C durante 1 h. La reacción se detuvo agregando resina Dowex®. La resina se filtró y el filtrado se concentró para dar el compuesto **32**, que se usó para el siguiente paso sin purificación.
- 25 [00212] Compuesto **33**: a una solución del compuesto 32

- (0.058 mmol) en DMF (3 mL), se añadió solución de piperidina al 5% en DMF (1.5 mL) y la reacción se agitó durante 45 min, luego se inyectó en un Teledyne ISCO 50 g de columna C18 Aq y eluida con 5-95% de MeCN/H₂O (ambos con 0.05% de AcOH como modificador). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para proporcionar el compuesto del título **33** (32 mg, 49% en dos pasos) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₅₃H₇₃F₂N₇O₁₈, 1133.5; encontrado 1134.4 (M+H).
- 10 [00213] Compuesto **34**: a una solución del compuesto 33 (32 mg, 0.028 mmol) en THF (2 mL) y agua (1 mL) a temperatura ambiente, se le añadió una solución 0.025 mM de LiOH en agua (1.1 mL, 0.028 mmol), y la reacción se agitó durante 2 h. Los volátiles se eliminaron a presión reducida y el residuo se
- 15 purificó en Teledyne ISCO con columna Gemini de 30 x 150 mm usando elución en gradiente 5-95% MeCN/H₂O (ambos con 0.05% de AcOH como modificador). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para obtener el compuesto del título **34** (26 mg, 82%) como un sólido
- 20 blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₅₂H₇₁F₂N₇O₁₈, 1119.5; encontrado 1120.4 (M+H). ¹H-RMN (500 MHz; DMSO-*d*₆): δ 9.19 (s, 1H), 8.47 (dd, *J* = 9.8, 2.8 Hz, 1H), 8.26 (m, 1H), 8.16-8.13 (m, 2H), 8.07 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.93 (dd, *J* = 8.3, 1.4
- 25 Hz, 1H), 5.60 (s, 1H), 5.02 (q, *J* = 17.4 Hz, 3H), 4.75 (t, *J*

= 6.9 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 3.68 (m, 2H), 3.51-3.46 (m, 32H), 2.98 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 2.89 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 2.68-2.61 (m, 2H), 2.00 (s, 1H), 1.92 (s, 1H), 1.80-1.72 (m, 4H), 1.63-1.61 (m, 1H), 1.53-1.43 (m, 5H).

5

Esquema 10



[00214] El Compuesto **35** se preparó siguiendo el procedimiento de la bibliografía de Bioconjugate Chemistry (2016), 27(10), 2549-2557.

10 [00215] Compuesto **36**: se añadieron EDC-HCl (67 mg, 0.350 mmol) y DMAP (34 mg, 0.278 mmol) a una mezcla de VX-787 (100 mg, 0.250 mmol) y el alcohol 37 (125 mg, 0.250 mmol) en CH₂Cl₂

(16 mL). Después de agitar durante 22 h a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con acetato de etilo (20 mL) y se lavó con H₂O (20 mL). La capa acuosa se extrajo con tres porciones de 20 mL de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de HCl 0.5 N (ac) (20 mL), luego con una solución saturada de NaHCO₃ (ac) (20 mL) y finalmente con salmuera (20 mL), luego se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. La purificación por cromatografía en 12 g de gel de sílice con 45-100% de acetato de etilo en hexanos proporcionó el compuesto 58b (149 mg, 67% de rendimiento, 82% de pureza), que se usó en el paso siguiente sin más purificación. MS (ESI, pos.): calculado para C₄₁H₄₂F₂N₆O₁₄, 880.27; encontrado 881.30 (M+H).

15 [00216] Compuesto **37**: una solución del Compuesto **36** (35 mg, 0.0397 mmol) en THF (1.5 mL) se desoxigenó burbujeando argón durante 5 min. Se añadió Zn en polvo (102 mg, 1.56 mmol) seguido de formiato de amonio (12 mg, 0.0190 mmol). Se burbujeó argón a través de la mezcla durante 3 min más, luego

20 la reacción se calentó bajo argón en un bloque circular a 60 °C durante 24 h. La reacción se filtró y los sólidos se lavaron con varias porciones de THF. El filtrado se concentró al vacío y después se purificó por cromatografía sobre 4 g de gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 40-100% en

25 hexanos para proporcionar el compuesto **37** (14 mg, 42%) como

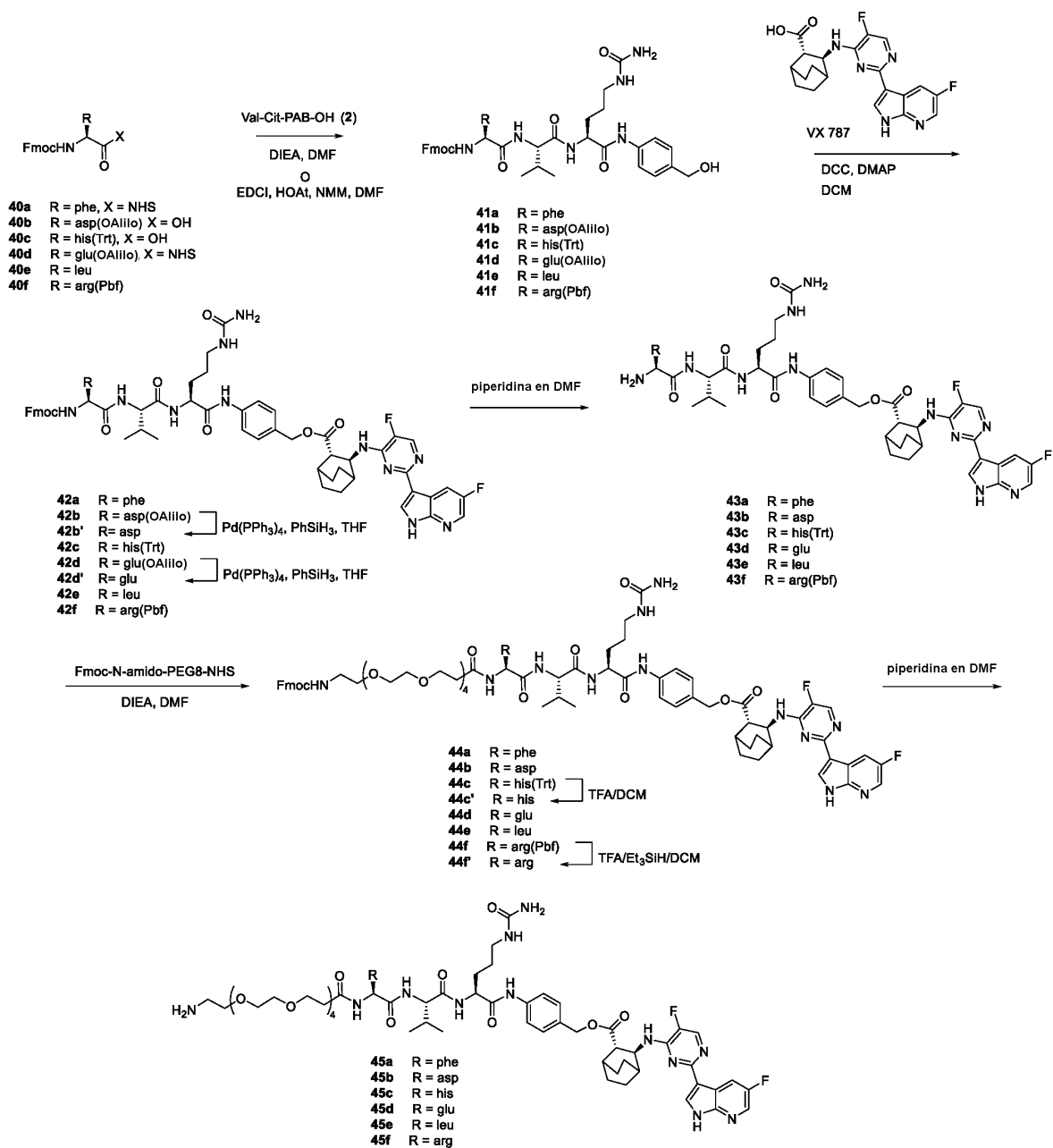
un sólido amarillo pálido. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{41}H_{44}F_2N_6O_{12}$, 850.30; encontrado 851.30 (M+H).

[00217] Compuesto **38**: se añadieron cloruro de oxalilo (8 μ L, 0.0933 mol) y DMF (2 μ L) a una solución de ácido Fmoc-N-amido-PEG8 (30 mg, 0.0452 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (1 mL). La solución de color amarillo brillante resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y luego se concentró al vacío. Al residuo resultante se le añadieron tres porciones de 1 mL de CH_2Cl_2 seco, concentrándose después de cada adición. En un vial separado, se añadió iPr_2NEt (16 μ L, 0.0918 mmol) a una suspensión del Compuesto **37** (20 mg, 0.0235 mmol) en CH_2Cl_2 (200 μ L). A esta mezcla se le añadió por goteo una solución del cloruro de ácido (0.0452 mmol) en CH_2Cl_2 (400 μ L). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h, la mezcla se concentró al vacío. El producto bruto se disolvió en DMSO y se cargó en una columna C18 Aq de 5.5 g, eluyendo con MeCN al 20-100% en H_2O con HOAc al 0.05% en ambos solventes. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y liofilizaron para dar el Compuesto **38** (7.3 mg, 21% de rendimiento) como un sólido blanco. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{75}H_{91}F_2N_7O_{23}$, 1495.61; encontrado 1496.60 (M+H).

[00217] Compuesto **39**: se añadió una solución de NaOMe/MeOH 0.1 M (13 μ L, 0.0013 mmol) a una solución a 0 °C del compuesto 38 (2.0 mg, 0.00134 mmol) en metanol anhidro (400 μ L). Después de agitar en un baño de hielo durante 4 h, la

reacción se neutralizó con una solución de HCl/MeOH 0.2 M
 (6.5 μ L, 0.0013 mmol) y se concentró al vacío. Se añadió
 CH₂Cl₂ (porciones de 0.5 mL) tres veces, concentrando la
 mezcla después de cada adición. El residuo resultante se
 5 disolvió en DMF anhidro (0.2 mL) y se trató con solución de
 piperidina/DMF al 10% (0.2 mL). Después de 30 min, la
 reacción se cargó en una columna C18 Aq de 5.5 g y se eluyó
 con MeCN al 0-100% en H₂O con TFA al 0.1% en ambos solventes.
 Las fracciones que contenían el producto limpio se combinaron
 10 y liofilizaron para dar la sal de TFA del compuesto 39 (1.1
 mg, 71%) como un sólido blanco. MS (ESI, pos.): calculado
 para C₅₂H₇₃F₂N₇O₁₇, 1105.50; encontrado 1106.50 (M+H). RMN ¹H
 (500 MHz; CD₃OD) δ 8.57 (dd, J = 9.5, 2.8 Hz, 1H), 8.17 (s,
 2H), 8.08 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 4.0 Hz), 1H),
 15 7.01 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.90-6.88 (m, 1H), 5.04 (s, 2H),
 4.92 (d, J = 1.9 Hz, 2H), 4.63 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 3.91 (d,
 J = 3.2 Hz, 1H), 3.83-3.74 (m, 6H), 3.66-3.53 (m, 30H), 2.92
 (dd, J = 6.6, 3.7 Hz, 2H), 2.83 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 2.64
 (td, J = 6.4, 3.4 Hz, 2H), 2.10 (t, J = 1.4 Hz, 1H), 1.96-
 20 1.81 (m, 4H), 1.74-1.64 (m, 2H), 1.55-1.50 (m, 2H).

Esquema 11



[00219] Compuesto **41a**: Procedimiento general A: A una solución en DMF (1.5 mL) de Fmoc-Phe-OSu (**40a**) (107 mg, 0.22 mmol) y sal de Val-Cit-PABA TFA (2) (99 mg, 0.2 mmol), se le

5 añadió N,N-diisopropiletilamina (105 μ L, 0.6 mmol). La

reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y luego se inyectó en una columna C18 Aq de 50 g y se eluyó con un gradiente de 5-95% de MeCN:H₂O (ambos con 0.05% de AcOH). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para proporcionar el compuesto del título **41a** (23 mg, 14%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₄₂H₄₈N₆O₇, 748.4; encontrado 749.3 (M+H).

[00220] Compuesto **41b**: Procedimiento general B: a una solución en DMF (1.5 mL) de Fmoc-Asp(OAllyl)-OH (**40b**) (83 mg, 0.21 mmol), sal Val-Cit-PABA.TFA (**2**) (99 mg, 0.2 mmol) y HOAt (41 mg, 0.3 mmol) se le añadieron NMM (66 µL, 0.6 mmol) y EDCI (48 mg, 0.25 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, luego se inyectó en una columna Teledyne ISCO 30 g C18 Aq. y se eluyó con 5-95% de MeCN/H₂O (ambos con 0.05% de AcOH). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para proporcionar el compuesto del título **41b** (85 mg, 56%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₄₀H₄₈N₆O₉, 756.3; encontrado 757.4 (M+H).

[00221] Compuesto **41c**: preparado por el procedimiento general B usando Fmoc-His(Trt)-OH (**40c**) (130 mg, 0.21 mmol). Rendimiento = 146 mg (74%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₅₈H₆₀N₈O₇, 980.5; encontrado 981.4 (M+H).

[00222] Compuesto **41d**: preparado por el procedimiento

general A usando Fmoc-Glu(OAllyl)-OSu (**40d**) (51 mg, 0.1 mmol). Rendimiento = 25 mg (33%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{27}H_{26}N_2O_8$, 506.2; encontrado 507.2 (M+H).

- 5 [00223] Compuesto **41e**: a una solución a 0 °C de Val-Cit-PABA (380 mg, 1.0 mmol) en DMA anhidra (5 mL) se le añadió FmocLeuOH (**40e**) (424 mg, 1.2 mmol), HOAt (170 mg, 1.2 mmol), EDC-HCl (240 mg, 1.2 mmol) y *N*-metilmorfolina (220 μ L, 2.0 mmol). Después de agitar en un baño de hielo durante 2.5 h,
- 10 la reacción se diluyó con H₂O (35 mL). El producto se recogió mediante filtración al vacío y se lavó tres veces con H₂O (porciones de 5 mL) y luego con seis porciones de 10-20 mL de acetato de etilo hasta que el análisis LCMS indicó que quedaba <5% de FmocLeuOH. Después de secar al vacío durante
- 15 la noche, el sólido blanco se trituroó hasta obtener un polvo y se secó de nuevo al vacío para proporcionar el compuesto **41e** (616 mg, 86%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{39}H_{50}N_6O_7$, 714.4; encontrado 715.4 (M+H).

- [00224] Compuesto **41f**: a una mezcla a 0 °C de Val-Cit-PABA
- 20 (200 mg, 0.527 mmol), FmocArg(Pbf)OH (**40f**) (410 mg, 0.632 mmol) y HOAt (86 mg, 0.632 mmol) en DMF anhidra (5 mL) se le añadieron *N*-metilmorfolina (90 μ L, 0.818 mmol) y EDC-HCl (120 mg, 0.626 mmol). La reacción se agitó en el baño de hielo durante 3 h, luego se cargó en una columna C₁₈ de 100 g y se
- 25 eluyó con MeCN al 10-60% en H₂O con HOAc al 0.05% en ambos

solventes. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y liofilizaron para dar el compuesto **41f** (345 mg, 65%) como un sólido blanco. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{52}H_{67}N_9O_{10}S$, 1009.47; encontrado 1010.40 (M+H).

- 5 [00225] Compuesto **42a**: Procedimiento general A: se añadieron VX-787 (11 mg, 0.026 mmol), DMAP (3.2 mg, 0.026 mmol) y DCC (8 mg, 0.039 mmol) a una solución en DCM (3 mL) de Fmoc-Phe-Val-Cit-PAB-OH (**41a**) (20 mg, 0.026 mmol). Después de agitar durante 5 h, se añadió más VX-787 (4 mg) y la
- 10 reacción se agitó durante 16 h y luego se concentró al vacío. El residuo se disolvió en DMSO (1 mL) y se purificó con una columna Teledyne ISCO en C18 Aq. de 15.5 g usando elución en gradiente 5-95% de MeCN/H₂O (ambos con 0.05% de AcOH). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron
- 15 para obtener el compuesto del título **42a** (10 mg, 50% de rendimiento con base en el material de partida recuperado) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{62}H_{65}F_2N_{11}O_8$, 1129.5; encontrado 1130.4 (M+H). También se recuperó 41a sin reaccionar (7 mg).
- 20 [00226] Compuesto **42b**: Procedimiento general B: se añadió EDCI (13.2 mg, 0.069 mmol) a una solución en DCM (6 mL) del compuesto **41b** (35 mg, 0.046 mmol), VX-787 (18.5 mg, 0.046 mmol) y DMAP (5.6 mg, 0.046 mmol) y la reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadió VX-787 adicional
- 25 (6 mg) y la reacción se agitó durante la noche. Los solventes

se eliminaron a presión reducida y el residuo se disolvió en DMF (1.5 mL) y se purificó con una columna Teledyne ISCO C₁₈ Aq de 30 g usando MeCN al 5-95%/H₂O (ambos con TFA al 0.05%). Las fracciones puras se combinaron y liofilizaron para
5 obtener el compuesto del título **42b** (23 mg, 44%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₆₀H₆₅F₂N₁₁O₁₀, 1137.5; encontrado 1138.4 (M+H).

[00227] Compuesto **42b'**: Pd(PPh₃)₄ (2.4 mg, 0.002 mmol) y fenilsilano (1 gota) se añadieron a una solución de THF (0.8
10 mL):DMF (0.4 mL) del compuesto **42b** (23 mg, 0.020 mmol).) y la reacción se agitó durante 30 min. Los volátiles se eliminaron al vacío para obtener el compuesto **42b'**, que se usó en el siguiente paso sin purificación.

[00228] Compuesto **42c**: sintetizado siguiendo el
15 Procedimiento general B usando el compuesto **41c** (39 mg, 0.04 mmol) para obtener el compuesto del título **42c** (30 mg, 55%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₇₈H₇₇F₂N₁₃O₈, 1361.6; encontrado 1362.4 (M+H).

[00229] Compuesto **42d**: sintetizado siguiendo el
20 Procedimiento general A usando el compuesto **41d** (15.4 mg, 0.02 mmol) para obtener el compuesto del título **42d** (13 mg, 57%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₆₁H₆₇F₂N₁₁O₁₀, 1151.5; encontrado 1152.4 (M+H).

[00230] Compuesto **42d'**: se añadieron Pd(PPh₃)₄ (1.3 mg,
25 0.001 mmol) y fenilsilano (2 µL, 0.0165 mmol) a una solución

en THF (1.5 mL)/DMF (0.5 mL) del compuesto **42d** (13 mg, 0.011 mmol) y la reacción se agitó durante 20 min. Los volátiles se eliminaron al vacío para obtener el compuesto **42d'** que se usó en el siguiente paso sin purificación.

- 5 [00231] Compuesto **42e**: Fmoc-Leu-Val-Cit-PABA (**41e**) (89 mg, 0.125 mmol), DMAP (30 mg, 0.245 mmol) y EDC-HCl (48 mg, 0.250 mmol) se añadieron a una solución de VX-787 (100 mg, 0.250 mmol) en THF:DMA 3:1 (3 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y luego se concentró al
- 10 vacío para eliminar el THF. La solución de DMA restante se cargó en una columna C18 Aq de 50 g y se eluyó con MeCN al 5-100% en H₂O con HOAc al 0.05% en ambos solventes. Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron y luego se volvieron a purificar mediante cromatografía en una
- 15 columna C18 Aq de 30 g, eluyendo con MeCN al 50-100% en H₂O con HOAc al 0.05% en ambos solventes. Después de la liofilización, se obtuvo el compuesto del título **42e** (37 mg, 24%) como un sólido blanco que era ~90% puro por LCMS. El producto se usó en el siguiente paso sin más purificación. MS
- 20 (ESI, pos.): calculado para C₅₉H₆₇F₂N₁₁O₈, 1095.51; encontrado 1096.50 (M+H).

- [00232] Compuesto **42f**: se añadieron DMAP (8 mg, 0.0655 mmol) y EDC-HCl (12 mg, 0.0626 mmol) a una solución del compuesto **41f** (31 mg, 0.0307 mmol) y VX-787 (25 mg, 0.0626 mmol)) en 3:1 THF:DMA (760 µL). Después de agitar a
- 25

temperatura ambiente durante 4 h, se eliminó el THF por concentración al vacío. La solución de DMA restante se cargó en una columna C18 Aq de 15.5 g y se eluyó con MeCN al 0-100% en H₂O con HOAc al 0.05% en ambos solventes. Las fracciones
5 que contenían el producto puro se combinaron y liofilizaron, proporcionando el compuesto **42f** (7 mg, 16%) como un sólido blanco. MS (ESI, pos.): calculado para C₇₂H₈₄F₂N₁₄O₁₁S, 1390.61; encontrado 1391.45 (M+H).

[00233] Procedimiento general para la eliminación de Fmoc:
10 Compuesto **43a**: se añadió piperidina al 5% en DMF (1 mL) a una solución en DMF (1 mL) del compuesto 42a (10 mg, 0.01 mmol) y la reacción se agitó durante 45 min. La reacción se inyectó en una columna Teledyne ISCO C18 Aq de 15.5 g y se eluyó con 5-95% de MeCN:H₂O (ambos con 0.05% de AcOH). Las fracciones
15 puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para obtener el compuesto del título **43a** (7 mg, 63%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₄₇H₅₅F₂N₁₁O₆, 907.4; encontrado 908.4 (M+H).

[00234] Compuesto **43b**: se siguió el procedimiento general
20 para la eliminación de Fmoc. Rendimiento = 78% a partir de **42b'** crudo como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₄₂H₅₁F₂N₁₁O₈, 875.4; encontrado 876.4 (M+H).

[00235] Compuesto **43c**: se siguió el procedimiento general
25 para la eliminación de Fmoc. Rendimiento = 53% a partir de

42c como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{66}H_{67}F_2N_{13}O_8$, 1139.5; encontrado 1140.4. (M+H).

[00236] Compuesto **43d**: se siguió el procedimiento general para la eliminación de Fmoc. Rendimiento = 59% a partir de

5 **42d'** como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{43}H_{53}F_2N_{11}O_8$, 889.4; encontrado 890.4 (M+H).

[00237] Compuesto **43e**: se añadió piperidina al 10% en DMF (400 μ L) a una solución del compuesto **42e** (20 mg, 0.0182 mmol) en DMF anhidra (400 μ L). Después de agitar a

10 temperatura ambiente durante 30 min, la reacción se cargó en una columna C18 Aq de 5.5 g y se eluyó con MeCN al 5-25% en H_2O con TFA al 0.1% en ambos solventes. Las fracciones puras se combinaron y liofilizaron para dar la sal de TFA del compuesto **43e** (13 mg, 72%) como un sólido blanco. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{44}H_{57}F_2N_{11}O_6$, 873.45; encontrado 874.40 (M+H).

[00238] Compuesto **43f**: solución de piperidina/DMF al 10% (100 μ L) se añadió a una solución del compuesto **42f** (6.8 mg, 0.00489 mmol) en DMF (100 μ L). Después de agitar a

20 temperatura ambiente durante 1 h, la solución se cargó en una columna C18 Aq de 5.5 g y se eluyó con MeCN al 0-100% en H_2O con HOAc al 0.05% en ambos solventes. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y liofilizaron para proporcionar el compuesto **43f** (5.2 mg, 91%) como un sólido

25 blanco. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{57}H_{74}F_2N_{14}O_9S$, 1168.55;

encontrado 1169.40 (M+H).

[00239] Procedimiento general para instalar Fmoc-N-amido-PEG8: Compuesto **44a**: A una solución en DMF (1 mL) del compuesto **43a** (7 mg, 0.008 mmol), éster de Fmoc-N-amido-PEG8-NHS (7 mg, 0.009 mmol) seguido de *N,N*-diisopropiletilamina (4 μ L, 0.023 mmol) y la reacción se agitó durante 2 h. El producto se purificó en Teledyne ISCO con una columna de 15.5 g C18 Aq usando elución en gradiente 5-95% MeCN/H₂O (ambos con 0.05% AcOH). Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para obtener el compuesto del título **44a** (5 mg, 42%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₈₁H₁₀₂F₂N₁₂O₁₇, 1552.7; encontrado 1553.7 (M+H).

[00240] Compuesto **44b**: se siguió el procedimiento general para instalar Fmoc-N-amido-PEG8. Rendimiento = 61% a partir de **43b** como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₇₆H₉₈F₂N₁₂O₁₉, 1520.7; encontrado 1521.4 (M+H).

[00241] Compuesto **44c**: se siguió el procedimiento general para instalar Fmoc-N-amido-PEG8. Rendimiento = 83% a partir de **43c** como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₉₇H₁₁₄F₂N₁₄O₁₇, 1784.4; encontrado 1785.6 (M+H).

[00242] Compuesto **44c'**: a una solución en DCM (2 mL) del compuesto **44c** (17 mg, 0.0073 mmol), se le añadió TFA (0.2 mL), después de agitar durante 3 h, la reacción se diluyó con MeOH (3 mL) y los volátiles se eliminaron al vacío. El

residuo se disolvió en MeCN:H₂O 1:1 (1.5 mL) y DMSO (0.2 mL) y se inyectó en una columna Teledyne ISCO 15.5 g C18 Aq y se eluyó usando un gradiente de elución de MeCN:H₂O al 5-95% (ambos con 10 mmol de acetato de amonio como modificador).

- 5 Las fracciones puras se combinaron, congelaron y liofilizaron para obtener el compuesto del título **44c'** (12 mg, 82%) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₇₈H₁₀₀F₂N₁₄O₁₇, 1542.7; encontrado 1543.8 (M+H).

- [00243] Compuesto **44d**: preparado siguiendo el procedimiento
10 general usando **43d**. El producto **44d** se usó en el siguiente paso sin purificación.

- [00244] Compuesto **44e**: iPr₂NEt (15 µL, 0.0861 mmol) se añadió a una solución de sal del compuesto **43e**-TFA (20 mg, 0.0206 mmol) y éster de Fmoc-N-amido-PEG8-NHS (20 mg, 0.0263
15 mmol) en DMA anhidro (400 µL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, la reacción se cargó en una columna C18 Aq de 15.5 g y se eluyó con MeCN al 10-100% en H₂O con TFA al 0.1% en ambos solventes. Las fracciones puras se combinaron y liofilizaron, proporcionando el compuesto **44e**
20 (13 mg, 42%) como un sólido blanco. MS (ESI, pos.): calculado para C₇₈H₁₀₄F₂N₁₂O₁₇, 1518.76; encontrado 1519.70 (M+H).

- [00245] Compuesto **44f**: a una solución del compuesto **43f** (7 mg, 0.00599 mmol) en DMF anhidra (100 µL) se le añadió una solución al 10% de iPr₂NEt en DMF (33 µL) seguido de éster
25 Fmoc-N-amido-PEG8-NHS (6 mg, 0.00789 mmol) en DMF anhidro

(100 μ L). Después de 1 h, la LCMS indicó una reacción incompleta. Se añadió éster de Fmoc-N-amido-PEG8-NHS adicional (25 μ L de una solución al 6% en DMF) y la reacción se agitó durante 2 h más para completar la reacción. La purificación por cromatografía en una columna C18 Aq ISCO de 5.5 g con MeCN al 0-100% en H₂O con HOAc al 0.05% en ambos solventes, seguido de la liofilización de las fracciones puras proporcionó el compuesto **44f** (9 mg, 82%) como un sólido blanco. MS (ESI, pos.): calculado para C₉₁H₁₂₁F₂N₁₅O₂₀S, 1814.0; encontrado 1815.7 (M+H).

[00246] Compuesto **45a**: siguiendo el procedimiento general para la eliminación de Fmoc, se preparó el compuesto del título **45a** a partir de **44a** con un rendimiento del 93% como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para C₆₆H₉₂F₂N₁₂O₁₅, 1330.7; encontrado 1331.6 (M+H). ¹H-RMN (500 MHz; DMSO-*d*₆): δ 10.02 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 8.48 (dd, J = 9.8, 2.8 Hz, 1H), 8.26 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.14 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.85 (s, 1H) 7.60 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.23-7.18 (m, 6H), 7.18-7.14 (m, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.07 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.98 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.74 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 4.60-4.56 (m, 1H), 4.38-4.35 (m, 1H), 4.20 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 3.48-3.47 (m, 25H), 3.41 (m, 2H), 3.39-3.34 (m, 4H), 3.02-2.96 (m, 6H), 2.77-2.74 (m, 1H), 2.65- 2.62 (m, 3H), 2.37-2.33 (m, 1H), 2.28 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 1.97-1.94 (m,

3H), 1.80-1.60 (m, 6H), 1.50-1.36 (m, 6H), 0.84 (dd, $J = 15.0, 6.7$ Hz, 6H).

[00247] Compuesto **45b**: siguiendo el procedimiento general para la eliminación de Fmoc, se preparó el compuesto del
 5 título **45b** a partir de **44b** con un rendimiento del 69% como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{61}H_{88}F_2N_{12}O_{17}$, 1298.6; encontrado 1299.5 (M+H). 1H -RMN (500 MHz; DMSO- d_6): δ 9.33 (s, 1H), 9.16 (dd, $J = 6.3, 0.8$ Hz, 1H), 8.48 (dd, $J = 9.8, 2.8$ Hz, 1H), 8.42- 8.41 (m, 1H), 8.26
 10 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.14 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.71-7.70 (m, 2H), 7.61-7.60 (m, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.21 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 5.03 (m, 2H), 4.74-4.70 (m, 2H), 4.02 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 3.93-3.91 (m, 1H), 3.60-3.53 (m, 3H), 3.53-3.42 (m, 35H), 2.99-2.95 (m,
 15 3H), 2.81-2.79 (m, 2H), 2.37-2.34 (m, 2H), 2.26-2.23 (m, 2H), 1.97-1.92 (m, 3H), 1.80-1.71 (m, 3H), 1.65-1.61 (m, 2H), 1.52-1.42 (m, 6H), 1.22 (d, $J = 0.3$ Hz, 1H), 0.92 (dd, $J = 9.6, 7.1$ Hz, 6H).

[00248] Compuesto **45c**: siguiendo el procedimiento general
 20 para la eliminación de Fmoc, se preparó el compuesto del título **45c** a partir de **44c'** con un rendimiento del 89% como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{63}H_{90}F_2N_{14}O_{15}$, 1320.7; encontrado 1322.0 (M+H). 1H -RMN (500 MHz; DMSO- d_6): δ 12.35 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 10.03 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.47 (dd, $J = 9.7, 2.8$ Hz, 1H), 8.29 (d, J
 25

- = 7.6 Hz, 2H), 8.24 (dd, J = 5.3, 2.3 Hz, 2H), 8.20 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.75-7.69 (m, 2H), 7.51 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.22 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.09-6.07 (m, 1H), 5.03 (m, 2H), 4.78-4.75 (m, 1H), 4.69
- 5 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 4.40-4.37 (m, 1H), 4.22-4.19 (m, 2H), 3.50 (s, 16H), 3.50 (s, 5H), 3.48 (d, J = 4.2 Hz, 7H), 3.46-3.41 (m, 5H), 3.07-2.90 (m, 8H), 2.37-2.34 (m, 2H), 2.00-1.94 (m, 3H), 1.80-1.70 (m, 3H), 1.70-1.56 (m, 3H), 1.51-1.35 (m, 6H), 0.84 (dd, J = 17.7, 6.8 Hz, 6H).
- 10 [00249] Compuesto **45d**: siguiendo el procedimiento general para la eliminación de Fmoc, se preparó el compuesto del título **45d** a partir de **44** sin purificar con un rendimiento del 47% (en dos pasos) como un sólido blanquecino esponjoso. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{62}H_{90}F_2N_{12}O_{17}$, 1312.7; encontrado 1313.6 (M+H). 1H -RMN (500 MHz; DMSO- d_6): δ 10.01 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.49-8.47 (m, 1H), 8.30-8.26 (m, 2H), 8.18-8.14 (m, 2H), 7.90 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.65 (s, 1H), 5.68 (s, 2H), 5.02 (m, 2H), 4.74 (t, J = 5.7
- 15 Hz, 1H), 4.28 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.18 (dd, J = 8.1, 5.6 Hz, 1H), 3.51 (m, 32H), 2.95 (d, J = 5.7 Hz, 4H), 2.75-2.74 (m, 2H), 2.42-2.29 (m, 3H), 2.11- 2.04 (m, 3H), 1.97-1.93 (m, 2H), 1.82-1.61 (m, 8H), 1.49-1.37 (m, 6H), 1.22 (s, 3H), 0.82 (dd, J = 12.6, 6.6 Hz, 6H).
- 20
- 25 [00250] Compuesto **45e**: se añadió piperidina al 10% en DMF

(100 μ L) a una solución del compuesto **44e** (16 mg, 0.0153 mmol) en DMF (100 μ L). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 min, la reacción se cargó en una columna C18 Aq de 5.5 g y se eluyó con MeCN al 5-100% en H₂O con TFA al 0.1% en ambos solventes. Las fracciones limpias se liofilizaron, proporcionando la sal de TFA del compuesto **45e** (7 mg, 47%) como un sólido blanco. MS (ESI, pos.): calculado para C₆₃H₉₄F₂N₁₂O₁₅, 1296.69; encontrado 1297.60 (M+H). RMN ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ 10.00 (br s, 1H), 8.48 (dd, *J* = 9.8, 2.6 Hz, 1H), 8.27 (m, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.16-8.14 (m, 1H), 8.11-8.04 (m, 2H), 7.71-7.69 (m, 1H), 7.63-7.61 (m, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.55 (br s, 1H), 5.98-5.96 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.07 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.98 (d, 1H), 4.75-4.72 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 4.37-4.32 (m, 2H), 4.16 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.58-3.43 (m, 32H), 3.04-2.93 (m, 4H), 2.69 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.43-2.29 (m, 2H), 1.97-1.92 (m, 3H), 1.83-1.31 (m, 16H), 0.86-0.78 (m, 12H).

[00251] Compuesto **45f**: a una suspensión del Compuesto **44f** (4 mg, 0.0022 mmol) en CH₂Cl₂ (50 μ L) se le añadió triisopropilsilano (5 μ L) seguido de TFA (50 μ L). Después de agitar a temperatura ambiente durante 90 min, la reacción se concentró al vacío. El residuo se diluyó con CH₂Cl₂ (200 μ L) y se concentró. El producto se diluyó tres veces más con CH₂Cl₂ (porciones de 200 μ L), concentrando cada vez. La espuma amarilla resultante (compuesto **44f'**) se trató con piperidina

al 5% en DMF (100 μ L). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h, la reacción se cargó en una columna C18 Aq de 5.5 g y se eluyó con MeCN al 0-100% en H₂O con TFA al 0.1% en ambos solventes. Las fracciones que contenían el

5 producto puro se combinaron y liofilizaron para dar la sal de TFA del compuesto **45f** (1 mg, 47%) como un sólido blanco. MS (ESI, pos.): calculado para C₆₃H₉₅F₂N₁₅O₁₅, 1339.7; encontrado 1340.5 (M+H). RMN ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ 12.25 (br s, 1H), 10.00 (br s, 1H), 8.48 (dd, *J* = 9.7, 2.8 Hz, 1H), 8.27 (dd, *J*

10 = 2.6, 1.3 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 8.13 (br d, *J* = 7 Hz, 1H), 8.09 (br d, *J* = 7 Hz, 1H), 7.76 (br s, 2H), 7.74 (br d, *J* = 9 Hz, 1H), 7.61 (br d *J* = 7 Hz, 1H), 7.55-7.50 (m, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.05 (br s, 1H), 5.47 (br s, 2H), 5.08 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H),

15 4.99 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.76 -4.73 (m, 1H), 4.38-4.33 (m, 2H), 4.21-4.18 (m, 1H), 3.59-3.54 (m, 12H), 3.49 (t, *J* = 10.5 Hz, 30H), 3.10-3.03 (m, 3H), 2.96-2.95 (m, 6H), 2.41-2.34 (m, 2H), 2.00-1.94 (m, 3H), 1.80-1.62 (m, 2H), 1.53-1.28 (m, 6H), 0.85-0.81 (m, 6H).

20

Ejemplo 2: Síntesis de conjugado de fármaco de anticuerpo no citotóxico anti-hemaglutinina

[00252] Los conjugados de fármaco y anticuerpo no citotóxico anti-hemaglutinina se sintetizaron como se describe a continuación.

25

[00253] Se mutó el anticuerpo monoclonal anti-hemaglutinina (anti-HA) mAb11729 para introducir una secuencia de pentapéptido consenso LLQGA (SEQ ID NO: 297) en el extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera. La mutación permitió
5 que los anticuerpos se conjugaran enzimáticamente hasta una carga máxima de 2 en las cadenas pesadas (una en cada cadena pesada). Un mAb que no se une a HA (derivado de un antígeno inmunológico que no tiene relación con enfermedades infecciosas) que contiene la misma secuencia consenso en el
10 extremo C-terminal de la cadena pesada se usó como control de isotipo de no unión.

[00254] Se desglicosilaron mAb11729 nativo y el anticuerpo de control de isotipo usando 400 U/mg de mAb de PNGaseF (NEB P0704L) en PBS pH 7.4 a 37 °C durante la noche.
15 Posteriormente, la mezcla de reacción se cambió de regulador de pH a PBS pH 7.4 usando filtros giratorios (Amicon, corte de 30 kDa). Este procedimiento permitió que los anticuerpos se conjugaran enzimáticamente hasta una carga máxima de 2 en el sitio Q295 de las cadenas pesadas.

20 [00255] Se mutó un segundo anticuerpo monoclonal anti-hemaglutinina (N3H2) mAb5385 (tal como se describe en J Virology 2014, vol 88, 7130-7144) para introducir una secuencia de pentapéptido consenso ELQGP (SEQ ID NO: 310) en el extremo C-terminal de la cadena pesada o GGGGSGELQRP (SEQ
25 ID NO: 311) en el extremo C-terminal de la cadena ligera. La

mutación permitió que los anticuerpos se conjugaran enzimáticamente hasta una carga máxima de dos. Se usó un mAb que no se une a HA (derivado de un antígeno inmunológico que no tiene relación con enfermedades infecciosas) que contiene
5 las mismas secuencias consenso en el extremo C-terminal de la cadena pesada o el extremo C-terminal de la cadena ligera como control de isotipo de no unión.

[00256] Los anticuerpos con un sitio de conjugación en el extremo C-terminal de la cadena pesada o en el sitio Q295 se
10 conjugaron a 1 mg/mL en PBS pH 7.4. Se añadió el compuesto 6 u 11 (ambos compuestos por VX-787, pero con diferentes enlazadores) en un exceso molar de 10-40 veces sobre el anticuerpo y la reacción enzimática se inició mediante la adición de 14 unidades de transglutaminasa bacteriana
15 (Zedira, T1001) por mg de anticuerpo y se incubó a 37 °C durante 16 horas. Los conjugados se purificaron mediante cromatografía de Proteína A (Pierce Protein A Columns, ThermoScientific, producto n° 20356). Los conjugados fueron analizados por ESI-MS para la determinación de la relación
20 carga útil:anticuerpo (DAR) usando un Waters Acquity UPLC. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C4 (2.1 X 50 mm ACQUITY UPLC BEH protein C4, 1.7 um, 300 A) en un gradiente de 10 min (minuto:porcentaje de fase móvil B; 0:10%, 1:10%, 5:90%, 7:90%, 7.2:10%, 10:10%). La fase móvil A
25 era ácido fórmico al 0.1% en agua y la fase móvil B era ácido

fórmico al 0.1% en acetonitrilo. El caudal se fijó en 0.3 mL/min. El escaneo TOF del detector se configuró desde m/z 500-4500 con los principales parámetros enumerados (voltaje capilar 3.0 kV; cono de muestreo 80 V; compensación de fuente a 100 V; temperaturas de fuente 150 °C; temperatura de desolvatación 450 °C; gas de cono 0 L/ hr; Gas de desolvatación 800 L/hr). Los espectros se desconvolucionaron con la función MaxEnt dentro del software MassLynx. Los iones moleculares resultantes, que cuando se pesaron de acuerdo con las intensidades, correspondieron a las cargas enumeradas en las Tablas 3 y 4. Los espectros de espectro de masas reales se representan en la figura 1 y la figura 2. Como alternativa, para determinar la carga de las cargas útiles en el anticuerpo, los conjugados se procesaron en Agilent 1260 usando una columna TSK-NPR Butyl HIC (cromatografía de interacción hidrofóbica) usando un gradiente lineal de fosfato de potasio 1 M pH 8.5 en agua durante 60 min. La carga útil se determinó mediante la integración de las áreas de los picos correspondientes a las especies de anticuerpo conjugado y no conjugado. Las proporciones de carga útil:anticuerpo se indican en la Tabla 5. La HPLC de exclusión por tamaño estableció que todos los conjugados eran >92% monoméricos (Tabla 5). Este procedimiento produjo un conjugado de anticuerpo-fármaco no citotóxico mAb11729-VX-787 (ncADC) con mAb11729 conjugado con el compuesto 11 a través

del pentapéptido LLQGA (SEQ ID NO: 297) en el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo ("11729-HC-Cterm-**11**"), un mAb11729-VX-787 ncADC con mAb11729 conjugado con el compuesto **11** a través del pentapéptido LLQGA (SEQ ID NO: 297) en el extremo N de la cadena pesada del anticuerpo ("11729-HC-Nterm-**11**"), un mAb11729-VX-787 ncADC con mAb11729 conjugado con el compuesto **11** mediante LLQGA (SEQ ID NO: 297) pentapéptido en el extremo C de la cadena ligera del anticuerpo ("11729-LC-Cterm-**11**"), un mAb11729-VX-787 ncADC con mAb11729 conjugado con el compuesto **11** a través del pentapéptido LLQGA (SEQ ID NO: 297) en el extremo N de la cadena ligera del anticuerpo ("11729-LC-Nterm-**11**"), un mAb11729-VX-787 ncADC con el compuesto **11** conjugado con el sitio Q295 ("11729-Q295-**11**"), un anticuerpo de control de isotipo con el compuesto **11** conjugado en el extremo C de la cadena pesada a través del pentapéptido LLQGA (SEQ ID NO: 297) ("Control de isotipo-HC-Cterm-**11**"), un control de isotipo antibody con el compuesto **11** conjugado en el sitio Q295 ("Control de isotipo-Q295-**11**"), un mAb11729-VX-787 ncADC con el compuesto **6** conjugado en el sitio Q295 ("11729-Q295-**6**"), un anticuerpo de Control de isotipo con compuesto **6** conjugado en el extremo C de la cadena pesada a través del pentapéptido LLQGA (SEQ ID NO: 297) ("Control de isotipo-HC-Cterm-**6**"), un anticuerpo de control de isotipo con el compuesto **6** conjugado en el sitio Q295 ("Control de isotipo-

Q295-6"), un mAb11729-baloxavir ncADC con el compuesto 15 conjugado en el extremo C de la cadena pesada de mAb11729 a través del pentapéptido LLQGA (SEQ ID NO: 297) ("11729-HC-Cterm-15"), y un control de isotipo anticuerpo con el
5 compuesto 15 conjugado en el extremo C de la cadena pesada ("Control de isotipo-HC-Cterm-15").

[00257] Se trataron mAb11729 nativo y los anticuerpos de control de isotipo (1-10 mg/mL) en HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5, con ditiotreitól 1 mM a 37 °C durante 30 min. Después
10 de la filtración en gel (G-25, acetato de sodio pH 4.5), se añadió al anticuerpo reducido el derivado del enlazador-carga útil de maleimido compuesto 18 (1.2 equivalentes/grupo SH) en DMSO (10 mg/mL) y la mezcla se ajustó a pH 7.0 con HEPES 1 M (pH 7.4). Los conjugados se purificaron usando PBS con
15 glicerol al 5% mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se filtraron en condiciones estériles. Las concentraciones de proteína y las proporciones de carga útil a anticuerpo se determinaron mediante análisis espectral UV. La HPLC de exclusión por tamaño estableció que todos los conjugados
20 usados eran >95% monoméricos. Todos los anticuerpos conjugados se analizaron mediante espectroscopia de masas para determinar los valores de enlazador-carga útil. Las proporciones de carga útil a anticuerpo se informan en la Tabla 6.

25 [00258] La Tabla 3, la Tabla 4 y la Tabla 5 contienen los

datos de carga (ESI-MS DAR) para ciertos conjugados. Los compuestos conjugados de transglutaminasa **11** y **15** produjeron DAR que se acercaban al valor teórico de 2. La Tabla 6 contiene una lista de valores de pureza y DAR para ncADC.

5

Tabla 3. Resumen de cargas de carga útil promedio ponderadas por intensidad en 11729-Q295-**11** y Control de isotipo-Q295-**11**.

11729-Q295-11				Control de isotipo-Q295-11			
PM de ión molecula r (Da)	Carga de carga útil correspondient e	Intensida d relativa	Carga promedio ponderad a de intensida d (DAR)	PM de ión molecula r (DA)	Carga de carga útil correspondient e	Intensida d relativa	Carga promed io pondera da de intensid ad (DAR)
146213	1	1189372	1.8	146576	1	481468	1.8
147389	2	4359378		147751	2	2082263	

10

Tabla 4. Resumen de cargas de carga útil promedio ponderadas por intensidad en 11729-HC-Cterm-**11** y Control de isotipo-HC-Cterm-**11**.

11729-HC-Cterm-11				Control de isotipo-HC-Cterm-11			
PM de ión molecula r (Da)	Carga de carga útil correspondient e	Intensida d relativa	Carga promedio ponderad a de intensida d (DAR)	PM de ión molecula r (DA)	Carga de carga útil correspondient e	Intensida d relativa	Carga prome dio ponder ada de intensi

							dad (DAR)
149921	1	149921	2.1	150436	1	70561	2.0
151216	2	1469952		151600	2	1104199	
152381	3	460892		152765	3	91528	

Tabla 5. Resumen de cargas de carga útil promedio ponderadas por intensidad en 11729-HC-Cterm-**15** y Control de isotipo-HC-Cterm-**15**.

11729-HC-Cterm-15				Control Isotype-HC-Cterm-15			
PM de ión molecula r (Da)	Carga de carga útil correspo ndiente	Intensidad relativa	Carga promedio ponderad a de intensidad (DAR)	PM de ión molecular (DA)	Carga de carga útil correspon diente	Intensidad relativa	Carga promedio ponderada de intensidad (DAR)
150062	1	66018	1.9	150206	1	160152	1.9
151013	2	217666		151146	2	265624	
151952	3	38052		152088	3	99316	

5 **Tabla 6.** Pureza (por SEC) y DAR de conjugados de los compuestos **6**, **11** y **15**.

Conjugado anticuerpo-fármaco	Proporción de fármaco a anticuerpo (DAR, ESI- MS)	Proporción de fármaco a anticuerpo (DAR, HIC)	Pureza (por SEC)
11729-Q295- 6	-	0.7	>95%

Control de isotipo-Q295- 6	-	1.1	>95%
11729-Q295- 11	1.8	-	92.6%
Control de isotipo-Q295- 11	1.8	-	96.4%
11729-HC-Cterm- 11	2.1	-	95.8%
Control de isotipo-HC-Cterm- 11	2.0	-	97.1%
11729-HC-Cterm- 15	1.9	-	97.8%
Control de isotipo-HC-Cterm- 15	1.9	-	94.7%
11729- 18	6.1	-	98%
Control de isotipo- 18	7.5	-	97%
11729-HC-Cterm- 34	2.1	-	97%
Control de isotipo-HC-Cterm- 34	1.3	-	99%
11729-HC-Cterm- 39	1.5	-	98%
Control de isotipo-HC-Cterm- 39	1.0	-	98%
11729-HC-Cterm- 45a	1.4	-	98%
Control de isotipo-HC-Cterm- 45a	1.7	-	94%
11729-HC-Cterm- 45b	1.4	-	96%
Control de isotipo-HC-Cterm- 45b	1.4	-	95%
11729-HC-Cterm- 45c	1.4	-	99%
Control de isotipo-HC-Cterm- 45c	2.0	-	95%
11729-HC-Cterm- 45d	1.1	-	96%
Control de isotipo-HC-Cterm- 45d	1.0	-	95%
F005-126-HC-Cterm- 11	1.6	-	>97%

Control de isotipo-HC-Cterm-11	1.7	-	>95%
F005-126-LC-Cterm-11	1.6	-	>98%
Control de isotipo-LC-Cterm-11	1.7	-	>98%

Ejemplo 3: ELISA de unión a células infectadas con anti-HA y ensayo de eficacia antiviral de fármacos

[00259] Se sembraron células MDCK London a 40,000 células/pocillo en 50 µL de medio de infección (DMEM (Life Technologies) que contenía piruvato de sodio al 1% (Life Technologies), solución de BSA baja en IgG al 0.21% (Sigma Aldrich) y gentamicina al 0.5%) (Life Technologies)) en una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5% durante cuatro horas. A continuación, las placas se infectaron con 50 µL de virus de la influenza H1N1 A/Puerto Rico/08/1934 a una MOI de 1.2, se golpearon suavemente y se volvieron a colocar a 37 °C con CO₂ al 5% durante 20 horas. Posteriormente, las placas se lavaron una vez con solución salina regulada en pH con fosfato (PBS, Life Technologies) y se fijaron con 200 µL de paraformaldehído al 4% (PFA, Alfa Aesar) en PBS y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con 300 µL de regulador de pH de bloqueo de bloque de inicio (ThermoFisher) durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos de control se probaron contra 11729-HC-Cterm-11, 11729-HC-Nterm-11, 11729-LC-Cterm-11 y

11729-LC-Nterm-**11**. Los anticuerpos de control usados fueron mAb11729 no conjugado, un anticuerpo Control de isotipo no conjugado, Control de isotipo-HC-Cterm-**6**, Control de isotipo-LC-Cterm-**6**, Control de isotipo-HC-Cterm-**45a**, Control de isotipo-LC-Cterm-**45a**, Control de isotipo-HC-Cterm-**34**, Control de isotipo-LC-Cterm-**34**, Control de isotipo-HC-Cterm-**45d** y Control de isotipo-HC-Cterm-**11**.

[00260] Los anticuerpos se diluyeron a una concentración inicial de 100 µg/mL en el regulador de pH de bloqueo de bloque inicial y cada uno se tituló 1:4 a una concentración final de 6.1×10^{-3} µg/mL. Después de incubar las placas, se eliminó el regulador de pH de bloqueo de bloque inicial y se añadieron los anticuerpos diluidos a las células a 75 µL/pocillo. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con regulador de pH de lavado (solución salina regulada en pH con imidazol y Tween® 20 diluido a 1X en agua Milli-Q; KPL) y se cubrieron con 75 µL/pocillo de anticuerpo secundario (Donkey anti-Human IgG HRP-conjugado; Jackson ImmunoResearch) diluido 1:2000 en StartingBlock Blocking Buffer. Esta solución secundaria se incubó en las placas durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con Wash Buffer, seguido de la adición de 75 µL/pocillo de ELISA Pico Chemiluminescent Substrate en una preparación 1:1. Se leyó

inmediatamente la luminiscencia de las placas en un lector de placas Spectramax i3x de Molecular Devices.

[00261] 11729-HC-Cterm-**11**, 11729-LC-Cterm-**11** y 11729-LC-Nterm-**11** se unieron a células infectadas con influenza A en concentraciones subnanomolares, demostrando una unión específica, tal como se muestra en la Tabla 7 y La figura 3. En particular, esta unión específica estaba en el mismo rango que el anticuerpo mAb11729 no conjugado, lo que indica que la adición de la carga útil no tuvo un efecto demasiado perjudicial en la unión. La conjugación del enlazador-carga útil al extremo N-terminal de la cadena pesada resultó en una unión reducida a las células infectadas con influenza A/H1N1/PR8, pero la conjugación del enlazador-carga útil al extremo C-terminal de la cadena pesada retuvo la unión a la influenza A/H1N1/PR8-células infectadas, tal como se muestra en la figura 11.

Tabla 7. ELISA de unión anti-HA de células infectadas con influenza A

Anticuerpo	IC ₅₀ log[M]
Anticuerpo de control de isotipo no conjugado	No se detectó unión
mAb11729	1.817x10 ⁻⁹
Control de isotipo-HC-Cterm- 11	No se detectó unión

11729-HC-Cterm-11	3.756x10 ⁻⁹
-------------------	------------------------

[00262] Para probar la eficacia antiviral, se analizó la capacidad de 11729-HC-Cterm-11 para suprimir la infección de células por el virus de la influenza. Se sembraron células MDCK London a razón de 20,000 células/pocillo en 100 µL de medio de cultivo (DMEM que contenía piruvato sódico al 1%, suero bovino fetal al 10% y gentamicina al 0.5%) en una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 18 horas. Al día siguiente, todos los anticuerpos se diluyeron a una concentración inicial de 500 µg/mL en medio de infección con tripsina (DMEM que contenía piruvato de sodio al 1%, solución de BSA baja en IgG al 0.21%, 1 mg/mL de tripsina tratada con TPCK y gentamicina al 0.5%) y titulado 1:3 a una concentración final de 1.143x10⁻¹ µg/mL. El virus de la influenza H1N1 A/Puerto Rico/08/1934 que fue diseñado para expresar GFP en las células que infecta ("H1N1 A/Puerto Rico/08/1934-GFP") se diluyó a una MOI de uno en medio de infección con tripsina (Life Technologies) y mezclado 1:1 con anticuerpo diluido o ADC. Se eliminó el medio de crecimiento de las placas de 96 pocillos sembradas y se añadió una mezcla de virus-anticuerpo o virus-ADC a las células a razón de 100 µL por pocillo. Las placas se golpearon ligeramente y se devolvieron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 20 horas. Posteriormente, las placas se lavaron una vez con PBS y se

fijaron con 50 μ L de PFA al 4% en PBS y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron dos veces con PBS y se cubrieron con 50 μ L de PBS. Las placas se leyeron inmediatamente para la señal de GFP en un analizador
5 ImmunoSpot (Cellular Technology Limited).

[00263] La conjugación del enlazador-carga útil **11** con el extremo C-terminal de la cadena pesada y la cadena ligera y el extremo N-terminal de la cadena ligera mejoró la actividad antiviral de los conjugados de anticuerpo-fármaco sobre el
10 anticuerpo parental contra el virus influenza A/H1N1/Pr8 de 3 a 163 veces, tal como se muestra en la Tabla 8 y la figura 4. La conjugación del enlazador-carga útil **11** con el extremo C-terminal de la cadena pesada aumentó 10 veces la actividad antiviral de los conjugados de anticuerpo-fármaco sobre el
15 anticuerpo parental contra el virus de influenza A/H1N1/Cal09, tal como se muestra en la Tabla 9 y la figura 6. La conjugación del enlazador-carga útil **6** con el extremo C-terminal de la cadena pesada incrementó la actividad antiviral de los conjugados de anticuerpo-fármaco sobre el
20 anticuerpo original contra la influenza A/H1N1/PR8 en 51 veces; sin embargo, la conjugación de 6 con el extremo C-terminal de la cadena ligera no aumentó la actividad antiviral sobre el anticuerpo original, tal como se muestra en la Tabla 8 y la figura 7. La conjugación de los enlazador-
25 cargas útiles al extremo C-terminal de la cadena pesada

aumentó la actividad antiviral de los conjugados de anticuerpo y fármaco sobre el anticuerpo original contra el virus de la influenza A/H1N1/PR8 en 7 veces para 11729-HC-Cterm-**34** y en 35 veces para 1129-HC-Cterm-**45a**, pero la

5 conjugación de las enlazador-carga útil al extremo C-terminal de la cadena ligera no aumentó la actividad antiviral sobre el anticuerpo original, tal como se muestra en la Tabla 8 y la figura 8. La conjugación de las enlazador-carga útil al extremo C-terminal de la cadena ligera y la actividad

10 antiviral fuertemente aumentada de los conjugados de anticuerpo-fármaco sobre el anticuerpo parental contra el virus de la influenza A/H3N2/HK68X31 de 3 a 10 veces, tal como se muestra en La Tabla 9 y la figura 9. La conjugación del enlazador-carga útil al extremo C-terminal de la cadena

15 pesada aumentó la actividad viral de los conjugados de anticuerpo-fármaco sobre el anticuerpo parental contra la influenza A/H1N1/PR8 en 71 veces, tal como se muestra en la Tabla 8 y la figura 10.

Tabla 8. Actividad antiviral de los anticuerpos contra el virus de la influenza A/H1N1/PR8

Anticuerpo	IC₅₀ log[M]	Aumento en veces sobre anticuerpo progenitor
Corrida 1		
Anticuerpo de control de isotipo	No se detectó eficacia	N/A
mAb11729	3.136×10^{-8}	1.00
Control de isotipo-HC-Cterm- 11	No se detectó eficacia	N/A
11729-HC-Cterm- 11	1.914×10^{-10}	163.85
11729-LC-Cterm- 11	9.457×10^{-9}	3.32
11279-HC-Nterm- 11	Lost binding	N/A
11729-LC-Nterm- 11	1.027×10^{-8}	3.05
Corrida 2		
mAb11729	1.773×10^{-8}	1.00
11729-HC-Cterm- 6	3.471×10^{-10}	51.08
11729-LC-Cterm- 6	1.028×10^{-8}	1.72
Control de isotipo-HC-Cterm- 6	No se detectó eficacia	N/A
Control de isotipo-LC-	No se detectó eficacia	N/A

Cterm-6		
Corrida 3		
mAb11729	2.623×10^{-8}	1.00
11729-HC-Cterm-45a	7.439×10^{-10}	35.26
11729-LC-Cterm-45a	9.91×10^{-9}	0.08
Control de isotipo-HC-Cterm-45a	No se detectó eficacia	N/A
Control de isotipo-LC-Cterm-45a	No se detectó eficacia	N/A
11729-HC-Cterm-34	3.629×10^{-9}	7.23
11729-LC-Nterm-34	1.305×10^{-8}	2.01
Control de isotipo-HC-Cterm-34	No se detectó eficacia	N/A
Control de isotipo-LC-Cterm-34	No se detectó eficacia	N/A
Corrida 4		
mAb11729	2.141×10^{-8}	1.00
11729-HC-Cterm-45d	2.984×10^{-10}	71.75
Control de isotipo-HC-Cterm-45d	No se detectó eficacia	N/A
Anticuerpo de control de isotipo	No se detectó eficacia	N/A

VX-787	9.457×10^{-9}	3.32
--------	------------------------	------

Tabla 9. Actividad antiviral de los anticuerpos contra el virus de la influenza A/H1N1/Cal09

Anticuerpo	IC₅₀ log[M]	Aumento en veces sobre anticuerpo progenitor
mAb11729	7.022×10^{-10}	1.00
11729-HC-Cterm-11	6.528×10^{-11}	10.76
Control de isotipo-HC-Cterm-11	No se detectó eficacia	N/A

5 **Tabla 10.** Actividad antiviral de anticuerpos contra el virus influenza A/H3N2/HK68x31

Anticuerpo	IC₅₀ log[M]	Aumento en veces sobre anticuerpo progenitor
mAb5385	5.15×10^{-10}	1.00
5385-HC-Cterm-11	5.262×10^{-11}	9.78
5385-LC-Cterm-11	1.802×10^{-10}	2.86
Control de isotipo-HC-Cterm-11	No se detectó eficacia	N/A

Control de isotipo-LC-Cterm-11	No se detectó eficacia	N/A
Anticuerpo de control de isotipo	No se detectó eficacia	N/A
VX-787	7.045×10^{-9}	N/A

Ejemplo 4: Estabilidad del plasma *in vitro* del conjugado de anticuerpo-fármaco anti-influenza HA mAb11729 en mono o plasma humano empobrecido en IgG

5 [00264] Se incubó 11729-HC-Cterm-11 *in vitro* con plasma de diferentes especies y se evaluó la DAR.

[00265] La muestra de ncADC se añadió a plasma de mono cynomologus combinado fresco (BioReclamation, lote CYN260056-CYN260057), o plasma humano empobrecido en IgG (BioIVT, lote # BRH1097869), de forma independiente, hasta una concentración final de 50 µg/mL en Eppendorf (Eppendorf, Cat# 022363514), y posteriormente se incubaron a 37 °C en un baño de agua durante 0-72 horas. Las muestras se retiraron a las 0, 24, 48 y 72 horas y luego se almacenaron congeladas a -80 °C hasta su análisis.

[00266] Para el análisis DAR, se purificó ncADC a partir de muestras de plasma mediante captura por afinidad usando un procesador de partículas magnéticas DynaMag-2 (Life Technologies, Cat#12321D). En primer lugar, se inmovilizó el

anticuerpo kappa antihumano biotinilado (reactivo generado por Regeneron) en perlas paramagnéticas de estreptavidina (Invitrogen, # de catálogo 605602). Cada muestra de plasma que contenía el ncADC se mezcló a 1850 rpm con 1 mg de perlas a temperatura ambiente durante 2 horas en una unidad ThermoMixer C (Eppendorf, número de catálogo 2231000574). A continuación, las perlas se lavaron tres veces con 600 µL de regulador de pH Tris-HCl 50 mM pH 7.5 (diluido en regulador de pH Tris-HCl 1 M pH 7.5, Invitrogen, Cat#15567-027) y luego una vez con 600 µL de acetonitrilo al 10% (VWR Chemicals, Cat#BDH83640.100E) en agua. Después de los lavados, los ncADC se eluyeron incubando las perlas con 50 µL de ácido fórmico al 1% en acetonitrilo:agua 25:75 (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras eluidas se redujeron aún más añadiendo 2 µL de TCEP 0.5 M (Sigma, Cat 646547-10X1ML) a cada muestra (TCEP 19.2 mM en solución final) y se incubaron a 50 °C durante 30 min en una unidad ThermoMixer C.

[00267] Las muestras de ncADC reducido se inyectaron en una columna BEH300 C4 de 1.7 µm (Waters Corporation, Cat# 186007567) acoplada a un espectrómetro de masas Synapt G2-Si (Waters). La velocidad de flujo fue de 8 µL/min (fase móvil A: ácido fórmico al 0.1% en agua; fase móvil B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo) y el gradiente de cromatografía líquida fue un gradiente de 10 minutos con ncADC eluido durante 2.1-6.5 minutos, correspondiente al 26-40% de la fase

móvil B.

[00268] Los espectros adquiridos se desconvolucionaron usando el software MaxEnt1 (Waters Corporation) con los siguientes parámetros: Rango de masas: 20-60 kDa rango m/z: 5 700 Da-4000 Da; Resolución: 1.0 Da/canal; Ancho a media altura: 1.0 Da; Razones mínimas de intensidad: 33%; Máximo de iteraciones: 15.

[00269] No se observó una pérdida significativa de las enlazador-carga útil del ncADC después de la incubación de 72 10 horas con mono cynomolgus o plasma humano empobrecido en IgG (figura 5).