

# CONJUGADO ANTICUERPO-FÁRMACO QUE COMPRENDE UN ANTICUERPO ANTI-GUCY2C, ASÍ COMO MÉTODOS DE PRODUCCIÓN Y USOS DEL MISMO

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente divulgación se refiere a nuevos conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un enlazador modular favorable que enlaza la sustancia farmacológica farmacéuticamente activa con el anticuerpo. La presente divulgación se refiere además a métodos para producir el conjugado anticuerpo-fármaco, así como a usos del mismo y composiciones farmacéuticas que lo comprenden. Las modalidades de la presente divulgación se desarrollaron particularmente como conjugados anticuerpo-fármaco para su uso en el tratamiento de cánceres gastrointestinales positivos para guanilato ciclasa 2C (GUCY2C) y se describirán a continuación con referencia a esta solicitud. Sin embargo, se apreciará que la presente divulgación no se limita a este campo de uso particular

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Aparte de la resección quirúrgica y la radioterapia, la quimioterapia sigue siendo la opción terapéutica predominante en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, también está bien establecido que la quimioterapia, debido a su limitada selectividad y especificidad hacia las células cancerosas, generalmente ofrece solo una pequeña ventana terapéutica para la administración de dosis altamente tóxicas de agentes quimioterapéuticos, que regularmente conducen a efectos secundarios graves para los pacientes debido al efecto tóxico sobre las células no cancerosas, mientras que solo transmiten una baja eficacia contra las células cancerosas malignas.

Se han desarrollado soluciones de terapia farmacológica dirigida para aumentar la administración específica de sustancias farmacológicas citotóxicas directamente a las células cancerosas malignas. En particular, los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) ofrecen nuevas opciones de tratamiento que permiten administrar sustancias farmacológicas a las células cancerosas malignas con gran especificidad y con efectos muy limitados o nulos en las células no cancerosas.

Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) suelen consistir en un anticuerpo unido covalentemente a un fármaco citotóxico mediante un enlazador sintético. Mientras que (a) el

anticuerpo garantiza un alto grado de especificidad y (b) el fármaco citotóxico asegura el efecto sobre las células cancerosas una vez administrado, (c) el compuesto enlazador utilizado para conjugar el anticuerpo y el fármaco desempeña un papel importante, ya que puede afectar significativamente al índice terapéutico, la eficacia y la farmacocinética de un ADC.

En particular, el compuesto enlazador debe (i) garantizar una elevada estabilidad plasmática del conjugado en circulación para evitar la liberación prematura del fármaco y los consiguientes efectos sistémicos no deseados fuera del objetivo; (iii) proporcionar un alto grado de solubilidad acuosa del conjugado para permitir la administración de sustancias farmacológicas hidrofóbicas/lipofílicas y evitar la agregación de los ADC en una composición farmacéutica; y (iv) garantizar una exposición adecuada de las células cancerosas diana a la sustancia farmacológica citotóxica para maximizar el efecto terapéutico.

La naturaleza lipofílica de muchos fármacos citotóxicos puede afectar negativamente a las propiedades de un ADC hasta el punto de que las cargas útiles no lleguen eficazmente a las células diana. La modulación de las propiedades de los ADC mediante la fijación de grupos polares en los enlazadores puede reducir la agregación durante la conjugación y mejorar las propiedades fisicoquímicas de los ADC, lo que mejora la farmacocinética (PK) y el índice terapéutico de los ADC (véase, por ejemplo, *Nature Biotechnology*, 2015, 33, 733-735). La modulación del enlazador para efectuar un cambio en la polaridad o la carga del metabolito final puede mejorar la actividad frente a células resistentes a múltiples fármacos (MDR) debido a una mejor retención de las cargas útiles dentro de las células (véase, por ejemplo, *Cancer Res*; 70(6) Mar. 15, 2010, p2528). Los elementos químicos de los enlazadores, por ejemplo, grupos de polietilenglicol (PEG), azúcar o ácido sulfúrico (véanse, por ejemplo, WO2014062697, US20100323973), no sólo afectan a la eficacia de la conjugación y a la facilidad de producción de los ADC, sino que a menudo permanecen como parte de los metabolitos y, por tanto, afectan a la actividad y seguridad del ADC.

La eficacia terapéutica de una ADC no sólo depende de la liberación adecuada de la sustancia farmacológica citotóxica, sino también de la bioconjugación eficaz que conecta la sustancia farmacológica con el anticuerpo y, además, del número de moléculas de la sustancia farmacológica citotóxica unidas con éxito a un único anticuerpo, es decir, la relación fármaco-anticuerpo (DAR). Se sabe que un DAR bajo disminuye la eficacia de la

ADC y requiere que se conjugue una sustancia farmacológica altamente tóxica, mientras que un DAR alto se ha relacionado con una inestabilidad potencial de la ADC que conduce a un aumento de los efectos sistémicos, una vida media reducida de la ADC y una alteración general de la farmacocinética de la molécula. Sin embargo, dado que normalmente se han aplicado químicas estocásticas para conjugar sustancias farmacológicas con anticuerpos, incluso los ADC aprobados por la FDA están compuestos por una mezcla de conjugados, que son heterogéneos con respecto a su DAR.

Además, la selección de la diana adecuada y la alta especificidad del anticuerpo influyen enormemente en la probabilidad de que un nuevo ADC sea terapéuticamente eficaz. A este respecto, deben identificarse antígenos específicos del cáncer o asociados al cáncer que permitan generar anticuerpos que puedan dirigirse a células cancerosas malignas con una alta especificidad y sin que se unan a células sanas o no cancerosas.

Con respecto a los cánceres gastrointestinales, cabe destacar que representan aproximadamente el 26 % de todos los diagnósticos de cáncer y son responsables de aproximadamente el 35 % de las muertes por cáncer en todo el mundo. Se estima que en 2018 se produjeron 4,8 millones de nuevos casos de cáncer gastrointestinal (GI) y 3,4 millones de muertes relacionadas, en todo el mundo.

Los cánceres gastrointestinales comprenden tumores esofágicos, gástricos, colorrectales, hepáticos, esofágicos y pancreáticos, siendo el cáncer colorrectal (CCR) el más frecuente, con un 10,2 % de los nuevos casos, seguido del gástrico (5,7 %), hepático (4,7 %), esofágico (3,2 %) y pancreático (2,5 %). El CCR contribuye a alrededor del 9 % de todas las muertes relacionadas con el cáncer, seguido del cáncer gástrico (8,2 %), el cáncer de hígado (8,2 %), el cáncer de esófago (5,3 %) y el cáncer de páncreas (4,5 %), con alrededor de 3,4 millones de muertes por cáncer GI en todo el mundo en 2018 (Arnold et al. (2020) *Gastroenterology* 159:335-349). El cáncer colorrectal (CCR) es, por lo tanto, el tercer cáncer más común en todo el mundo después del cáncer de pulmón y de mama, pero la segunda causa de muerte por cáncer.

En las mujeres, el CCR es el segundo cáncer más frecuente en la edad adulta y el tercero en los hombres, y es la cuarta causa de muerte por cáncer.

Las tasas de supervivencia a 5 y 10 años son del 65 % y el 58 %, respectivamente, y las tasas de incidencia y mortalidad son un 25 % más altas en hombres que en mujeres. De 1975 a 2013, la tasa de incidencia de CCR aumentó de 10 a 15 casos por cada 100.000 habitantes en estadounidenses de entre 20 y 49 años. Esto es paralelo a un aumento de los casos de CCR de alrededor del 20 % en los países en desarrollo como Argentina, Brasil y China. Además, el 30 % de todos los pacientes con CCR experimentan metástasis, cuyo pronóstico sigue siendo malo, con una supervivencia media a 5 años de sólo el 18,5 % en Estados Unidos y el 27,7 % en Europa.

Aunque la tasa de incidencia ha disminuido en los últimos 30 años debido a las mejoras en los paradigmas de cribado y tratamiento, es alarmante que las tasas de incidencia en individuos menores de 50 años hayan aumentado de forma constante, con un aumento anual de la tasa de incidencia global del 2,2 % entre 2012-2016. Se desconoce la etiología exacta de este cambio de paradigma, pero es probable que pueda atribuirse a cambios en la dieta y otros factores de riesgo relacionados con el estilo de vida o al aumento del cribado no sistemático de adultos jóvenes.

El 10-20 % de todos los pacientes con CCR poseen antecedentes familiares positivos y ~5 % de todos los casos de CCR están vinculados a un síndrome hereditario conocido de CCR detectable por línea germinal. En algunos casos, el aumento de la incidencia esporádica de CCR se asocia a una enfermedad inflamatoria intestinal de larga evolución y a factores variables del estilo de vida, como la inactividad física, una dieta poco saludable, el tabaquismo, la obesidad y el consumo excesivo de alcohol.

Las diferencias en los resultados clínicos y en la respuesta farmacológica al tratamiento del CCR dependen de la localización del cáncer en el colon y el recto. Entre los factores que contribuyen a ello se encuentran sus distintas funciones fisiológicas, el microbioma intestinal, los tipos de células inmunitarias residentes en la región, los carcinógenos alimentarios y el momento de detección de la enfermedad. Además, los factores ontogenéticos pueden contribuir a la gravedad de la enfermedad y al resultado del tratamiento:

El intestino grueso proximal (derecho) (ciego, colon ascendente y colon transversal) deriva del intestino medio embrionario, mientras que el intestino grueso distal (izquierdo) (flexura esplénica, colon descendente, colon sigmoide y recto) deriva del intestino posterior embrionario. Estas diferencias ontogenéticas se asocian a patrones de expresión génica

diferenciales a lo largo del eje proximal-distal. En las mujeres y en los afroamericanos, los tumores de colon esporádicos proximales se diagnostican con mayor frecuencia, con una incidencia del 51-62 % de los casos, que también muestran un estadio TNM más alto en el primer diagnóstico, presentan un patrón con altos niveles de hipermetilación del promotor en todo el genoma, denominado fenotipo metilador de islas CpG (CIMP), presentan inestabilidad de microsatélites (MSI) debido a mecanismos deficientes de reparación de desajustes del ADN (dMMR), mutan con mayor frecuencia en KRAS y BRAF y tienen un peor pronóstico en términos de supervivencia. Los tumores colorrectales distales tienen más probabilidades de presentar inestabilidad cromosómica (CIN) y muestran un pronóstico más favorable.

Los perfiles genómicos del CCR han revelado una importante heterogeneidad intratumoral e intertumoral como resultado de la acumulación de mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas durante el inicio y la progresión de la enfermedad. La inestabilidad genómica en el CCR se presenta como una de las dos formas principales: CIN y MSI. El CCR que carece de CIN o MSI se clasifica como CCR con estabilidad genómica (GS).

En los CCR con GS, es probable que los genes de reparación del ADN y los supresores tumorales estén silenciados transcripcionalmente a través de CIMP, aunque una gran proporción de CCR MSI y una pequeña población de CCR CIN también son CIMP-positivos, y alrededor del 10 % de los CCR son negativos para CIN, MSI o CIMP.

La inestabilidad cromosómica (CIN) CIN se caracteriza por alteraciones numéricas cromosómicas (aneuploidía) y alteraciones estructurales (alteraciones somáticas del número de copias, deleciones, inserciones, amplificaciones o pérdida de heterocigosidad), y se produce en el 65-70 % de los CCR esporádicos. Casi todos los tumores CIN muestran señalización Wnt activada, y el 80 % albergan inactivación mutacional de APC, un regulador negativo de la vía Wnt. La inactivación/delección mutacional de TP53 se produce en el 60 % de los tumores CIN y la pérdida de función de p53 impulsa directamente la CIN y proporciona un contexto permisivo para los mecanismos de inestabilidad del genoma.

Con respecto a la inestabilidad del genoma, la disfunción combinada de los telómeros y la deficiencia de p53 es uno de los principales mecanismos de la NIC, como revelan la aparición de puentes de anafase en carcinomas de CCR humano en fase inicial y la aparición espontánea de CCR en ratones mutantes de p53 con deficiencia de telomerasa.

El CCR inestable por microsatélites (MSI) se caracteriza por la presencia de microsatélites, secuencias de ADN que contienen motivos repetitivos que tienden a acumular mayores tasas de mutación que otras regiones genómicas. La MSI es la manifestación fenotípica de la reparación deficiente de los errores de emparejamiento (dMMR) resultante de la inactivación mutacional de los genes MMR, incluidos MLH1, MSH2, MSH3, MSH6, PMS2 y Exo1 (De' Angelis et al. Acta Biomed 2018 dic 17;89(9-S):97-101).

Otros factores importantes que contribuyen a la etiología del CCR son las alteraciones genéticas somáticas que activan vías de transducción de señales clave que promueven el estado proproliferativo de las células cancerosas del CCR. En el CCR, las principales vías de señalización proproliferativa son las vías EGFR-RAS y WNT- $\beta$ -catenina.

**Señalización del EGFR** La activación del EGFR desencadena las cascadas de señalización RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT que, en última instancia, conducen a la proliferación. Las mutaciones en el propio EGFR son raras en el CCR, con un 1 % de los casos de CCR atribuibles a una mutación en el CCR (Barber et al N Engl J Med 351: 2883) y, en cambio, muestra una sobreexpresión en ~80 % de los CCR. La activación potenciada del EGFR puede producirse a través de modificaciones postraduccionales que implican la metilación de R198 y R200 por la proteína arginina metiltransferasa 1 (PRMT1), lo que potencia su unión al EGF y la consiguiente activación de la señalización, incluso en presencia del inhibidor del EGFR.

Recientemente se ha demostrado que el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), ligando del receptor MET, puede sustituir totalmente al EGF en la transformación de células madre intestinales (ISC) de ratón Lgr5+ en organoides intestinales, que comprenden todos los linajes celulares intestinales diferenciados. Además, el HGF y el EGF fueron igualmente eficaces para promover la expansión de organoides de ratón mutantes de *Apc*, mientras que la supresión de Met en las ISC in vivo atenuó la aptitud de las células madre y la formación de adenomas intestinales impulsados por *Apc*. Estos hallazgos indican que la señalización EGFR y MET tienen una funcionalidad solapada y parcialmente redundante en la mucosa intestinal del ratón. Resultados recientes también indican que la señalización HGF/MET puede superar completamente la inhibición de EGFR en ISCs humanas y células madre de CCR, permitiendo la expansión de ISCs normales individuales, así como de células *mutantes*

de APC en organoides, incluso en presencia de inhibición de EGFR (Joosten et al Gastroenterology 2019 Oct;157(4):1153-1155) .

Otro factor decisivo para la eficacia clínica del bloqueo del EGFR es el estado mutacional de sus componentes de señalización descendentes, en concreto, las mutaciones de ganancia de función en RAS, RAF, MEK o ERK, que pueden mantener la proliferación y la supervivencia de las células cancerosas tras la inhibición del EGFR. Las mutaciones activadoras en KRAS, NRAS o HRAS están presentes colectivamente en ~50 % de los casos de CCR; estas mutaciones afectan a los codones 12 o 13 y, con menor frecuencia, a los codones 61, 117 o 146. Con respecto a la vía RAS en el CCR, el efector RAS, BRAF, está mutado en el 10-15 % de los CCR en estadio temprano y en torno al 5 % en el CCR en estadio IV, en el codón 600 del punto caliente (hotspot) (V600E). Clínicamente, la inhibición de BRAF por sí sola mostró una actividad limitada en el CCR metastásico BRAFV600E debido a la reactivación de la señalización MAPK mediada por EGFR, lo que condujo a la aprobación de combinaciones de inhibidores de EGFR con inhibidores de BRAF y MEK que ahora se han convertido en el tratamiento estándar en pacientes con tumores metastásicos mutantes de BRAF.

El cribado del CCR puede realizarse mediante métodos de visualización directa como la colonoscopia, la colonografía por TC, la sigmoidoscopia flexible, la sigmoidoscopia flexible con prueba inmunoquímica fecal (FIT) o mediante pruebas basadas en heces como la prueba de sangre oculta en heces basada en guayaco, la FIT o la prueba de ADN en heces multiobjetivo o mediante pruebas serológicas como la prueba de ADN SEPT9.

Una vez realizado el diagnóstico de CCR, la estadificación es un factor importante, ya que determina las opciones de tratamiento para el paciente. Para la estadificación del tumor, el sistema Tumor, ganglios, metástasis (TNM) del Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC)/Unión para el Control Internacional del Cáncer (UICC) es un sistema de estadificación de uso común que define los siguientes estadios del cáncer:

Los tratamientos convencionales habituales del CCR son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Dependiendo de la localización y la progresión de la enfermedad, estos tratamientos pueden combinarse. Las opciones de tratamiento incluyen, por ejemplo, en el estadio I, la resección quirúrgica sola. En el estadio III, la cirugía curativa va seguida de quimioterapia adyuvante como tratamiento estándar. La escisión mesorrectal total (EMT)

mediante abordajes quirúrgicos laparoscópicos y transanales suele ser la opción para el cáncer localizado y siempre que sea fácil acceder a la localización del tumor. Sin embargo, a menudo no es posible la extirpación completa de todas las células cancerosas. Aproximadamente el 66 % de los pacientes con cáncer de colon y recto en estadio II y el 61 % en estadio III deben someterse a tratamientos adicionales con quimioterapia adyuvante y/o radioterapia. Estos tratamientos tienen muchos efectos secundarios debido a su falta de especificidad y citotoxicidad hacia cualquier célula que esté creciendo y dividiéndose. A pesar de las recientes mejoras en las opciones de diagnóstico y tratamiento, el 54 % de los pacientes recaen incluso después del tratamiento neoadyuvante. Por lo tanto, es crucial disponer de más tratamientos alternativos y eficaces para tratar a los pacientes con CCR.

La quimioterapia actual para el CCR incluye tanto la terapia de agente único, basada principalmente en la fluoropirimidina (5-FU), como los regímenes de agente múltiple que contienen uno o varios fármacos, como oxaliplatino (OX), irinotecán (IRI) y capecitabina (CAP o XELODA o XEL), siendo los regímenes de terapia combinada FOLFOX (5-FU+OX), FOXFIRI (5-FU+IRI), XELOX o CAPOX (CAP+OX), y CAPIRI (CAP+OX) los principales enfoques en el tratamiento de primera línea. Sin embargo, la quimioterapia está asociada a ciertas limitaciones, como la toxicidad sistémica, una tasa de respuesta insatisfactoria, así como una resistencia innata y adquirida impredecible, y una baja selectividad específica del tumor.

En la actualidad, los principales agentes quimioterápicos utilizados para el tratamiento de los pacientes afectados se basan en fluoropirimidinas (intravenosas u orales), ya sea como tratamientos de agente único, como el 5-fluorouracilo (5-FU) intravenoso y la capecitabina oral (CAP) o como regímenes de múltiples agentes, incluidas las combinaciones FOLFOX (5-FU y oxaliplatino), FOLFIRI (5-FU e irinotecán), XELOX/CAPOX (CAP y oxaliplatino), CAPIRI (CAP e irinotecán). Además de la quimioterapia tradicional, los agentes dirigidos contra el EGFR, cetuximab y panitumumab, están aprobados para el tratamiento de primera línea del CCRm. Las combinaciones de cetuximab con FOLFIRI o panitumumab con FOLFOX han mejorado significativamente la eficacia terapéutica. Sin embargo, las decisiones de tratamiento para el CCRm en estadio temprano no tienen en cuenta las mutaciones *BRAF* o *KRAS*, dado el pronóstico drásticamente desfavorable que confieren estas mutaciones, como se ha visto en los ensayos clínicos. Aunque la tasa de supervivencia

de los pacientes con CCRm ha mejorado en los últimos años, la respuesta y el pronóstico de los pacientes con las mutaciones mencionadas siguen siendo malos.

La actual falta de terapias eficaces y las limitaciones citotóxicas inespecíficas han llevado a los investigadores a orientarse hacia el desarrollo de estrategias de medicina predictiva, preventiva y personalizada para mejorar el tratamiento del CCR y el CCRm, dada la importante necesidad no cubierta de terapias prospectivas para pacientes con CCRm *con mutación de BRAF o KRAS*. Incluso hoy en día, los pacientes con cáncer colorrectal metastásico (CCRm) tienen una tasa de supervivencia global a 5 años de <10 %.

El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte por enfermedad maligna en todo el mundo, con tasas de mortalidad especialmente elevadas en Asia oriental, meridional y central; Europa central y oriental; y Sudamérica. Las opciones de tratamiento del cáncer gástrico varían en función de su estadio: El cáncer muy incipiente suele tratarse mediante cirugía. El cáncer potencialmente resecable suele tratarse mediante cirugía como primer tratamiento, con gastrectomía subtotal o gastrectomía total. También pueden extirparse los ganglios linfáticos cercanos y posiblemente partes de órganos próximos. Además, los pacientes pueden recibir quimioterapia sola o quimio más radioterapia (quimiorradiación); por ejemplo, los pacientes pueden recibir 5-fluorouracilo (5-FU) en combinación con cisplatino (CDDP) (terapia FP). Otros posibles regímenes de tratamiento incluyen epirubicina, cisplatino y fluorouracilo (terapia ECF), o regímenes en los que el fluorouracilo se sustituye por capecitabina (terapia ECX), o terapia ECF en la que el cisplatino se sustituye por oxaliplatino (terapia EOF). Alternativamente, tanto el cisplatino como el fluorouracilo pueden sustituirse por oxaliplatino y capecitabina (terapia EOX).

En los cánceres gástricos metastásicos, el tratamiento se dirige a controlar el crecimiento del cáncer y puede incluir quimioterapia sola, quimioterapia más inmunoterapia o quimioterapia junto con radioterapia. La combinación de platino y fluoropirimidina (5-FU) es el régimen de quimioterapia de primera línea estándar en todo el mundo en un contexto no curativo. Tras el fracaso del platino y el 5-FU, el paclitaxel más ramucirumab se ha establecido como tratamiento estándar de segunda línea. Sin embargo, la neuropatía relacionada con el tratamiento, la progresión durante o la rápida recurrencia tras el régimen perioperatorio FLOT (fluorouracilo, oxaliplatino, docetaxel) han aumentado la demanda de un tratamiento de segunda línea sin taxanos. Recientemente se ha aprobado el uso de trifluridina/tipiracilo en

pacientes con cáncer gástrico metastásico. Además de la quimioterapia, los pacientes pueden ser tratados con inhibidores de puntos de control inmunitarios, como ipilimumab (anti-CTLA-4), nivolumab (anti-PD-1), pembrolizumab (anti-PD-1) o atezolizumab (anti-PD-L1).

La endoscopia gastrointestinal es indispensable para el diagnóstico del cáncer gástrico, así como la laparoscopia de estadificación (LS), que es un procedimiento breve y mínimamente invasivo que sólo requiere una pequeña incisión. Entre las ventajas de la LS se incluyen el diagnóstico preciso de la diseminación peritoneal y la invasión extraserosa, así como la posibilidad de realizar un lavado peritoneal para citología. En los pacientes con cáncer gástrico avanzado en los que el diagnóstico por imagen no permite establecer un diagnóstico, la citología del lavado peritoneal obtenida antes del tratamiento puede ser muy importante para la planificación del mismo. La citología de lavado peritoneal obtenida mediante LS para la evaluación de la diseminación peritoneal se considera útil para evaluar los efectos de la quimioterapia neoadyuvante y/o la inmunoterapia.

El tumor hepático más frecuente es el carcinoma hepatocelular (CHC) entre todos los cánceres primarios de hígado, con un 75-85 % de los casos. El CHC suele diagnosticarse en un estadio avanzado, para el que siguen existiendo limitadas opciones terapéuticas eficaces. Hasta 2007, no existían opciones de tratamiento eficaces para los pacientes diagnosticados de enfermedad en estadio avanzado o los pacientes que pasaban a enfermedad en estadio avanzado tras el fracaso de otros tratamientos. El sorafenib fue el primer fármaco sistémico aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) como tratamiento estándar para el CHC avanzado entre 2007 y 2016. En los últimos años, se han desarrollado otros fármacos de molécula pequeña que incluyen lenvatinib, regorafenib o cabozantinib, que han sido aprobados o siguen en fase de ensayo clínico. Estos fármacos también se están probando actualmente en combinación con inhibidores de puntos de control inmunitarios, como nivolumab o pembrolizumab. Además, se están probando combinaciones de inhibidores del punto de control inmunitario e inhibidores de la angiogénesis, como atezolizumab y bevacizumab.

El cáncer de esófago, como una de las formas de cáncer gastrointestinal, se está tratando en función de su estadio, lo que puede incluir tratamientos endoscópicos, así como quimioterapia y radioterapia. Entre los fármacos y combinaciones de fármacos más comunes que se están utilizando para tratar el cáncer de esófago, pero que no suelen administrarse con radiación, se incluyen ECF: epirubicina (Ellence), cisplatino y 5-FU (especialmente para

tumores de la unión gastroesofágica), DCF: docetaxel (Taxotere), cisplatino y 5-FU, o trifluridina y tipiracilo (Lonsurf), un fármaco combinado en forma de píldora.

Para el cáncer de páncreas se han aprobado varios regímenes de quimioterapia, el más utilizado y mejor estudiado es la Gemcitabina. La gemcitabina suele administrarse en combinación con paclitaxel unido a albúmina (Nab), lo que mejora el tiempo de supervivencia en comparación con la monoterapia con gemcitabina. Entre las opciones de tratamiento alternativas se incluye el régimen multifarmacológico FOLFIRINOX (5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán y oxaliplatino). Además, en el caso del cáncer de páncreas, se están evaluando clínicamente tratamientos combinados con inhibidores de los puntos de control inmunitarios, como pembrolizumab o nivolumab, en combinación con gemcitabina, nab-paclitaxel o capecitabina.

La guanilil ciclasa 2C (GUCY2C, EC: 4.6.1.2) es miembro de una familia de proteínas receptoras enzimáticas que sintetizan guanosina 3',5' monofosfato cíclico (GMP cíclico; cGMP). GUCY2C es un receptor transmembrana para los ligandos hormonales endógenos: guanilina y uroguanilina. La unión del ligando al receptor extracelular cataliza la conversión de GTP en GMP cíclico (cGMP) e inicia vías de señalización descendentes relacionadas con el cGMP, que están implicadas en la regulación de procesos homeostáticos intestinales como la proliferación, diferenciación y apoptosis de células epiteliales (Lisby et al. Expert Rev Precis Med Drug Dev. 2021; 6(2): 117-129).

GUCY2C se expresa específicamente en las células epiteliales intestinales. GUCY2C regula la progresión dinámica de las células a lo largo del eje cripta-vellosidad y cripta-superficie, coordinando procesos homeostáticos que incluyen la proliferación, la reparación del ADN, la programación metabólica, el destino celular específico de linaje y las interacciones epitelio-mesénquima que organizan dicho eje. Dado el importante papel de GUCY2C en el mantenimiento de la regeneración epitelial, la desregulación del eje GUCY2C-cGMP promueve patologías que incluyen la enfermedad inflamatoria intestinal y el trastorno del tránsito intestinal, además del cáncer colorrectal. Es importante destacar que el silenciamiento del eje de señalización GUCY2C se asocia con la tumorigénesis colorrectal a través de la pérdida de la unión del ligando.

La proteína GUCY2C puede detectarse de forma casi universal (>95 %) en todos los tumores colorrectales humanos primarios y metastásicos, independientemente de su localización anatómica o grado, así como en un subconjunto de tumores gastroesofágicos y pancreáticos, pero no en tumores que surgen fuera del tracto gastrointestinal. También se demostró que GUCY2C se expresa en tumores esofágicos, gástricos y pancreáticos (Danaee et al (2017) PLoS One. 2017; 12(12): e0189953).

Dado su patrón de expresión único en el cáncer colorrectal (CCR) y el cáncer colorrectal metastásico (CCRM) se han adoptado diversos enfoques para utilizar GUCY2C en el tratamiento de estas enfermedades que han incluido vacunas contra el cáncer que utilizan GUCY2C, su uso como diana para la terapia con células CAR-T (Magee et al. Cancer Immunol Res. 6(5), 509-516 (2018)), o el uso de anticuerpos terapéuticos y conjugados anticuerpo-fármaco dirigidos contra GUCY2C. El documento WO2013/163633 A1 divulga anticuerpos anti-GUCY2C y ADC anti-GUCY2C que comprenden auristatina E (MMAE) y auristatina F MMAE (MMAF) que inhiben la mitosis mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina. Los ensayos clínicos del ADC anti-GUCY2C TAK264 (MLN0264, 5F9vcMMAE) que empleaba MMAE como carga útil han finalizado. WO2021/205325 A1 divulga anticuerpos biespecíficos anti-CD3-GUCY2C y su uso respectivo en la terapia del cáncer para inducir una respuesta citolítica de células T en células diana GUCY2C positivas. Si bien estos esfuerzos indican que las terapias dirigidas a GUCY2C pueden ser eficaces, sigue existiendo una falta de terapias dirigidas a GUCY2C aprobadas y, en particular, de ADC aprobados dirigidos a GUCY2C.

En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) mejorados, que medien la conjugación estable de una sustancia farmacológica citotóxica con el anticuerpo, permitiendo al mismo tiempo una fácil adaptación de la relación fármaco-anticuerpo (DAR) del ADC y/o la solubilidad acuosa en función de la citotoxicidad y la hidrofobicidad de la sustancia farmacológica que se va a conjugar, respectivamente. Además, se necesitan ADC mejorados que tengan una alta potencia y un buen perfil de eficacia en el contexto del tratamiento del cáncer gastrointestinal.

Es un objeto de la presente divulgación superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior, o proporcionar una alternativa útil. En particular, es objeto de la presente divulgación proporcionar ADCs mejorados que tengan alta potencia y un buen perfil de eficacia en el contexto del tratamiento del cáncer gastrointestinal.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Como se ha indicado anteriormente, la presente divulgación pretende proporcionar ADCs mejorados que tengan una estructura de enlazador que sea particularmente adecuada para proporcionar ADCs con alta potencia y un buen perfil de eficacia en el contexto del tratamiento del cáncer gastrointestinal.

Los ADC aquí descritos tienen un enlazador con una arquitectura modular global que proporciona una selección de funcionalidades de enlazador beneficiosas para un ADC de alta potencia. Específicamente, el enlazador modular utilizado en el ADC de la presente divulgación comprende dos unidades funcionales de una secuencia peptídica escindible y un espaciador autoinmolante, en donde un grupo potenciador de la solubilidad y la sustancia farmacológica citotóxica están unidos a cada uno de los espaciadores autoinmolantes en proximidad física. Además, cada unidad funcional está conectada a una unidad de ramificación correspondiente en el núcleo multimérico del enlazador a través de un espaciador químico definido. Dado que el núcleo multimérico del ADC de la presente divulgación comprende dos unidades de ramificación cada una, que están conectadas a una sustancia farmacológica citotóxica, respectivamente, el enlazador tiene un Grado definido de Etiquetado (DOL) de 2.

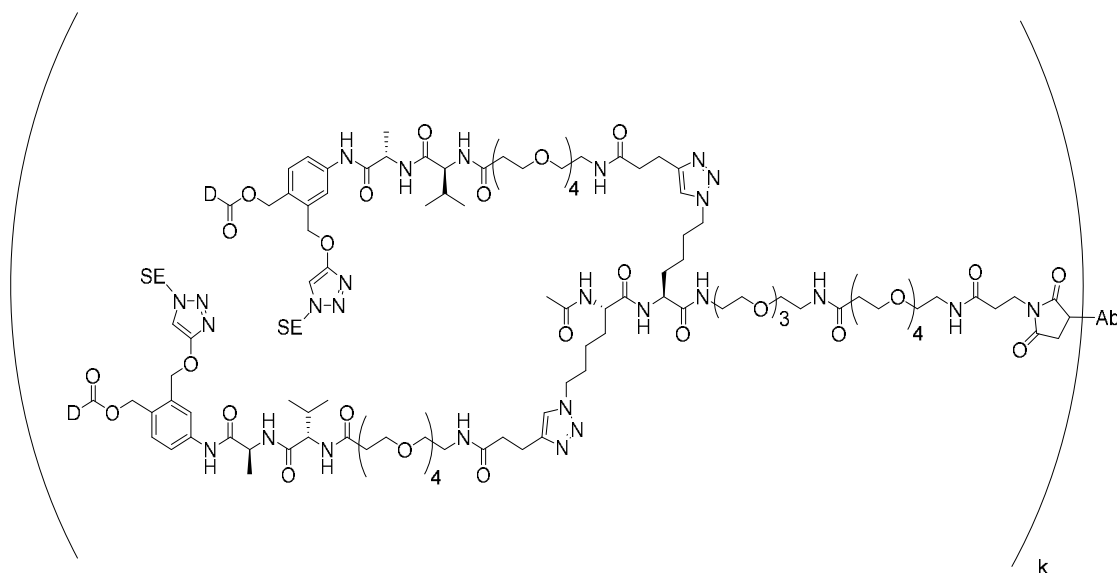
---

Por último, el enlazador se conjuga con el anticuerpo a través de otro espaciador químico que se extiende desde el núcleo multimérico. La conjugación del enlazador portador de la sustancia farmacológica con el anticuerpo se produce a través del extremo del espaciador que se extiende desde el núcleo multimérico mediante una reacción de un grupo maleimida terminal del espaciador con un átomo de azufre de un residuo de cisteína en la cadena pesada constante del anticuerpo.

Ventajosamente, las reacciones tiol son muy eficaces y suelen desarrollarse rápidamente en condiciones suaves. Esto significa que los grupos tiol-reactivos pueden formar conjugados rápidamente y con un alto grado de completitud. Además, los enlaces tioéter formados entre los grupos tiol y los grupos tiol reactivos son estables en condiciones fisiológicas. Aunque son menos propensos a la hidrólisis o degradación en comparación con otros tipos de enlaces químicos, puede conseguirse una mayor estabilidad del conjugado, por ejemplo,

mediante la incorporación de un grupo amino básico adyacente a la maleimida, como se describe en Lyon *et al.* Nat. Biotechnol. 2014, 32, 1059-1062. Por consiguiente, en los ADC de la invención, el producto de reacción es típicamente un succinimidil tioéter o un derivado del mismo y une de forma estable el anticuerpo con el enlazador portador de la sustancia farmacológica.

En consecuencia, en un primer aspecto la presente divulgación se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula (I)



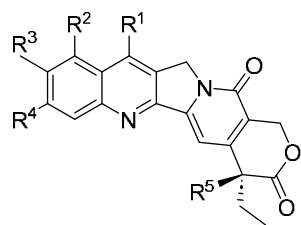
Fórmula (I)

o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; en donde:

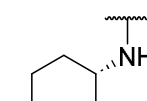
k es un número entero entre 2 y 4;

Ab es un anticuerpo anti-GUCY2C;

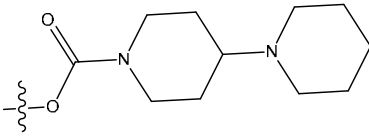
D es una sustancia farmacéuticamente activa seleccionada entre



en donde:

– R<sup>2</sup> y R<sup>1</sup> forman juntos , R<sup>3</sup> es -CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup> es -F y R<sup>5</sup> es -OH; o

– R<sup>1</sup> es -H, R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub> N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>3</sup> -OH, R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-; o

– R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> es -H, R<sup>3</sup> es , y R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-; o

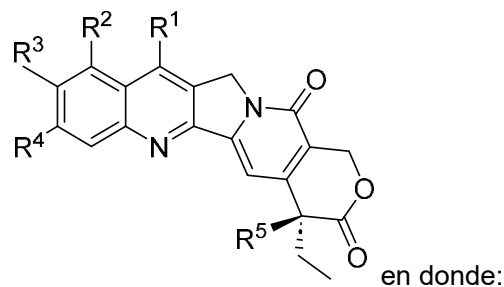
– R<sup>1</sup> es -H, R<sup>2</sup> es -NO<sub>2</sub>, R<sup>3</sup> -H, y R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-; o

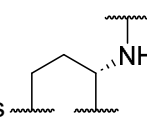
– R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> es -H, R<sup>3</sup> -H, y R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-; o

– R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> es -H, R<sup>3</sup> -OH, y R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-;

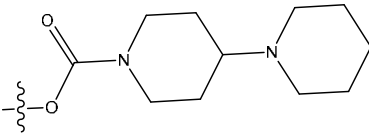
SE es un grupo potenciador de la solubilidad y comprende una alfa ciclodextrina, una beta ciclodextrina, una gamma ciclodextrina, una polisarcosina, un PEG o un polialcohol de hidratos de carbono.

Preferiblemente, D es

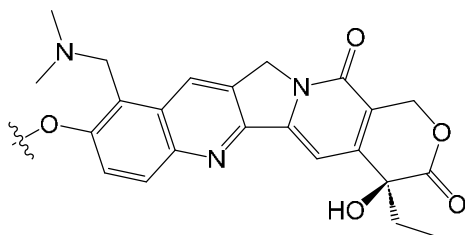


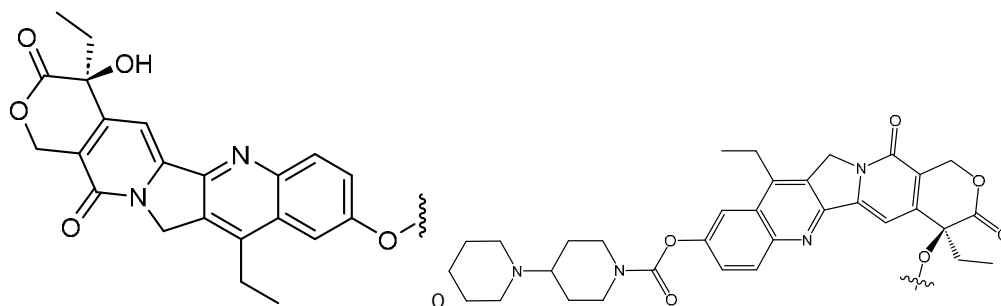
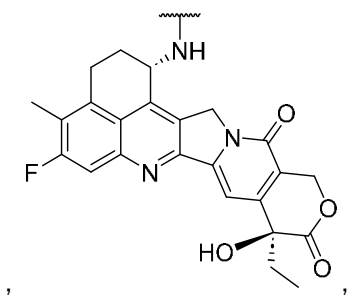
– R<sup>2</sup> y R<sup>1</sup> forman juntos , R<sup>3</sup> es -CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup> es -F y R<sup>5</sup> es -OH; o

– R<sup>1</sup> es -H, R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub> N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>3</sup> -OH, R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-; o

– R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> es -H, R<sup>3</sup> es , y R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-.

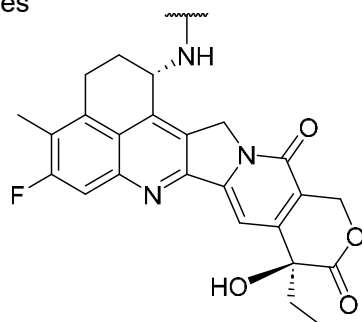
En modalidades preferidas, D es





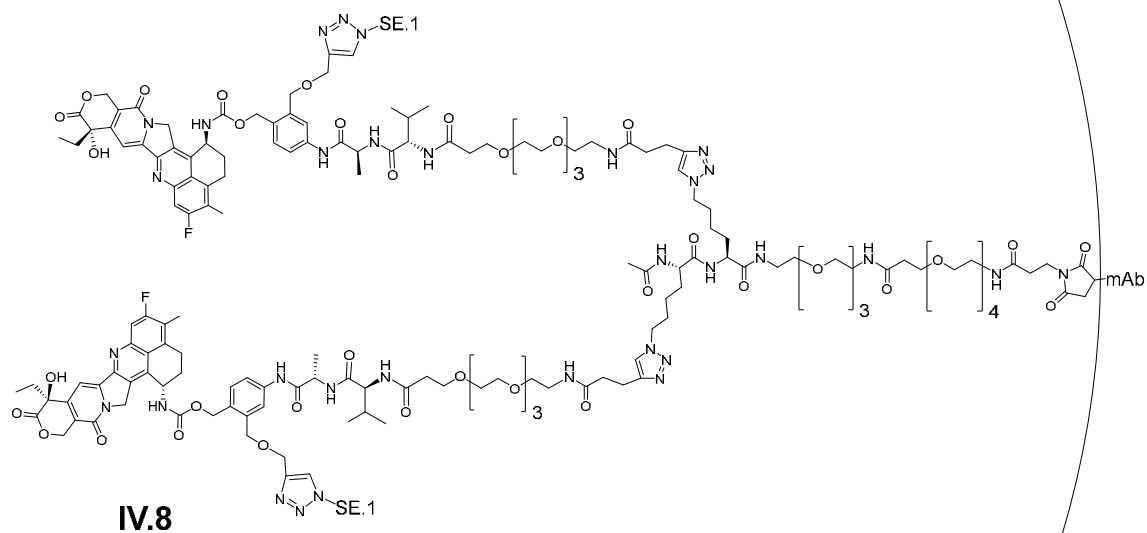
en donde la línea ondulada indica el lugar de unión de D al enlazador, tal como se describe en el presente documento.

Más preferiblemente, D es



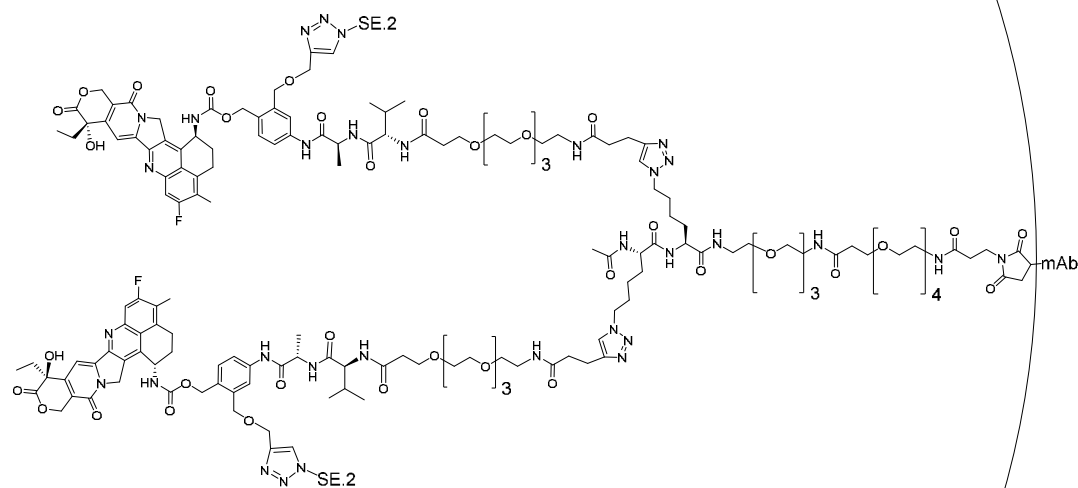
En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que reconoce y se une a una secuencia diana o epítipo de la Guanilato Ciclasa 2C (GUCY2C).

Una modalidad específicamente preferida del conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula (I) del primer aspecto es:



en donde k es 2, y mAb es un anticuerpo anti-GUCY2C seleccionado del grupo de mAb1, mAb8 y mAb41, todos según se describe en el presente documento, preferiblemente, mAb es mAb8

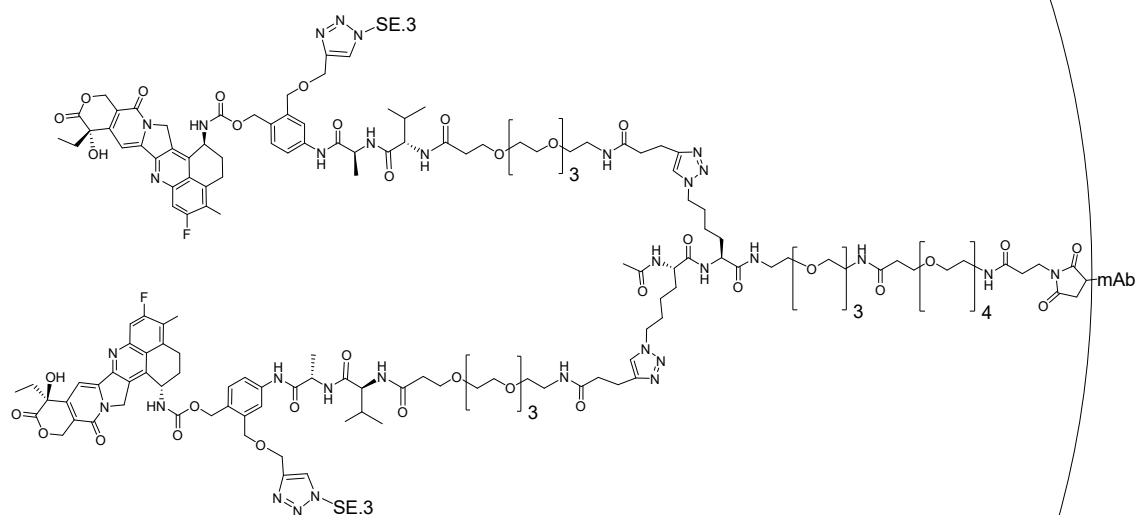
Otra modalidad específicamente preferida del conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula (I) del primer aspecto es:



**IV.9**

en donde k es 2, y mAb es un anticuerpo anti-GUCY2C seleccionado del grupo de mAb1, mAb8 y mAb41, todos como se divulgan en el presente documento, preferiblemente, mAb es mAb8.

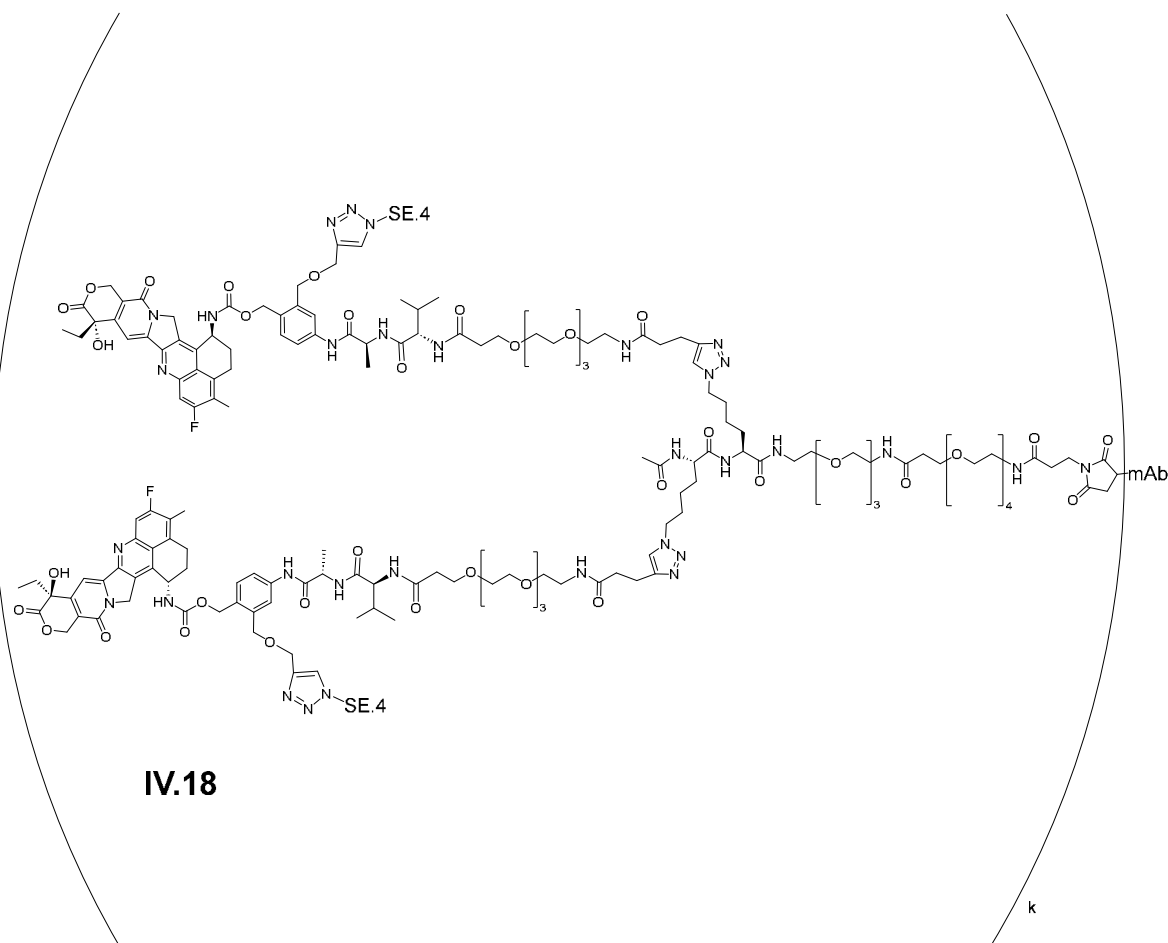
Otra modalidad específicamente preferida del conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula (I) del primer aspecto es:



**IV.12**

en donde k es 2 y mAb es un anticuerpo anti-GUCY2C seleccionado del grupo de mAb1, mAb8 y mAb41, todos como se divulgan en el presente documento, preferiblemente, mAb es mAb8.

Otra modalidad específicamente preferida del conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula (I) del primer aspecto es:



en donde k es 2 y mAb es un anticuerpo anti-GUCY2C seleccionado del grupo de mAb1, mAb8 y mAb41, todos como se divulgan en el presente documento, preferiblemente, mAb es mAb8.

IV.22

k

21

En un segundo aspecto, la presente divulgación se refiere al conjugado anticuerpo-fármaco del primer aspecto para su uso como medicamento, preferiblemente para su uso en el tratamiento del cáncer, más preferiblemente para el tratamiento del cáncer gastrointestinal, como el cáncer colorrectal (CCR), el cáncer colorrectal metastásico (CCRm) o el cáncer de páncreas.

En un tercer aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco del primer aspecto.

Por consiguiente, el segundo y tercer aspectos de la presente divulgación también abarcan métodos para tratar el cáncer, preferiblemente para tratar el cáncer gastrointestinal, como el cáncer colorrectal (CCR), el cáncer colorrectal metastásico (CCRm) o el cáncer de páncreas, en los que el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco del primer aspecto o de la composición farmacéutica del tercer aspecto a un paciente que lo necesite. Del mismo modo, el segundo aspecto de la presente divulgación también abarca el uso del conjugado anticuerpo-fármaco del primer aspecto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, preferiblemente para el tratamiento del cáncer gastrointestinal, como el cáncer colorrectal (CCR), el cáncer colorrectal metastásico (CCRm) o el cáncer de páncreas.

En tales modalidades, el cáncer gastrointestinal se caracteriza típicamente por la expresión de una secuencia diana o epítipo de un antígeno Guanilato Ciclasa 2C (GUCY2C).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las modalidades de la presente divulgación se describirán ahora, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

**Fig. 1** Citotoxicidad in vitro de un ADC anti-GCC que comprende el conjugado carga útil-enlazador (IV.8), en comparación con el ADC anti-GCC de la presente divulgación que comprende las cargas útiles del enlazador (IV.17) y (IV.19) en **(A)** células HEK que sobreexpresan GUCY2C humano (células HEK293-GUCY2C-HDP-2B3, o **(B)** células HEK293 de tipo silvestre. SEC indica purificación de ADC mediante cromatografía de exclusión por tamaño. “N/A” indica que no se calculó la EC50.

**Fig. 2** Citotoxicidad in vitro de los ADC anti-GCC que comprenden los conjugados carga útil-enlazador (IV.9), (IV.12) y (IV.18) en **(A)** células HEK que sobreexpresan GUCY2C humano (células HEK293-GUCY2C-HDP-2B3, o **(B)** células HEK293 de tipo silvestre.

**Fig. 3** muestra el volumen tumoral medio [ $\text{mm}^3$ ] representado desde el día 0 hasta el día 67 tras la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con los Exatecan-TBDC de la presente divulgación IV.12 y IV.11, como dosis única de 15 mg/kg el día 1 ( $n = 10$  animales/grupo, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 4** muestra el volumen tumoral medio [ $\text{mm}^3$ ] representado desde el día 0 hasta el día 66 después de la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con el Exatecan-TBDC de la presente divulgación IV.9 ya sea como dosis única de 15 mg/kg el día 1 o 1 vez por semana durante 3 semanas con 10 o 15 mg/kg ( $n = 10$  animales/grupo, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 5** muestra el volumen tumoral medio [ $\text{mm}^3$ ] representado desde el día 0 hasta el día 66 tras la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con el Exatecan-TBDC de la presente divulgación IV.8 como dosis única de 15 mg/kg el día 1 ( $n = 10$  animales/grupo, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 6** muestra el volumen tumoral medio [ $\text{mm}^3$ ] representado desde el día 0 hasta el día 66 tras la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con el Exatecan-TBDC de la presente divulgación IV.18 como dosis única de 15 mg/kg el día 1 ( $n = 10$  animales/grupo, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 7** muestra el volumen tumoral medio [ $\text{mm}^3$ ] representado desde el día 0 hasta el día 22 después de la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con los Exatecan-TBDC de la presente divulgación IV.9, IV.8, IV.12 o IV.18 o IV.20 1 vez por semana durante 3 semanas con 5 mg/kg cada uno ( $n = 10$  animales, media representada  $\pm$  DE). “hD” significa DAR alto (DAR10).

**Fig. 8** muestra el volumen tumoral medio [ $\text{mm}^3$ ] representado desde el día 0 hasta el día 22 después de la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con

Exatecan-TBDC de la presente divulgación IV.9, IV.8, IV.12 o IV.18 o IV.20 1 vez por semana durante 3 semanas con 2,5 mg/kg cada uno (n = 10 animales, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 9** muestra un ensayo de bystander *in vitro*. Células HEKwt negativas, teñidas con CellTracer FarRed, y células HEK-GUCY2C que expresan GUCY2C, teñidas con CFDA, fueron co-cultivadas y tratadas con ADCs anti-GCC. Después de 72 horas, se evaluó la muerte accidental causada por los compuestos analizando las células HEKwt apoptóticas (7AAD+) negativas. Los tres ADC anti-GCC produjeron entre un 22,5 % y un 32,8 % de células HEKwt apoptóticas si estas células se cultivaban con células HEK-GUCY2C que expresaban GUCY2C, mientras que no se observó ningún efecto en las células HEKwt sin células HEK-GUCY2C que expresaran la diana.

**Fig. 10** muestra el volumen tumoral medio [ $\text{mm}^3$ ] representado desde el día 0 hasta el día 100 después de la asignación del grupo, medido con calibrador. Los ratones fueron tratados con un vehículo de control IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 1 vez por semana durante 3 semanas con 5 mg/kg cada uno (n = 10 animales, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 11** muestra el volumen tumoral medio [ $\text{mm}^3$ ] representado desde el día 0 hasta el día 100 después de la asignación del grupo, medido con calibrador. Los ratones fueron tratados con vehículo de control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 1x/semana durante 3 semanas con 2,5 mg/kg cada uno (n = 10 animales, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 12** muestra la supervivencia global desde el día 0 hasta el día 100 tras la asignación del grupo. La supervivencia se monitorizó diariamente. Los ratones fueron tratados con vehículo de control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 1x/semana durante 3 semanas con 5 mg/kg cada uno (n = 10 animales, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 13** muestra la supervivencia global desde el día 0 hasta el día 100 tras la asignación de grupos. La supervivencia se monitorizó diariamente. Los ratones fueron tratados con el vehículo de control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 1x/semana durante 3 semanas con 2,5 mg/kg cada uno (n = 10 animales, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 14** muestra el volumen tumoral medio [ $\text{mm}^3$ ] representado desde el día 0 hasta el día 87 después de la asignación del grupo, medido con calibrador. Los ratones fueron tratados con un vehículo de control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 con una dosis intravenosa única de 10 mg/kg (n = 10 animales, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 15** muestra el volumen tumoral medio [mm<sup>3</sup>] representado desde el día 0 hasta el día 87 después de la asignación del grupo, medido con calibrador. Los ratones se trataron con vehículo de control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 con una dosis intravenosa única de 5 mg/kg (n = 10 animales, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 16** muestra la supervivencia global desde el día 0 hasta el día 87 después de la asignación del grupo. La supervivencia se monitorizó diariamente. Los ratones fueron tratados con un vehículo de control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 con una dosis intravenosa única de 10 mg/kg (n = 10 animales, media representada  $\pm$  DE).

**Fig. 17** muestra la supervivencia global desde el día 0 hasta el día 87 después de la asignación del grupo. La supervivencia se monitorizó diariamente. Los ratones se trataron con vehículo de control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 con una dosis intravenosa única de 5 mg/kg (n = 10 animales, media representada  $\pm$  DE).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de que la presente divulgación se describa en detalle a continuación, debe entenderse que esta divulgación no se limita a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos en este documento, ya que pueden variar. Asimismo, debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento tiene por objeto describir únicamente modalidades particulares y no pretende limitar el alcance de la presente divulgación, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia.

Preferiblemente, los términos utilizados en el presente documento se definen como se describe en “A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kolbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza). Las definiciones de los grupos químicos utilizados en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, tendrán el significado y se definirán según lo dispuesto en el “Compendio de Terminología Química” (“Libro de Oro”) publicado por la

Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) versión 2.3.3, [goldbook.iupac.org](http://goldbook.iupac.org), ISBN: 0-9678550-9-8), cuyo contenido se incorpora por referencia en el presente documento.

No obstante, para proporcionar una comprensión clara y coherente de la especificación y las reivindicaciones, así como del alcance que debe darse a determinados términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

### **Definiciones**

El término “**enlazador modular**” en el contexto de la presente divulgación se refiere a un enlazador que comprende al menos una molécula de una sustancia farmacológica citotóxica (también denominada simplemente fármaco o carga útil), varios módulos estructurales y funcionales adicionales (también denominados espaciadores o unidades o grupos funcionales), incluyendo al menos un grupo potenciador de la solubilidad y una unidad de ramificación, así como un grupo reactivo adecuado para conectar de forma estable el enlazador modular a una fracción de unión a diana, como un anticuerpo.

El término “**grupo potenciador de la solubilidad**” en el contexto de la presente divulgación se refiere a un módulo dentro del enlazador modular, que al menos contrarresta -en el mejor de los casos anula- las propiedades hidrófobas/lipofílicas de una sustancia farmacológica citotóxica, de forma que proporciona al enlazador modular que comprende una carga útil específica un alto grado de solubilidad acuosa. Una variedad de grupos potenciadores de la solubilidad adecuados para la incorporación en el enlazador modular de la presente divulgación son bien conocidos por el experto e incluyen, sin limitación: (a) grupos funcionales polares, tales como grupos hidroxilo (-OH), amina (-NH<sub>2</sub>), y carboxilo (-COOH); grupos sulfonato polares (-SO<sub>3</sub>H); cadenas poliméricas, tales como cadenas de polietilenglicol (PEG) hidrofílicas; grupos tensioactivos, como cadenas de alquilo; estructuras de anillos aromáticos; sustituyentes halógenos, como la adición de flúor o cloro; grupos éster (-COO-) o éter (-O-); y ciclodextrinas/oligosacáridos cíclicos.

En el contexto de la presente divulgación, el término “**espaciador autoinmolante**” se refiere a un espaciador que está conectado de forma estable a la sustancia farmacológica citotóxica, pero que experimenta una autoinmolación desencadenada, es decir, una descomposición, de forma que su conexión con la sustancia farmacológica citotóxica se suprime y la sustancia

farmacológica se libera sin aductos ni restos del propio espaciador autoinmolante. En algunas modalidades, un cambio de pH puede desencadenar la autoinmolación del espaciador y la liberación de la carga útil. En otras modalidades, el espaciador autoinmolante también está conectado a una secuencia peptídica escindible enzimáticamente y la escisión enzimática del péptido desencadena la autoinmolación del espaciador y la liberación de la carga útil. Un ejemplo ilustrativo de espaciador autoinmolante desencadenado enzimáticamente es un espaciador p-aminobencílico (PAB) conectado a un dipéptido Val-Ala escindible enzimáticamente.

En el contexto de la presente divulgación, el término “**enlazador escindible**” se refiere a un enlazador que es escindible (i) por una enzima, o (ii) en un entorno reductor. Además, los términos “escindible enzimáticamente” o “escindible por una enzima” o similares indican que el péptido, la estructura, la secuencia o el espaciador en cuestión pueden ser escindidos por una enzima, en particular por una proteasa lisosomal, como la catepsina B, lo que da lugar a la liberación de la sustancia farmacológicamente activa (carga útil).

En el contexto de la presente divulgación, el término “**unidad de ramificación**” se refiere a una estructura dentro de un enlazador modular que permite una furcación del compuesto en una estructura ramificada, en la que cada rama está típicamente conectada a al menos una molécula de la sustancia farmacológica citotóxica a través de un espaciador autoinmolante. Por lo tanto, un enlazador modular comprende típicamente tantas moléculas de fármaco como ramas. Como tal, un enlazador modular que comprende entre 1 y 10, preferiblemente entre 2 y 8, 2 y 6 o 2 y 4 ramas, comprende típicamente entre 1 y 10, preferiblemente entre 2 y 8, 2 y 6 o 2 y 4 moléculas de sustancia farmacológica citotóxica, respectivamente.

Tal como se utiliza aquí, el término “**anticuerpo**” se refiere a una proteína formada por una o más cadenas polipeptídicas codificadas por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina o ADNc derivados de los mismos. Dichos genes de inmunoglobulina incluyen los genes de cadena ligera kappa, lambda y pesada alfa, delta, épsilon, gamma y mu de región constante, así como cualquiera de los muchos genes diferentes de región variable.

La unidad estructural básica de la inmunoglobulina (anticuerpo) suele ser un tetrámero compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, las cadenas ligeras (L, con un

peso molecular de unos 25 kDa) y las cadenas pesadas (H, con un peso molecular de unos 50-70 kDa). Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada como VH o V<sub>H</sub>) y una región constante de cadena pesada (abreviada como CH o C<sub>H</sub>). La región constante de la cadena pesada consta de tres dominios, a saber, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera contiene una región variable de cadena ligera (abreviada como VL o V<sub>L</sub>) y una región constante de cadena ligera (abreviada como CL o C<sub>L</sub>). Las regiones VH y VL pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, que también se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR) intercaladas con regiones más conservadas denominadas regiones marco (FR). Cada región VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el orden de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera forman un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes (regiones Fc) no intervienen directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, como la participación en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis a través de la unión al receptor Fcγ, la vida media/velocidad de eliminación a través del receptor Fc neonatal (FcRn) y la activación del complemento a través del componente C1q, que conduce a las acciones quimiotáctica, opsónica y, potencialmente en el caso de un antígeno celular diana viable, citolítica del complemento. Los anticuerpos humanos de la clase IgG1 son los más potentes en la activación del sistema del complemento y, por lo tanto, son el isotipo deseable para los anticuerpos terapéuticos de los ADC de la presente invención.

Los receptores Fcγ humanos incluyen FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal para los que se demostró que un conjunto común de residuos IgG1 está implicado en la unión de todos los FcγRs, mientras FcγRII y FcγRIII utilizan sitios distintos fuera de este conjunto común (Shields et al. (2001) J. Biol. Chem 276: 6591-6604). Un grupo de residuos de IgG1 redujo la unión a todos los FcγRs cuando se alteraron a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239 (numeración según el sistema de numeración de la UE, Edelman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 63 (1969) 78-85.). Todos se encuentran en el dominio CH2 de IgG y se agrupan cerca de la bisagra que une CH1 y CH2. Mientras que FcγR1 utiliza sólo el conjunto común de residuos IgG1 para la unión, FcγRII y FcγRIII interactúan con residuos distintos además del conjunto común. La alteración de algunos residuos redujo la unión sólo a FcγRII (por ejemplo, Arg-292) o FcγRIII (por ejemplo, Glu-

293). Algunas variantes mostraron una mejor unión a Fc $\gamma$ RII o Fc $\gamma$ RIII pero no afectaron a la unión al otro receptor. Se cree que el receptor FcRn neonatal está implicado tanto en la eliminación de anticuerpos como en la transcitosis a través de los tejidos (véase: Junghans (1997) Immunol. Res 16: 29-57; y Ghetie et al. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18: 739-766). Los residuos de IgG1 humana que se ha determinado que interactúan directamente con el FcRn humano incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435.

Los términos **“CDR”**, **“CDR<sub>L1</sub>”**, **“CDR<sub>L2</sub>”**, **“CDR<sub>L3</sub>”**, **“CDR<sub>H1</sub>”**, **“CDR<sub>H2</sub>”**, **“CDR<sub>H3</sub>”** utilizados en el presente documento siguen la convención de numeración de Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)). Sin embargo, aunque la convención de numeración de Kabat para residuos de aminoácidos en secuencias de dominio variable y secuencias de anticuerpo de longitud completa se utiliza a lo largo de esta especificación, será evidente para los expertos en la materia que existen convenciones de numeración alternativas para residuos de aminoácidos en secuencias de dominio variable y secuencias de anticuerpo de longitud completa. También existen convenciones de numeración alternativas para las secuencias CDR, por ejemplo las establecidas en Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883. La estructura y el plegamiento proteico del anticuerpo pueden significar que otros residuos basados en el sistema de numeración utilizado se consideren parte de la secuencia CDR y así lo entendería una persona experta; sin embargo, estas diferencias funcionales no implican una unión al antígeno alterada o diferente del anticuerpo respectivo. Otras convenciones de numeración para secuencias CDR disponibles para un experto incluyen los métodos “AbM” (Universidad de Bath) y “contact” (University College London).

Las CDR son las más importantes para la unión del anticuerpo o de su porción de unión al antígeno. Las CDR pueden sustituirse por otras secuencias, siempre que se conserve la estructura tridimensional necesaria para la unión al antígeno. Los cambios estructurales de la construcción suelen provocar una pérdida de unión suficiente al antígeno.

Por lo general, los anticuerpos se unen específicamente al antígeno con el que están relacionados con gran afinidad, lo que se refleja en una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  M a  $10^{-11}$  M o inferior. Cualquier  $K_D$  superior a aproximadamente  $10^{-4}$  M se considera generalmente indicativa de una unión inespecífica.

Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo que **“reconoce y se une específicamente”** a un antígeno se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno y a antígenos sustancialmente idénticos con alta afinidad, lo que significa tener un  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o menos, preferiblemente  $10^{-8}$  M o menos, aún más preferiblemente  $5 \times 10^{-9}$  M o menos, y lo más preferiblemente de aproximadamente  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M a aproximadamente  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M o menos, o, por ejemplo, de aproximadamente  $10^{-8}$  M a aproximadamente  $10^{-11}$  M o menos, pero que no se une a antígenos no relacionados (por ejemplo, estructural o secuencialmente no relacionados) con una afinidad igual a la afinidad por el antígeno, por ejemplo, de aproximadamente  $10^{-10}$  M a aproximadamente  $10^{-11}$  M o menos, pero no se une a antígenos no relacionados (por ejemplo, no relacionados estructural o secuencialmente) con una afinidad igual a la afinidad por la diana específica.

El anticuerpo del ADC de la presente divulgación que, por ejemplo, también puede denominarse inmunoglobulina, puede ser de cualquiera de los isotipos comúnmente conocidos, incluidos, entre otros, IgA, IgA secretora, IgG e IgM. El isotipo IgG se divide en subclases en determinadas especies: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en humanos, e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en ratones.

El término **“fragmento de anticuerpo”** o **“fragmento de unión a antígeno”** utilizado en el presente documento se refiere a un fragmento de anticuerpo o análogo de un anticuerpo que conserva la especificidad de unión del anticuerpo anti-GUCY2C de origen, tal como se describe en el presente documento, y comprende una porción (por ejemplo, una o más CDR) o región variable de la región de unión a antígeno del anticuerpo de origen. El fragmento de anticuerpo es, por ejemplo, Fab, Fab',  $F(ab')_2$ , fragmento Fv, sc-Fv, unicuerpo, diacuerpo, anticuerpo lineal, nanocuerpo, anticuerpo de dominio o fragmento de anticuerpo multiespecífico formado a partir del fragmento de anticuerpo. Un fragmento Fab consta de las regiones CH1 y variable de una cadena ligera y una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un fragmento Fab' contiene una cadena ligera y una porción de cadena pesada que contiene el dominio VH, el dominio CH1 y la región entre los dominios CH1 y CH2. Un fragmento  $F(ab')_2$  contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, formando así un enlace disulfuro intercadena entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento  $F(ab')_2$  está compuesto por dos fragmentos Fab' unidos por el enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas. Un

**“fragmento Fv”** contiene regiones variables de las cadenas pesada y ligera, pero carece de la región constante. El término **“anticuerpo de cadena simple”** es una proteína recombinante de cadena simple formada por la conexión de la región variable de la cadena pesada VH y la región variable de la cadena ligera VL de un anticuerpo a través de un péptido conector. Es el fragmento de anticuerpo más pequeño con un sitio de unión al antígeno completo. El término **“fragmento de anticuerpo de dominio”** es un fragmento de inmunoglobulina con funciones inmunológicas que sólo contiene una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. En algunos casos, dos o más regiones VH están unidas covalentemente a un enlazador peptídico para formar un fragmento de anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones VH del fragmento de anticuerpo de dominio bivalente pueden dirigirse al mismo antígeno o a antígenos diferentes.

En el contexto de la presente divulgación, el término **“fracción reactiva para la conjugación con un anticuerpo”** se refiere a un grupo químicamente reactivo dentro del enlazador que puede reaccionar con un grupo reactivo correspondiente del anticuerpo en condiciones adecuadas de manera que el producto de reacción resultante conjugue covalentemente el compuesto enlazador restante con el anticuerpo.

En el contexto de la presente divulgación, el término **“producto de reacción del enlazador modular y un grupo reactivo correspondiente de un anticuerpo”** se refiere a una fracción formada como resultado de una reacción entre la fracción reactiva del enlazador modular de la presente divulgación y un grupo reactivo correspondiente de un anticuerpo. Por ejemplo, si la fracción reactiva del enlazador modular de la presente divulgación es una maleimida, el producto de reacción resultante de la reacción de la maleimida con el átomo de azufre del residuo de cisteína de la fracción de unión a la diana es un succinimidil tioéter o un derivado del mismo. Además, si la fracción reactiva del enlazador modular de la presente divulgación es un grupo que reacciona selectivamente con el grupo tiol de una cisteína libre de la fracción de unión a diana, es decir si la fracción reactiva del enlazador modular es una “fracción reactiva al tiol”, el producto de reacción se selecciona típicamente entre: acetamida sustituida con tiol; succinimida sustituida con tiol; ácido succinámico sustituido con tiol; heteroarilo sustituido con tiol, en particular benzotiazol sustituido con tiol, feniltetrazol sustituido con tiol y feniloxadiazol sustituido con tiol; y un disulfuro, en donde un átomo de azufre procede de un residuo de cisteína de la fracción de unión a la diana.

Tal y como se utiliza aquí, un “**derivado**” de un compuesto se refiere a una especie que tiene una estructura química similar al compuesto, pero que contiene al menos un grupo químico no presente en el compuesto y/o deficiente de al menos un grupo químico presente en el compuesto. El compuesto con el que se compara el derivado se conoce como compuesto “padre”. Típicamente, un “derivado” puede producirse a partir del compuesto padre en uno o más pasos de reacción química.

En el contexto de la presente divulgación, el término “**sal o solvatos farmacéuticamente aceptables**” incluye sales de adición ácida, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formados con ácidos orgánicos como el ácido glicólico, el ácido pirúvico, el ácido láctico, el ácido malónico, el ácido málico, el ácido inaleico, el ácido fumárico, el ácido tartárico, el ácido cítrico, el ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, el ácido cinámico, el ácido mandélico, el ácido metano sulfónico, el ácido etanosulfónico, el ácido 1,2-etano-disulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, 2-naftalenosulfónico, 4-toluenosulfónico, alcanfor sulfónico, laurilsulfúrico, glucónico, glutámico, salicílico, mucónico y similares. El término incluye además sales básicas de adición formadas con las bases conjugadas de cualquiera de los ácidos inorgánicos enumerados anteriormente, en las que las bases conjugadas comprenden un componente catiónico seleccionado entre  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , y  $\text{NH}_g\text{R}'_{4-g}^+$ ; en donde  $\text{R}'$  es un alquilo  $\text{C}_{1-13}$  y  $g$  es un número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, o 4, así como formas de adición de disolvente (es decir, solvatos) de la sal de adición ácida respectiva.

Tal como se utiliza en el presente documento, “**tratar**”, “**tratamiento**” o “**tratando**” de una enfermedad o trastorno significa lograr uno o más de los siguientes objetivos: (a) reducir la gravedad del trastorno; (b) limitar o prevenir el desarrollo de los síntomas característicos del trastorno o trastornos tratados; (c) inhibir el empeoramiento de los síntomas característicos del trastorno o trastornos tratados; (d) limitar o prevenir la reaparición del trastorno o trastornos en pacientes que hayan padecido previamente el trastorno o trastornos; y (e) limitar o prevenir la reaparición de los síntomas en pacientes que hayan padecido previamente el trastorno o trastornos.

En el presente documento, por “**paciente**” se entiende cualquier mamífero que pueda beneficiarse de un tratamiento con los conjugados de fármaco de unión a diana descritos en

el presente documento. Preferentemente, un “paciente” se selecciona del grupo que consiste en animales de laboratorio (por ejemplo, ratón o rata), animales domésticos (incluidos, por ejemplo, cobaya, conejo, pollo, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, burro, gato o perro) o primates, incluidos los seres humanos. Se prefiere especialmente que el “paciente” sea un ser humano.

Una “**cantidad terapéuticamente eficaz**” es una cantidad de un agente terapéutico suficiente para lograr el fin previsto. La cantidad eficaz de un agente terapéutico determinado variará en función de factores como la naturaleza del agente, la vía de administración, el tamaño y la especie del animal que va a recibir el agente terapéutico y la finalidad de la administración. La cantidad efectiva en cada caso individual puede determinarse empíricamente por un artesano experto según métodos establecidos en la técnica.

Además de las definiciones anteriores, y a menos que el contexto requiera claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras “**comprende**”, “**que comprende**” y similares deben interpretarse en un sentido inclusivo en contraposición a un sentido exclusivo o exhaustivo; es decir, en el sentido de “que incluye, pero no se limita a”. Además, la referencia a lo largo de esta especificación a “**una modalidad**”, “**algunas modalidades**” o “**una modalidad**” significa que un rasgo, estructura o característica particular descrita en relación con la modalidad está incluida en al menos una modalidad de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las frases “en una modalidad”, “en algunas modalidades” o “en una modalidad” en varios lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma modalidad, pero pueden hacerlo. Además, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada, como sería evidente para un experto en la materia a partir de esta divulgación, en una o más modalidades.

A menos que se especifique lo contrario, el uso de los adjetivos ordinales “**primero**”, “**segundo**”, “**tercero**”, etc., para describir un objeto común, sólo indican que se hace referencia a diferentes instancias de objetos similares y no pretenden implicar que los objetos descritos deban estar en una secuencia determinada, ya sea temporal, espacial, de clasificación o de cualquier otra manera.

Tal y como se utiliza aquí, el término “**ejemplar**” se emplea en el sentido de proporcionar ejemplos, en contraposición a indicar calidad. Es decir, una “**modalidad ejemplar**” es una modalidad proporcionada como ejemplo, en lugar de ser necesariamente una modalidad de calidad ejemplar.

A lo largo del texto de esta especificación se citan varios documentos. Cada uno de los documentos citados en el presente documento (incluidas todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, presentaciones de secuencias de números de acceso de GenBank, etc.), ya sea supra - o infra, se incorpora por referencia en su totalidad en la medida de lo posible en virtud de la ley de patentes respectiva.

### **Conjugados anticuerpo-fármaco (ADC)**

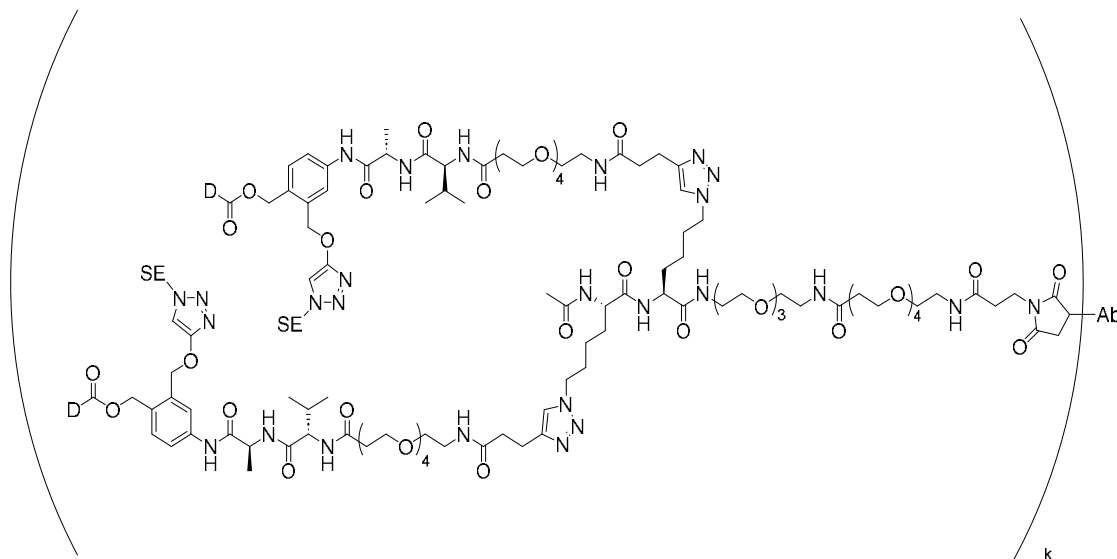
Los inventores de la presente divulgación han desarrollado nuevos conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un enlazador modular que comprende varios módulos (es decir, también denominados grupos, unidades, elementos, etc.), y que han sido implicados en la función y eficacia de los ADC.

La arquitectura modular del enlazador puede acomodar sustancias farmacológicamente activas con diversas propiedades fisicoquímicas, así como enlazar de forma estable la sustancia farmacológica portadora del enlazador a un anticuerpo, de forma que se pueda proporcionar un ADC robusto y fiable.

Además, y como se hará evidente a partir de la descripción más adelante, a través de las químicas de conjugación empleadas en el ADC, tanto un homogéneo Grado de Etiquetado (DOL) de 2 por molécula de enlace y una relación fármaco-anticuerpo (DAR) de 4 a 8 es fácilmente alcanzable.

Por lo tanto, se descubrió que, de una manera relativamente sencilla, el ADC de la presente divulgación proporciona un direccionamiento eficaz de células cancerosas seleccionadas, GUCY2C-positivas con la sustancia farmacológicamente activa del conjugado dada la especificidad del anticuerpo para un antígeno específico asociado al cáncer o específico del cáncer.

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula (I)



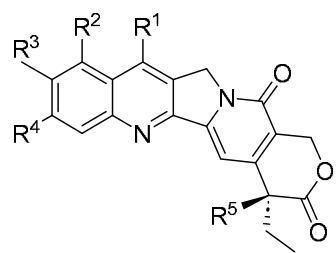
Fórmula (I)

o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; en donde:

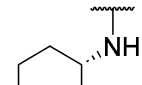
k es un número entero entre 2 y 4;

Ab es un anticuerpo anti-GUCY2C;

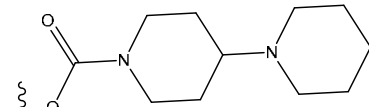
D es una sustancia farmacéuticamente activa seleccionada entre



en donde:

– R<sup>2</sup> y R<sup>1</sup> forman juntos , R<sup>3</sup> es -CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup> es -F y R<sup>5</sup> es -OH; o

– R<sup>1</sup> es -H, R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub> N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>3</sup> -OH, R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-; o

– R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> es -H, R<sup>3</sup> es , y R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-; o

- R<sup>1</sup> es -H, R<sup>2</sup> es -NO<sub>2</sub>, R<sup>3</sup> -H, y R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-; o
- R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> es -H, R<sup>3</sup> -H, y R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-; o
- R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> es -H, R<sup>3</sup> -OH, y R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-;

SE es un grupo potenciador de la solubilidad y comprende una alfa ciclodextrina, una beta ciclodextrina, una gamma ciclodextrina, una polisarcosina, un PEG o un polialcohol de hidratos de carbono.

Los principios activos farmacéuticos D particularmente adecuados en el ADC de la presente divulgación son las camptotecinas, una clase de compuestos que comprende tanto miembros naturales como sintéticos, que han demostrado ser anticancerígenos a través de la inhibición de la topoisomerasa I, interfiriendo así con los procesos de replicación y reparación del ADN, lo que conduce a daños en el ADN y, en última instancia, a la muerte celular en las células cancerosas.

En el ADC de la presente invención, la sustancia farmacológica activa D es un compuesto de camptotecina seleccionado entre SN-38, topotecán, irinotecán, rubitecán, belotecán, SN38 y exatecán.

Un miembro notable de esta clase de compuestos es el SN-38 (un derivado de la camptotecina, generado como metabolito activo cuando el fármaco quimioterapéutico irinotecán / CPT- 11 se metaboliza en el organismo del paciente.

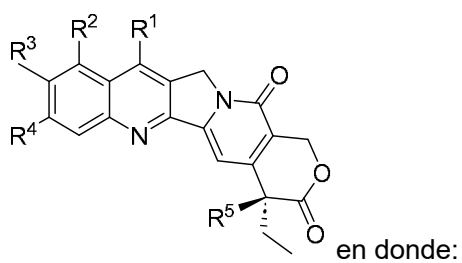
El topotecán y el irinotecán son camptotecinas que también se utilizan como agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, como el cáncer de ovario, el cáncer de pulmón de células pequeñas y el cáncer de cuello uterino. Como ya se ha indicado anteriormente, el irinotecán es un profármaco, que se administra en forma inactiva y se convierte en su forma activa (SN-38) dentro del organismo. Tanto el topotecán como el irinotecán suelen administrarse por vía intravenosa.

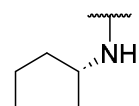
El rubitecán sigue siendo un agente quimioterapéutico en investigación de la clase de la camptotecina, similar al irinotecán y al topotecán. El rubitecán se ha estudiado por su posible uso en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, como el colorrectal, el de ovario y el de páncreas, y se ha estudiado ampliamente en la investigación oncológica

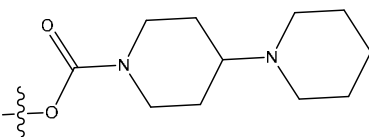
El belotecán es otro compuesto de la camptotecina que inhibe la topoisomerasa 1, lo que altera los procesos esenciales de replicación y reparación del ADN y provoca la muerte de las células cancerosas.

Exatecan es otro compuesto de camptotecina (también conocido como DX-8951f o SG2000) adecuado para su inclusión en el ADC de la presente invención.

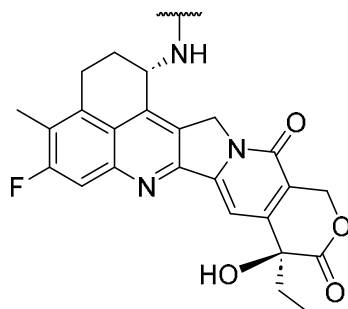
Teniendo en cuenta lo anterior, preferiblemente, D es



- R<sup>2</sup> y R<sup>1</sup> forman juntos , R<sup>3</sup> es -CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup> es -F y R<sup>5</sup> es -OH; o
- R<sup>1</sup> es -H, R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub> N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>3</sup> -OH, R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-; o

- R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> es -H, R<sup>3</sup> es , y R<sup>4</sup> es -H y R<sup>5</sup> es -O-.

Más preferiblemente, D es



Como se ha descrito anteriormente, tanto la sustancia farmacéuticamente activa D como el grupo potenciador de la solubilidad SE están conectados a un espaciador autoinmolante del

enlazador modular del ADC. En particular, D se conecta en posición para a la secuencia de enlace escindible de la parte autoinmolante del espaciador aminobencílico, mientras que el grupo potenciador de la solubilidad SE se conecta en posición meta a la secuencia de enlace escindible adjunta. Por consiguiente, una vez que el espaciador aminobencílico sufre la autoinmolación desencadenada, es decir, la descomposición, el fármaco activo D se libera como metabolito de la reacción de autoinmolación sin que quede ningún resto químico del compuesto enlazador. En tales modalidades, el grupo amino de un espaciador para-aminobencílico sirve como donante de electrones en la cascada de electrones de la reacción de autoinmolación 1,6 que libera el fármaco citotóxico D. Ventajosamente, este mecanismo de liberación sin trazas garantiza que el fármaco citotóxico no se altere a través de su conexión y posterior liberación del compuesto enlazador.

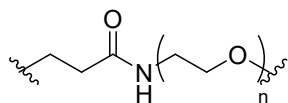
Se ha demostrado que es ventajoso que el grupo potenciador de la solubilidad SE esté unido al espaciador autoinmolante en meta, mientras que la sustancia farmacológica citotóxica está unida en la posición para adyacente. Sin querer estar limitado por la teoría, la proximidad del grupo potenciador de la solubilidad SE y la sustancia farmacológica citotóxica D resulta en el enmascaramiento de las propiedades lipófilas/hidrófobas de la sustancia farmacológica mediante la formación de un complejo denominado “hospedero-huésped”, de forma que se aumenta aún más la solubilidad del compuesto enlazador modular.

Una vez que el ADC reconoce y se une a la secuencia diana o al epítipo diana del antígeno específico del cáncer, es internalizado por la célula cancerosa y se convierte en un sustrato para las proteasas lisosomales. En el ADC de la presente invención, el espaciador autoinmolante está unido a una secuencia dipéptida escindible, que es una diana para dichas proteasas lisosomales, concretamente para las cisteína proteasas de la familia de las catepsinas, incluidas las catepsinas B, C, D, H, L, S y Z. Típicamente, la secuencia dipéptida es una secuencia valina-alanina (Val-Ala), que es escindible por la catepsina B. Una vez escindida la secuencia dipéptida, se desencadena la cascada de electrones de la reacción de autoinmolación, lo que conduce a la liberación sin trazas de la sustancia farmacológica del espaciador autoinmolante del ADC.

En casos alternativos, la secuencia peptídica puede ser un dipéptido seleccionado entre valina-citrulina (Val-Cit), o fenilalanina-lisina (Phe-Lys), o un tripéptido seleccionado entre ácido glutámico-valina-alanina (Glu-Val-Ala) o ácido glutámico-valina-citrulina (Glu-Val-Cit).

Como ya se ha indicado anteriormente, una característica ventajosa del enlazador modular del ADC de la presente divulgación es su núcleo multimérico que comprende dos unidades de ramificación secuenciales basadas en aminoácidos, cada una conectada indirectamente a la secuencia dipéptida o tripéptida y al espaciador autoinmolante que lleva tanto la sustancia farmacológicamente activa D como el grupo potenciador de la solubilidad SE.

En algunas modalidades, el ADC del primer aspecto, la unidad de ramificación distal al sitio de conjugación del enlazador portador del fármaco con el anticuerpo lleva un casquillo de acilo terminal, en donde dicho casquillo de acilo constituye el extremo de la unidad de ramificación final en el núcleo multimérico del enlazador modular. Además, cada unidad de ramificación está separada de la secuencia dipéptida o tripéptida que precede al espaciador autoinmolante que lleva tanto D como SE por un espaciador C<sub>2</sub>-amida-PEG<sub>n</sub>. El término “C<sub>2</sub>-amida-PEG<sub>n</sub>” se refiere a un enlazador que comprende moléculas de etilenglicol unidas covalentemente a un grupo propilamida,



en donde n es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

Como también se ha mencionado anteriormente, las sustancias farmacológicamente activas, incluidas las camptotecinas, suelen tener una solubilidad desfavorablemente baja en soluciones acuosas como las fisiológicas/sistémicas. Por lo tanto, para evitar la agregación indeseable de los ADC de la invención, el enlazador modular comprende necesariamente un grupo potenciador de la solubilidad S conectado a cada espaciador autoinmolante. El grupo potenciador de la solubilidad SE puede ser una alfa-ciclodextrina, una beta-ciclodextrina, una gamma-ciclodextrina, una polisarcosina, un PEG o un polialcohol de carbohidratos.

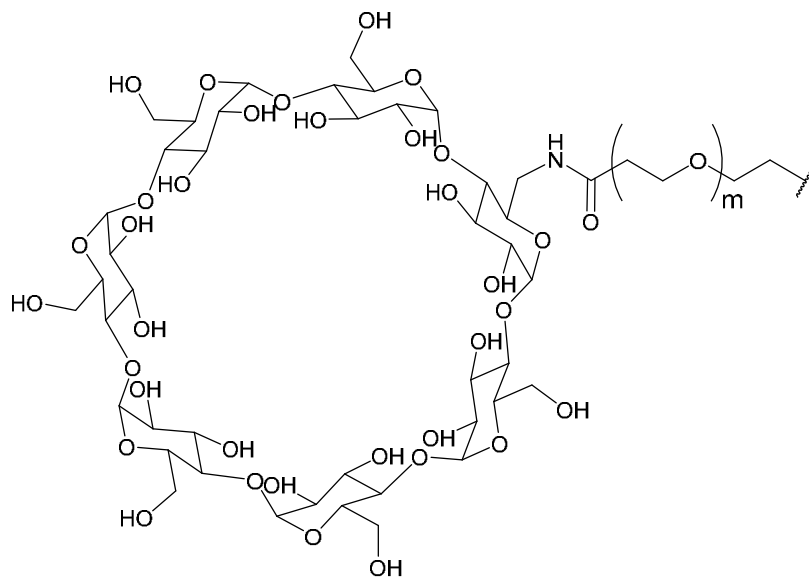
Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos compuestos por unidades de glucosa dispuestas en forma de toroide (donut). Tienen un interior hidrófobo y un exterior hidrófilo. Esta estructura única les permite formar complejos de inclusión con moléculas hidrófobas o poco solubles y, cuando una sustancia farmacológica hidrófoba/lipofílica forma un complejo con una ciclodextrina, suele aumentar su solubilidad en una solución acuosa. Por consiguiente, un fármaco activo hidrófobo puede encapsularse en el bolsillo hidrófobo de la

ciclodextrina, protegiéndolo del medio acuoso circundante y aumentando así su solubilidad. No obstante, las ciclodextrinas son químicamente compatibles con una amplia gama de sustancias farmacológicamente activas y normalmente no son reactivas con respecto a las moléculas encapsuladas mediante la formación de un complejo de inclusión. Esto permite mantener la estabilidad del complejo y la integridad del principio activo al mismo tiempo.

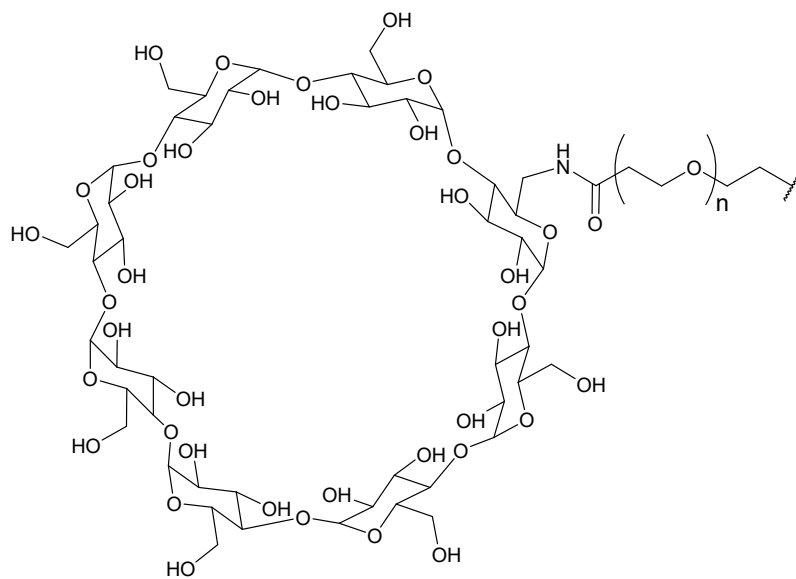
Además, las ciclodextrinas se han utilizado ampliamente en productos farmacéuticos, alimentos y cosméticos durante muchos años y se ha demostrado que sus perfiles generales de seguridad y biocompatibilidad son favorables.

Por consiguiente, las ciclodextrinas son grupos potenciadores de la solubilidad S especialmente adecuados en el contexto de los compuestos enlazadores aquí descritos. Por ejemplo, las alfa-ciclodextrinas (que comprenden seis moléculas de glucosa), las beta-ciclodextrinas (que comprenden siete moléculas de glucosa) y las gamma-ciclodextrinas (que comprenden ocho moléculas de glucosa), cuando se unen a un espaciador amida-PEG<sub>1-12</sub>.

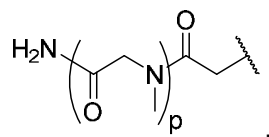
Por lo tanto, en algunas modalidades del ADC del primer aspecto, el SE se selecciona de:



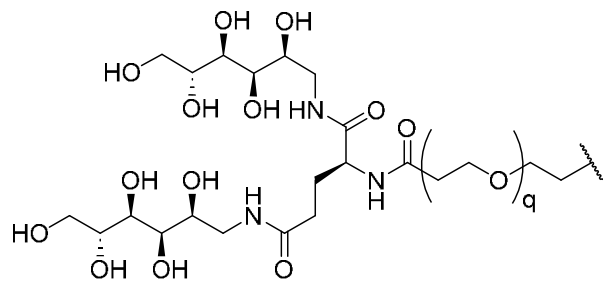
en donde m es de 2 a 12, como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, preferiblemente m es 4, 5, 6, 7 u 8;



en donde n es de 2 a 12, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12; preferiblemente n es 4, 5, 6, 7 u 8,

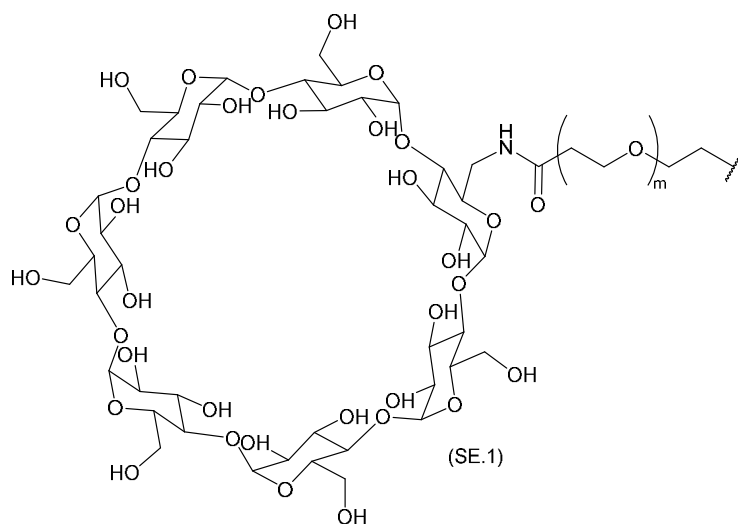


en donde p es de 1 a 20, como por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20; preferiblemente p es de 8 a 14, aún más preferiblemente p es de 10 a 12, -----  
o



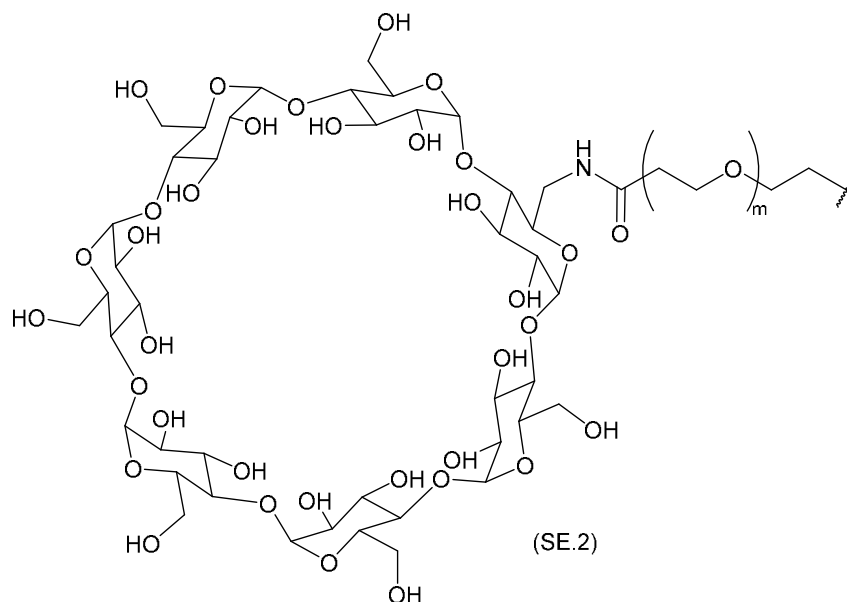
en donde q es de 2 a 12, como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, preferiblemente q es 4, 5, 6, 7 u 8.

En algunas modalidades, SE es:



y m es 4.

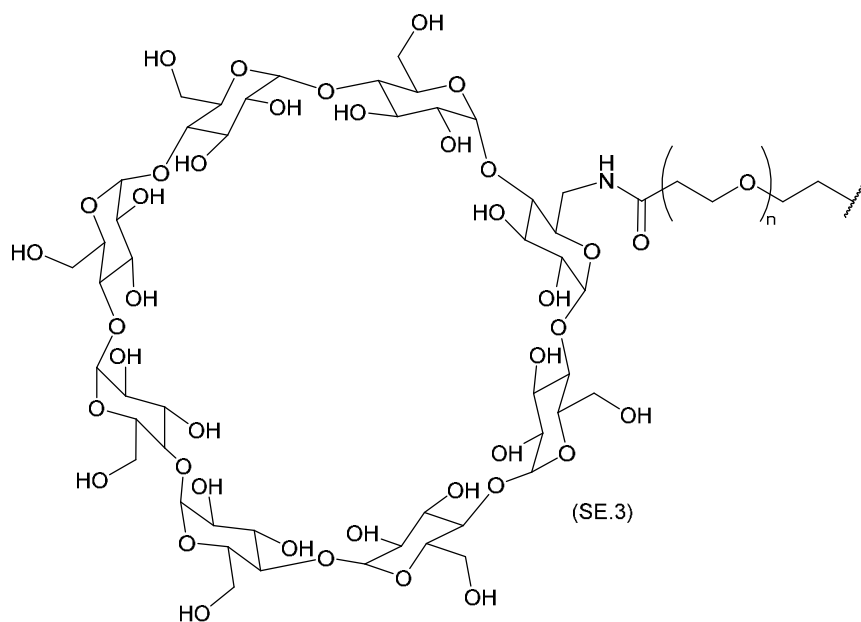
Alternativamente SE es:



y m es 8.

La selección de la longitud de los espaciadores de PEG de  $m = 4$  o  $m = 8$  para las beta-ciclodextrinas arriba descritas es particularmente ventajosa cuando la sustancia farmacéutica D es una camptotecina.

En otras modalidades, SE es:

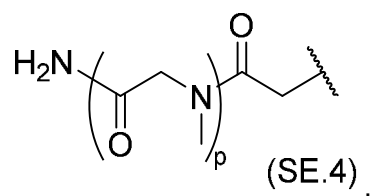


y n es 4.

La selección de la longitud del espaciador de PEG de  $n = 4$  para la gamma-ciclodextrina anterior es particularmente ventajosa cuando la sustancia farmacéutica D es una camptotecina.

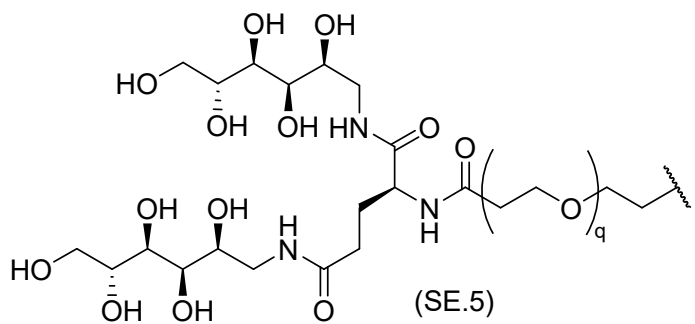
Resulta especialmente ventajoso enlazar un grupo potenciador de la solubilidad basado en ciclodextrina de los tipos ilustrados anteriormente con el espaciador X autoinmolante a través de una cadena de PEG de las longitudes indicadas anteriormente. Tales longitudes de cadena de PEG favorecen una disposición conformacional del compuesto enlazador que permite un complejo de inclusión que coloca la sustancia farmacológica lipofílica en el bolsillo de la estructura de anillo de ciclodextrina anulando sustancialmente las propiedades hidrofóbicas/lipofílicas de la camptotecina.

En otras modalidades, SE es:



y p es 10.

En algunas modalidades, SE es:



y q es 8.

Como ya se ha indicado, el anticuerpo del ADC reconoce específicamente y se une a una secuencia diana o epítipo de un antígeno, como para mediar la especificidad de células cancerosas del ADC. Sin embargo, como también se ha descrito anteriormente, preferiblemente el anticuerpo del ADC del primer aspecto es uno de:

- un anticuerpo monoclonal;
- un fragmento de anticuerpo funcional o un derivado de anticuerpo, como un fragmento variable de cadena única (scFv), un fragmento de unión a **antígeno**, como un fragmento Fab, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o una construcción de anticuerpo bi- o tri-específica,
- un Diacuerpo,
- un anticuerpo contra camélidos,
- a anticuerpo de dominio,
- un nanocuerpo,
- un homodímero bivalente con dos cadenas formadas por scFvs,
- un anticuerpo de tiburón,
- un anticuerpo compuesto por secuencias marco de primates del nuevo mundo más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de primates que no son del nuevo mundo o
- una construcción dimerizada que comprende un dominio de cadena pesada constante 3 (CH<sub>3</sub>), una cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) y una cadena pesada variable (V<sub>H</sub>).

Un diacuerpo, tal como se ha descrito anteriormente, se refiere a una molécula similar a un anticuerpo en la que la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) derivadas del mismo anticuerpo progenitor formarán un heterodímero mediante un enlace no covalente. Los diacuerpos y su generación se describen, por ejemplo, en Holliger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448, 1993. Los diacuerpos pueden ser, por ejemplo, diacuerpos modificados con cisteína para facilitar la conjugación con las cargas de enlace, tal como se describe en el presente documento.

El término “nanocuerpo<sup>®</sup>” (Nb) se refiere a dominios variables simples (VHH) de anticuerpos de cadena pesada de camélidos (hcAbs). Los nanocuerpos anti-GUCY2C pueden, por ejemplo, conjugarse con las cargas útiles enlazadoras de la presente divulgación introduciendo un enlazador que contenga cisteína al que puedan conjugarse las cargas útiles enlazadoras aquí divulgadas. Dada la corta vida media plasmática de los nanocuerpos, es ventajoso fusionar el nanocuerpo anti-GUCY2C mediante un enlazador a un segundo nanocuerpo que se une a la albúmina sérica humana (HSA). Los métodos correspondientes se describen, por ejemplo, en J Nanobiotechnol 21, 410 (2023).

El término “anticuerpo de tiburón” se refiere a las IgNAR, que representan el anticuerpo esencial del sistema inmunitario adaptativo de un tiburón. Los IgNAR contienen un homodímero de cadena pesada no asociado a cadenas ligeras. La unión a antígeno de las IgNAR requiere dos VNAR (dominio variable de IgNAR) independientes y altamente solubles con un peso molecular de alrededor de 12 kDa. El VNAR de tiburón es la molécula similar a un anticuerpo más pequeña que existe en la naturaleza. Las IgNAR dirigidas contra GUCY2C pueden, por ejemplo, modificarse recombinantemente para que contengan uno o más residuos de cisteína que faciliten la conjugación con las cargas-enlazador de la presente divulgación, o pueden modificarse para que contengan un enlazador con cisteína al que puedan conjugarse las cargas-enlazador de la presente divulgación. Al igual que los nanocuerpos, los IgNAR pueden fusionarse con IgNAR anti-HAS para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, véase, por ejemplo, mAbs 4:6, 673-685; noviembre/diciembre de 2012. Preferiblemente, los anticuerpos tiburón son anticuerpos desinmunizados.

Cada uno de los formatos de anticuerpos antes mencionados debe garantizar un reconocimiento y una unión altamente específicos de la secuencia diana o del epítipo diana

del antígeno específico del cáncer, de forma que se eviten efectos no deseados fuera de diana.

En el contexto de la presente invención, cuando los pacientes con cáncer gastrointestinal, tales como cáncer colorrectal (CCR), cáncer colorrectal metastásico (CCRm) o pacientes con cáncer de páncreas se van a beneficiar del ADC del primer aspecto, predominantemente, el anticuerpo es típicamente un anticuerpo monoclonal que reconoce y se une a una secuencia diana o epítipo de Guanilato Ciclasa 2C (GUCY2C), preferiblemente Guanilato Ciclasa 2C humana, o cinomolgus, más preferiblemente Guanilato Ciclasa 2C humana. ----- Se han descrito anti-GUCY2C altamente específicos en PCT/EP2023/080350 (publicado como WO2024/094688 A1), que se incorpora por referencia en su totalidad.

Por consiguiente, en una modalidad del primer aspecto, el anticuerpo del ADC es el anticuerpo monoclonal anti-GUCY2C mAb1, que incluye una región de unión a antígeno que comprende:

- una región variable de cadena ligera mAb1 (mAb1 V<sub>L</sub>) región determinante de la complementariedad (CDR<sub>L</sub>) secuencias CDR<sub>L</sub>1 de SEQ ID NO: 1, CDR<sub>L</sub>2 de SEQ ID NO: 2 y CDR<sub>L</sub>3 de SEQ ID NO: 3 y
- una región variable de cadena pesada mAb1 (mAb1 V<sub>H</sub>) CDR<sub>H</sub>1 de SEQ ID NO: 4, CDR<sub>H</sub>2 de SEQ ID NO: 5 y CDR<sub>H</sub>3 de SEQ ID NO: 6.

Más específicamente, el anticuerpo mAb1 incluye una región de unión a antígeno que comprende:

- el mAb1 V<sub>L</sub> comprende una región marco 1 (FR<sub>L</sub>1) de SEQ ID NO: 14, CDR<sub>L</sub>1 de SEQ ID NO: 1, un FR<sub>L</sub>2 de SEQ ID NO: 15, CDR<sub>L</sub>2 de SEQ ID NO: 2, un FR<sub>L</sub>3 de SEQ ID NO: 16, CDR<sub>L</sub>3 de SEQ ID NO: 3 y un FR<sub>L</sub>4 de SEQ ID NO: 17; y
- el mAb1 V<sub>H</sub> comprende una región marco 1 (FR<sub>H</sub>1) de la SEQ ID NO: 18, CDR<sub>H</sub>1 de la SEQ ID NO: 4, una FR<sub>H</sub>2 de la SEQ ID NO: 19, CDR<sub>H</sub>2 de la SEQ ID NO: 5, una FR<sub>H</sub>3 de la SEQ ID NO: 20, CDR<sub>H</sub>3 de la SEQ ID NO: 6 y una FR<sub>H</sub>4 de la SEQ ID NO: 21.

Además, el anticuerpo mAb1 incluye una región de unión a antígeno que comprende:

- el mAb1 V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 32 y

- el mAb1V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 33.

En otra modalidad del primer aspecto, el anticuerpo del ADC es el anticuerpo monoclonal anti-GUCY2C mAb8, que incluye una región de unión a antígeno que comprende:

- una región variable de cadena ligera mAb8 (mAb8 V<sub>L</sub>) región determinante de la complementariedad (CDR<sub>L</sub>) secuencias CDR<sub>L</sub>1 de SEQ ID NO: 1, CDR<sub>L</sub>2 de SEQ ID NO: 2 y CDR<sub>L</sub>3 de SEQ ID NO: 7 y
- una región variable de cadena pesada mAb8 (mAb8 V<sub>H</sub>) CDR<sub>H</sub>1 de SEQ ID NO: 4, CDR<sub>H</sub>2 de SEQ ID NO: 5 y CDR<sub>H</sub>3 de SEQ ID NO: 6.

Más específicamente, el anticuerpo mAb8 incluye una región de unión a antígeno que comprende:

- el mAb8 V<sub>L</sub> comprende una región marco 1 (FR<sub>L</sub>1) de SEQ ID NO: 22, CDR<sub>L</sub>1 de SEQ ID NO: 1, un FR<sub>L</sub>2 de SEQ ID NO: 15, CDR<sub>L</sub>2 de SEQ ID NO: 2, un FR<sub>L</sub>3 de SEQ ID NO: 23, CDR<sub>L</sub>3 de SEQ ID NO: 7 y un FR<sub>L</sub>4 de SEQ ID NO: 24; y
- el mAb8 V<sub>H</sub> comprende una región marco 1 (FR<sub>H</sub>1) de SEQ ID NO: 18, CDR<sub>H</sub>1 de SEQ ID NO: 4, un FR<sub>H</sub>2 de SEQ ID NO: 19, CDR<sub>H</sub>2 de SEQ ID NO: 5, un FR<sub>H</sub>3 de SEQ ID NO: 20, CDR<sub>H</sub>3 de SEQ ID NO: 6 y un FR<sub>H</sub>4 de SEQ ID NO: 21.

Además, el anticuerpo mAb8 incluye una región de unión a antígeno que comprende:

- el mAb8 V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 34 y
- el mAb8 V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 35.

En otra modalidad del primer aspecto, el anticuerpo del ADC es el anticuerpo monoclonal anti-GUCY2C mAb41, que incluye una región de unión a antígeno que comprende:

- una región variable de cadena ligera mAb41 (mAb41 V<sub>L</sub>) región determinante de la complementariedad (CDR<sub>L</sub>) secuencias CDR<sub>L</sub>1 de SEQ ID NO: 8, CDR<sub>L</sub>2 de SEQ ID NO: 9 y CDR<sub>L</sub>3 de SEQ ID NO: 10 y
- una región variable de cadena pesada mAb41 (mAb41 V<sub>H</sub>) CDR<sub>H</sub>1 de SEQ ID NO: 11, CDR<sub>H</sub>2 de SEQ ID NO: 12 y CDR<sub>H</sub>3 de SEQ ID NO: 13.

Más específicamente, el anticuerpo mAb41 incluye una región de unión a antígeno que comprende:

- el mAb41 V<sub>L</sub> comprende una región marco 1 (FR<sub>L</sub>1) de SEQ ID NO: 25, CDR<sub>L</sub>1 de SEQ ID NO: 8, un FR<sub>L</sub>2 de SEQ ID NO: 26, CDR<sub>L</sub>2 de SEQ ID NO: 9, un FR<sub>L</sub>3 de SEQ ID NO: 27, CDR<sub>L</sub>3 de SEQ ID NO: 10 y un FR<sub>L</sub>4 de SEQ ID NO: 28; y
- el mAb41 V<sub>H</sub> comprende una región marco 1 (FR<sub>H</sub>1) de la SEQ ID NO: 29, CDR<sub>H</sub>1 de la SEQ ID NO: 11, una FR<sub>H</sub>2 de la SEQ ID NO: 30, CDR<sub>H</sub>2 de la SEQ ID NO: 12, una FR<sub>H</sub>3 de la SEQ ID NO: 31, CDR<sub>H</sub>3 de la SEQ ID NO: 13 y una FR<sub>H</sub>4 de la SEQ ID NO: 21.

Además, el anticuerpo mAb41 incluye una región de unión a antígeno que comprende:

- el mAb41 V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 36 y
- el mAb41 V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 37.

En algunas modalidades del conjugado anticuerpo-fármaco según el primer aspecto, el anticuerpo es: (a) un anticuerpo humanizado o humano; y/o (b) un anticuerpo de tipo IgG, preferiblemente un anticuerpo IgG1; y/o (c) un anticuerpo recombinante.

Según una modalidad, el anticuerpo anti-GUCY2C del ADC es un anticuerpo recombinante o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El término “recombinante” o “producido recombinantemente” se refiere a una proteína, como el anticuerpo anti-GUCY2C o el fragmento de unión a antígeno de la presente divulgación, que se ha expresado en células heterólogas. Por ejemplo, el anticuerpo anti-GUCY2C o el fragmento de unión a antígeno de la presente divulgación pueden expresarse en células procariotas o eucariotas. Las células procariotas para la expresión del anticuerpo del ADC de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, bacterias gramnegativas como *E. coli*, o bacterias grampositivas como *Bacillus subtilis*. El uso de sistemas de expresión procarióticos heterólogos puede ser particularmente útil para la expresión de fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo anti-GUCY2C del ADC de la presente divulgación y puede realizarse según protocolos establecidos conocidos en la técnica, como por ejemplo Kwong y Rader, Curr. Protoc. Protein Sci. 55:6.10.1-6.10.14. para la expresión de fragmentos Fab.

Sin embargo, se prefiere el uso de células eucariotas para la expresión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente divulgación debido a la glicosilación del anticuerpo expresado heterológicamente. Es aún más preferible utilizar células de mamífero para la expresión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Por ejemplo, pueden usarse células de ovario de hámster chino (CHO), o cualquiera de sus progenies genéticamente diferentes, como las líneas celulares K1-, DukX B11-, DG44, para la expresión del anticuerpo de la invención. Otras líneas celulares de mamífero que pueden utilizarse para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, células NS0, células de riñón embrionario (HEK) 293, células PER.C6, células MCF7. Las células pueden, por ejemplo, transfectarse con un vector de expresión que comprende la secuencia codificante para el anticuerpo anti-GUCY2C o el fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención. El vector de expresión o plásmido recombinante se produce colocando las secuencias codificantes del anticuerpo bajo el control de elementos genéticos reguladores adecuados, incluyendo secuencias promotoras y potenciadoras como, por ejemplo, un promotor CMV. Las secuencias de cadena pesada y ligera pueden expresarse, por ejemplo, a partir de vectores de expresión individuales que se transfectan conjuntamente, o a partir de vectores de expresión dual. Dicha transfección puede ser una transfección transitoria o una transfección estable. Las células transfectadas se cultivan posteriormente para producir la construcción de anticuerpo transfectada. Cuando se realiza una transfección estable, se seleccionan clones estables que segregan anticuerpos con cadenas pesadas y ligeras correctamente asociadas mediante un cribado con un ensayo apropiado, como por ejemplo ELISA, se subclonan y se propagan para su producción futura. Los métodos correspondientes se describen, por ejemplo, en el documento WO03/018771.

Según una modalidad, el anticuerpo anti-GUCY2C del ADC de la presente divulgación comprende una región Fc, que comprende la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 38. Los anticuerpos de la presente divulgación que comprenden una región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 38 son capaces de inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Sin embargo, puede ser deseable reducir o eliminar la función efectora del anticuerpo de la ADC de la presente divulgación, tal como se divulga en el presente documento, por ejemplo, para

evitar la muerte de la célula diana, la secreción no deseada de citoquinas o la muerte de células que expresan el receptor Fcγ, como los macrófagos.

Por consiguiente, el anticuerpo anti-GUCY2C de la ADC de la presente divulgación, tal como se describe en el presente documento, también puede incluir modificaciones y/o mutaciones que alteran las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos, tales como las que disminuyen la ADCC, ADCP o citotoxicidad dependiente del complemento CDC, tal como se conoce en la técnica. Preferiblemente, la ADCC, ADCP y CDC se reducen en al menos un 90 % o más, más preferiblemente en al menos un 95 %, más preferiblemente en al menos un 97,5 %, incluso más preferiblemente en al menos un 98 %, 99 % en comparación con un anticuerpo que comprende una región Fc de tipo silvestre que comprende, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 38.

La unión de la IgG1 a los receptores Fcγ activadores e inhibidores (FcγRs) o al primer componente del complemento (C1q) depende de residuos situados en la región bisagra y en el dominio CH2. Dos regiones del dominio CH2 son críticas para la unión de los FcγRs y el complemento C1q y tienen secuencias únicas. La sustitución de residuos de IgG1 e IgG2 humanas en las posiciones 233-236 y de residuos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 redujo en gran medida la ADCC y la CDC (Armour, et al., Eur. J. Immunol. 29(8) (1999) 2613-2624; Shields, et al., J. Biol. Chem. 276(9) (2001) 6591-6604, WO 2021/234402 A2).

Por consiguiente, en una modalidad, el anticuerpo anti-GUCY2C del ADC de la presente divulgación comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicha molécula tiene una afinidad reducida por los receptores Fc de IgG1 FcγRI, FcγRII y FcγRIII, así como por el componente del complemento C1q en comparación con una región Fc de tipo silvestre (por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 38).

La afinidad a una región Fc, como la unión de IgG1 a FcγRs, puede determinarse utilizando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, pero no limitadas a, métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); KinExA, Rathanaswami et al. Analytical Biochemistry, Vol. 373:52-60, 2008; o radioinmunoensayo (RIA)), o mediante un ensayo de resonancia de plasmón de superficie como se describe en,

por ejemplo, Wilkinson et al. PLoS One. 2021; 16(12): e0260954 u otro mecanismo de ensayo basado en la cinética (por ejemplo, análisis BIACORE™. o análisis Octet™ (forteBIO)), y otros métodos como ensayos de unión indirecta, ensayos de unión competitiva transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), electroforesis en gel y cromatografía (por ejemplo, filtración en gel).

Así pues, en algunas modalidades, el anticuerpo anti-GUCY2C del ADC de la presente divulgación se ha modificado genéticamente para que comprenda una región Fc variante que comprenda la modificación de al menos un residuo de aminoácido que contacte directamente con los FcγRs basándose en análisis estructurales y cristalográficos. El término “manipulado genéticamente” o “ingeniería genética”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la modificación de la secuencia de aminoácidos o parte de la misma de un polipéptido o proteína dado o natural, como por ejemplo la región Fc de un anticuerpo, en el sentido de sustitución, inserción, delección o reversión de nucleótidos y/o aminoácidos, o cualquier combinación de las mismas, mediante métodos de tecnología genética, como por ejemplo la mutagénesis dirigida al sitio descrita en Carter, Biochem. J. (1986) Vol. 237: 1-7, o J Biol Chem. (2015) Vol. 290(5): 2577-2592. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “sustitución de aminoácidos” o “mutación” se refiere a modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la proteína, en las que uno o más aminoácidos se sustituyen por el mismo número de aminoácidos diferentes, produciendo una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos diferente de la proteína original. Por sustitución conservadora de aminoácidos se entiende una sustitución que, debido a su tamaño, carga, polaridad y/o conformación similares, no afecta significativamente a la estructura y función de la proteína. Los grupos de aminoácidos conservadores en ese sentido representan, por ejemplo, los aminoácidos no polares Gly, Ala, Val, Ile y Leu; los aminoácidos aromáticos Phe, Trp y Tyr; los aminoácidos cargados positivamente Lys, Arg y His; y los aminoácidos cargados negativamente Asp y Glu.

Es importante destacar que la región Fc del anticuerpo ADC de la presente divulgación está modificada genéticamente para incluir al menos una sustitución de aminoácidos por cisteína en un sitio dentro de la región Fc, de modo que esta cisteína modificada está disponible para la conjugación pero no perturba el plegamiento y ensamblaje de la inmunoglobulina. Los correspondientes anticuerpos sustituidos con cisteína o modificados con cisteína se han divulgado en WO2016040856A2, o Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932;

Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249 y WO2016/142049). La sustitución de cisteína preferida en la región Fc de los anticuerpos inventivos aquí divulgados es D265C (según el sistema de numeración de la UE) como se divulga en WO2016142049A1.

Preferentemente, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada (Fc) que comprende la sustitución de aminoácidos D265C. Más concretamente, el anticuerpo mAb1 comprende la región de constante de cadena pesada (Fc) de SEQ ID NO: 39, el anticuerpo mAb8 comprende la región de constante de cadena pesada (Fc) de SEQ ID NO: 40, y el anticuerpo mAb41 comprende la región de constante de cadena pesada (Fc) de SEQ ID NO: 41. Más preferiblemente, dicha región constante de cadena pesada (Fc) comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y D265C según el sistema de numeración EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85). El sistema de numeración UE también puede denominarse “índice UE como en Kabat” y se refiere a la numeración del anticuerpo humano IgG1 UE, que se refiere a la numeración del anticuerpo UE de Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85. Específicamente, en las modalidades en las que las tres sustituciones L234A, L235A y D265C están presentes en la región Fc del anticuerpo del ADC de la invención, el anticuerpo mAb1 comprende la región constante de cadena pesada (Fc) de SEQ ID NO: 42, el anticuerpo mAb8 comprende la región constante de cadena pesada (Fc) de SEQ ID NO: 43, y el anticuerpo mAb41 comprende la región constante de cadena pesada (Fc) de SEQ ID NO: 44. Más preferiblemente, el anticuerpo comprende (a) un mAb1-L234A-L235A-D265C de cadena pesada de SEQ ID NO: 42; o (b) un mAb8-L234A-L235A-D265C de cadena pesada de SEQ ID NO: 43; o (c) un mAb41-L234A-L235A-D265C de SEQ ID NO: 44. El uso de dichas regiones Fc que comprenden las sustituciones L234A, L235A y D265C en los anticuerpos anti-GUCY2C del ADC del primer aspecto es particularmente ventajoso para reducir la interacción de las respectivas regiones Fc (es decir, las que comprenden dichas mutaciones) con FcγRs en al menos 95 %, 97,5 %, 99 % en comparación con una región Fc de tipo silvestre, mientras que al mismo tiempo proporciona el sitio de unión para el enlazador portador de fármaco al anticuerpo del ADC mediante conjugación basada en tiol específica del sitio. El uso correspondiente de tales regiones Fc sustituidas por cisteína y anticuerpos que comprenden tales mutaciones para la conjugación enlazador-carga útil se describe, por ejemplo, en el documento WO2016142049A1.

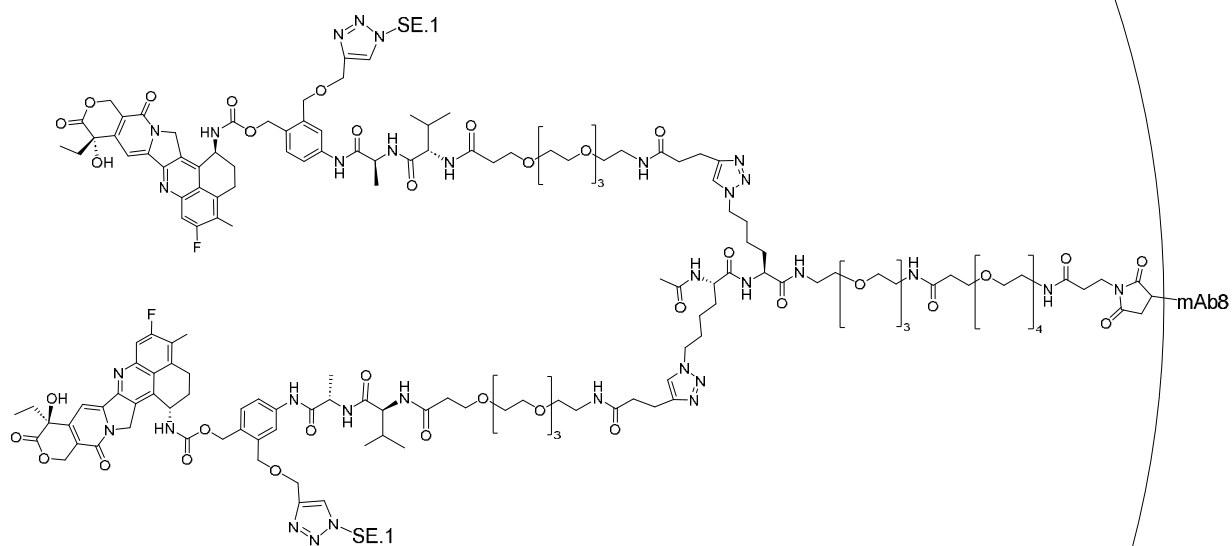
En una modalidad preferida, el anticuerpo mAb1 comprende una cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 45 y una cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 42.

En una modalidad preferida, el anticuerpo mAb8 comprende una cadena ligera según SEQ ID NO: 46 y una cadena pesada según SEQ ID NO: 43.

En una modalidad preferida, el anticuerpo mAb41 comprende una cadena ligera según SEQ ID NO: 47 y una cadena pesada según SEQ ID NO: 44.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere al uso de un anticuerpo anti-GUCY2C modificado con cisteína según se ha divulgado anteriormente que comprende al menos la sustitución de aminoácidos D265C (numeración según el sistema de numeración de la UE) en la fabricación de un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la presente divulgación, preferiblemente, el anticuerpo anti-GUCY2C modificado con cisteína comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y D265C (numeración según el sistema de numeración de la UE). Por ejemplo, la presente divulgación se refiere al uso de anticuerpos anti-GUCY2C mAb1, mAb8 y mAb41 como se divulga en el presente documento en la fabricación de un conjugado anticuerpo-fármaco como se divulga en el presente documento. Por ejemplo, en algunas modalidades, la presente divulgación se refiere al uso de mAb1 según se divulga en el presente documento en la fabricación de un conjugado anticuerpo-fármaco conjugando mAb1 con una de las cargas útiles enlazadoras IV.9, IV.8, IV.12, IV.18, IV.20 o IV.22. En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere al uso de mAb1 como se divulga en el presente documento en la fabricación de un conjugado anticuerpo-fármaco mediante la conjugación de mAb8 con una de las cargas útiles enlazadoras IV.9, IV.8, IV.12, IV.18, IV.20 o IV.22. En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere al uso de mAb41 según se divulga en el presente documento en la fabricación de un conjugado anticuerpo-fármaco conjugando mAb1 con una de las cargas útiles enlazadoras IV.9, IV.8, IV.12, IV.18, IV.20 o IV.22.

En una modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:

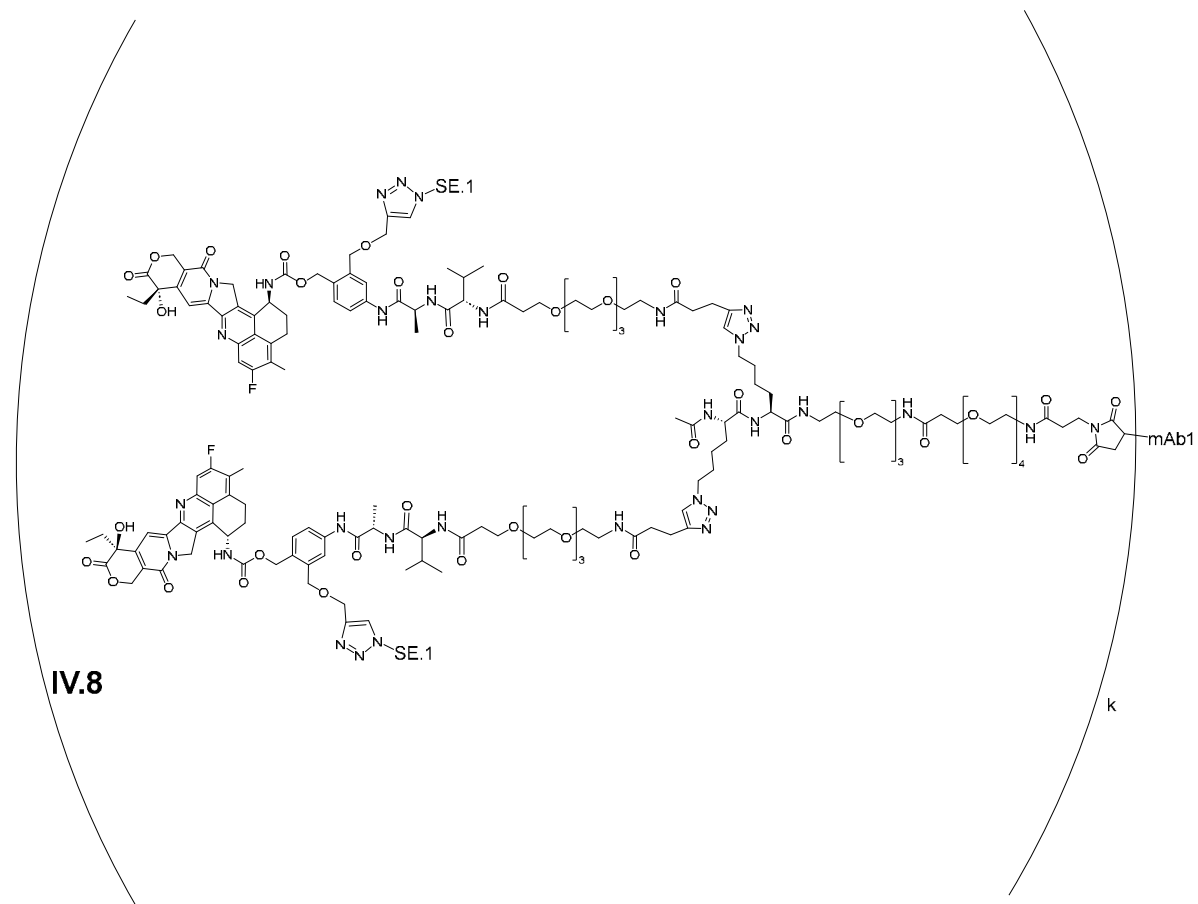


**IV.8**

k

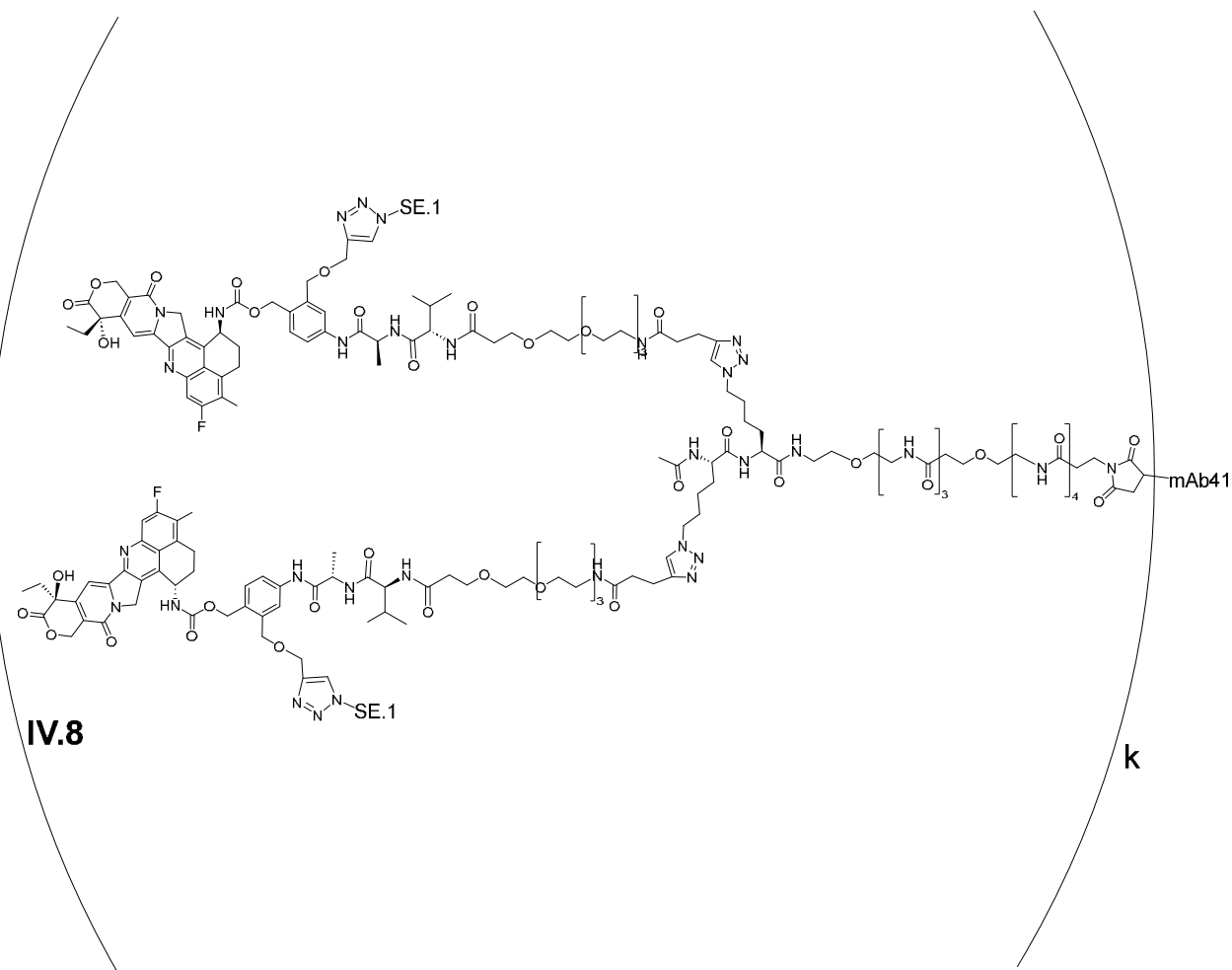
en donde k es 2.

En una modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



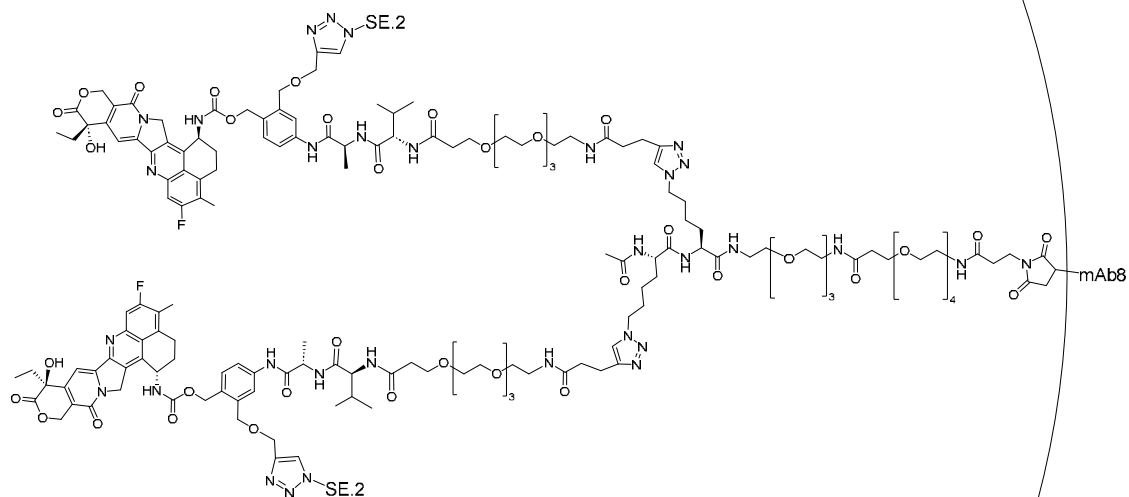
en donde k es 2.

En una modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:

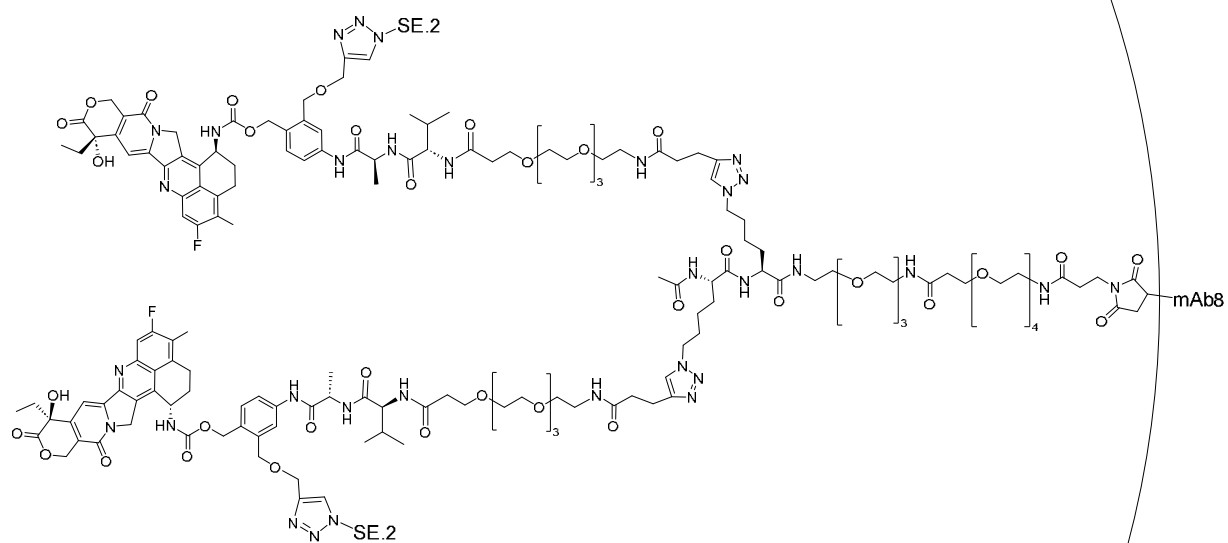


**IV.9**

**k**

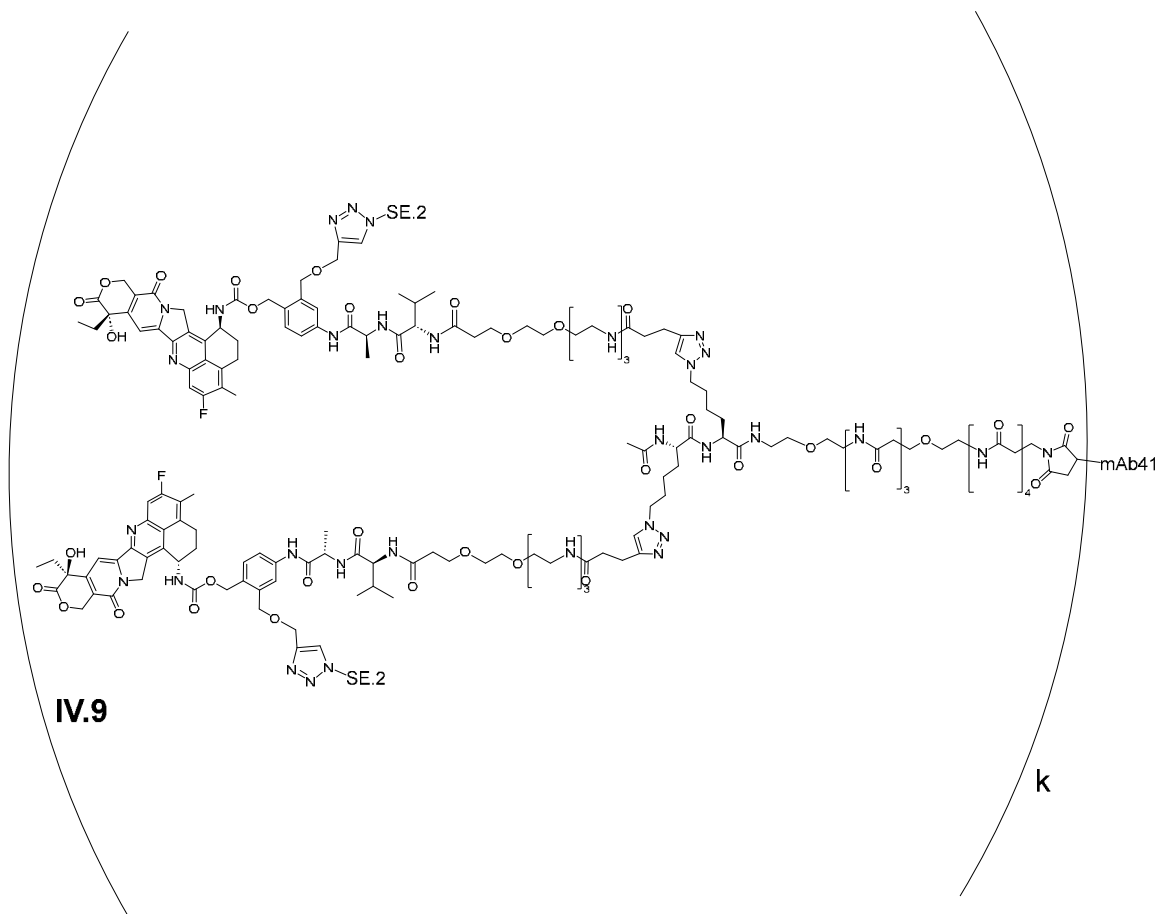
en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



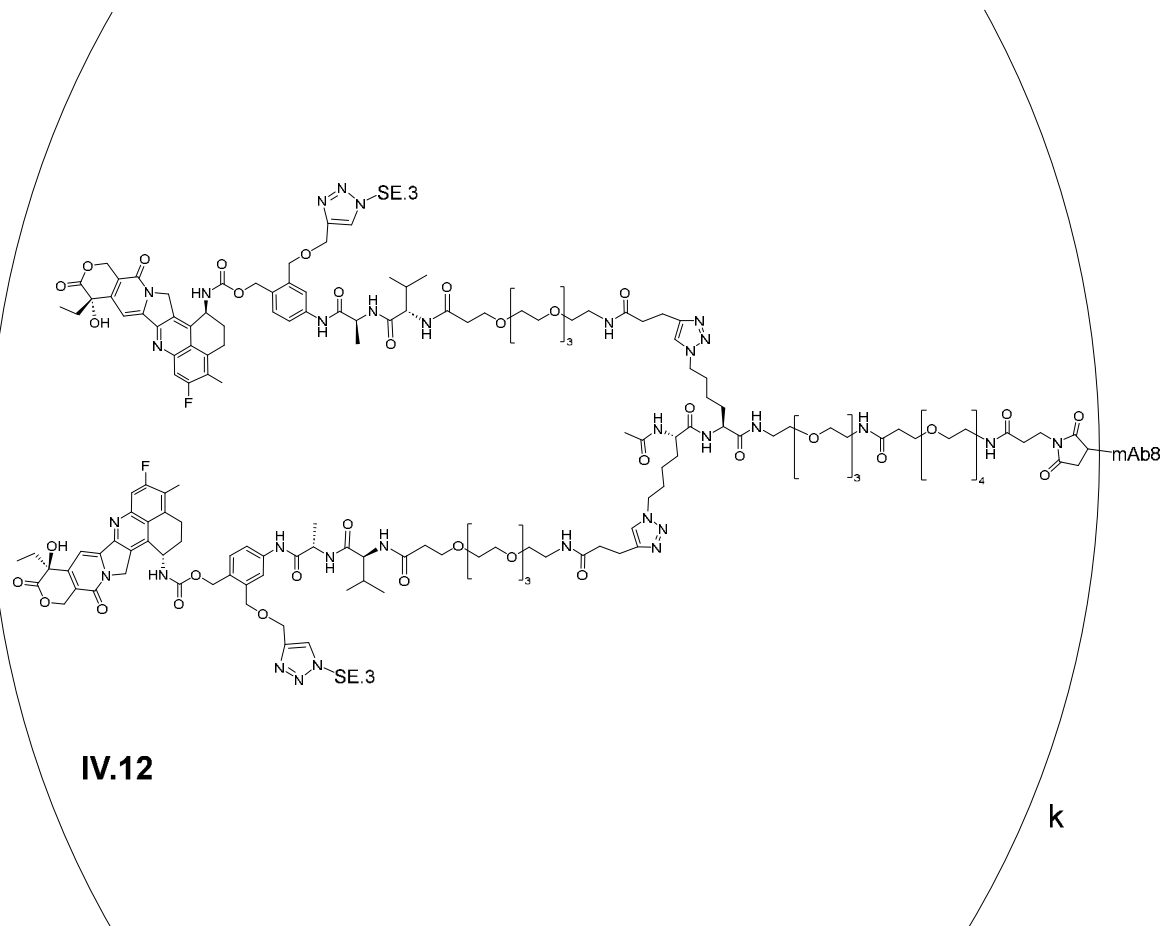
en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



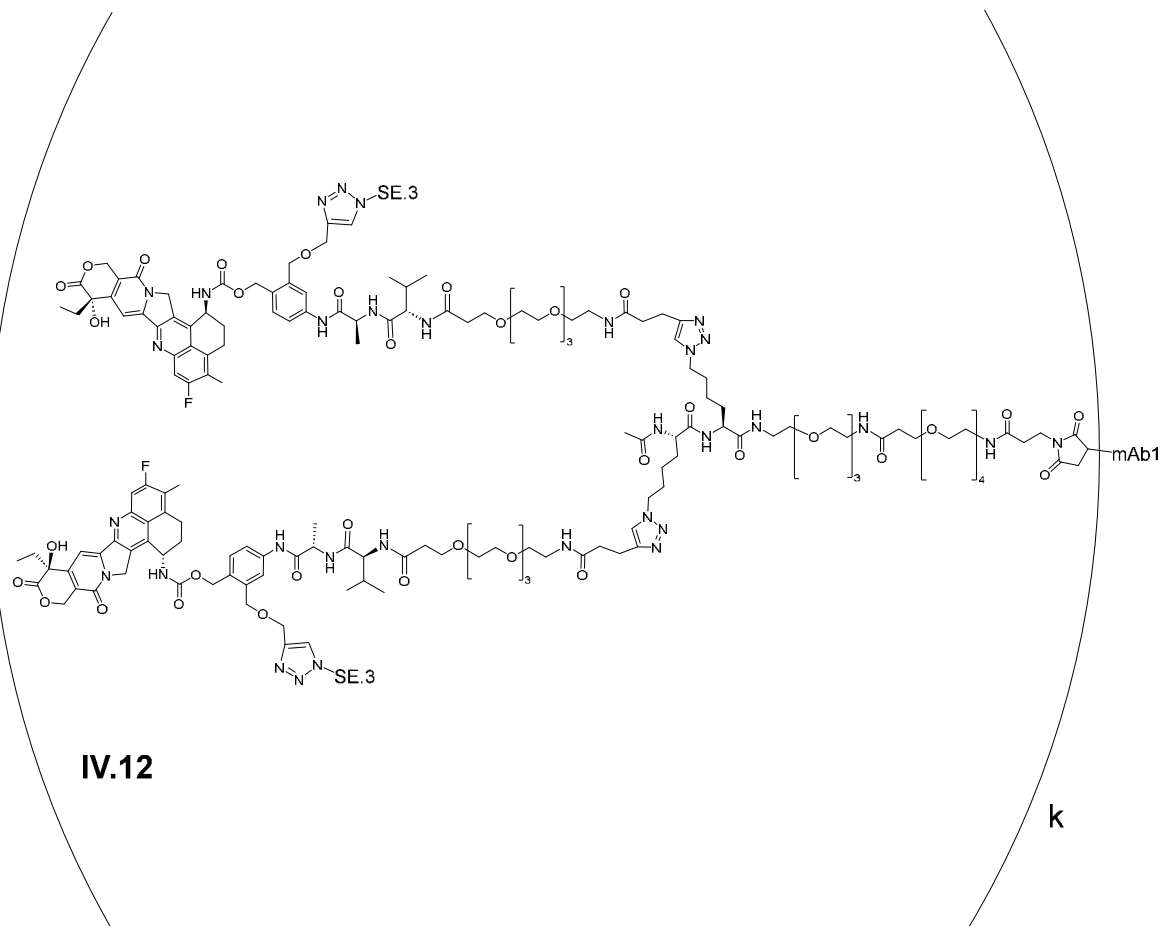
en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



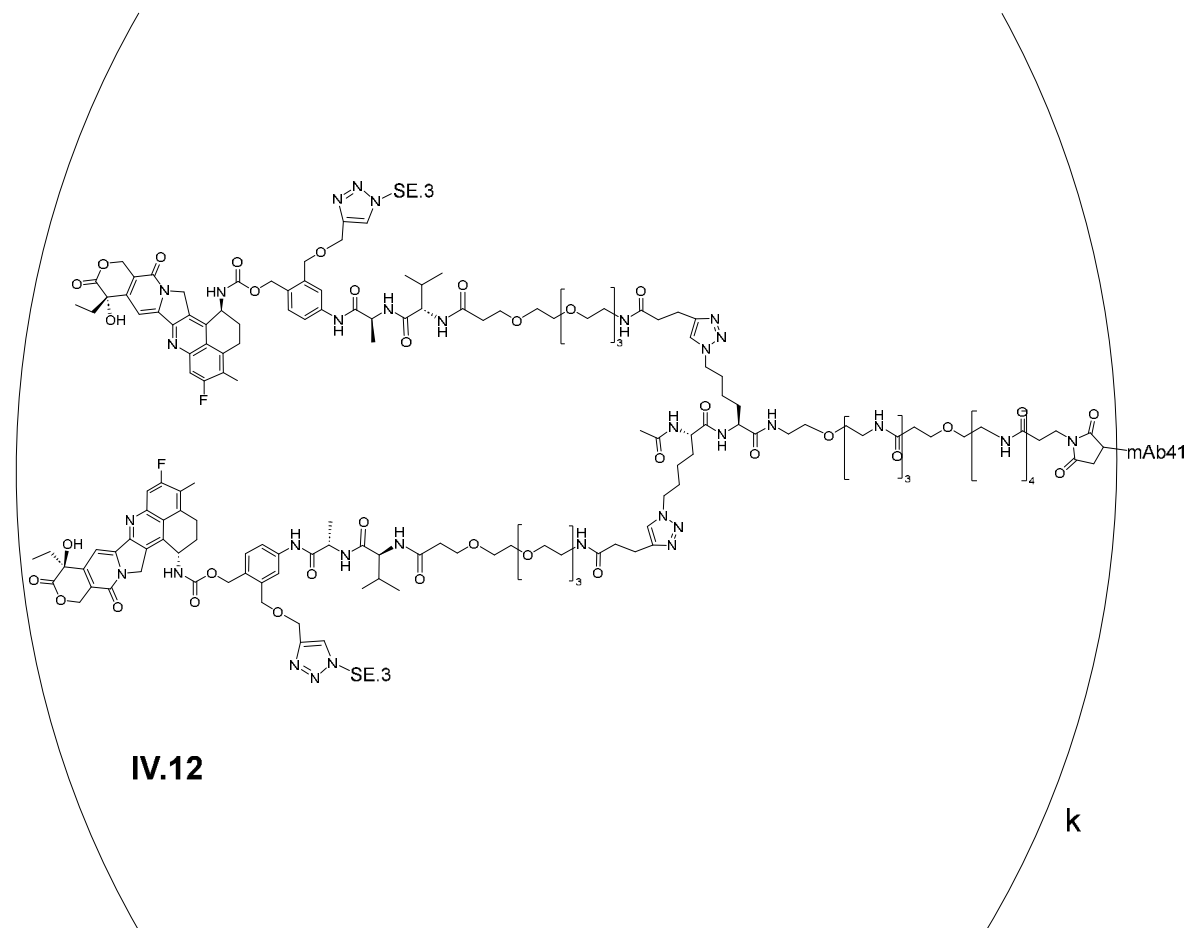
en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



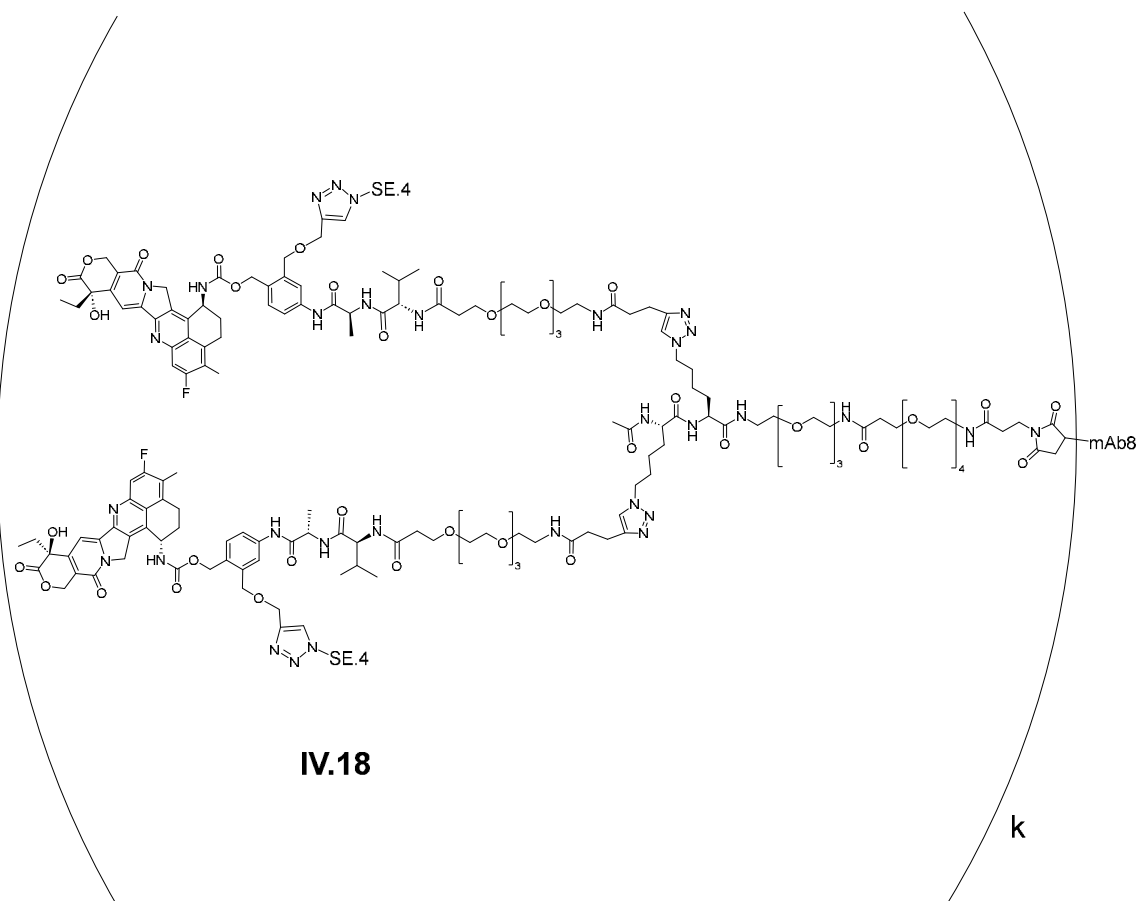
en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



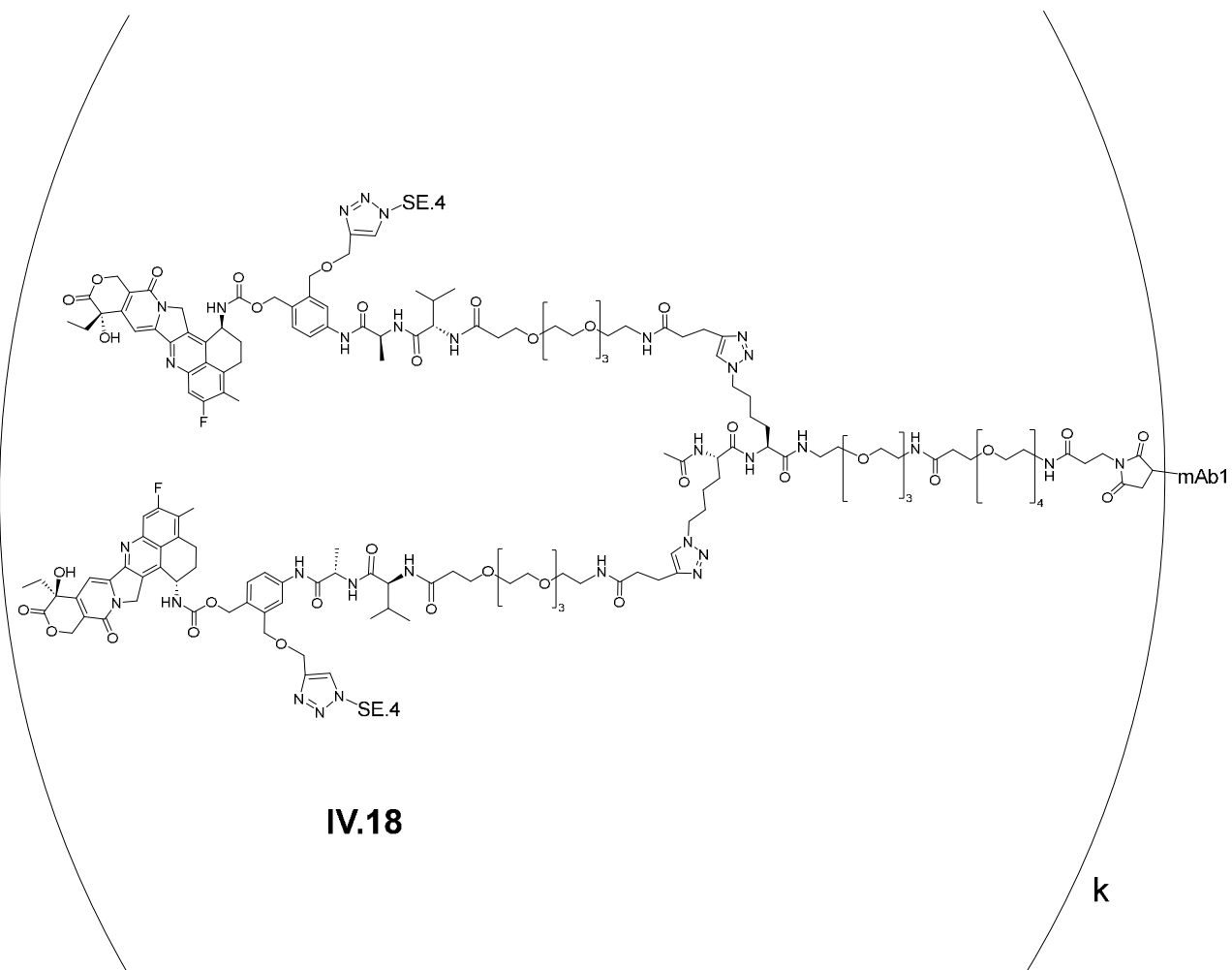
en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



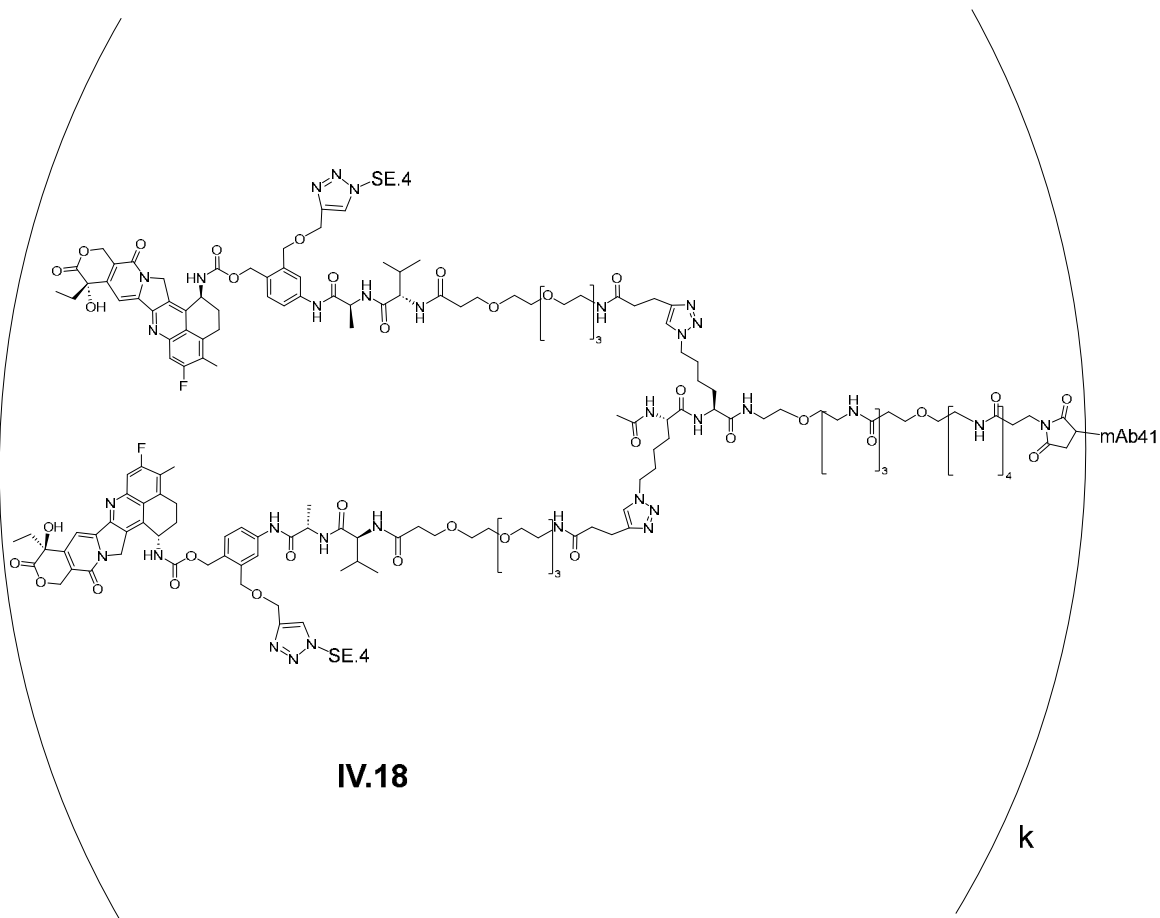
en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



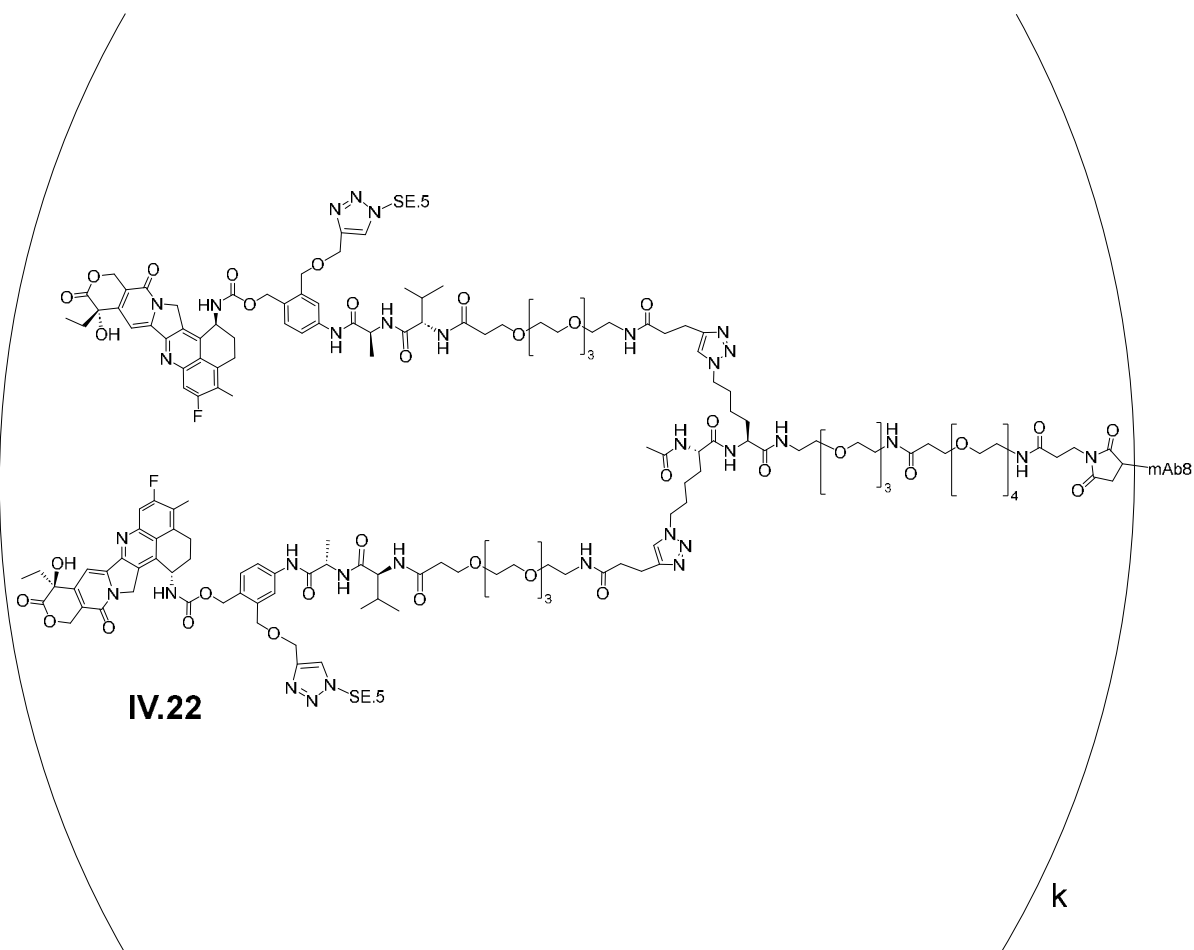
en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



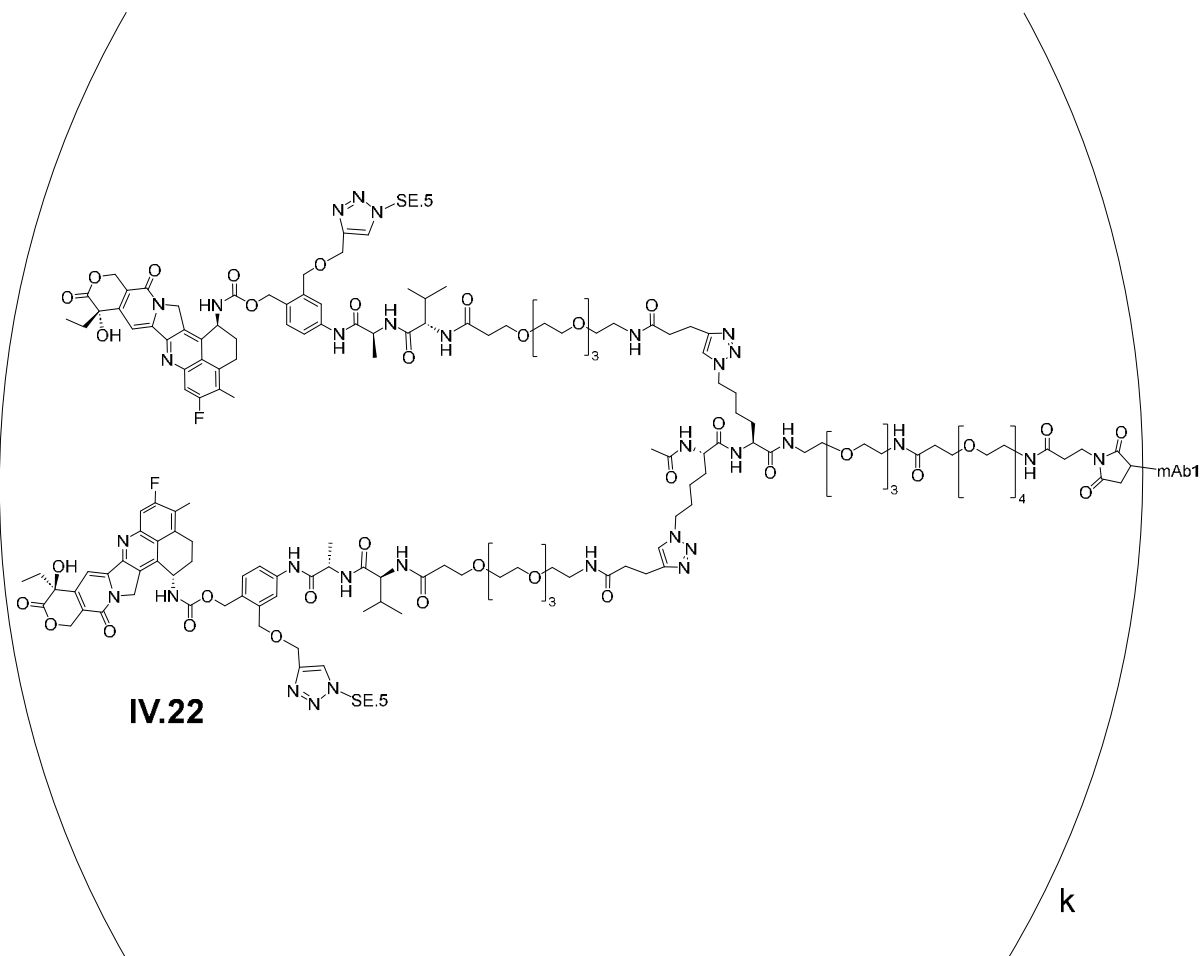
en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



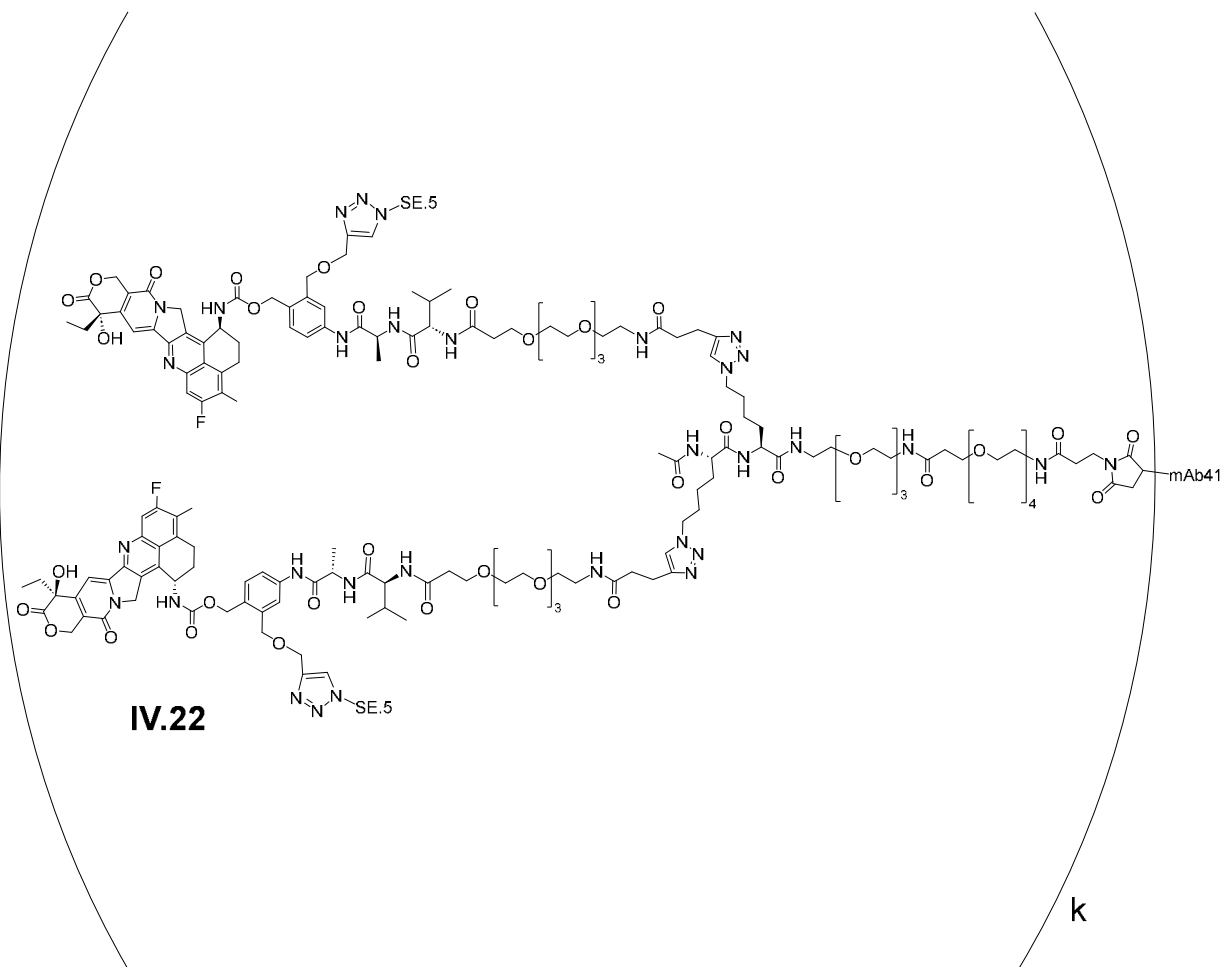
en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



en donde k es 2.

En otra modalidad específica del primer aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco es:



en donde k es 2.

Como se ha indicado anteriormente, en un segundo aspecto, la presente divulgación se refiere además al ADC del primer aspecto para su uso como medicamento.

Como se ha descrito anteriormente, el ADC es particularmente adecuado para su uso en el tratamiento del cáncer, más preferiblemente para el tratamiento del cáncer gastrointestinal, como el cáncer colorrectal (CCR), el cáncer colorrectal metastásico (CCRm) o el cáncer de páncreas, en donde el cáncer gastrointestinal puede caracterizarse por la expresión de una secuencia diana o epítipo de un antígeno Guanilato Ciclasa 2C (GUCY2C).

Además, en un tercer aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco del primer aspecto.

En particular, la composición farmacéutica se utiliza en forma de medicamento de administración sistémica. Esto incluye parenterales, que comprenden entre otros inyectables e infusiones. Los inyectables se formulan en forma de ampollas o como inyectables listos para su uso, por ejemplo, jeringas listas para su uso o jeringas de un solo uso y, aparte de esto, en frascos punzables para extracción múltiple. La administración de inyectables puede realizarse en forma de aplicación subcutánea (s.c), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) o intracutánea (i.e.). En particular, es posible producir las formulaciones inyectables respectivamente adecuadas como una suspensión de cristales, soluciones, sistemas nanoparticulares o un coloide disperso como, por ejemplo, hidrosoles.

Las formulaciones inyectables pueden producirse además como concentrados, que pueden disolverse o dispersarse con diluyentes acuosos isotónicos. La infusión también puede prepararse en forma de soluciones isotónicas, emulsiones grasas, formulaciones liposomales y microemulsiones. Al igual que los inyectables, las formulaciones para infusión también pueden prepararse en forma de concentrados para dilución. Las formulaciones inyectables también pueden aplicarse en forma de infusiones permanentes tanto en terapia hospitalaria como ambulatoria, por ejemplo, mediante minibombas.

Es posible añadir a las formulaciones de fármacos parenterales, por ejemplo, albúmina, plasma, expansores, sustancias tensioactivas, diluyentes orgánicos, sustancias que influyen en el pH, sustancias complejantes o sustancias poliméricas, en particular como sustancias para influir en la adsorción de los TBDC de la presente divulgación a proteínas o polímeros

o también pueden añadirse con el fin de reducir la adsorción de los TBDC de la presente divulgación a materiales como instrumentos de inyección o materiales de envasado, por ejemplo, plástico o vidrio.

Los adyuvantes y portadores añadidos durante la producción de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación formuladas como parenterales son preferiblemente aqua sterilisata (agua esterilizada), sustancias que influyen en el valor de pH como, por ejemplo, ácidos o bases orgánicos o inorgánicos, así como sales de los mismos, sustancias amortiguadoras para ajustar los valores de pH, sustancias para la isotonización como, por ejemplo, cloruro sódico, hidrogenocarbonato sódico, glucosa y fructosa, tensioactivos y surfactantes, respectivamente, y emulsionantes como, por ejemplo, ésteres parciales de ácidos grasos de sorbitanos polioxietilenados (por ejemplo, monolaurato de sorbitán polietilenglicol, comúnmente denominado Tween®) o, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de polioxietilenos (por ejemplo, tensioactivo de aceite de ricino polioxietilado, comúnmente denominado Cremophor®), aceites grasos como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite de ricino, ésteres sintéticos de ácidos grasos como, por ejemplo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y aceite neutro (por ejemplo, Miglyol® o una mezcla de triglicéridos de cadena media), así como adyuvantes poliméricos como, por ejemplo gelatina, dextrano, polivinilpirrolidona, aditivos que aumentan la solubilidad de disolventes orgánicos como, por ejemplo, propilenglicol, etanol, N,N-dimetilacetamida, propilenglicol o sustancias formadoras de complejos como, por ejemplo, citrato y urea, conservantes como, por ejemplo, éster hidroxipropílico y éster metílico del ácido benzoico, alcohol bencílico, antioxidantes como, por ejemplo, sulfito sódico y estabilizadores como, por ejemplo, EDTA.

Cuando se formulan las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación como suspensiones, en una modalidad preferida se añaden agentes espesantes para evitar el fraguado de los TBDC de la presente divulgación o, tensioactivos y polielectrolitos para asegurar la resuspensión de sedimentos y/o agentes formadores de complejos como, por ejemplo, EDTA. También es posible conseguir complejos del principio activo con diversos polímeros. Ejemplos de tales polímeros son polietilenglicol, poliestireno, carboximetilcelulosa, Pluronic® o éster de ácido graso de sorbitol de polietilenglicol. Los TBDC de la presente divulgación también pueden incorporarse en formulaciones líquidas en forma de compuestos de inclusión, por ejemplo, con ciclodextrinas. En determinadas modalidades, pueden añadirse agentes dispersantes como adyuvantes adicionales. Para la

producción de liofilizados pueden utilizarse agentes de andamiaje como manita, dextrano, sacarosa, albúmina humana, lactosa, PVP o variedades de gelatina.

A la luz de lo anterior, se apreciará que el segundo y tercer aspectos de la presente divulgación también abarcan métodos para tratar el cáncer, preferiblemente para tratar el cáncer gastrointestinal, como el cáncer colorrectal (CCR), el cáncer colorrectal metastásico (CCRM) o el cáncer de páncreas, en los que el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco del primer aspecto o de la composición farmacéutica del tercer aspecto a un paciente que lo necesite. Del mismo modo, como el segundo aspecto de la presente divulgación también abarca el uso del conjugado anticuerpo-fármaco del primer aspecto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, preferiblemente para el tratamiento del cáncer gastrointestinal, tal como cáncer colorrectal (CCR), cáncer colorrectal metastásico (CCRM) o cáncer de páncreas.

De nuevo, en tales modalidades, el cáncer gastrointestinal se caracteriza típicamente por la expresión de una secuencia diana o epítipo de un antígeno Guanilato Ciclasa 2C (GUCY2C).

## Secuencias

**Tabla 1:** Secuencias de aminoácidos de la presente divulgación -----

| SEQ ID NO | Secuencia         | Descripción |
|-----------|-------------------|-------------|
| 1         | RASQSISSYLN       | mAb1 CDRL1  |
| 2         | AASSLQS           | mAb1 CDRL2  |
| 3         | QQSYSTPWT         | mAb1 CDRL3  |
| 4         | SSAMH             | mAb1 CDRH1  |
| 5         | LINPGNGNTKYSQKFQG | mAb1 CDRH2  |
| 6         | AYFRGLGFDI        | mAb1 CDRH3  |
| 7         | QQSYSTPLT         | mAb8 CDRL3  |
| 8         | TGTSSDVGSINLVS    | mAb41 CDRL1 |
| 9         | EGSKRPS           | mAb41 CDRL2 |
| 10        | SYVPRSSLV         | mAb41 CDRL3 |

|    |                                                                                                                                     |                         |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 11 | TYTIN                                                                                                                               | mAb41 CDRH1             |
| 12 | RIIPVLGIANYAQKFQG                                                                                                                   | mAb41 CDRH2             |
| 13 | DTPRLRSSYYMDV                                                                                                                       | mAb41 CDRH3             |
| 14 | DIQMTQSPSSLSASAGDRVITC                                                                                                              | mAb1 FR 1 <sub>L</sub>  |
| 15 | WYQQKPGKAPKLLIY                                                                                                                     | mAb1 FR 2 <sub>L</sub>  |
| 16 | GVPSRFSGSGSGTDFTLAISLQPEDFATYYC                                                                                                     | mAb1 FR 3 <sub>L</sub>  |
| 17 | FGQGTKVDIK                                                                                                                          | mAb1 FR 4 <sub>L</sub>  |
| 18 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFI                                                                                                      | mAb1 FR 1 <sub>H</sub>  |
| 19 | WVRQAPGQRLEWMG                                                                                                                      | mAb1 FR 2 <sub>H</sub>  |
| 20 | RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR                                                                                                    | mAb1 FR 3 <sub>H</sub>  |
| 21 | WGQGTLVTVSS                                                                                                                         | mAb1 FR 4 <sub>H</sub>  |
| 22 | DIRMTQSPSSLSASAGDRVITC                                                                                                              | mAb8 FR 1 <sub>L</sub>  |
| 23 | GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC                                                                                                     | mAb8 FR 3 <sub>L</sub>  |
| 24 | FGGGTKLEIK                                                                                                                          | mAb8 FR 4 <sub>L</sub>  |
| 25 | QSALTQPASVSGSPGQSITISC                                                                                                              | mAb41 FR 1 <sub>L</sub> |
| 26 | WYQQHPGKAPKLMY                                                                                                                      | mAb41 FR 2 <sub>L</sub> |
| 27 | GVSNRFSASKSGNTASLTISGLQTEDEADYYC                                                                                                    | mAb41 FR 3 <sub>L</sub> |
| 28 | FGGGTKLTVL                                                                                                                          | mAb41 FR 4 <sub>L</sub> |
| 29 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS                                                                                                      | mAb41 FR 1 <sub>H</sub> |
| 30 | WVRQAPGQGLEWMG                                                                                                                      | mAb41 FR 2 <sub>H</sub> |
| 31 | RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR                                                                                                    | mAb41 FR 3 <sub>H</sub> |
| 32 | DIQMTQSPSSLSASAGDRVITICRASQSISSYL<br>NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS<br>GSGTD FTLAISLQPEDFATYYCQQ<br>SYSTPWTFGQ GTKVDIK            | mAb1 V <sub>L</sub>     |
| 33 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFISS<br>AMHWVRQAPGQRLEWMGLINPGNGNTKYSQ<br>KFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVY<br>YCARAYFRGLGFDIWGQGTLVTVSS | mAb1 V <sub>H</sub>     |
| 34 | DIRMTQSPSSLSASAGDRVITICRASQSISSYL<br>NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS<br>GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTF<br>GGGKLEIK               | mAb8 V <sub>L</sub>     |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                  |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 35 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFISS<br>AMHWVRQAPGQRLEWMGLINPGNGNTKYSQ<br>KFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVY<br>YCARAYFRGLGFDIWGQGTLVTVSS                                                                                                                                                                                                                                              | mAb8 V <sub>H</sub>                                                                              |
| 36 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSIN<br>LVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNRF<br>SASKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCSSYVPR<br>SSLVFGGGTKLTVL                                                                                                                                                                                                                                                        | mAb41 V <sub>L</sub>                                                                             |
| 37 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFST<br>YTINWVRQAPGQGLEWMGRIIPVLGIANYAQK<br>FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYY<br>CARDTPRLRSSYYMDVWGQGTLVTVSS                                                                                                                                                                                                                                           | mAb41 V <sub>H</sub>                                                                             |
| 38 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS<br>LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<br>KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW<br>YVDGVEVHNAKTKPREEQINSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG<br>QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY<br>PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF<br>LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY<br>TQKSLSLSPGK | HC (tipo silvestre)                                                                              |
| 39 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFISS<br>AMHWVRQAPGQRLEWMGLINPGNGNTKYSQ<br>KFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVY<br>YCARAYFRGLGFDIWGQGTLVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV<br>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVCVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQINSTYRVVSVLTVLHQDWLNG                | mAb1 cadena pesada<br>(HC) con la mutación<br>D265C (según el sistema<br>de numeración de la UE) |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                 |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVD<br>KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS<br>PGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                 |
| 40 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFISS<br>AMHWVRQAPGQRLEWMGLINPGNGNTKYSQ<br>KFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVY<br>YCARAYFRGLGFDIWGQGTLVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT<br>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVCVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQINSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVD<br>KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS<br>PGK | mAb8 HC con la<br>mutación D265C (según<br>el sistema de numeración<br>de la UE)                |
| 41 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFST<br>YTINWVRQAPGQGLEWMGRIIPVLGIANYAQK<br>FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY<br>CARDTPRLRSSYYMDVWGQGTLVTVSSASTK<br>GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV<br>VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP<br>KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVCVSHEDPEVKFNWYVDG<br>VEVHNAKTKPREEQINSTYRVVSVLTVLHQDW<br>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP<br>QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA<br>VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKL                                         | mAb41 HC con la<br>mutación D265C<br>(numeración según el<br>sistema de numeración<br>de la UE) |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                     |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                     |
| 42 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFISS<br>AMHWVRQAPGQRLEWMGLINPGNGNTKYSQ<br>KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVY<br>YCARAYFRGLGFDIWGQGTLLTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT<br>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>DKTHTCPPCPAPE <b>AA</b> GGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCV <b>CV</b> SHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQINSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD<br>KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS<br>PGK | mAb1 HC con las<br>mutaciones L234A,<br>L235A y D265C<br>(numeración según el<br>sistema de numeración<br>de la UE) |
| 43 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFISS<br>AMHWVRQAPGQRLEWMGLINPGNGNTKYSQ<br>KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVY<br>YCARAYFRGLGFDIWGQGTLLTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT<br>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>DKTHTCPPCPAPE <b>AA</b> GGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCV <b>CV</b> SHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQINSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD<br>KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS<br>PGK | mAb8 HC con las<br>mutaciones L234A,<br>L235A y D265C<br>(numeración según el<br>sistema de numeración<br>de la UE) |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                       |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 44 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFST<br>YTINWVRQAPGQGLEWMGRIIPVLGIANYAQK<br>FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY<br>CARDTPRLRSSYYMDVWGQGTLLTVSSASTK<br>GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV<br>VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP<br>KSCDKTHTCPPCPAPEA <b>A</b> AGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCV <b>V</b> CVSHEDPEVKFNWYVDG<br>VEVHNAKTKPREEQINSTYRVVSVLTVLHQDW<br>LNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP<br>QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA<br>VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSPGKMABLALADC | mAb41 HC con las mutaciones L234A, L235A y D265C (numeración según el sistema de numeración de la UE) |
| 45 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSIN<br>LVSWYQQHPGKAPKLLMIYEGSKRPSGVSNRF<br>SASKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCSSYVPR<br>SSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE<br>LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK<br>AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH<br>RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | mAb41 cadena ligera (LC)                                                                              |
| 46 | DIRMTQSPSSLSASAGDRVITICRASQSISSYL<br>NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS<br>GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTF<br>GGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES<br>VTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC<br>EVTHQGLSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | mAb8 cadena ligera (LC)                                                                               |
| 47 | DIQMTQSPSSLSASAGDRVITICRASQSISSYL<br>NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS<br>GSGTDFTLAISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWT<br>FGQGKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | mAb1 cadena ligera (LC)                                                                               |

|  |                                                                                              |  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | SVVCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQE<br>SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------|--|

## **EJEMPLOS**

La presente divulgación se describe además mediante los siguientes Ejemplos no limitativos.

### **Información general**

Aunque la presente divulgación se ha ilustrado y descrito en detalle en los dibujos y en la descripción anterior, dicha ilustración y descripción deben considerarse ilustrativas o ejemplares y no restrictivas; la presente divulgación no se limita a las modalidades divulgadas.

Todas las secuencias de aminoácidos aquí descritas se muestran de N-terminal a C-terminal; todas las secuencias de ácidos nucleicos aquí descritas se muestran 5'->3'.

Los productos químicos y los disolventes se obtuvieron de proveedores comerciales como ABCR, Fisher Scientific, Merck Chemicals, Carl Roth, Sigma-Aldrich, VWR International, Biozol Diagnostika, TCI Deutschland, IRIS Biotech, AnalytiChem, Hycultec, Hölzel Diagnostika, Bachem, Thermo Fisher, Activate Scientific, AxisPharm, Biosynth o BLD Pharmatech y se utilizaron sin purificación adicional. El agua utilizada para las reacciones, preparaciones y purificaciones se purificó mediante un sistema de agua pura ELGA Purelab flex 2. La TLC se realizó con láminas de poliéster recubiertas de gel de sílice 60 (Macherey-Nagel) y las manchas se visualizaron mediante irradiación ( $\lambda = 254$  nm), o soluciones de tinción de ninhidrina, molibdato o  $\text{KMNO}_4$ .

### **Métodos experimentales generales**

#### *HPLC analítica*

La RP-HPLC analítica se llevó a cabo en un sistema VWR-Hitachi Chromaster equipado con un detector de matriz de diodos 5430, un automuestreador 5260, una bomba cuaternaria 5160, un horno de columna 6310 y una columna Luna® C18 (2) 5  $\mu\text{m}$  100 Å 250 x 4,6 mm, Kinetex® EVO-C18 5  $\mu\text{m}$  100 Å 250 x 4,6 mm y ACE C18-PFP 5  $\mu\text{m}$  100 Å 250 x 4,6 mm a

25 °C con un caudal entre 1 - 1,4 ml/min utilizando elución en gradiente lineal de acetonitrilo en agua. A continuación se indican los parámetros especificados.

#### Método A

|                           |                                                        |        |        |
|---------------------------|--------------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna                   | Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm |        |        |
| Fase móvil                | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo               |        |        |
| Gradiente                 | Tiempo [min]                                           | A [ %] | B [ %] |
|                           | 0,0                                                    | 95     | 5      |
|                           | 15,0                                                   | 0      | 100    |
|                           | 18,0                                                   | 0      | 100    |
|                           | 18,5                                                   | 95     | 5      |
|                           | 22,0                                                   | 95     | 5      |
| Longitudes de onda        | 210, 260 nm                                            |        |        |
| Caudal                    | 1,4 ml/min                                             |        |        |
| Temperatura de la columna | 22 °C                                                  |        |        |
| Tiempo de ejecución       | 22 minutos                                             |        |        |

#### Método B

|                    |                                                        |        |        |
|--------------------|--------------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna            | Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm |        |        |
| Fase móvil         | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo               |        |        |
| Gradiente          | Tiempo [min]                                           | A [ %] | B [ %] |
|                    | 0,0                                                    | 95     | 5      |
|                    | 0,5                                                    | 70     | 30     |
|                    | 15,5                                                   | 50     | 50     |
|                    | 16,0                                                   | 0      | 100    |
|                    | 19,0                                                   | 0      | 100    |
|                    | 19,5                                                   | 95     | 5      |
|                    | 22,0                                                   | 95     | 5      |
| Longitudes de onda | 210, 260 nm                                            |        |        |

|                           |            |
|---------------------------|------------|
| Caudal                    | 1,4 ml/min |
| Temperatura de la columna | 22 °C      |
| Tiempo de ejecución       | 22 minutos |

#### Método C

|                           |                                                      |        |        |
|---------------------------|------------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna                   | Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm |        |        |
| Fase móvil                | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo             |        |        |
| Gradiente                 | Tiempo [min]                                         | A [ %] | B [ %] |
|                           | 0,0                                                  | 95     | 5      |
|                           | 15,0                                                 | 0      | 100    |
|                           | 18,0                                                 | 0      | 100    |
|                           | 18,5                                                 | 95     | 5      |
|                           | 22,0                                                 | 95     | 5      |
| Longitudes de onda        | 246, 210 nm                                          |        |        |
| Caudal                    | 1,4 ml/min                                           |        |        |
| Temperatura de la columna | 25 °C                                                |        |        |
| Tiempo de ejecución       | 22 minutos                                           |        |        |

#### Método D

|                    |                                                      |        |        |
|--------------------|------------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna            | Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm |        |        |
| Fase móvil         | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo             |        |        |
| Gradiente          | Tiempo [min]                                         | A [ %] | B [ %] |
|                    | 0,0                                                  | 95     | 5      |
|                    | 15,0                                                 | 0      | 100    |
|                    | 18,0                                                 | 0      | 100    |
|                    | 18,5                                                 | 95     | 5      |
|                    | 22,0                                                 | 95     | 5      |
| Longitudes de onda | 210, 260 nm                                          |        |        |

|                           |            |
|---------------------------|------------|
| Caudal                    | 1,4 ml/min |
| Temperatura de la columna | 25 °C      |
| Tiempo de ejecución       | 22 minutos |

#### Método E

|                           |                                                |        |        |
|---------------------------|------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna                   | Avantor ACE C18-PFP, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm |        |        |
| Fase móvil                | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo       |        |        |
| Gradiente                 | Tiempo [min]                                   | A [ %] | B [ %] |
|                           | 0,0                                            | 95     | 5      |
|                           | 2,0                                            | 70     | 30     |
|                           | 26,0                                           | 40     | 60     |
|                           | 26,5                                           | 0      | 100    |
|                           | 28,0                                           | 0      | 100    |
|                           | 28,5                                           | 95     | 5      |
|                           | 30,0                                           | 95     | 5      |
| Longitudes de onda        | 210, 380 nm                                    |        |        |
| Caudal                    | 1 ml/min                                       |        |        |
| Temperatura de la columna | 25 °C                                          |        |        |
| Tiempo de ejecución       | 30 min                                         |        |        |

#### Método F

|            |                                                      |        |        |
|------------|------------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna    | Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm |        |        |
| Fase móvil | A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo                |        |        |
| Gradiente  | Tiempo [min]                                         | A [ %] | B [ %] |
|            | 0,0                                                  | 95     | 5      |
|            | 2,0                                                  | 70     | 30     |
|            | 26,0                                                 | 40     | 60     |
|            | 26,5                                                 | 0      | 100    |
|            | 28,0                                                 | 0      | 100    |

|                           |             |    |   |
|---------------------------|-------------|----|---|
|                           | 28,5        | 95 | 5 |
|                           | 30,0        | 95 | 5 |
| Longitudes de onda        | 210, 380 nm |    |   |
| Caudal                    | 1,4 ml/min  |    |   |
| Temperatura de la columna | 25 °C       |    |   |
| Tiempo de ejecución       | 30 min      |    |   |

#### Método G

|                           |                                                      |        |        |
|---------------------------|------------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna                   | Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm |        |        |
| Fase móvil                | A: Agua<br>B: Acetonitrilo                           |        |        |
| Gradiente                 | Tiempo [min]                                         | A [ %] | B [ %] |
|                           | 0,0                                                  | 95     | 5      |
|                           | 14,8                                                 | 50     | 50     |
|                           | 15,0                                                 | 0      | 100    |
|                           | 18,0                                                 | 0      | 100    |
|                           | 18,5                                                 | 95     | 5      |
|                           | 22,0                                                 | 95     | 5      |
| Longitudes de onda        | 190, 210 nm                                          |        |        |
| Caudal                    | 1,4 ml/min                                           |        |        |
| Temperatura de la columna | 25 °C                                                |        |        |
| Tiempo de ejecución       | 22 minutos                                           |        |        |

#### Método H

|            |                                                        |        |        |
|------------|--------------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna    | Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm |        |        |
| Fase móvil | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo               |        |        |
| Gradiente  | Tiempo [min]                                           | A [ %] | B [ %] |
|            | 0,0                                                    | 95     | 5      |
|            | 14,8                                                   | 50     | 50     |

|                           |             |    |     |
|---------------------------|-------------|----|-----|
|                           | 15,0        | 0  | 100 |
|                           | 18,0        | 0  | 100 |
|                           | 18,5        | 95 | 5   |
|                           | 22,00       | 95 | 5   |
| Longitudes de onda        | 210, 246 nm |    |     |
| Caudal                    | 1,4 ml/min  |    |     |
| Temperatura de la columna | 25 °C       |    |     |
| Tiempo de ejecución       | 22 minutos  |    |     |

#### Método I

|                           |                                                        |        |        |
|---------------------------|--------------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna                   | Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm |        |        |
| Fase móvil                | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo               |        |        |
| Gradiente                 | Tiempo [min]                                           | A [ %] | B [ %] |
|                           | 0,0                                                    | 95     | 5      |
|                           | 15,0                                                   | 0      | 100    |
|                           | 18,0                                                   | 0      | 100    |
|                           | 18,5                                                   | 95     | 5      |
|                           | 22,0                                                   | 95     | 5      |
| Longitudes de onda        | 210, 305 nm                                            |        |        |
| Caudal                    | 1,4 ml/min                                             |        |        |
| Temperatura de la columna | 25 °C                                                  |        |        |
| Tiempo de ejecución       | 22 minutos                                             |        |        |

#### Método J

|            |                                                      |        |        |
|------------|------------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna    | Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm |        |        |
| Fase móvil | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo             |        |        |
| Gradiente  | Tiempo [min]                                         | A [ %] | B [ %] |
|            | 0,0                                                  | 95     | 5      |

|                           |             |    |     |
|---------------------------|-------------|----|-----|
|                           | 26,0        | 15 | 85  |
|                           | 26,5        | 0  | 100 |
|                           | 28,0        | 0  | 100 |
|                           | 28,5        | 95 | 5   |
|                           | 30          | 95 | 5   |
| Longitudes de onda        | 210, 380 nm |    |     |
| Caudal                    | 1,4 ml/min  |    |     |
| Temperatura de la columna | 25 °C       |    |     |
| Tiempo de ejecución       | 30 min      |    |     |

#### Método K

|                           |                                                      |        |        |
|---------------------------|------------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna                   | Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm |        |        |
| Fase móvil                | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo             |        |        |
| Gradiente                 | Tiempo [min]                                         | A [ %] | B [ %] |
|                           | 0,0                                                  | 95     | 5      |
|                           | 14,8                                                 | 70     | 30     |
|                           | 15,0                                                 | 0      | 100    |
|                           | 18,0                                                 | 0      | 100    |
|                           | 18,5                                                 | 95     | 5      |
|                           | 22,0                                                 | 95     | 5      |
| Longitudes de onda        | 210, 230 nm                                          |        |        |
| Caudal                    | 1,4 ml/min                                           |        |        |
| Temperatura de la columna | 25 °C                                                |        |        |
| Tiempo de ejecución       | 22 minutos                                           |        |        |

#### Método L

|            |                                                      |  |  |
|------------|------------------------------------------------------|--|--|
| Columna    | Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm |  |  |
| Fase móvil | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo             |  |  |

| Gradiente                 | Tiempo [min] | A [ %] | B [ %] |
|---------------------------|--------------|--------|--------|
|                           | 0,0          | 95     | 5      |
|                           | 25,0         | 40     | 60     |
|                           | 25,2         | 0      | 100    |
|                           | 27,8         | 0      | 100    |
|                           | 28,0         | 95     | 5      |
|                           | 30,0         | 95     | 5      |
| Longitudes de onda        | 210, 260 nm  |        |        |
| Caudal                    | 1,4 ml/min   |        |        |
| Temperatura de la columna | 25 °C        |        |        |
| Tiempo de ejecución       | 30 min       |        |        |

#### Método M

| Columna                   | Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm |        |        |
|---------------------------|--------------------------------------------------------|--------|--------|
| Fase móvil                | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo               |        |        |
| Gradiente                 | Tiempo [min]                                           | A [ %] | B [ %] |
|                           | 0,0                                                    | 95     | 5      |
|                           | 15,0                                                   | 80     | 20     |
|                           | 15,2                                                   | 0      | 100    |
|                           | 18,0                                                   | 0      | 100    |
|                           | 18,5                                                   | 95     | 5      |
|                           | 22,0                                                   | 95     | 5      |
| Longitudes de onda        | 205, 220 nm                                            |        |        |
| Caudal                    | 1,4 ml/min                                             |        |        |
| Temperatura de la columna | 25 °C                                                  |        |        |
| Tiempo de ejecución       | 22 minutos                                             |        |        |

#### Método N

|         |                                                        |
|---------|--------------------------------------------------------|
| Columna | Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm |
|---------|--------------------------------------------------------|

|                           |                                          |        |        |
|---------------------------|------------------------------------------|--------|--------|
| Fase móvil                | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo |        |        |
| Gradiente                 | Tiempo [min]                             | A [ %] | B [ %] |
|                           | 0,0                                      | 95     | 5      |
|                           | 0,5                                      | 80     | 20     |
|                           | 15,5                                     | 60     | 40     |
|                           | 16,0                                     | 0      | 100    |
|                           | 19,0                                     | 0      | 100    |
|                           | 19,5                                     | 95     | 5      |
|                           | 22,0                                     | 95     | 5      |
| Longitudes de onda        | 210, 260 nm                              |        |        |
| Caudal                    | 1,4 ml/min                               |        |        |
| Temperatura de la columna | 22 °C                                    |        |        |
| Tiempo de ejecución       | 22 minutos                               |        |        |

#### Método O

|                           |                                                      |        |        |
|---------------------------|------------------------------------------------------|--------|--------|
| Columna                   | Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm |        |        |
| Fase móvil                | A: 0,05 % TFA en agua<br>B: Acetonitrilo             |        |        |
| Gradiente                 | Tiempo [min]                                         | A [ %] | B [ %] |
|                           | 0,0                                                  | 95     | 5      |
|                           | 0,5                                                  | 80     | 20     |
|                           | 15,5                                                 | 60     | 40     |
|                           | 16,0                                                 | 0      | 100    |
|                           | 19,0                                                 | 0      | 100    |
|                           | 19,5                                                 | 95     | 5      |
|                           | 22,0                                                 | 95     | 5      |
| Longitudes de onda        | 210, 260 nm                                          |        |        |
| Caudal                    | 1,4 ml/min                                           |        |        |
| Temperatura de la columna | 22 °C                                                |        |        |

|                     |            |
|---------------------|------------|
| Tiempo de ejecución | 22 minutos |
|---------------------|------------|

#### *Espectroscopia de RMN*

$^1\text{H}$  y el espectro se registraron a 500 MHz a temperatura ambiente y se referenciaron a trimetilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) de campo bajo a campo alto. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en hercios (Hz) y las abreviaturas que indican la multiplicidad son las siguientes: s = singlete, d = doblete, t = triplete, dd = doblete de dobletes, m = multiplete.

#### *Espectrometría de masas (EM)*

Las mediciones de EM se llevaron a cabo en un Advion expression® CMS. Las muestras se enviaron por inyección directa con una jeringa. Para la ionización se utilizó una fuente de ionización por electrospray (ESI) o una fuente de ionización a presión atmosférica (APCI). Los análisis se realizaron en modo de iones positivos. En el caso de la ESI, la temperatura del capilar se fijó en 250°C. Las temperaturas del gas de la fuente se fijaron en 250 y 300°C, respectivamente, con un flujo de 4 y 5 L/min, respectivamente. El flujo de gas de nebulización se fijó en 0,5 L/min. El voltaje del electrospray se fijó en 3,5 kV. Para la APCI, la temperatura del capilar se fijó en 250 °C, la temperatura del gas de origen en 350 °C y se utilizó una descarga de corona APCI a 5  $\mu\text{A}$ .

#### *Purificación RP-HPLC preparativa*

La purificación RP-HPLC preparativa se llevó a cabo en un sistema Agilent 1260 Infinity II equipado con bomba binaria, multimuestreador, VWD, colector de fracciones y organizador de columnas. Como columnas, Phenomenx Luna® C18 (2) 10  $\mu\text{m}$  100 Å 250 x 21,2 mm, Kinetex® EVO-C18 5  $\mu\text{m}$  100 Å 250 x 21,2 mm y ACE C18-PFP 5  $\mu\text{m}$  100 Å 250 x 21,2 mm con caudales entre 24 - 30 ml/min utilizando elución en gradiente lineal de acetonitrilo en agua (+0,05 % TFA).

#### *Cromatografía flash*

La purificación mediante cromatografía flash sobre sílice se realizó utilizando un Teledyne ISCO CombiFlash NextGen 300+ equipado con detección UV y ELSD y columnas de sílice de fase normal de un solo uso RediSep® con malla entre 230 y 400.

*Procedimiento general 1 (GP1): Reacción de clic CuAAC para la unión del potenciador de solubilidad*

A una solución agitada de azida (0,9-1,5 equiv.) y alquino (1 equiv.) en DMF se añadió DMF:agua (5:1 o 10:1) que contenía tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (TBTA, 0,125-0,625 equiv.) o tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THPTA, 0,125-2 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (0,125-0,625 equiv.) o tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THPTA, 0,125-2 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (0,1-1 equiv.) y Ascorbato de Na (0,25-3,0 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente hasta su finalización. Una vez completada, la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento mediante HPLC preparativa para obtener el producto tras liofilización.

*Procedimiento general 2 (GP2): Reacción de clic CuAAC sobre andamiaje de poliazida*

A una solución agitada de poliazida (1 equiv.) y alquino (1,05-1,25 equiv. por fracción de azida) en DMF se añadió agua con Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THPTA, 0,63-1,35 equiv. por fracción de azida), sulfato de cobre(II) pentahidratado (0,525-0,65 equiv. por fracción de azida) y Ascorbato de Na (1-2,15 equiv. por fracción de azida). La proporción resultante de DMF/agua fue de 5:1 o 10:1. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente hasta su finalización. Una vez completada, la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento mediante HPLC preparativa para obtener la carga de enlace multimérica después de la liofilización.

*Procedimiento general 3 (GP3): Fijación de intermedios 3.1 o 3.2*

La carga de enlace protegida con Fmoc se trató con dietilamina ( $\text{Et}_2\text{N}$ , 20-24 equiv.) en DMF a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se siguió por RP-HPLC. El disolvente se eliminó *al vacío* y el residuo se coevaporó una vez con DMF. A continuación, el residuo se disolvió en DMF bajo argón y se añadió una solución del **intermedio 3.1 o 3.2** (1,1-1,5 equiv.) en DMF seguida de N-etildisopropilamina (DIPEA, 1,4-3 equiv.). La solución se agitó a temperatura ambiente y el progreso se siguió por RP-HPLC. Una vez completada, se evaporó el disolvente y el producto bruto se purificó por RP-HPLC.

*Procedimiento general 4 (GP4): Fijación de maleimida*

A una solución agitada de la carga de enlace multimérica en DMF seca se añadió éster Mal-PEG(4)-NHS (1-4 equiv.) y DIPEA (1-4 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura

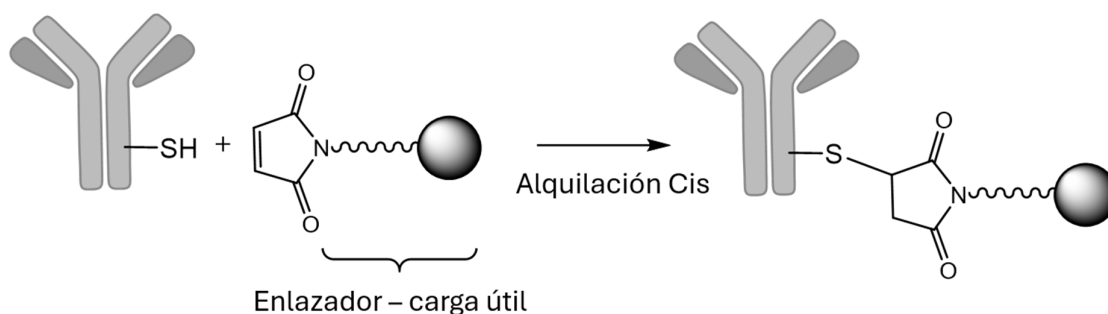
ambiente durante 30 min. Una vez completada, la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento mediante HPLC preparativa para obtener el compuesto final tras liofilización.

**Procedimiento general 5 (GP5): Unión de PEG-azida a Mono-6-amino-6-deoxi-ciclodextrina**

El éster azido-PEG-NHS (1 equiv.) se disolvió en agua o DMF y se añadió una solución de mono-6-amino-6-deoxi-ciclodextrina (1 equiv.) en agua o DMF. Si se utilizaba DMF como disolvente, se añadía DIPEA (1,5-2 equiv.) si era necesario. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente hasta su finalización y se controló por RP-HPLC. En caso necesario, se añadió otra porción de mono-6-amino-6-deoxi-ciclodextrina (0,2 equiv.). Una vez completada, la mezcla de reacción se liofilizó y se utilizó como crudo sin purificación adicional en caso de que se utilizara agua como disolvente. Si se utilizó DMF como disolvente, el producto se aisló por precipitación en MTBE. En caso de utilizar mono-6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina, se empleó mono-6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina disponible comercialmente. En caso de utilizar mono-6-amino-6-deoxi-gamma-ciclodextrina, el material se sintetizó a partir de gamma-ciclodextrina según Tang, W., Ng, S.-C. *Nat. Protoc.* 2008, 3, 691-697.

**Generación de ADC - conjugación de cargas útiles enlazadores con anticuerpos**

Los anticuerpos se conjugaron con los conjugados portadores de fármacos mediante la denominada tecnología Thiomab. En este enfoque, la conjugación tiene lugar mediante el acoplamiento de una fracción reactiva tiol terminal, como un residuo de maleimida del enlazador portador del fármaco ("carga del enlazador"), al grupo SH libre de un residuo de cisteína modificado genéticamente en la región Fc del anticuerpo, como se muestra en el siguiente esquema de reacción:



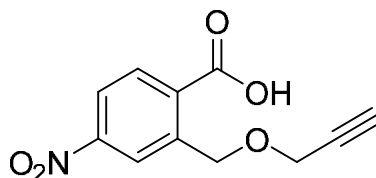
Los principios de este método de conjugación se divulgan en Junutula *et al.* (2008), cuyo contenido se incorpora aquí por referencia.

Los anticuerpos anti-GUCY2C utilizados en los presentes experimentos comprenden una sustitución D265C en ambos dominios Fc, para proporcionar un residuo de cisteína que tiene un grupo SH libre. La tecnología respectiva se divulga en el documento WO2016/142049 A1, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia.

### **EJEMPLO 1 - Síntesis de compuestos enlazadores modulares**

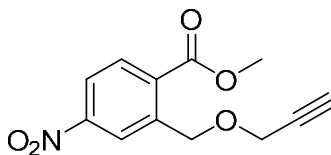
#### **Ejemplo 1.1- Síntesis de intermediarios de enlace**

Paso 1: Síntesis del ácido 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoico



A una solución de metil-2-(bromometil)-4-nitrobenzoato (CAS-Nr. 133446-99-8, 2 g, 7,30 mmol, 1 equiv.) en 10 ml de acetonitrilo se añadieron prop-2-in-ol (2,16 ml, 36,5 mmol, 5 equiv.) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (5,96 g, 18,3 mmol, 2,5 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 80 °C durante 3 h y el progreso se monitorizó por RP-HPLC. La mezcla de reacción se filtró. El filtrado se diluyó con acetato de etilo (20 ml), se lavó con agua (10 ml) y se extrajo con  $\text{NaHCO}_3$  (2x 10 ml). Para la precipitación, las capas acuosas combinadas se acidificaron a pH 2 utilizando HCl 2 M (50 ml). Tras filtración, el sólido obtenido se recogió en 1,4-dioxano y se liofilizó durante la noche para producir ácido 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoico como un sólido rojo pálido (1,44 g, 83 %). RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  8,36 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 8,22 (dd,  $J$  = 8,6, 2,5 Hz, 1H), 8,09 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 1H), 4,94 (s, 2H), 4,36 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 2H), 3,53 (t,  $J$  = 2,4 Hz, 1H). HPLC (método **A**):  $t_R$  = 11,3 min.

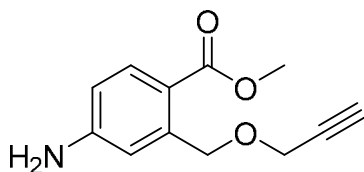
Paso 2: Síntesis de 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato de Metilo



A una disolución de ácido 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoico (1,44 g, 6,12 mmol, 1 equiv.) en 30 ml de metanol seco se añadió  $\text{SOCl}_2$  (3,56 ml, 49 mmol, 8 equiv.) a 0°C. La

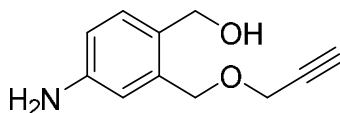
mezcla se agitó a 70°C durante 3,5 h y el progreso se controló por RP-HPLC. Una vez completado el proceso, el disolvente y los volátiles se eliminaron a presión reducida. El residuo obtenido se recogió en 1,4-dioxano y se liofilizó durante la noche para producir metil-4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato (1,52 g, 99 %) como un sólido marrón pálido. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO) δ 8,37 (dd, *J* = 2,3, 1,1 Hz, 1H), 8,28 - 8,22 (m, 1H), 8,08 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 4,92 (d, *J* = 0,8 Hz, 2H), 4,34 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,49 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H). HPLC (método **A**): *t<sub>R</sub>* = 13,1 min.

Paso 3: Síntesis de 4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato de metilo



A una suspensión agitada de metil-4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato (1,52 g, 6,1 mmol, 1 equiv.) en una mezcla de EtOH (15 ml) y agua (7,5 ml) se añadió polvo de hierro (2,73 g, 48,8 mmol, 8 equiv.) y NH<sub>4</sub>Cl (2,61 g, 48,8 mmol, 8 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se dejó agitar a 80°C durante 4 h y el progreso se monitorizó por RP-HPLC. Tras el consumo total del material de partida, la reacción se enfrió hasta rt, se filtró a través de Celite y se lavó con acetato de etilo (15 ml). El filtrado se lavó con solución de bicarbonato sódico sat., agua y salmuera (15 ml cada una). Las capas acuosas se extrajeron con acetato de etilo (15 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Después de la filtración, el disolvente se eliminó a presión reducida para obtener 4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato como un sólido rojo (1,29 g, 96 %) después de secar *al vacío*. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,87 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,99 (dt, *J* = 2,2, 1,0 Hz, 1H), 6,59 (dd, *J* = 8,5, 2,5 Hz, 1H), 5,00 (s, 2H), 4,31 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 3,84 (s, 3H), 2,48 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H). HPLC (método **A**): *t<sub>R</sub>* = 10,5 min.

Paso 4: Síntesis de (4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)metanol



A una solución enfriada (0°C) de THF seco (13 ml) se añadió lentamente LiAlH<sub>4</sub> (1 M en THF, 12,01 mmol, 12,01 ml, 2,5 equiv.). Se añadió gota a gota a 0°C una solución de 4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato (1,06 g, 4,8 mmol, 1 equiv.) en THF seco (10 ml). Tras la adición completa, la mezcla resultante se dejó agitar toda la noche a rt. El progreso de la

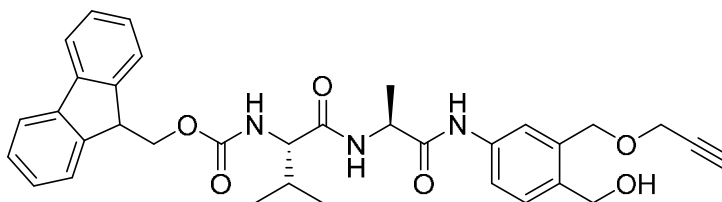
reacción se monitorizó mediante RP-HPLC. La mezcla de reacción se vertió en una solución de tartrato sódico potásico 1 M (120 ml) en agitación vigorosa y se agitó durante otros 30 min a rt. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (3x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera (30 ml cada una). La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener el producto bruto. La purificación mediante cromatografía flash ISCO  $\text{SiO}_2$  (0-100 % de acetato de etilo en hexano) produjo (4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)metanol (0,65 g, 71 %).  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO)  $\delta$  6,99 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 1H), 6,58 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 6,45 (dd,  $J$  = 8,0, 2,4 Hz, 1H), 4,93 (s, 2H), 4,62 - 4,53 (m, 1H), 4,47 (s, 2H), 4,35 (d,  $J$  = 5,4 Hz, 2H), 4,15 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 2H), 3,42 (t,  $J$  = 2,4 Hz, 1H). HPLC (método **A**):  $t_R$  = 4,8 min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 174,2  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  calculado= 174,1

#### Paso 5: Síntesis Fmoc-Val-Ala-OH

La síntesis de Fmoc-Val-Ala-OH se realizó como se describe en el documento WO 2017/149077.

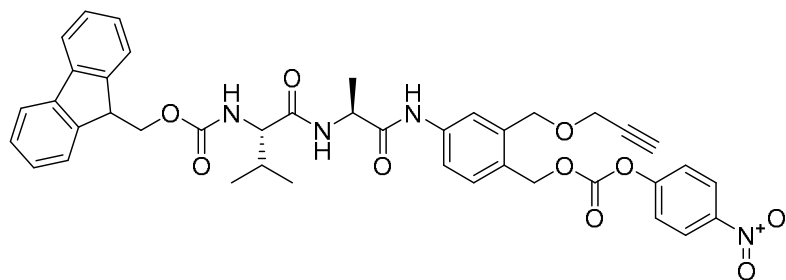
### **Ejemplo 1.2 - Síntesis de intermedios enlazador-carga útil**

#### Paso 6: Síntesis del **intermedio 1.1**



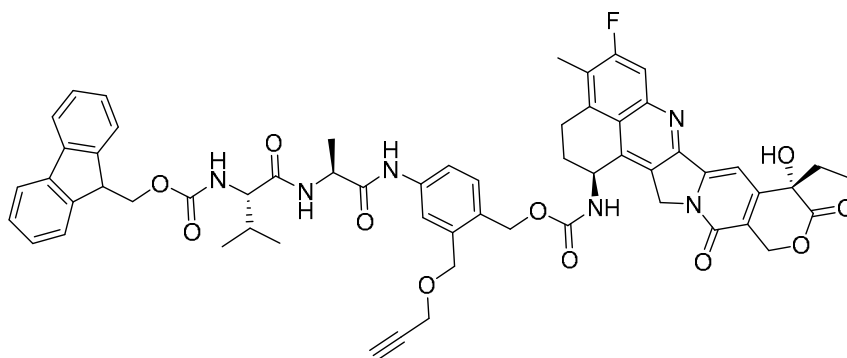
A una solución agitada de Fmoc-Val-Ala-OH (1,43 g, 3,41 mmol, 1 equiv.) y (4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)metanol (0,65 g, 3,41 mmol, 1 equiv.) en THF seco (20 ml) se añadió N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ, 1,05 g, 4,1 mmol, 1,2 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 5 d. El disolvente se eliminó a presión reducida. El intermedio crudo resultante se purificó mediante cromatografía flash sobre sílice (gradiente de 0-5 % de MeOH en DCM) para producir el **intermedio 1.1** como un sólido incoloro (1,25 g, 63 %). HPLC (método **A**):  $t_R$  = 12,9 min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 601,2  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ ,  $m/z$  calculado= 601,3

#### Paso 7: Síntesis del **intermedio 1.2**



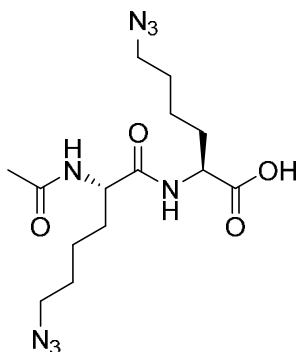
A una disolución agitada del **intermedio 1.1** (0,72 g, 1,24 mmol) en DMF seca (15 ml) se añadieron bis-4-nitrofenil-carbonato (0,75 g, 2,48 mmol, 2 equiv.) y N-etildiisopropilamina (DIPEA, 3,1 mmol, 0,53 ml, 2,5 equiv.) bajo atmósfera de argón. La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 h. Una vez completada, el disolvente se eliminó a presión reducida. El intermedio bruto se purificó mediante cromatografía flash sobre sílice (gradiente de 0-100 % de etilacetato en n-hexano) para producir el **intermedio 1.2** (0,75 g, 81 %) como un sólido amarillo pálido tras liofilización a partir de 1,4-dioxano:agua (4:1). HPLC (método **C**):  $t_R$  = 13,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 771,2  $[M+Na]^+$ , m/z calculado= 771,3

#### Paso 8: Síntesis del **intermedio 1.3**



A una suspensión agitada de mesilato de exatecano (0,58 g, 1,1 mmol, 1 equiv.) en DMF seca (20 ml) se añadió una solución recién preparada del **intermedio 1.2** (0,82 g; 1,1 mmol, 1 equiv.) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, 0,042 g, 0,275 mmol, 0,25 equiv.) en DMF seca (20 ml). A la mezcla resultante se añadió DIPEA (0,28 g, 2,16 mmol, 0,37 ml, 2 equiv.) y 2,6-lutidina (141 mmol, 16,3 ml, 129 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y el progreso se monitorizó por RP-HPLC. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. La purificación mediante cromatografía flash sobre sílice (gradiente de 0-5 % de MeOH en DCM) y liofilización de 1,4-dioxano:agua (4:1) dio el **intermedio 1.3** (1,08 g, 95 %) como un sólido gris. HPLC (método **D**):  $t_R$  = 13,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1045,3  $[M+H]^+$ , m/z calculado= 1045,4

### **Ejemplo 1.3 - Síntesis del intermedio 2.1**

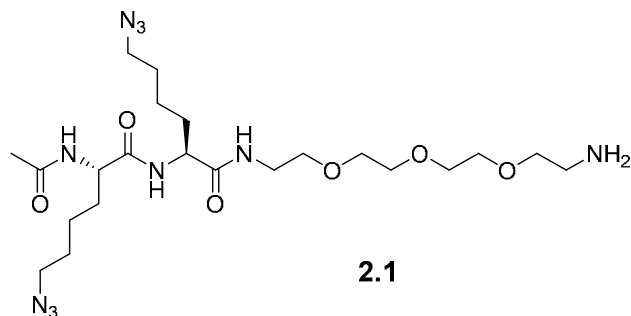


#### **Ac-Lys(N<sub>3</sub>)-Lys(N<sub>3</sub>)-OH**

La resina de 2-clorotritilo (4 g) se hinchó durante 10 min en abs. DCM (20 ml). La suspensión se filtró, se añadió una solución de Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (1,578 g, 4 mmol, 1 equiv.), DIPEA (3,48 ml, 20 mmol, 5 equiv.) en abs. DCM (20 ml) y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La suspensión se filtró, la resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y se añadió la solución de tapado (20 ml, MeOH/DIPEA/DCM 1/1/8) y se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. Se filtró la suspensión y se repitió una vez el procedimiento de tapado. La resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min) y se secó *al vacío*. La carga de la resina se determinó como se describe en *J. Pept. Sci.* **2017**, *23*, 757-762.

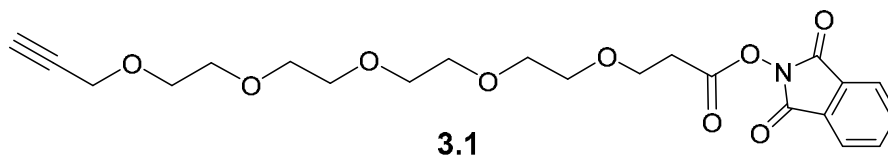
Para el siguiente paso, la resina se hinchó en DMF durante 10 min. La suspensión se filtró y se añadió a la resina una solución de desprotección Fmoc de piperidina al 20 % en DMF. La suspensión se incubó durante 20 min, se filtró y se repitió una vez el procedimiento de desprotección. A continuación, la resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min). La resina se hinchó en DMF durante 10 min, se filtró y se añadió una solución de Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (3 equiv.), TBTU (3 equiv.) y DIPEA (6 equiv.) en DMF. La suspensión se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min) y el grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20 % como se ha descrito anteriormente. Para la acetilación, la resina se hinchó en DMF durante 10 min, se filtró la suspensión y se añadió una solución de anhídrido acético (3 equiv.) y piridina (3 equiv.) en DMF. La suspensión se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, se filtró, la resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min) y se secó *al vacío*.

Para la escisión, la resina se trató con una solución de hexafluoroisopropanol en DCM (1:4, 20 ml) durante 15 min. Se recoge la solución y la resina se trata de nuevo con hexafluoroisopropanol en DCM (1:4, 20 ml). La resina se lava con hexafluoroisopropanol en DCM (1:4) y los filtrados combinados se concentran *al vacío*. El péptido crudo resultante se purificó por RP-HPLC y se obtuvo **Ac-Lys(N<sub>3</sub>)- Lys(N<sub>3</sub>)-OH** (731 mg, 50 %) como un liofilizado incoloro.



**Ac-Lys(N<sub>3</sub>)- Lys(N<sub>3</sub>)-OH** (731 mg, 1,98 mmol, 1 equiv.) y HOBt (910 mg, 5,94 mmol, 3 equiv.) se disolvieron en DMF (8 ml). Se añadió DIC (920 µl, 5,9 mmol, 3 equiv.), se agitó la solución durante 5 min a temperatura ambiente y después se añadió una solución de Boc-Amino-PEG(3)-Amina (CAS-Nr. 101187-40-0, 868 mg, 2,97 mmol, 1,5 equiv.) en DMF (4 ml) seguida de DIPEA (1,04 ml, 5,98 mmol, 3 equiv.). La reacción se agitó a temperatura ambiente y se siguió por RP-HPLC. Después de 20 h, la solución se concentró y el residuo se disolvió en acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con ácido cítrico 0,2 M (1 x 50 ml), solución de bicarbonato sódico (3 x 50 ml) y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró *al vacío* dando 1,428 g de producto bruto. La purificación por RP-HPLC seguida de liofilización en presencia de HCl (1 equiv.) durante dos veces dio el **intermedio 2.1** (705 mg, 66 %) como HCl-sal. HPLC (método H): *t<sub>R</sub>* = 11,2 min. MS (ESI): *m/z* encontrado= 543,3 [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* calculado= 543,3 [M+H]<sup>+</sup>.

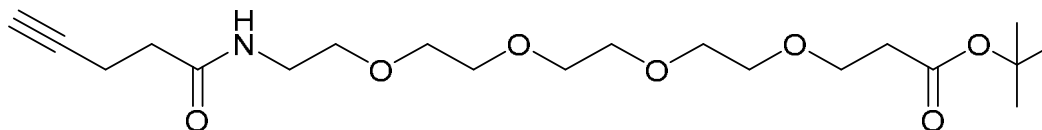
#### **Ejemplo 1.4- Síntesis del intermedio 3.1**



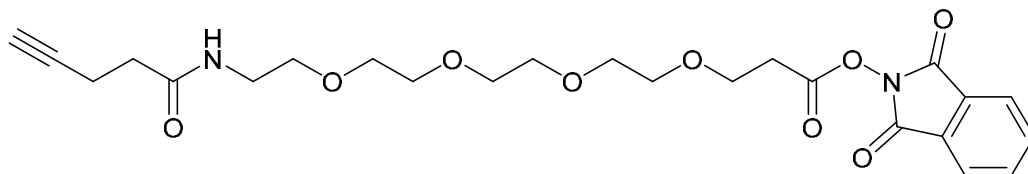
Se añadieron EDC x HCl (485,8 mg, 2,53 mmol, 1,3 equiv.) y DIPEA (1,09 ml, 6,24 mmol, 3,2 equiv.) a una disolución de Propargil-PEG(5)-ácido (CAS-Nr. 1245823-51-1, 593,1 mg, 1,94 mmol, 1 equiv.) en abs. THF (8,9 ml). Una disolución de N-hidroxifthalimida (413,4 mg,

2,53 mmol, 1,3 equiv.) en abs. THF (8,9 ml) durante 10 minutos. La reacción se agitó a temperatura ambiente y se controló por TLC y RP-HPLC. Después de 21 h, la solución se diluyó con acetato de etilo (60 ml) y la capa orgánica se lavó con HCl 1N (30 ml), solución de bicarbonato sódico (30 ml) y salmuera (30 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró *al vacío*. El producto bruto resultante (724,7 mg) se purificó por cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de n-hexano a acetato de etilo. El **intermedio 3.1** (457,3 mg, 52 %) se obtuvo como aceite amarillento.  $C_{22}H_{27}NO_9$  RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,89 (dd, J = 5,5, 3,1 Hz, 2H), 7,80 (dd, J = 5,5, 3,1 Hz, 2H), 4,21 (d, J = 2,3 Hz, 2H), 3,89 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,73 - 3,63 (m, 17H), 2,97 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,44 (t, J = 2,4 Hz, 1H). RMN  $^{13}C$  (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 167,65, 161,73, 134,73, 128,82, 123,92, 79,61, 74,48, 70,69, 70,58, 70,54, 70,53, 70,49, 70,46, 70,33, 69,04, 65,76, 58,33, 32,14. HPLC (método I):  $t_R$  = 11,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 472,2  $[M+Na]^+$ , m/z calculado= 472,2  $[M+Na]^+$

### **Ejemplo 1.5 - Síntesis del intermedio 3.2**



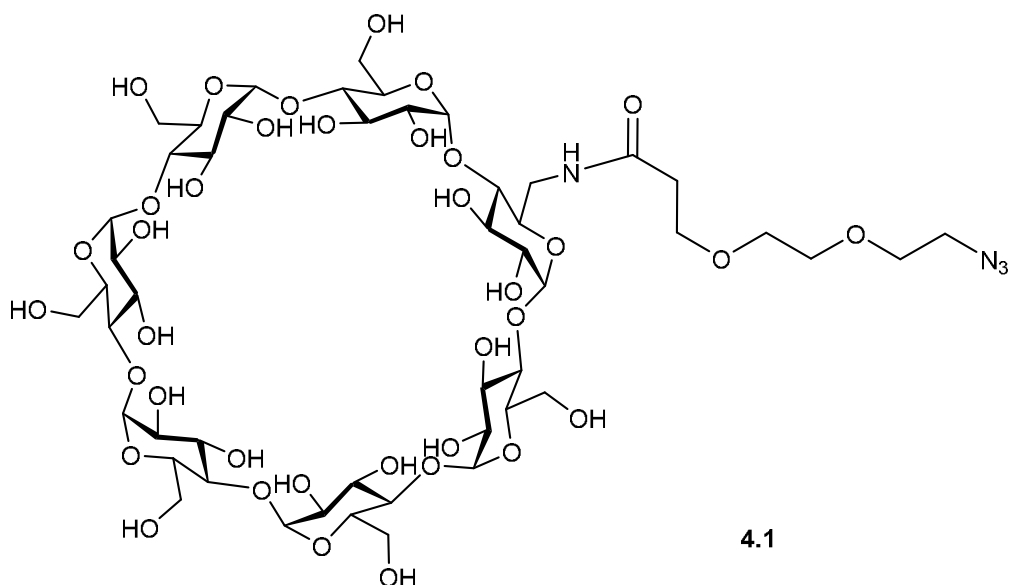
A una disolución de ácido pent-4-inoico (2 g, 20,4 mmol, 1,05 equiv.) en DMF (40 ml) se añadieron HATU (11,64 g, 30,6 mmol, 1,6 equiv.) y DIPEA (10,7 ml, 61,2 mmol) a 5 °C y la disolución resultante se agitó durante 10 min a 5 °C. A continuación, se añadió gota a gota una solución de 1-amino-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato *de terc-butilo* (6,24 g, 19,4 mmol, 1 equiv.) en DMF (10 ml) y se dejó que la solución resultante se calentara hasta temperatura ambiente. Después de 2 h, la solución se concentró *al vacío* y el residuo se recogió en acetato de etilo (300 ml). La capa orgánica se lavó con ácido cítrico 0,2 M (150 ml), solución saturada de bicarbonato sódico (150 ml) y salmuera (150 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró *al vacío*. La purificación por cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de hexano a acetona proporcionó 1-(pent-4-inamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato *de terc-butilo* (8,20 g, cuant.).  $C_{20}H_{35}NO_7$ . HPLC (método A):  $t_R$  = 10,6 min. MS (ESI): m/z encontrado= 424,4  $[M+Na]^+$ , m/z calculado= 424,2  $[M+Na]^+$



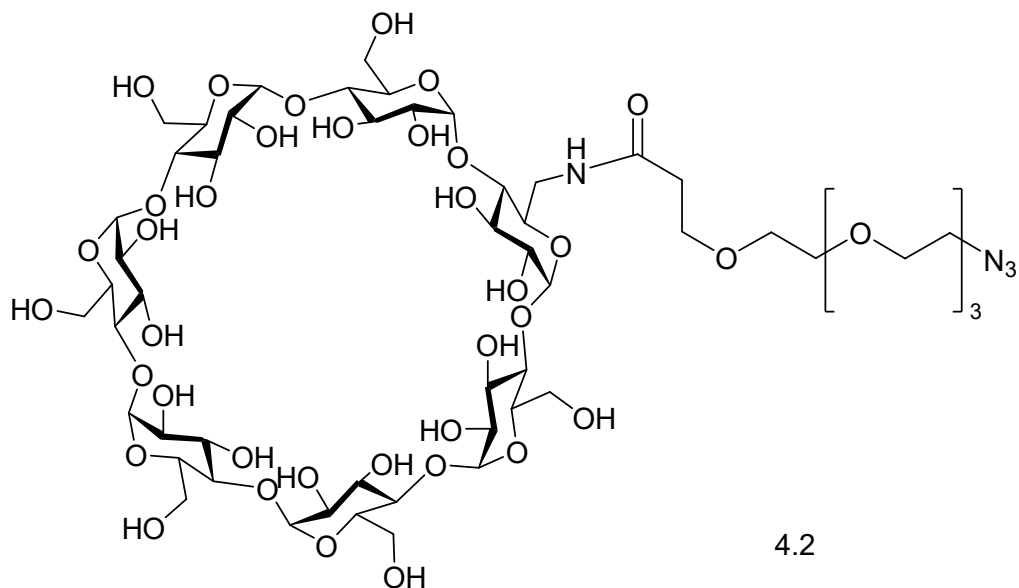
### 3.2

El 1-(pent-4-inamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato *de terc-butilo* (8,20 g, máx. 19,4 mmol, 1 equiv.) se disolvió en TFA (15,6 ml) y se agitó durante 1 h a 300 mbar. El TFA se eliminó *al vacío* y el residuo se coevaporó dos veces con tolueno. El residuo obtenido se disolvió en THF (abs., 50 ml) y se añadieron clorhidrato de *N-etil-N'-carbodiimida* (4,66 g, 24,3 mmol, 1,25 equiv.) así como DIPEA (11 ml, 63 mmol, 3,25 mmol). A continuación, se añadió gota a gota una solución de N-hidroxifthalimida (3,96 g, 24,3 mmol, 1,25 equiv.) en THF (abs., 50 ml) y la solución rojiza resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Se añadió acetato de etilo (400 ml) y la capa orgánica se lavó con HCl 2N (100 ml), solución saturada de bicarbonato sódico (100 ml) y salmuera (100 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró *al vacío*. La purificación por cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de diclorometano a acetona proporcionó el **intermedio 3.2** (4,96 g, 52 %) como aceite amarillento. C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8,01 - 7,89 (m, 4H), 7,87 (s, 1H), 3,77 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,63 - 3,46 (m, 12H), 3,40 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 3,20 (q, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,01 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,70 (t, *J* = 2,6 Hz, 1H), 2,39 - 2,31 (m, 2H), 2,31 - 2,23 (m, 2H). RMN <sup>13</sup> C (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 170,18, 168,21, 161,61, 135,39, 128,10, 123,85, 83,65, 71,00, 69,73, 69,68, 69,62, 69,60, 69,50, 69,01, 65,18, 38,50, 34,02, 31,55, 14,09. HPLC (método **A**): *t<sub>R</sub>* = 10,5 min. MS (ESI): *m/z* encontrado= 491,4 [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* calculado= 491,2 [M+H]<sup>+</sup>

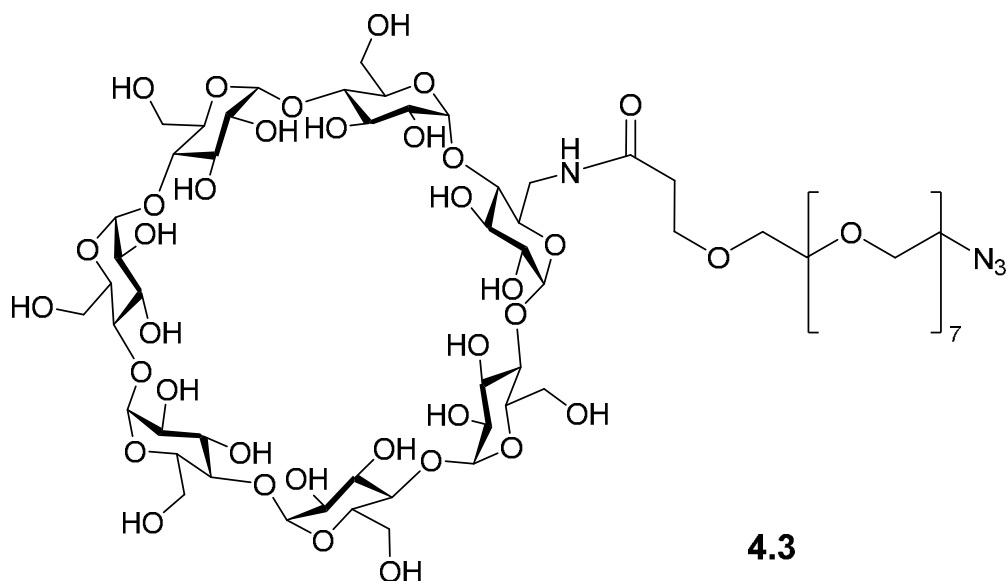
#### **Ejemplo 1.6 - Síntesis de los intermedios 4.x (N-PEG<sub>3n</sub>-beta/gamma-CD)**



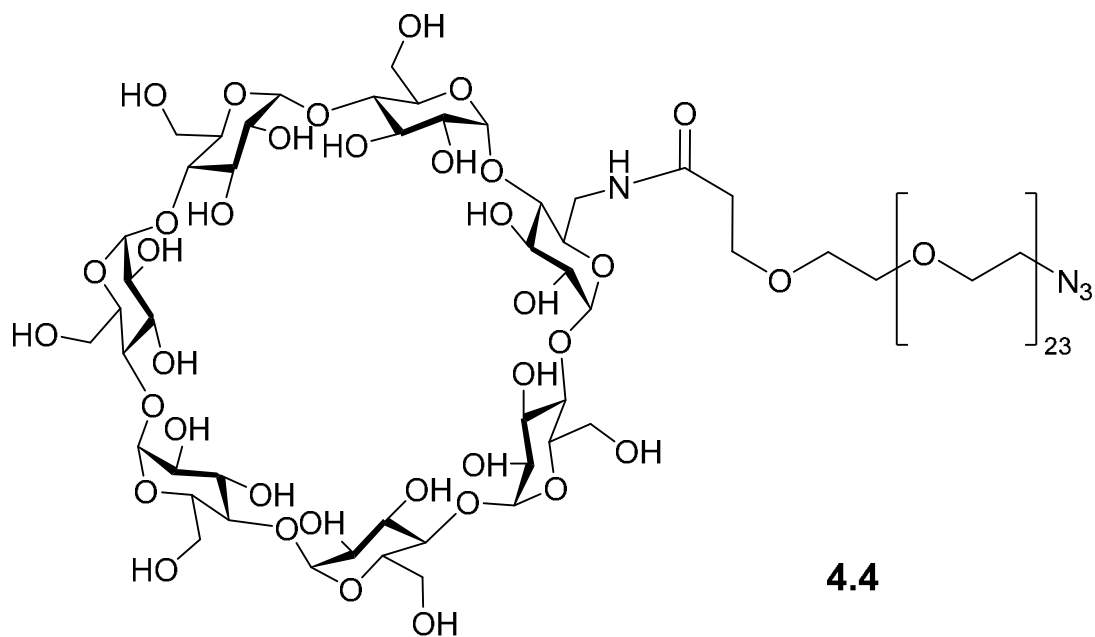
**El intermedio 4.1** se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(2)-NHS y 6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina. El producto bruto obtenido se utilizó sin purificación adicional.



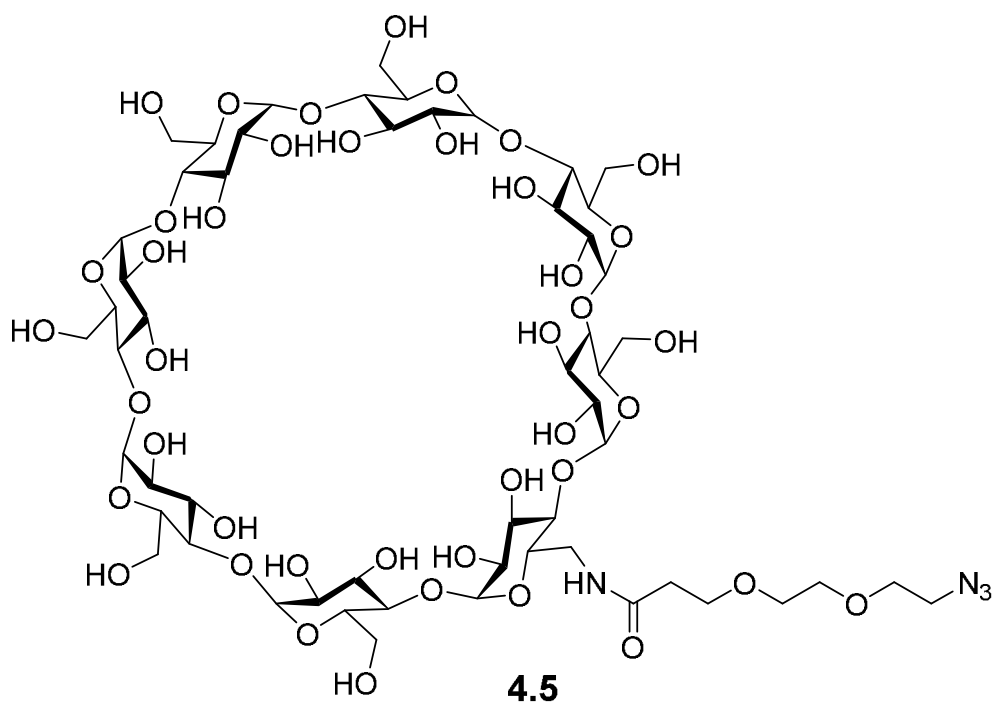
**El intermedio 4.2** se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(4)-NHS y 6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina. El producto bruto obtenido se utilizó sin purificación adicional.



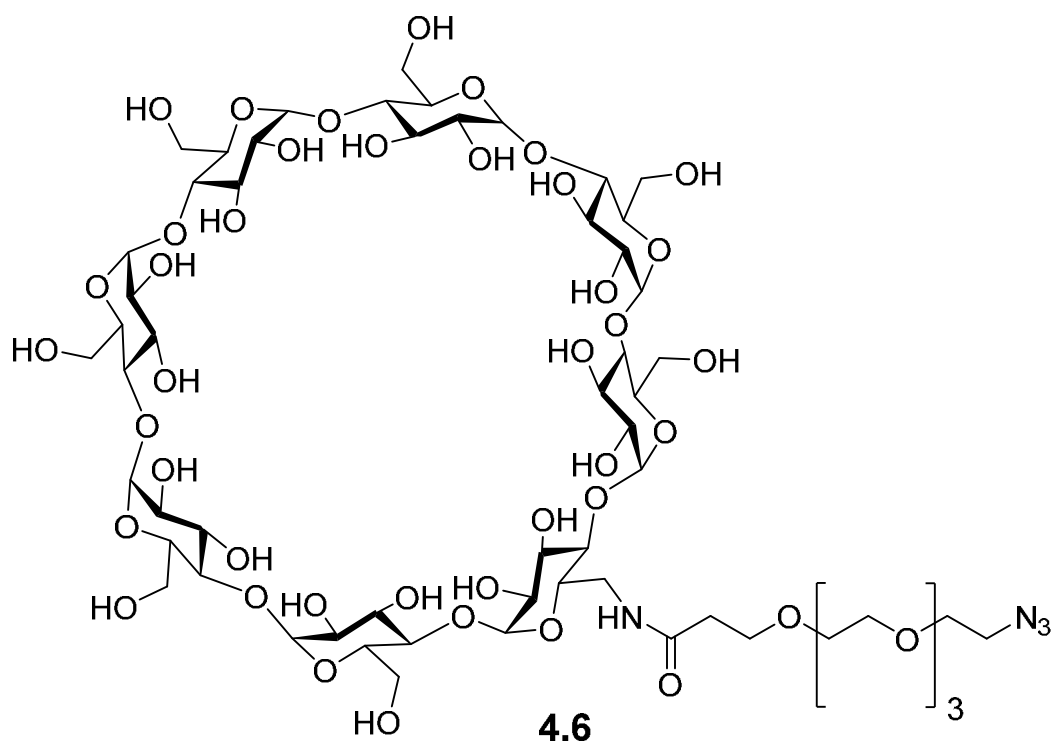
**El intermedio 4.3** se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(8)-NHS y 6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina. El producto bruto obtenido se utilizó sin purificación adicional.



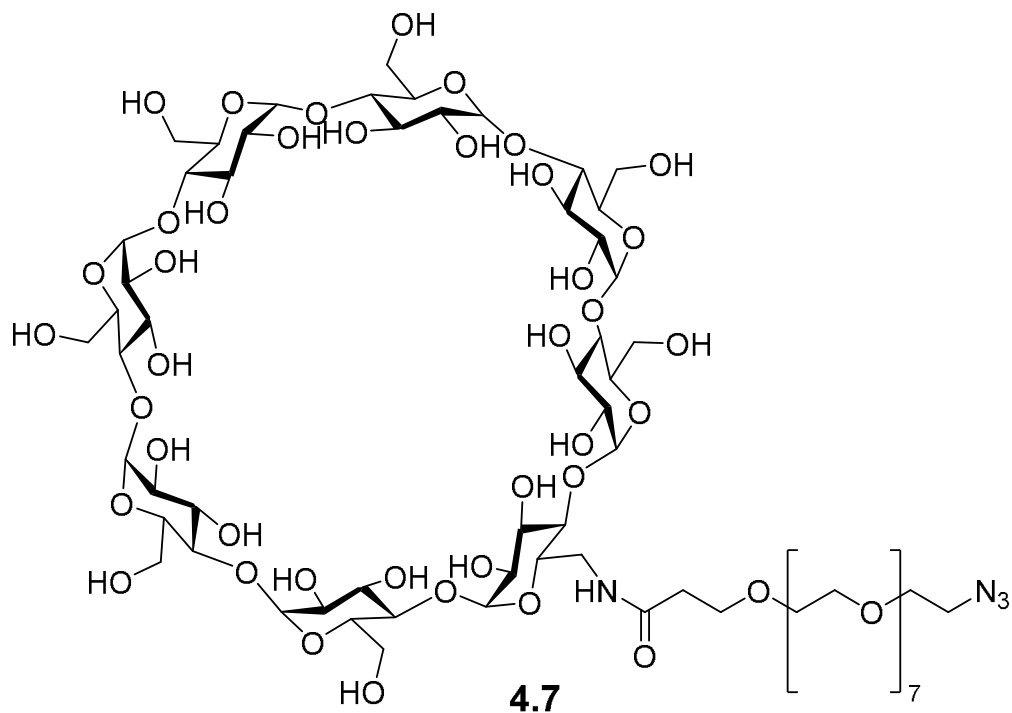
**El intermedio 4.4** se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(24)-NHS y 6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina. El producto bruto obtenido se utilizó sin purificación adicional.



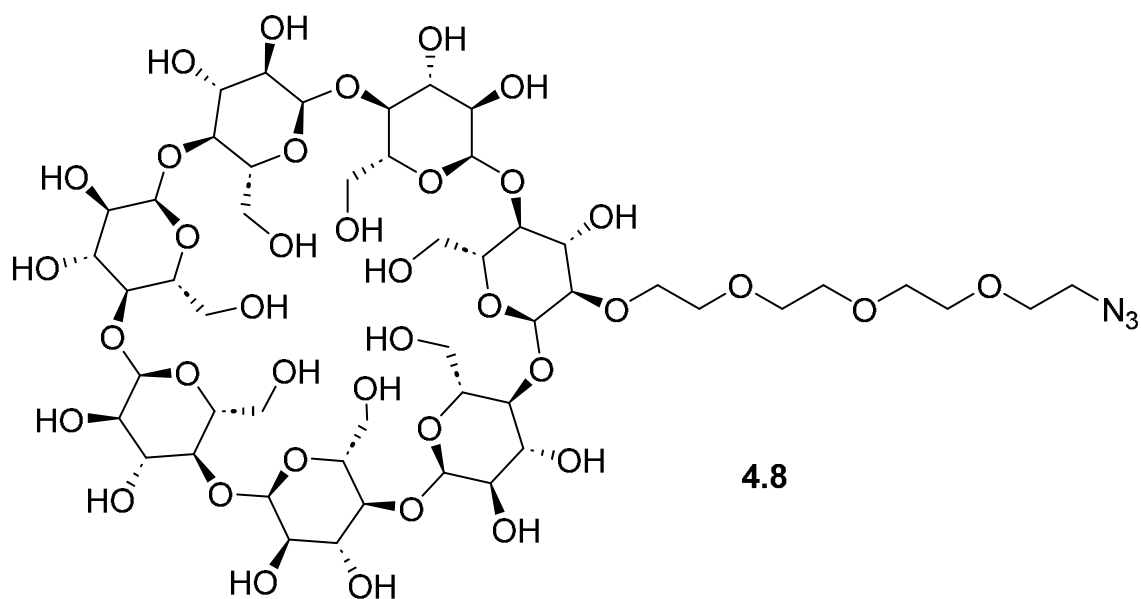
**El intermedio 4.5** se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(2)-NHS y 6-amino-6-deoxi-gamma-ciclodextrina. El producto bruto obtenido se utilizó sin purificación adicional.



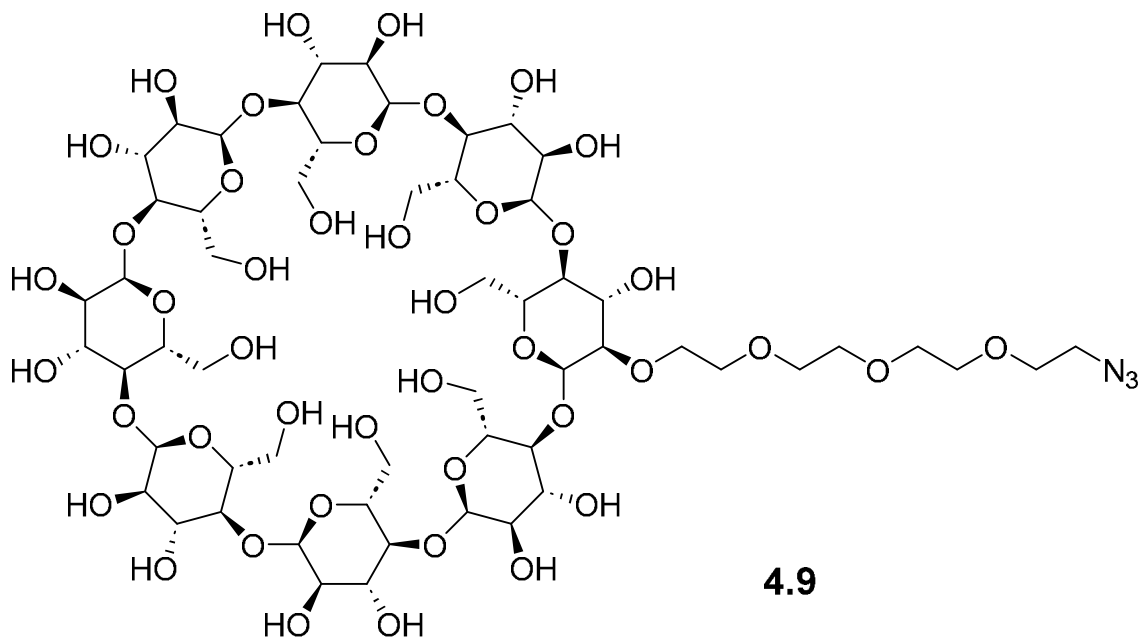
**El intermedio 4.6** se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(4)-NHS y 6-amino-6-deoxi-gamma-ciclodextrina. El producto bruto obtenido se utilizó sin purificación adicional.



**El intermedio 4.7** se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(8)-NHS y 6-amino-6-deoxi-gamma-ciclodextrina. El producto bruto obtenido se utilizó sin purificación adicional.

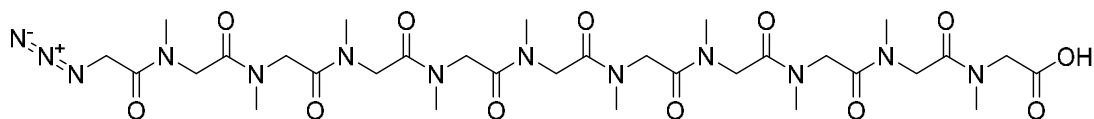


La beta-ciclodextrina (2,000 g, 1,762 mmol) se coevaporó dos veces con 30 ml de DMSO seco (abs.) y se volvió a disolver en 30 ml de DMSO. Se añadió hidruro de litio (21 mg, 2,643 mmol, 1,5 equiv.) y la suspensión se agitó bajo atmósfera de Argón durante 15 h. Posteriormente, se añadió 1-azido-2-{2-[2-(2-bromoetoxi)etoxi]etoxi}etano (497 mg, 1,762 mmol, 1,0 equiv.) disuelto en 2 ml de DMSO (abs.), seguido de yoduro de litio (24 mg, 176  $\mu$ mol, 0,1 equiv.) y la mezcla se agitó a 55 °C durante 7,5 h y después a temperatura ambiente. Después de que la TLC (acetonitrilo/agua/conc. amoníaco 6:3:1) indicara que no había más conversión, la mezcla se concentró *al vacío* hasta aproximadamente 6 ml y el resto se añadió gota a gota a 160 ml de acetona enfriada con hielo. El precipitado resultante se aisló por centrifugación, se resuspendió en 120 ml de acetona fría por sonificación y se centrifugó de nuevo. Tras secar *al vacío*, el sólido se absorbió en 5 ml de agua, la beta-ciclodextrina insoluble se eliminó por filtración y el filtrado se liofilizó. El producto bruto (2,263 g) se acidificó a pH 2 con ácido trifluoroacético y se purificó por prep. RP-HPLC para obtener 532 mg (23 %) de **intermedio puro 4.8** como liofilizado incoloro. MS (ESI): m/z encontrado= 1336,8 [M+H]<sup>+</sup>, m/z calculado= : 1336,5 [M+H]<sup>+</sup>



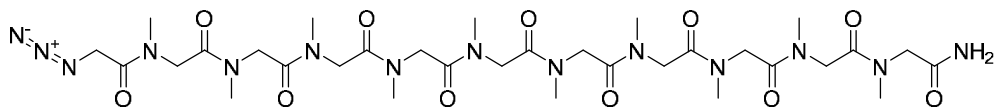
El **intermedio 4.9** se sintetizó según el **intermedio 4.8** utilizando gamma-ciclodextrina. El producto objetivo se obtuvo en un 22 % de rendimiento como liofilizado incoloro. MS (ESI): m/z encontrado= 1498,9 [M+H]<sup>+</sup>, m/z calculado= 1498,5 [M+H]<sup>+</sup>

#### **Ejemplo 1.7 - Síntesis de intermedios 5.x**



### 5.1

**El intermedio 5.1** se sintetizó según los documentos WO2019081455 y WO2022207699 utilizando resina Wang cargada con Fmoc-Sar, Fmoc-Sar-Sar-OH, Fmoc-Sar-OH y ácido azidoacético para el recubrimiento *N-terminal*. La desprotección con Fmoc se realizó con piperidina al 20 % en DMF durante 15 min (dos veces). El acoplamiento de aminoácidos se realizó con aminoácido (3 equiv.), HATU (2,9 equiv.) y DIPEA (6 equiv.) en DMF. La separación de la resina se realizó con TFA puro (10 ml/g de resina) seguido de precipitación con metil *terc-butil* éter helado y purificación por RP-HPLC. El **intermedio 5.1** (166,7 mg, 41 %) se obtuvo como un sólido incoloro. C<sub>32</sub>H<sub>53</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub>. HPLC (método H): *t<sub>R</sub>* = 7,4 min. MS (ESI): *m/z* encontrado= 834,2 [M+Na]<sup>+</sup>, *m/z* calculado= 834,4 [M+Na]<sup>+</sup>

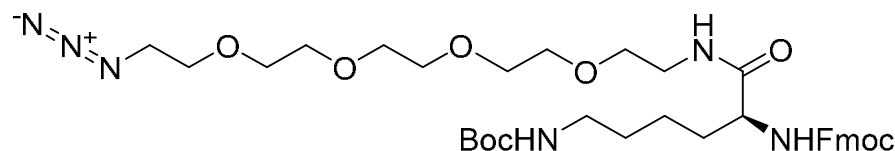


### 5.2

**El intermedio 5.2** se sintetizó según los documentos WO2019081455 y WO2022207699 utilizando resina NovaGel Rink-Amide cargada con Fmoc-Sar, Fmoc-Sar-Sar-OH, Fmoc-Sar-OH y ácido azidoacético para el recubrimiento *N-terminal*. La desprotección con Fmoc se realizó con piperidina al 20 % en DMF durante 15 min (dos veces). El acoplamiento de aminoácidos se realizó con aminoácido (3 equiv.), HATU (2,9 equiv.) y DIPEA (6 equiv.) en DMF. La separación de la resina se realizó con TFA/TIS 95/5 (10 ml/g de resina) seguida de precipitación con metil-*terc-butil* éter helado y purificación por RP-HPLC. El **intermedio 5.2** (83,6 mg, 54 %) se obtuvo como un sólido incoloro. C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>N<sub>14</sub>O<sub>11</sub>. HPLC (método K): *t<sub>R</sub>* = 7,1 min. MS (ESI): *m/z* encontrado= 811,5 [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* calculado= 811,4 [M+H]<sup>+</sup>

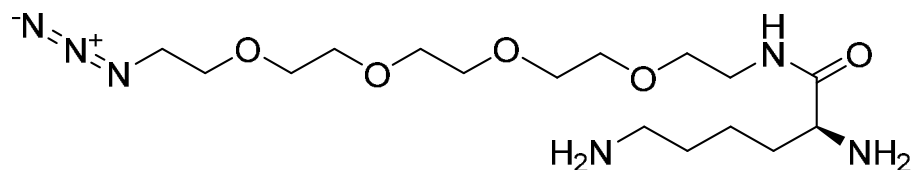
## **Ejemplo 1.8 - Síntesis de los intermedios 6.x**

### ***Síntesis del intermedio 6.1***



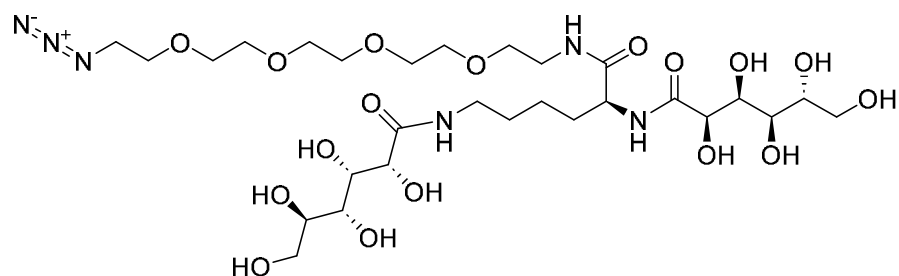
### Fmoc-Lys(Boc)-NH-PEG4-N<sub>3</sub>

A una disolución de Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,056 g, 6,5 mmol, 1 equiv.) en DMF (30 ml) se añadieron TBTU (2,467 g, 7,8 mmol, 1,2 equiv.) y DIPEA (1,33 ml, 7,8 mmol, 1,2 equiv.) y la disolución resultante se mezcló durante 1 min. A continuación, se añadió la solución de aminoácidos preactivada a una solución de 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-amina (1,680 g, 6,5 mmol, 1 equiv.) en DMF (10 ml) y la solución resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadió agua (5 ml) y la solución se evaporó *al vacío*. El residuo se disolvió en acetato de etilo (100 ml) y la capa orgánica se lavó con solución acuosa 0,2 M de ácido cítrico (50 ml), solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó *al vacío*. La purificación mediante cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de MTBE a acetona proporcionó **Fmoc-Lys(Boc)-NH-PEG4-N<sub>3</sub>** (3,545 g, 76 %) como un sólido incoloro y pegajoso. C<sub>36</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 7,88 (dt, J = 7,7, 0,9 Hz, 2H), 7,82 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 7,76 - 7,68 (m, 2H), 7,42 (td, J = 7,5, 1,0 Hz, 2H), 7,33 (tt, J = 7,4, 1,2 Hz, 3H), 6,68 (s, 1H), 4,30 - 4,18 (m, 3H), 3,93 (td, J = 8,6, 5,2 Hz, 1H), 3,62 - 3,56 (m, 2H), 3,55 - 3,48 (m, 12H), 3,41 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,37 (dd, J = 5,6, 4,4 Hz, 2H), 3,21 (ddt, J = 19,6, 13,6, 7,6 Hz, 2H), 2,89 (q, J = 10,3, 8,3 Hz, 2H), 1,69 - 1,43 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,24 (s, 4H). RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 171,86, 155,78, 155,45, 143,79, 143,70, 140,60, 127,49, 126,92, 125,17, 119,95, 77,21, 69,71, 69,69, 69,67, 69,63, 69,60, 69,48, 69,11, 68,88, 65,50, 54,56, 49,93, 46,62, 38,47, 31,63, 29,08, 28,16, 22,69. HPLC (método A): t<sub>R</sub> = 14,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 735,4 [M+Na]<sup>+</sup>, m/z calculado= 735,4 [M+Na]<sup>+</sup>



### Lys-NH-PEG4-N<sub>3</sub>

A una disolución de Fmoc-Lys(Boc)-NH-PEG4-N<sub>3</sub> (2,00 g, 2,8 mmol, 1 equiv.) en DMF (20 ml) se añadió dietilamina (5,00 ml, 56,1 mmol, 17 equiv.) y la disolución resultante se agitó durante 30 min a 600 mbar a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó *al vacío* y la purificación mediante cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de diclorometano a diclorometano/MeOH/conc. amoníaco (9:1:0,1) proporcionó el intermedio desprotegido con Fmoc H-Lys(Boc)-NH-PEG4-N<sub>3</sub> (1,182 g, 86 %) como aceite incoloro. A continuación, a una solución de H-Lys(Boc)-NH-PEG4-N<sub>3</sub> (1,163 g, 2,4 mmol, 1 equiv.) en 1,4-dioxano (20 ml) se añadió HCl 1M (11,85 ml, 11,8 mmol, 5 equiv.) y se agitó durante 10 min a 600 mbar a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó *al vacío*, el residuo se disolvió en HCl 1M (11,85 ml, 11,8 mmol, 5 equiv.) y se agitó durante 10 min a 600 mbar a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó *al vacío* y se coevaporó adicionalmente dos veces con 1,4-dioxano. Se obtuvo **Lys-NH-PEG4-N<sub>3</sub>** (1,119 g, cuant.) como aceite incoloro muy viscoso. C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8,67 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 8,32 (s, 3H), 8,11 (s, 3H), 3,78 - 3,72 (m, 1H), 3,61 - 3,58 (m, 2H), 3,59 - 3,47 (m, 12H), 3,45 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 3,38 (dd, J = 5,5, 4,4 Hz, 2H), 3,28 (d, J = 5,9 Hz, 1H), 3,23 (dq, J = 13,7, 5,8 Hz, 1H), 2,73 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 1,73 (qd, J = 7,3 Hz, 2H), 1,59 (qd, J = 8,5, 7,8, 6,0 Hz, 2H), 1,42 - 1,33 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 168,43, 69,74, 69,70, 69,66, 69,62, 69,49, 69,13, 68,63, 51,78, 49,97, 38,66, 38,11, 30,18, 26,08, 20,97. HPLC (método H): t<sub>R</sub> = 6,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 391,3 [M+H]<sup>+</sup>, m/z calculado= 391,3 [M+H]<sup>+</sup>

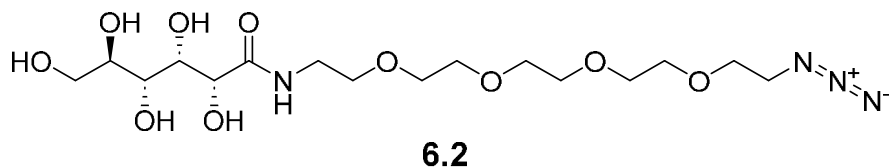


### 6.1

A una disolución de Lys-NH-PEG4-N<sub>3</sub> (500 mg, 1,1 mmol, 1 equiv.) en DMF (10 ml) se añadieron D-GLUCONO-1,5-lactona (481 mg, 2,7 mmol, 2,5 equiv.) y DIPEA (917 µL, 5,4 mmol, 5,0 equiv.) y la disolución resultante se agitó durante 15 h a temperatura ambiente seguida de 1 h a 80°C. Después de 16,5 h de tiempo de reacción en total, D-GLUCONO-1,5-lactona (481 mg, 2,7 mmol, 2,5 equiv.) y DIPEA (917 µL, 5,4 mmol, 5,0 equiv.). Después de 21 h de reacción en total, el disolvente se eliminó *al vacío* y el residuo se coevaporó con una mezcla de metanol (10 ml) y DIPEA (917 µL) seguida de coevaporación con metanol (10 ml).

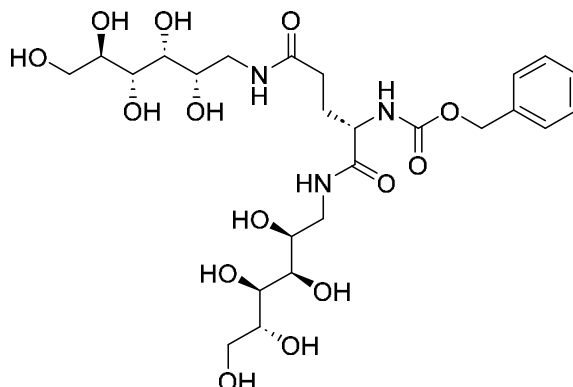
El producto bruto se precipitó en MTBE helado. La purificación por HPLC preparativa proporcionó el **intermedio 6.1** (294 mg, 36 %) como un sólido incoloro de aspecto vítreo.  $C_{28}H_{54}N_6O_{17}$ . RMN  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,90 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 7,61 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,53 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 4,41 (s, 10H), 4,22 (td, J = 8,4, 5,0 Hz, 2H), 4,06 (d, J = 3,5 Hz, 1H), 3,97 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 3,93 - 3,86 (m, 3H), 3,62 - 3,56 (m, 4H), 3,56 - 3,43 (m, 14H), 3,43 - 3,35 (m, 4H), 3,20 (qd, J = 6,0, 3,5 Hz, 4H), 3,05 (dp, J = 13,9, 6,9 Hz, 2H), 1,73 - 1,64 (m, 1H), 1,56 (tdd, J = 13,5, 9,4, 5,3 Hz, 1H), 1,45 - 1,33 (m, 2H), 1,23 (s, 2H). RMN  $^{13}C$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 172,28, 172,17, 171,28, 73,50, 73,32, 72,36, 72,16, 71,46, 70,42, 70,10, 69,72, 69,64, 69,50, 69,14, 68,75, 63,29, 63,24, 51,99, 49,97, 38,52, 38,08, 31,75, 28,77, 22,46. HPLC (método M):  $t_R$  = 13,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 747,4  $[M+H]^+$ , m/z calculado= 747,4  $[M+H]^+$

### Síntesis del intermedio 6.2



Se disolvió 14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-amina (262 mg, 1,0 mmol, 1 equiv.) en DMF (2 ml). Se añadió D-GLUCONO-1,5-lactona (214 mg, 1,2 mmol, 1,2 equiv.) como un sólido seguido de la adición de DIPEA (348  $\mu$ L, 2,0 mmol, 2 equiv.) y la solución resultante se agitó durante 2h a 110°C. Tras enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó *al vacío*. La purificación por cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de diclorometano a diclorometano/metanol/agua (5:1:0,1) proporcionó el intermedio **6.1** (318 mg, 72 %).  $C_{16}H_{32}N_4O_{10}$ . HPLC (método M):  $t_R$  = 13,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 441,3  $[M+H]^+$ , m/z calculado= 441,2  $[M+H]^+$

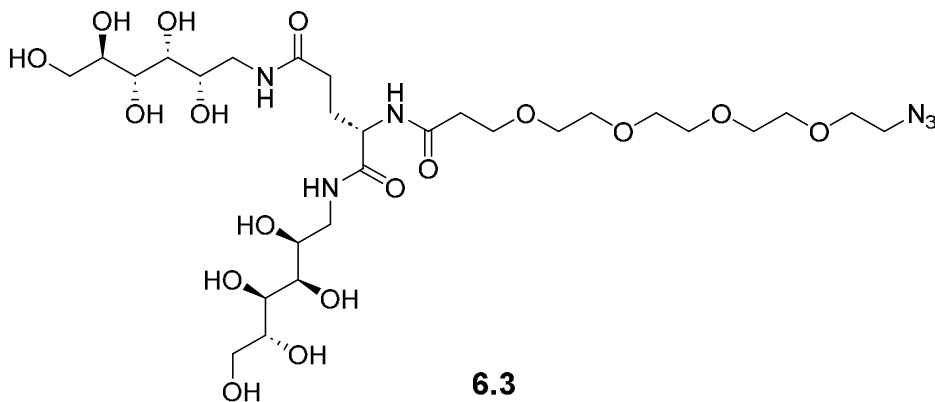
### Síntesis del intermedio 6.3



### Z-L-Glu(NHDG)-NHDG

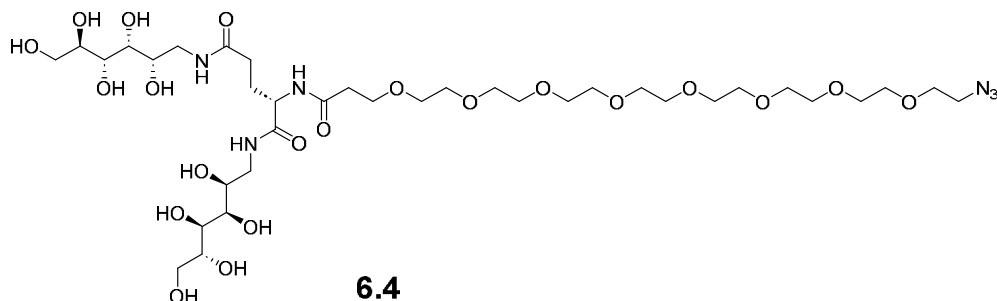
A una disolución de Z-L-GLU-OH (2,50 g, 8,9 mmol, 1 equiv.) en THF (abs., 50 ml) se añadió N-hidroxi-succinimida (2,32 g, 20,2 mmol, 2,3 equiv.) y la disolución se enfrió a 0°C. A continuación, se añadió *N,N'*-diclohexilcarbodiimida (3,85 g, 18,7 mmol, 2,1 equiv.) y la suspensión resultante se agitó 2 h a 0°C seguida de agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. La urea resultante se eliminó por filtración y el residuo aceitoso se disolvió en acetato de etilo (75 ml). La capa orgánica se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, salmuera y agua, se secó sobre sulfato magnésico y el disolvente se eliminó *al vacío*. Tras el tratamiento con éter dietílico, se obtuvo Z-L-Glu(Osu)-Osu (3,68 g, 87 %) como intermedio, que se utilizó sin purificación adicional.

A continuación, a una disolución de Z-L-Glu(Osu)-Osu (1,00 g, 2,1 mmol, 1 equiv.) en DMF (abs., 40 ml) se añadió d-glucamina (762,23 mg, 4,2 mmol, 2 equiv.) y la suspensión resultante se agitó durante 3 h a 65 °C. A medida que avanzaba la reacción, la suspensión inicial se convirtió en una solución. La solución se eliminó *al vacío* y la purificación por RP-HPLC proporcionó **Z-L-Glu(NHDG)-NHDG** (933,9 mg, 73 %).  $C_{25}H_{41}N_3O_{14}$ . HPLC (método H):  $t_R$  = 8,0 min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 630,3  $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  calculado= 630,2  $[M+Na]^+$



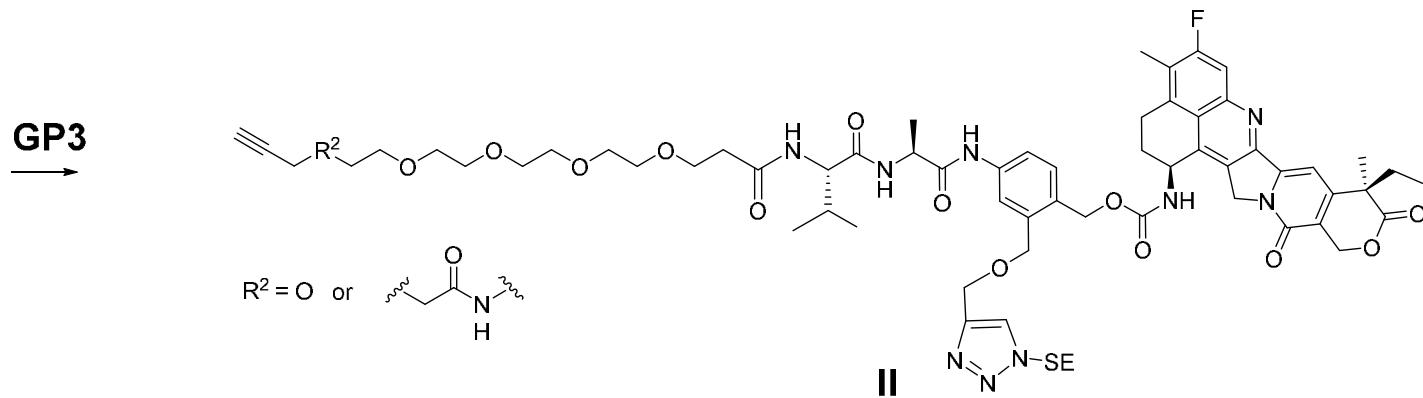
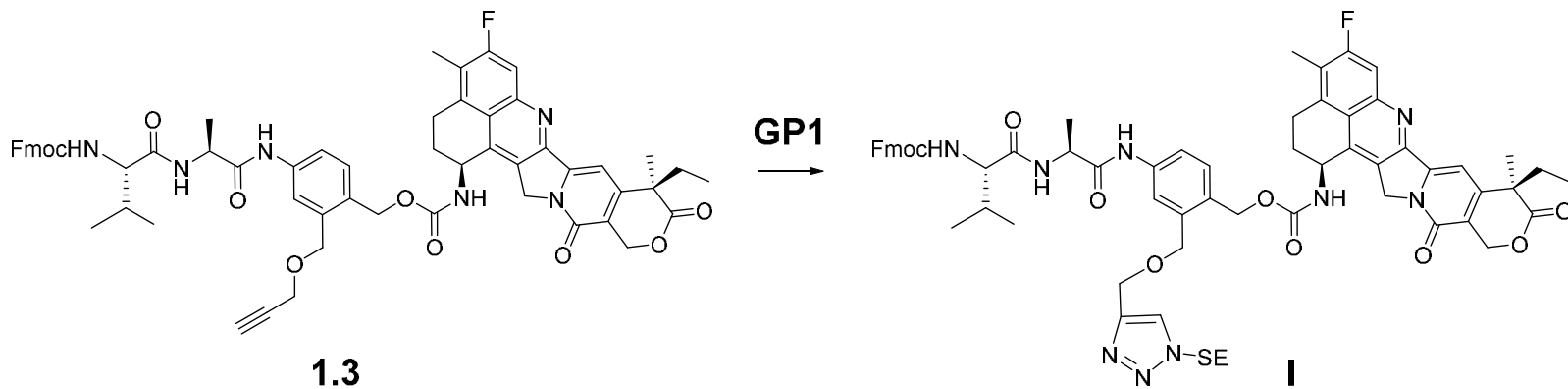
A una solución de **Z-I-Glu(NHDG)-NHDG** (924,9 mg, 1,5 mmol) en metanol (180 ml) se añadió Pd/C (10 %, 161 mg) bajo argón. La atmósfera se cambió de argón a hidrógeno, y la suspensión resultante se agitó durante 3,5 h a temperatura ambiente. El catalizador se eliminó por filtración a través de Celite y el disolvente del filtrado resultante se eliminó *in vacuo* obteniéndose H-I-Glu(NHDG)-NHDG (728,7 mg, 1,5 mmol, cuant.). A continuación, se disolvió H-I-Glu(NHDG)-NHDG (100,0 mg, 211,2  $\mu$ mol, 1,5 equiv.) en DMF (abs., 2 ml) y se añadió a una solución de éster de azido-PEG4-NHS (CAS-Nr. 944251-24-5, 54,68 mg, 140,8  $\mu$ mol, 1 equiv.) bajo una atmósfera de argón. Se añadió DIPEA (73,57  $\mu$ l, 422,4  $\mu$ mol, 3 equiv.) y la solución resultante se agitó durante 1,5 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó *al vacío* y la purificación por RP-HPLC proporcionó el **intermedio 6.3** (82,74 mg, 79 %).  $C_{28}H_{54}N_6O_{17}$ . HPLC (método A):  $t_R$  = 5,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 747,2  $[M+H]^+$ , m/z calculado= 747,4  $[M+H]^+$

#### Síntesis del intermedio 6.4

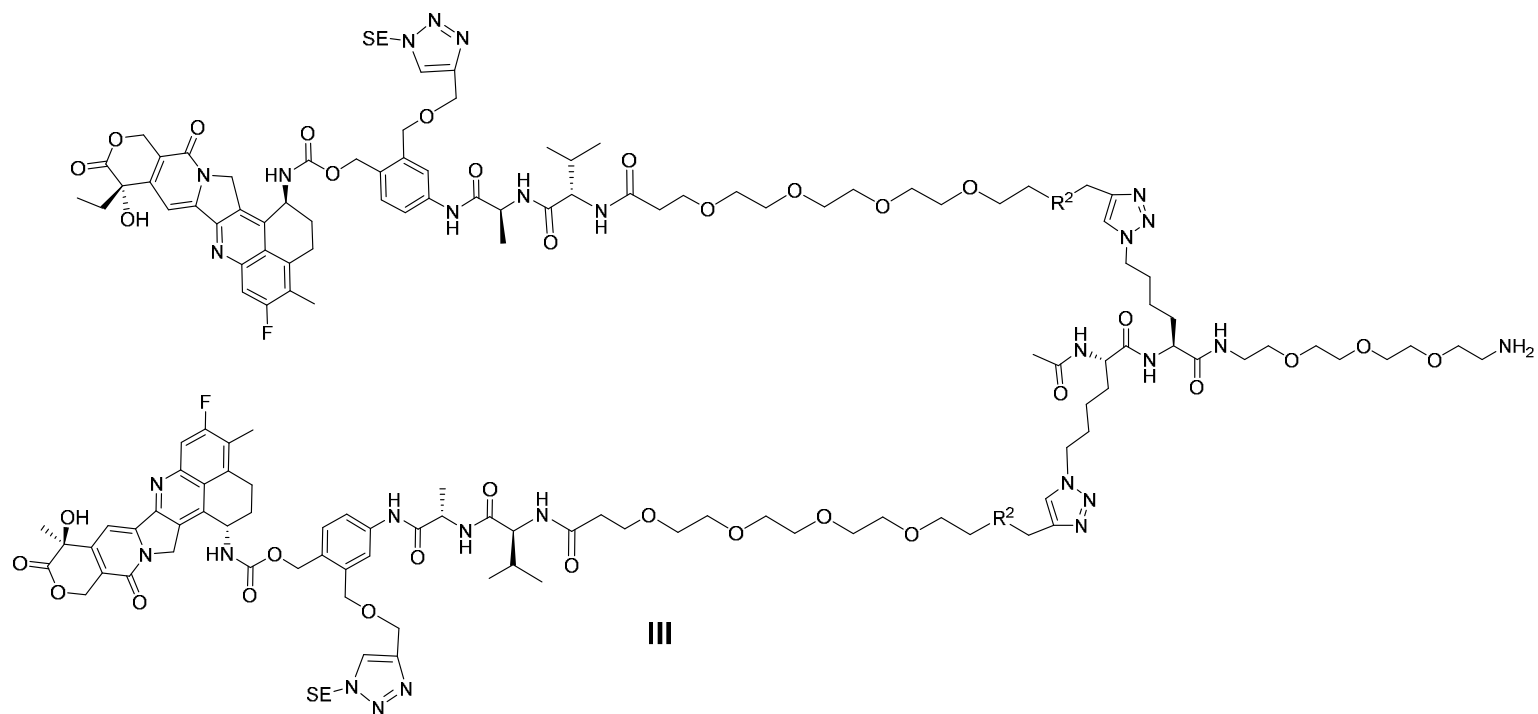


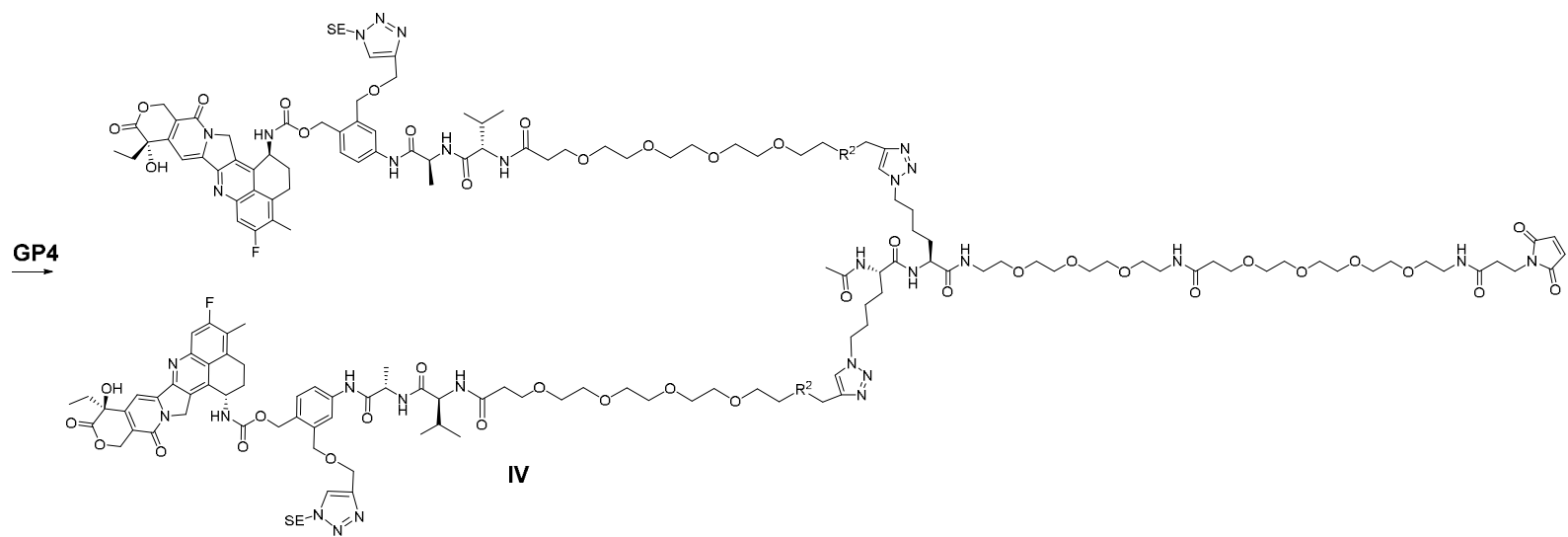
El intermedio 6.4 (91,9 mg, 71 %) se sintetizó como se ha descrito para el intermedio 6.3 pero utilizando éster de azido-PEG8-NHS (CAS-Nr. 1204834-00-3) en lugar de éster de azido-PEG4-NHS.  $C_{36}H_{70}N_6O_{21}$ . HPLC (método A):  $t_R$  = 6,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 923,6  $[M+H]^+$ , m/z calculado= 923,5  $[M+H]^+$

### **Ejemplo 2 - Síntesis de exatecanos enlazadores multiméricos**



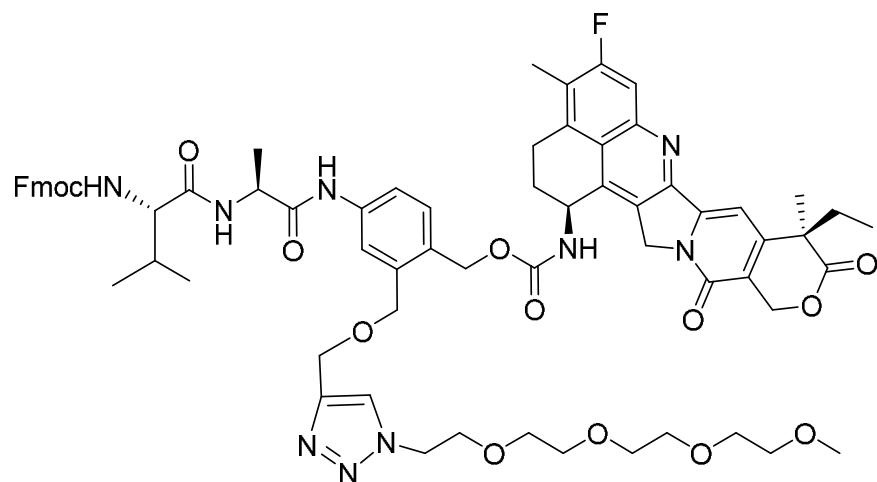
GP2  
→





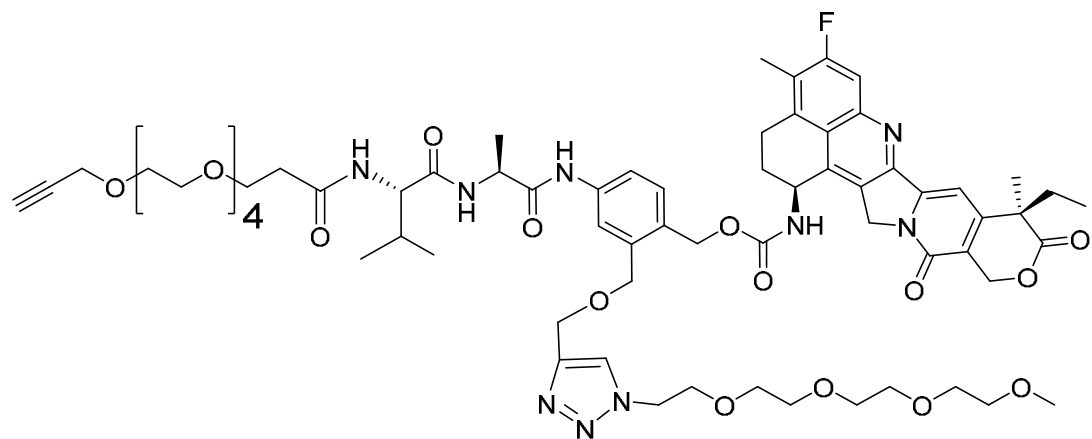
### Ejemplo 3 - Síntesis del compuesto IV.1

#### **Síntesis de I.1**



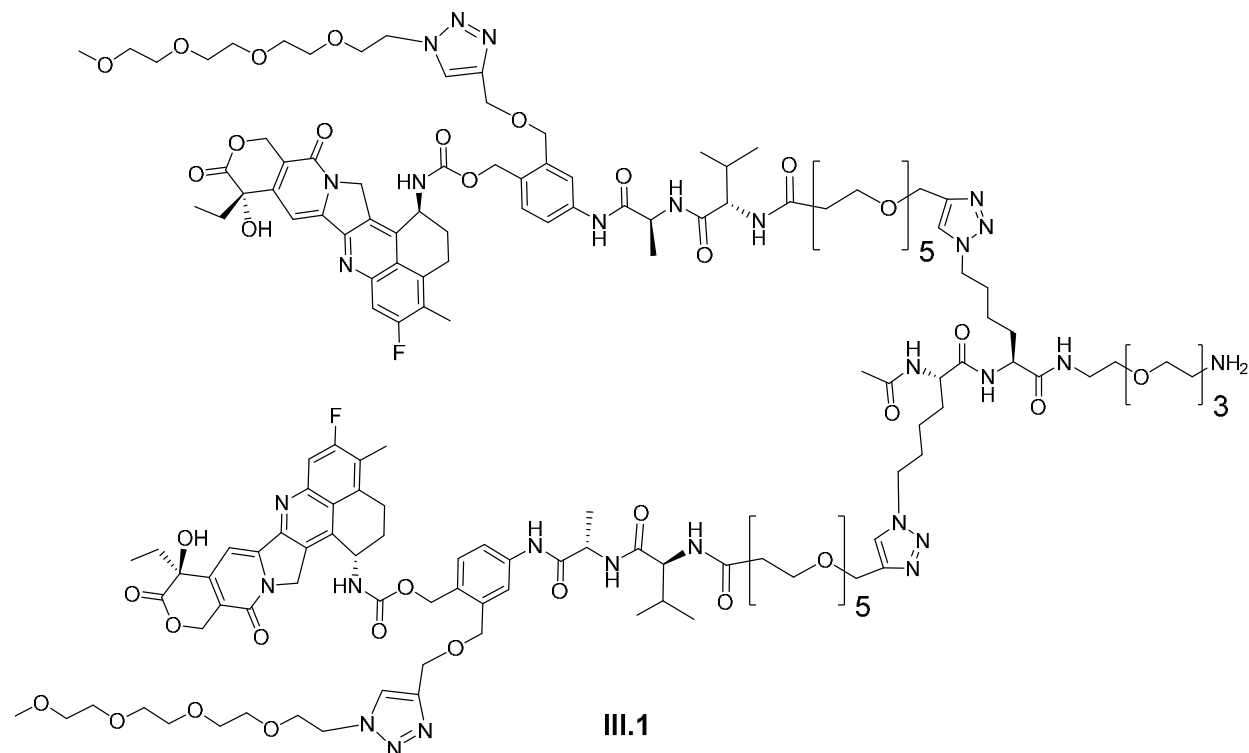
El intermedio **I.1** se sintetizó según el GP1 utilizando m-PEG(4)-azida (40,4 mg, 173  $\mu\text{mol}$ , 1,2 equiv.), intermedio **1.3** (150 mg, 144  $\mu\text{mol}$ , 1,0 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (3,6 mg, 14,4  $\mu\text{mol}$ , 0,1 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (9,6 mg, 18  $\mu\text{mol}$ , 0,125 equiv.) y ascorbato sódico (7,1 mg, 36  $\mu\text{mol}$ , 0,25 equiv.) en DMF/agua (1,65 ml, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **I.1** (137 mg, 74 %) como un sólido amarillento. HPLC (método D):  $t_R$  = 11,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1278,5  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , m/z calculado= 1278,5  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### Síntesis de II.1



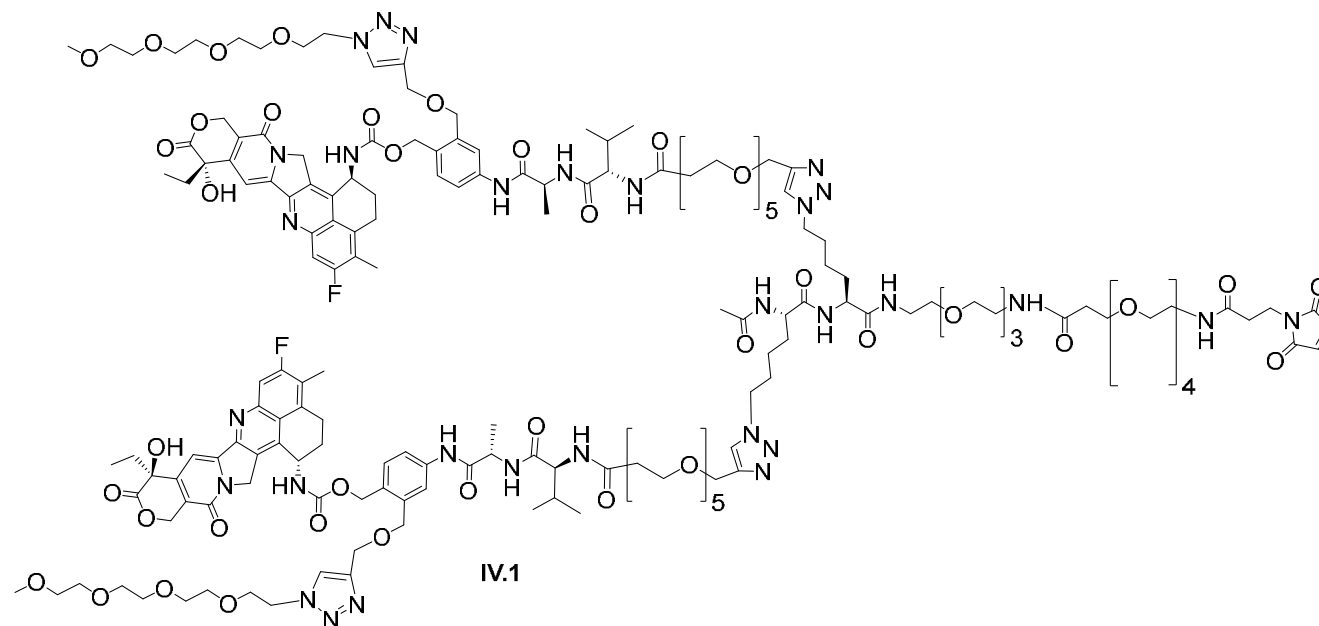
El intermedio **II.1** se sintetizó según el GP3 usando 222  $\mu$ l de dietilamina (2,14 mmol, 20 equiv.) en 1,37 ml de DMF para la desprotección con Fmoc y el intermedio **I.1** (137 mg, 107  $\mu$ mol, 1 equiv.), el **intermedio 3.1** (53,0 mg, 118  $\mu$ mol, 1,1 equiv.), diisopropiletilamina (56  $\mu$ l, 321  $\mu$ mol, 3 equiv.) en DMF (1 ml) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **II.1** (101 mg, 70 %) como un sólido amarillento. HPLC (método A):  $t_R$  = 11,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1342,5  $[M+H]^+$ , m/z calculado= 1342,6  $[M+H]^+$

### Síntesis de III.1



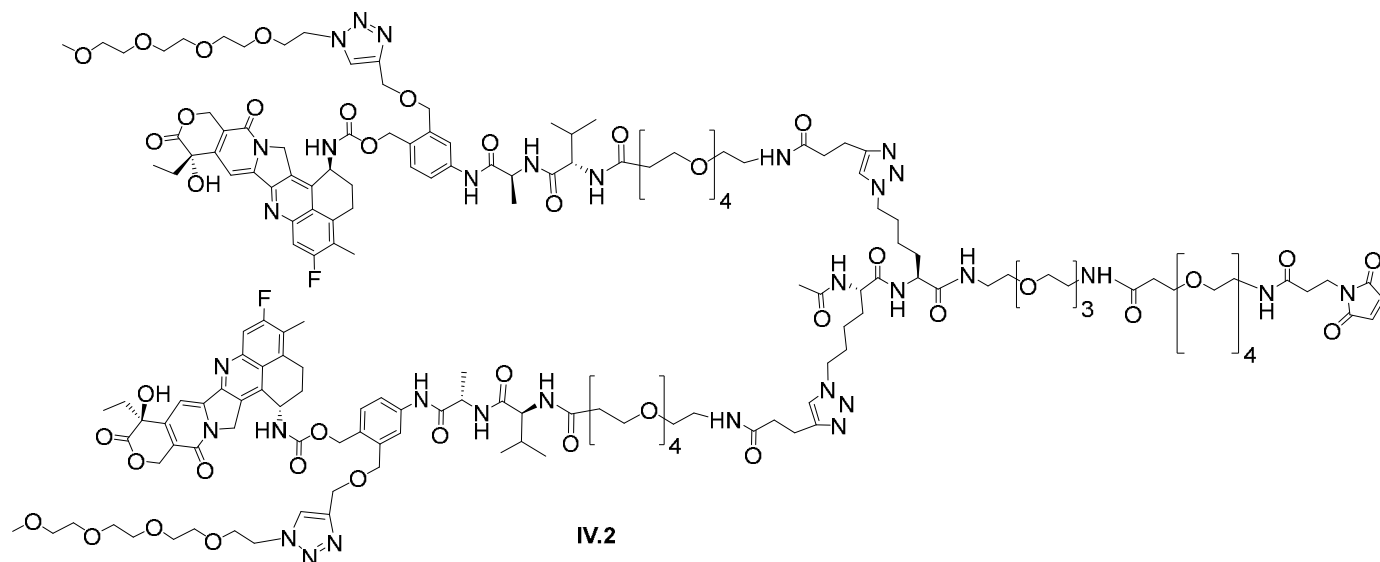
El intermedio **III.1** se sintetizó según el GP2 utilizando el **intermedio 2.1** (3,3 mg, 5,0  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), el intermedio **II.1** (17,3 mg, 12,9  $\mu\text{mol}$ , 2,5 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,6 mg, 6,5  $\mu\text{mol}$ , 1,25 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltiazolilmetil)amina (5,6 mg, 12,9  $\mu\text{mol}$ , 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (4,2 mg, 21,4  $\mu\text{mol}$ , 4,3 equiv.) en DMF/agua (0,55 ml, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **III.1** (22,4 mg, cuant.) como un sólido amarillento. HPLC (método J):  $t_R$  = 15,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1614,17  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , m/z calculado= 1613,8  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

### Síntesis de IV.1



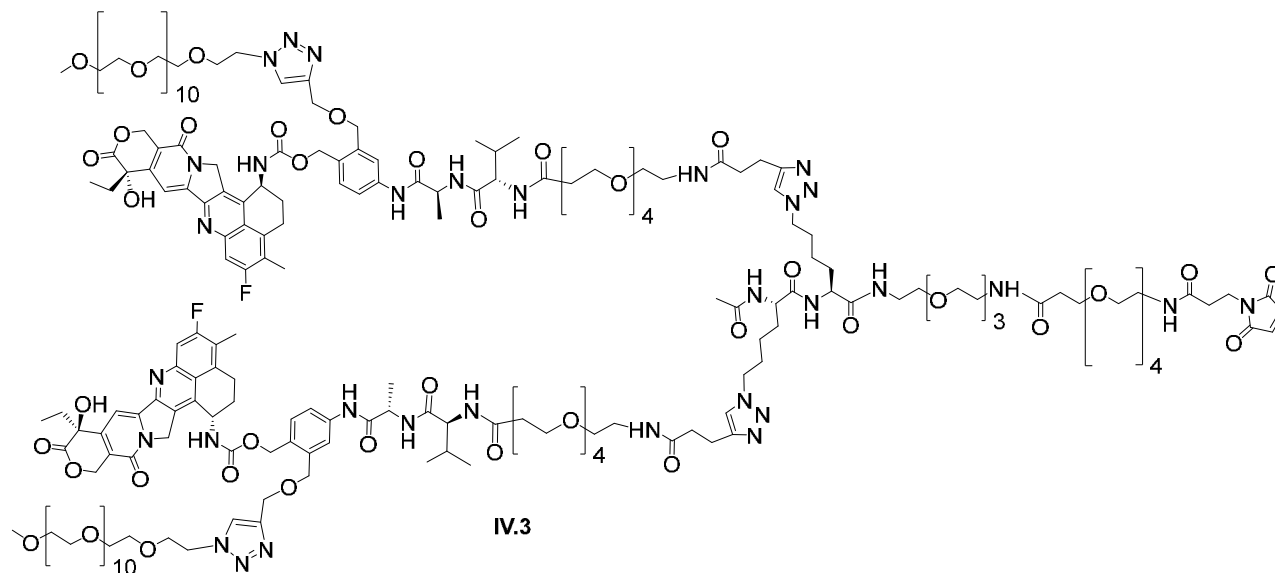
El compuesto **IV.1** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA del intermedio **III.1** (16,3 mg, 4,9  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), *N*-[15-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-il]-2,5-dihidro-2,5-dioxo-1*H*-pirrol-1-propanamida = Mal-PEG4-NHS-éster (10,8 mg, 21,0  $\mu\text{mol}$ , 4,3 equiv.) y DIPEA (3,3  $\mu\text{L}$ , 19,0  $\mu\text{mol}$ , 3,9 equiv.) en DMF (652  $\mu\text{L}$ ). La purificación por RP-HPLC proporcionó el compuesto **IV.1** (7,4 mg, 42 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{174}\text{H}_{244}\text{F}_2\text{N}_{30}\text{O}_{52}$ . HPLC (método J):  $t_R = 16,7$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1209,6  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ,  $m/z$  calculado= 1208,9  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$

#### **Ejemplo 4 - Síntesis del compuesto IV.2**



El compuesto IV.2 se sintetizó como se describió para el compuesto IV.1 pero utilizando el **intermedio 3.2**. El compuesto **IV.2** (30,76 mg) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{178}H_{250}F_2N_{32}O_{52}$ . HPLC (método J):  $t_R = 16,4$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1236,8  $[M+3H]^{3+}$ ,  $m/z$  calculado= 1236,3  $[M+3H]^{3+}$

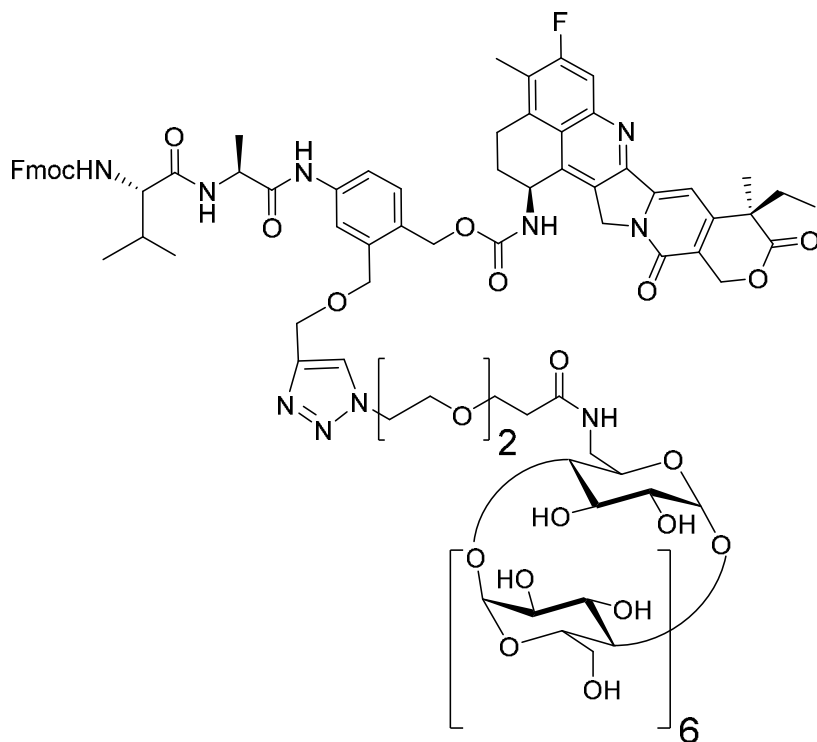
**Ejemplo 5 - Síntesis del compuesto IV.3**



El compuesto **IV.3** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.1** pero utilizando m-PEG(12)-azida en lugar de m-PEG(4)-azida y el **intermedio 3.2** en lugar del intermedio **3.1**. El compuesto **IV.3** (5,07 mg) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{210}H_{314}F_2N_{32}O_{68}$ . HPLC (método J):  $t_R = 16,4$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1471,7  $[M+3H]^{3+}$ ,  $m/z$  calculado= 1471,1  $[M+3H]^{3+}$

### Ejemplo 6 - Síntesis del compuesto IV.4

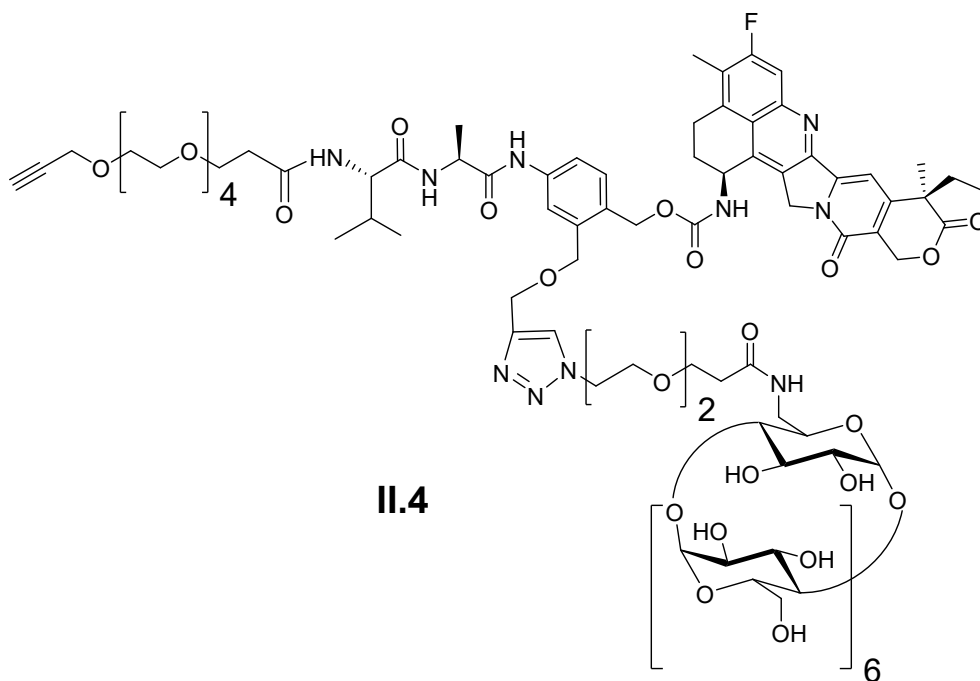
Síntesis de **I.4**



## **I.4**

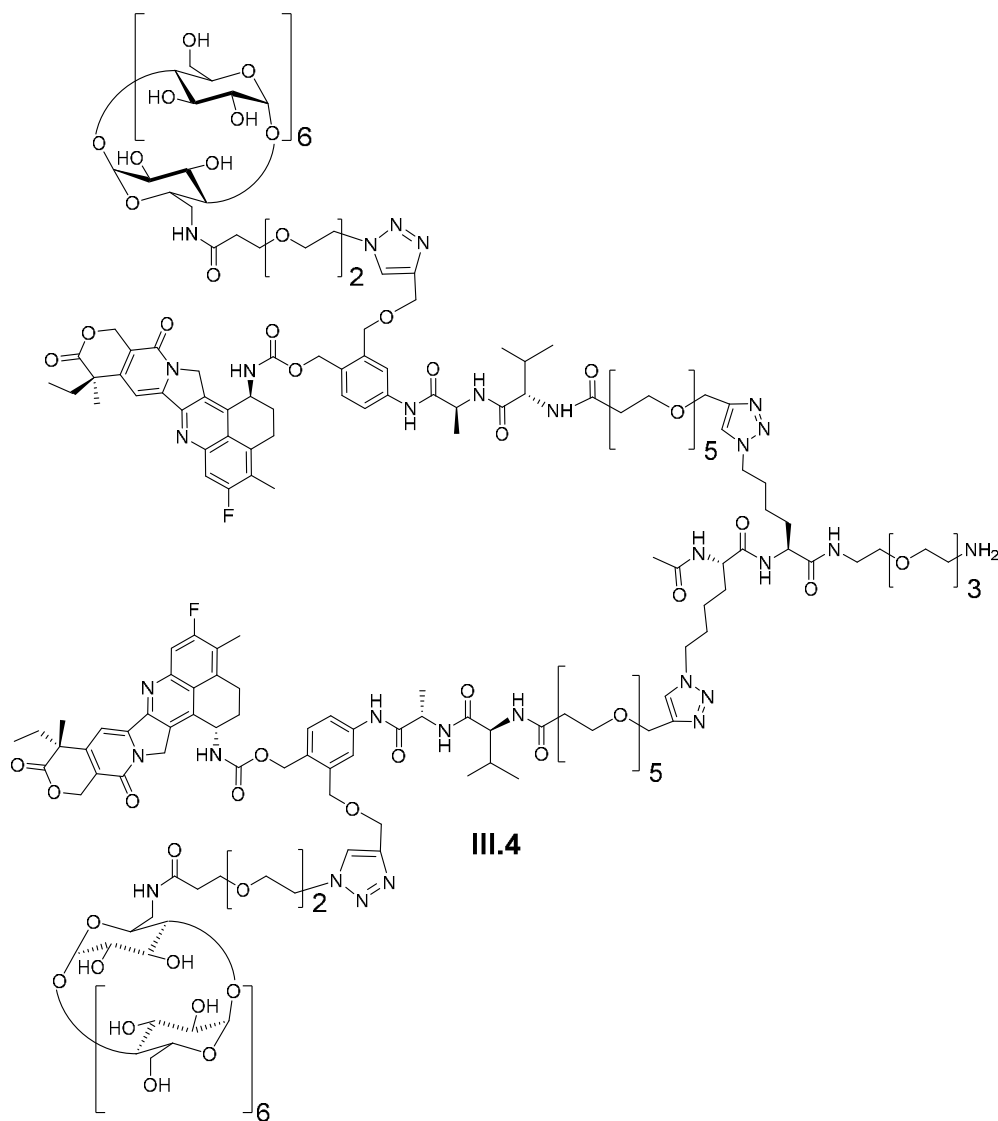
El intermedio **I.4** se sintetizó según el GP1 utilizando el intermedio **4.1** (22,4  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), el intermedio **1.3** (26,16 mg, 25,0  $\mu\text{mol}$ , 1,1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,23 mg, 4,9  $\mu\text{mol}$ , 0,2 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (3,17 mg, 6,0  $\mu\text{mol}$ , 0,26 equiv.) y ascorbato sódico (4,33 mg, 11,9  $\mu\text{mol}$ , 0,5 equiv.) en DMF/agua (0,28 ml, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **I.4** (31,51 mg, 60 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{108}\text{H}_{139}\text{FN}_{10}\text{O}_{48}$ . HPLC (método D):  $t_R = 10,7$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1182,5  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ,  $m/z$  calculado= 1182,4  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

#### Síntesis de II.4



El intermedio **II.4** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermedio **I.4** (31,51 mg, 13,3  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), 33  $\mu\text{L}$  de dietilamina (319,9  $\mu\text{mol}$ , 24 equiv.) en 1,6 ml de DMF para la desprotección por Fmoc y el **intermedio 3.1** (8,98 mg, 20,0  $\mu\text{mol}$ , 1,5 equiv.), diisopropiletilamina (6,8  $\mu\text{L}$ , 40,0  $\mu\text{mol}$ , 3 equiv.) en DMF (2,1 ml) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **II.4** (15,51 mg, 50 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{107}\text{H}_{151}\text{FN}_{10}\text{O}_{52}$ . HPLC (método D):  $t_R = 9,1$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1214,5  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ,  $m/z$  calculado= 1214,5  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

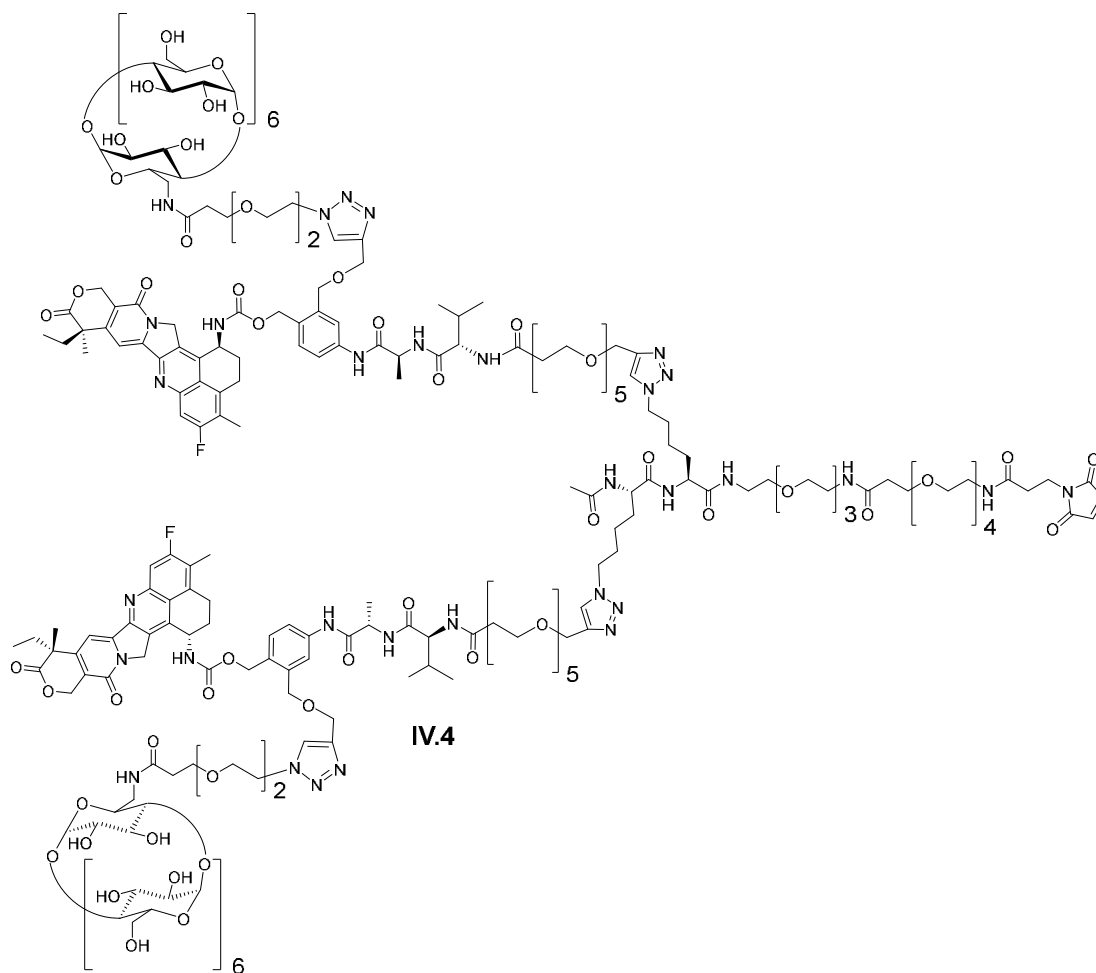
### Síntesis de III.4



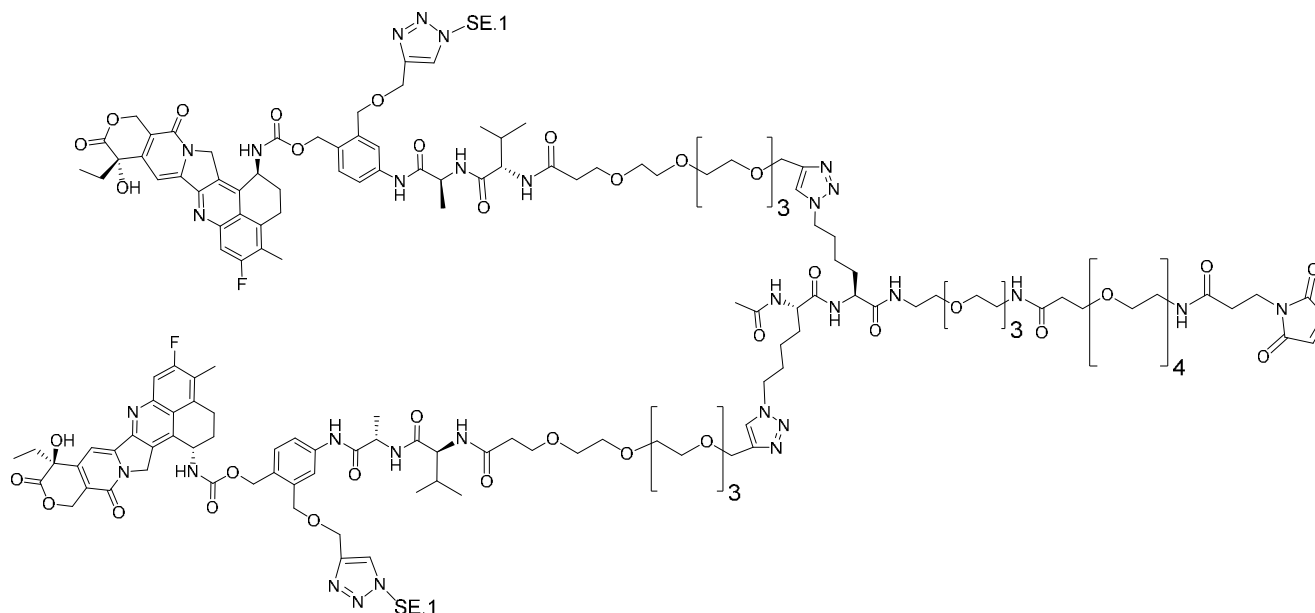
El intermedio **III.4** se sintetizó según el GP2 utilizando el **intermedio 2.1** (1,54 mg, 2,6  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), el intermedio **II.4** (15,51 mg, 6,4  $\mu\text{mol}$ , 2,5 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (0,87 mg, 3,5  $\mu\text{mol}$ , 1,3 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltiazolilmetil)amina (2,83 mg, 6,5  $\mu\text{mol}$ , 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (1,97 mg, 9,9  $\mu\text{mol}$ , 3,8 equiv.) en DMF/agua (0,12 ml, 5:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **III.4** (9,61 mg, 70 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{236}\text{H}_{344}\text{F}_2\text{N}_{30}\text{O}_{110}$ . HPLC (método E):  $t_R = 9,2$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1800,6  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ,  $m/z$  calculado= 1799,7  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$

## Síntesis de IV.4

El compuesto **IV.4** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA del intermedio **III.4** (9,61 mg, 1,74  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), *N*-[15-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-il]-2,5-dihidro-2,5-dioxo-1*H*-pirrol-1-propanamida = Mal-PEG4-NHS-éster (1,89 mg, 3,68  $\mu\text{mol}$ , 2,1 equiv.) y DIPEA (0,59  $\mu\text{L}$ , 3,48  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.) en DMF (0,4 ml). La purificación por RP-HPLC proporcionó el compuesto **IV.4** (6,95 mg, 69 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{254}\text{H}_{370}\text{F}_2\text{N}_{32}\text{O}_{118}$ . HPLC (método J):  $t_R$  = 12,9 min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1455,1  $[\text{M}+3\text{H}+\text{Na}]^{4+}$ ,  $m/z$  calculado= 1455,7  $[\text{M}+3\text{H}+\text{Na}]^{4+}$



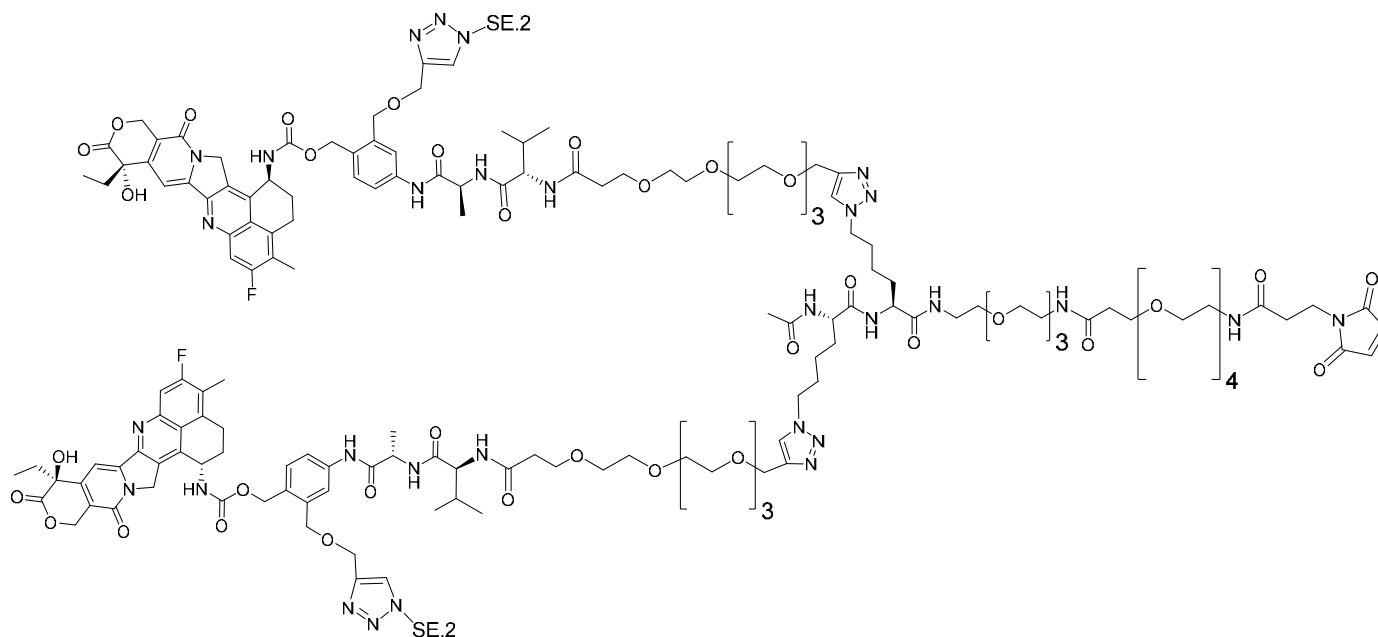
### **Ejemplo 7 - Síntesis del compuesto IV.5**



### **IV.5**

El compuesto **IV.5** se sintetizó como se ha descrito para el compuesto **IV.4** pero utilizando el **intermedio 4.2**. El compuesto **IV.5** (25,55 mg, 68 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{262}H_{386}F_2N_{32}O_{122}$ . HPLC (método J):  $t_R = 13,1$  min. MS (ESI): m/z encontrado= 1494,3  $[M+4H]^{4+}$ , m/z calculado= 1493,6  $[M+4H]^{4+}$

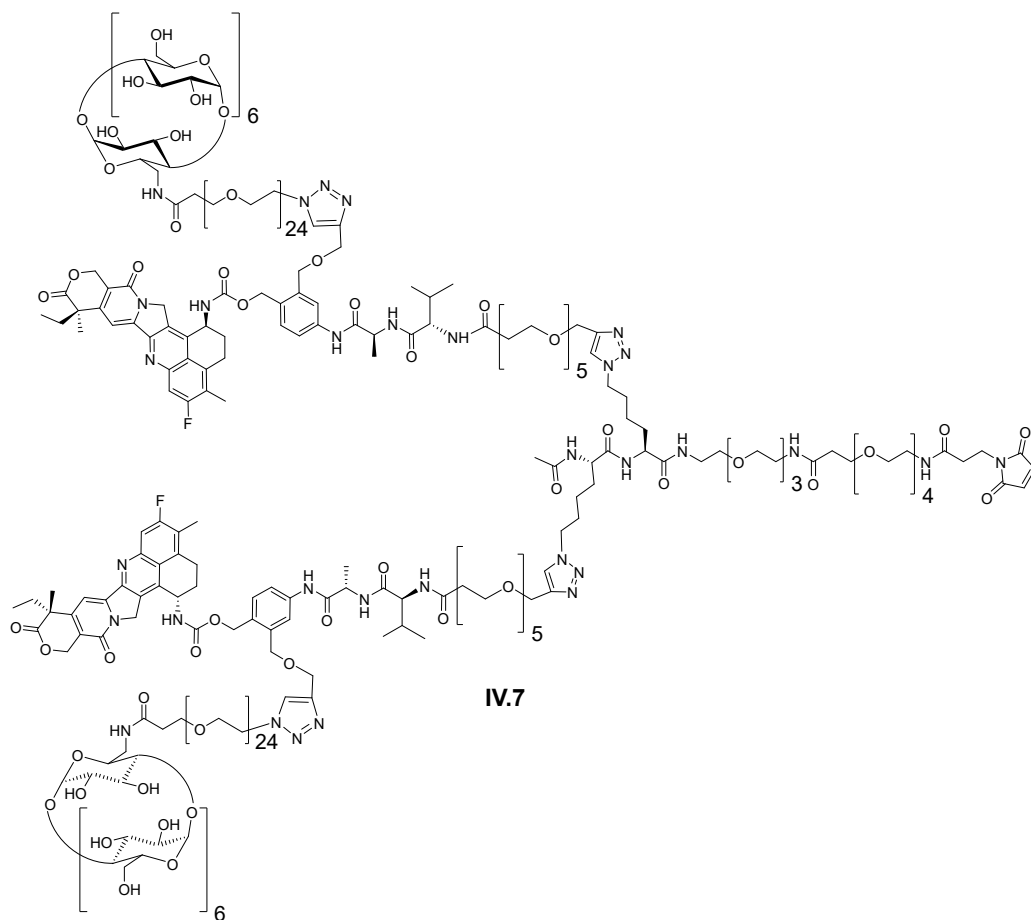
### **Ejemplo 8 - Síntesis del compuesto IV.6**



### **IV.6**

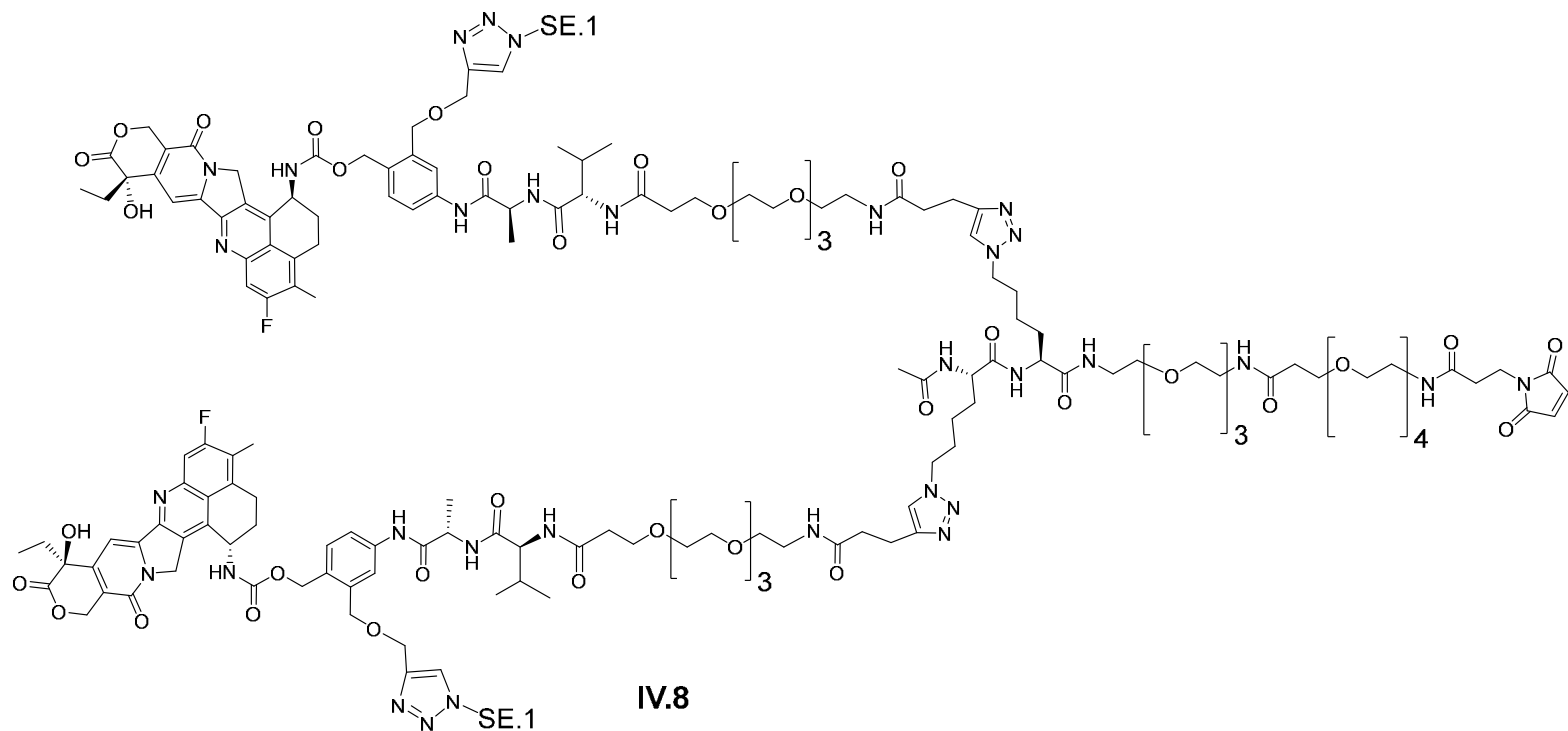
El compuesto **IV.6** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.4** pero usando el **intermedio 4.3**. El compuesto **IV.6** (6,70 mg, 83 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{278}H_{418}F_2N_{32}O_{130}$ . HPLC (método J):  $t_R = 13,3$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1582,3  $[M+4H]^{4+}$ ,  $m/z$  calculado= 1581,7  $[M+4H]^{4+}$

**Ejemplo 9 - Síntesis del compuesto IV.7**



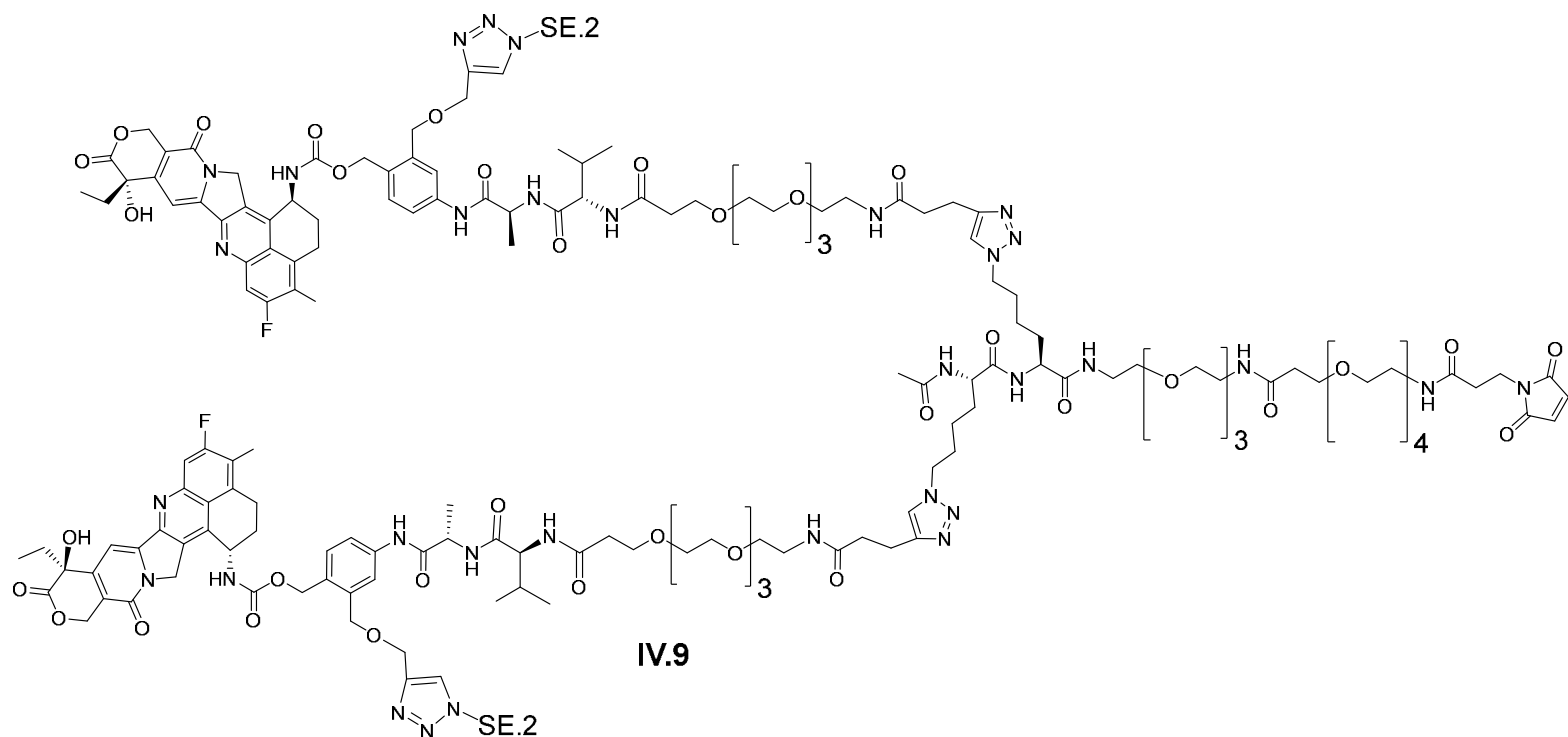
El compuesto **IV.7** se sintetizó como se ha descrito para el compuesto **IV.4** pero utilizando el **intermedio 4.4**. El compuesto **IV.7** (10,41 mg, 51 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{342}H_{546}F_2N_{32}O_{162}$ . HPLC (método J):  $t_R = 14,0$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1934,3  $[M+4H]^{4+}$ ,  $m/z$  calculado= 1933,9  $[M+4H]^{4+}$

**Ejemplo 10 - Síntesis del compuesto IV.8**



El compuesto **IV.8** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.4** pero utilizando **los intermedios 3.2 y 4.2**. El compuesto **IV.8** (19,3 mg, 35 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{266}H_{392}F_2N_{34}O_{122}$ . HPLC (método J):  $t_R = 12,9$  min. MS (ESI): m/z encontrado= 1514,6  $[M+4H]^{4+}$ , m/z calculado= 1514,1  $[M+4H]^{4+}$

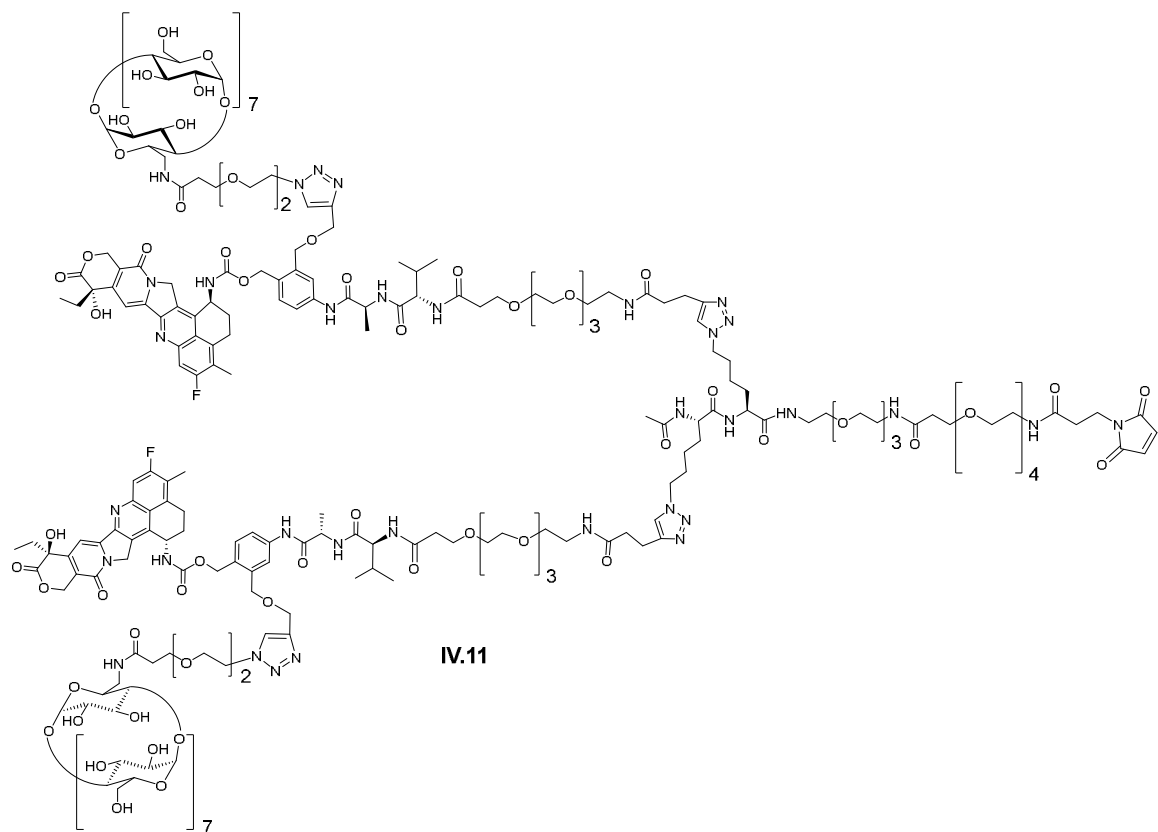
**Ejemplo 11 - Síntesis del compuesto IV.9**



El compuesto **IV.9** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.4** pero utilizando **los intermedios 3.2 y 4.3**. El compuesto **IV.9** (8,87 mg, 49 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{282}H_{424}F_2N_{34}O_{130}$ . HPLC (método J):  $t_R = 13,2$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1602,7  $[M+4H]^{4+}$ ,  $m/z$  calculado= 1602,2  $[M+4H]^{4+}$

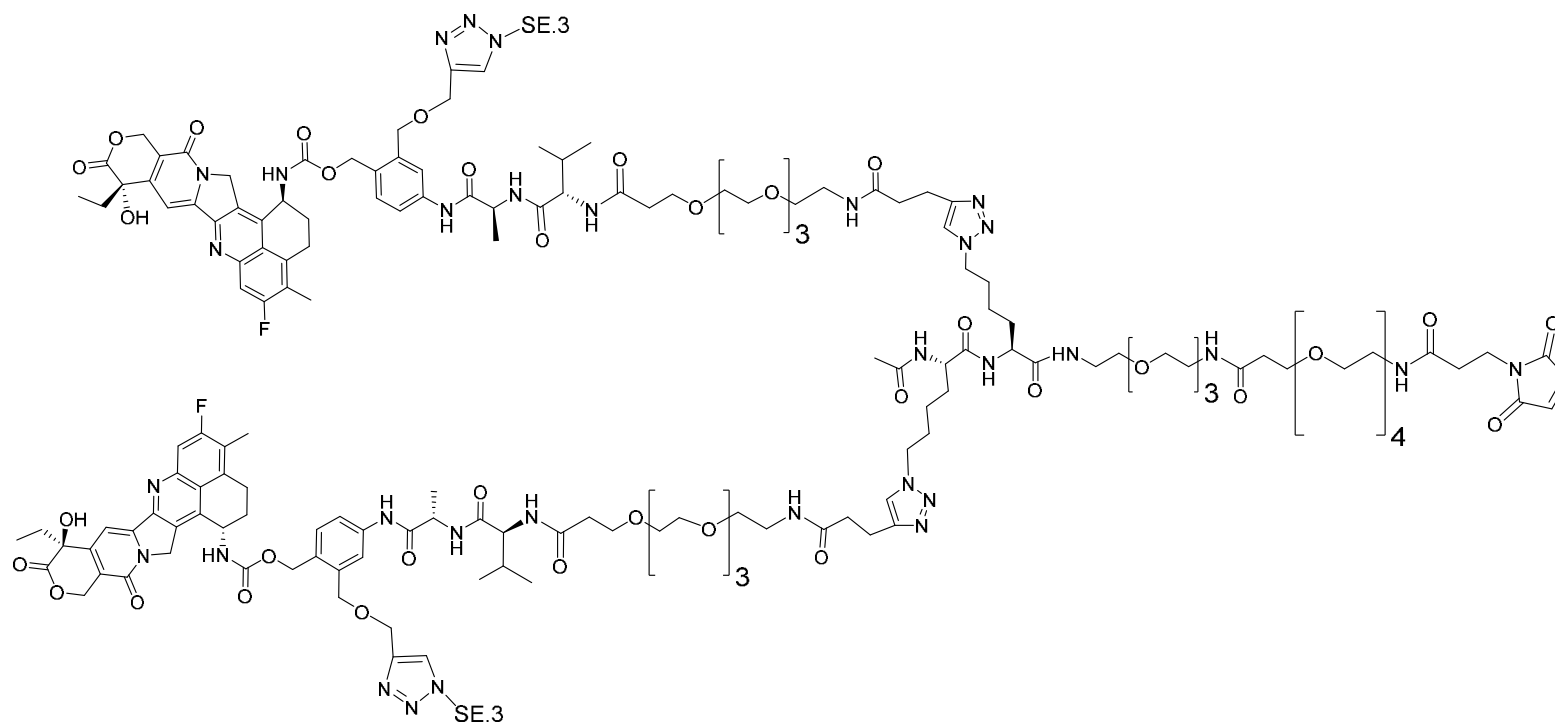
126

**Ejemplo 13 - Síntesis del compuesto IV.11**



El compuesto **IV.11** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.4** pero utilizando **los intermedios 3.2 y 4.5**. El compuesto **IV.11** (5,69 mg, 56 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{270}H_{396}F_2N_{34}O_{128}$ . HPLC (método J):  $t_R = 12,6$  min. MS (ESI): m/z encontrado= 1551,8  $[M+4H]^{4+}$ , m/z calculado= 1551,1  $[M+4H]^{4+}$

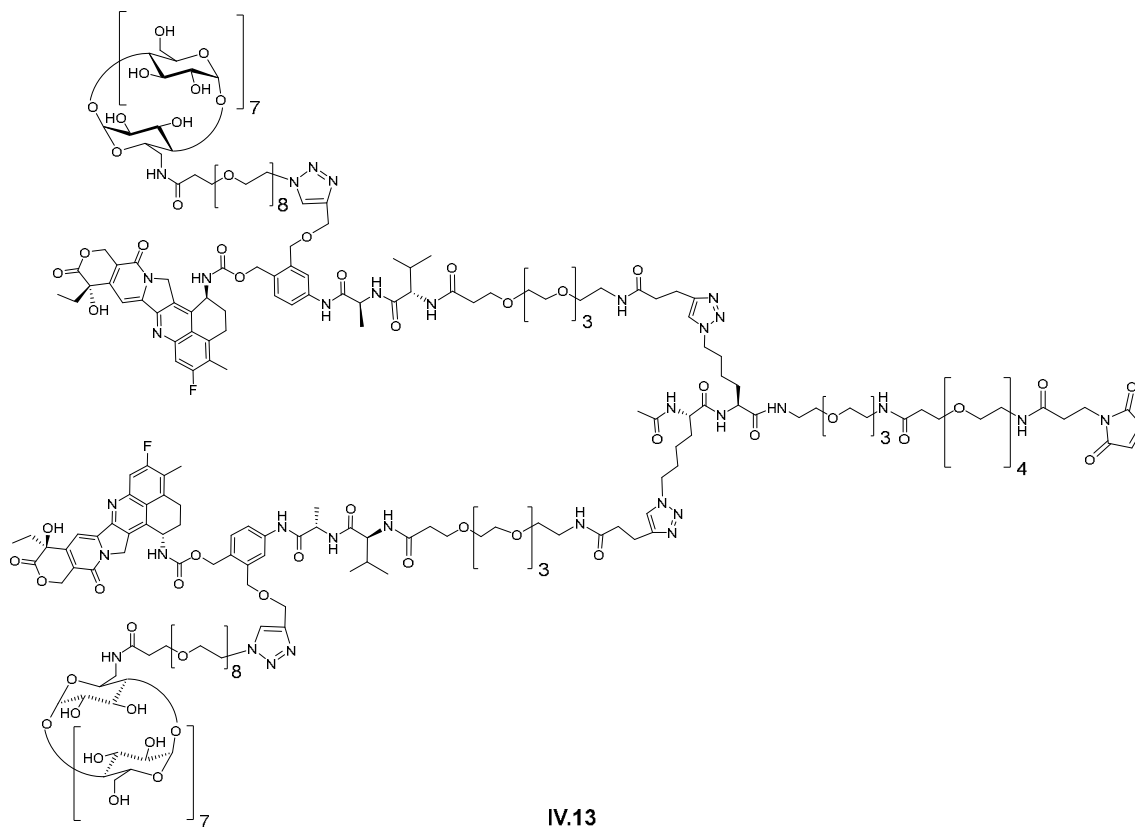
**Ejemplo 14 - Síntesis del compuesto IV.12**



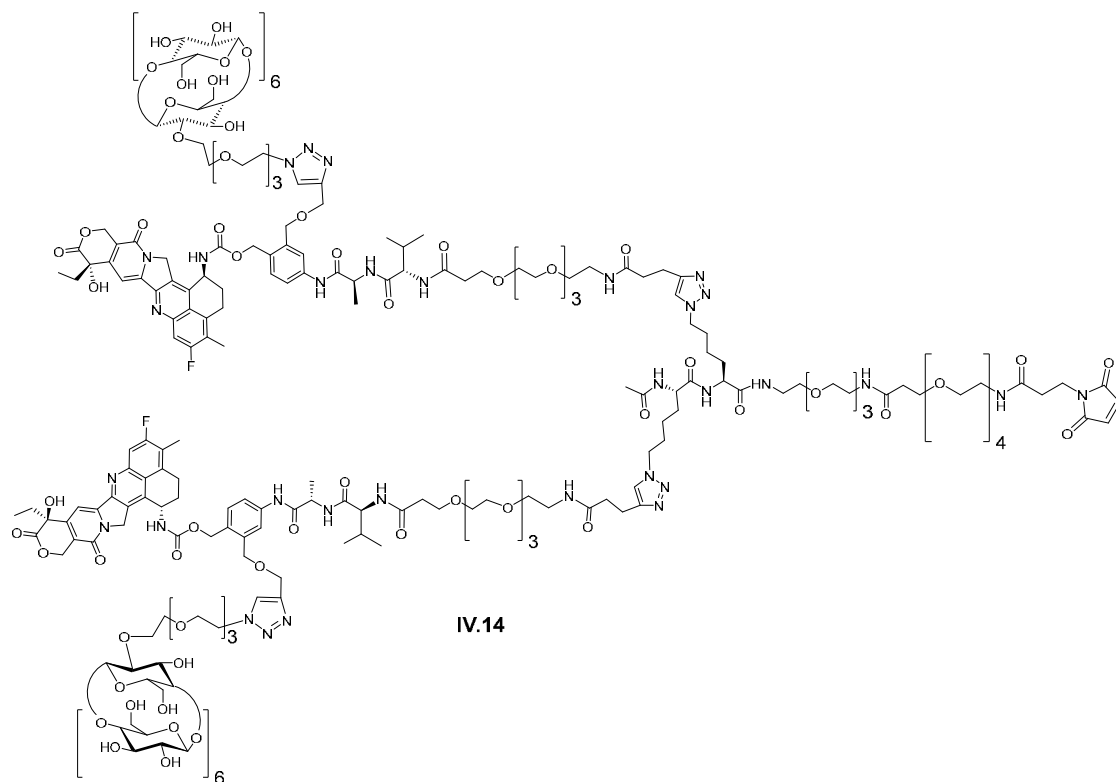
El compuesto **IV.12** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.4** pero utilizando **los intermedios 3.2 y 4.6**. El compuesto **IV.12** (43,17 mg, 59 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{278}H_{412}F_2N_{34}O_{132}$ . HPLC (método J):  $t_R = 12,4$  min. MS (ESI): m/z encontrado= 1596,8  $[M+4H]^{4+}$ , m/z calculado= 1595,67  $[M+4H]^{4+}$

### **Ejemplo 15 - Síntesis del compuesto IV.13**

El compuesto **IV.13** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.4** pero utilizando **los intermedios 3.2 y 4.7**. El compuesto **IV.13** (29,51 mg, 59 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{294}H_{444}F_2N_{34}O_{140}$ . HPLC (método J):  $t_R = 12,7$  min. MS (ESI): m/z encontrado= 1684,5  $[M+4H]^{4+}$ , m/z calculado= 1683,2  $[M+4H]^{4+}$



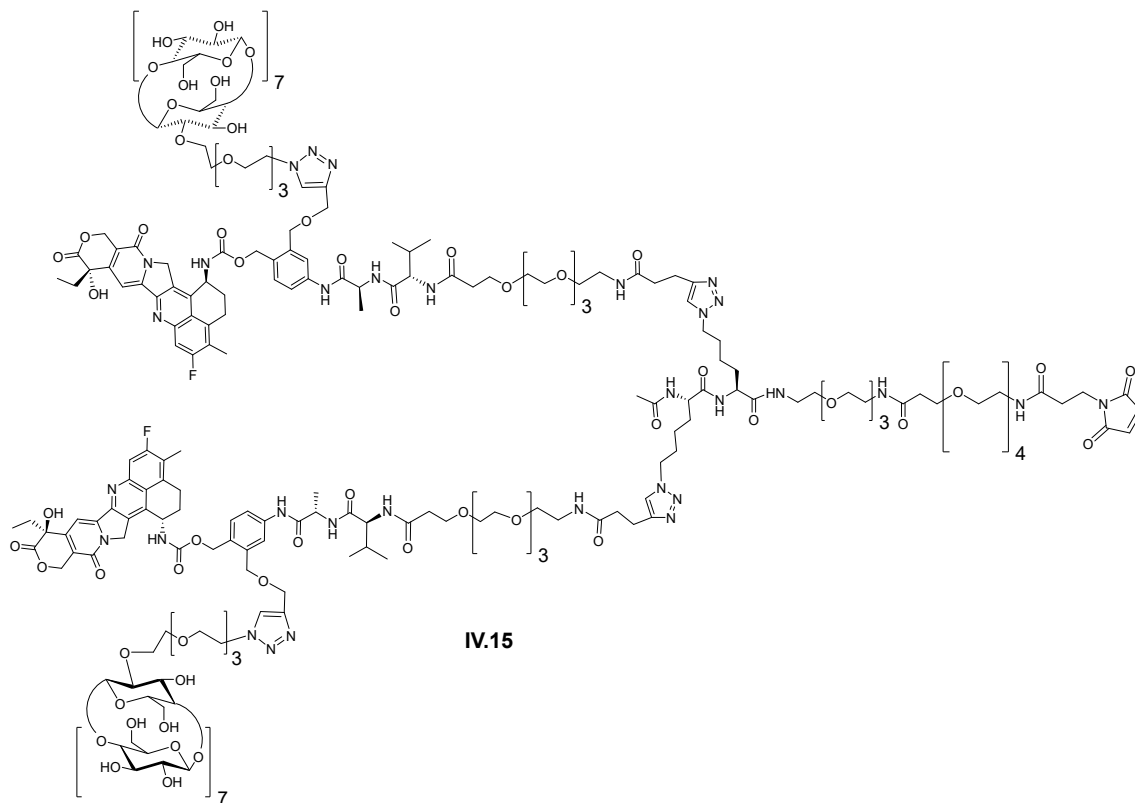
**Ejemplo 16 - Síntesis del compuesto IV.14**



El compuesto **IV.14** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.4** pero utilizando **los intermedios 3.2 y 4.8**. El compuesto **IV.14** (61,21 mg, 81 %) se obtuvo como un sólido amarillento. C<sub>260</sub>H<sub>382</sub>F<sub>2</sub>N<sub>32</sub>O<sub>120</sub>. HPLC (método J): *t*<sub>R</sub> = 12,7 min. MS (ESI): *m/z* encontrado= 1479,8 [M+4H]<sup>4+</sup>, *m/z* calculado= 1478,6 [M+4H]<sup>4+</sup>

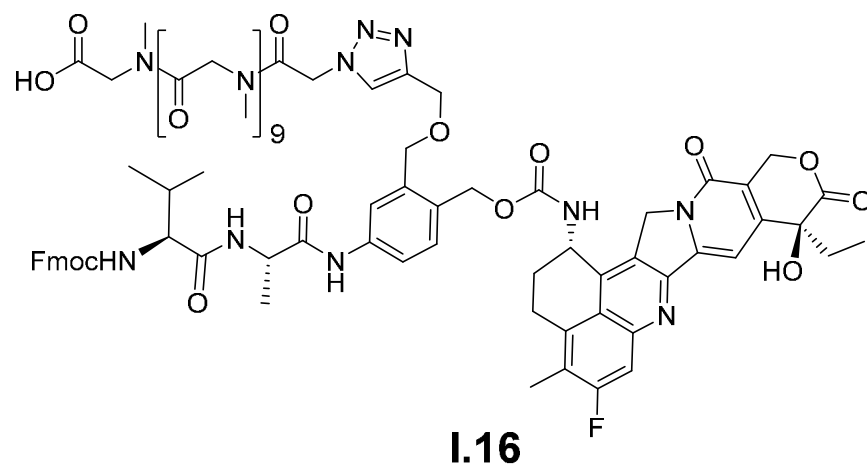
### **Ejemplo 17 - Síntesis del compuesto IV.15**

El compuesto **IV.15** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.4** pero utilizando **los intermedios 3.2 y 4.9**. El compuesto **IV.15** (29,68 mg, 68 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{272}H_{402}F_2N_{32}O_{130}$ . HPLC (método J):  $t_R = 12,5$  min. MS (ESI): m/z encontrado= 1560,1  $[M+4H]^{4+}$ , m/z calculado= 1559,7  $[M+4H]^{4+}$



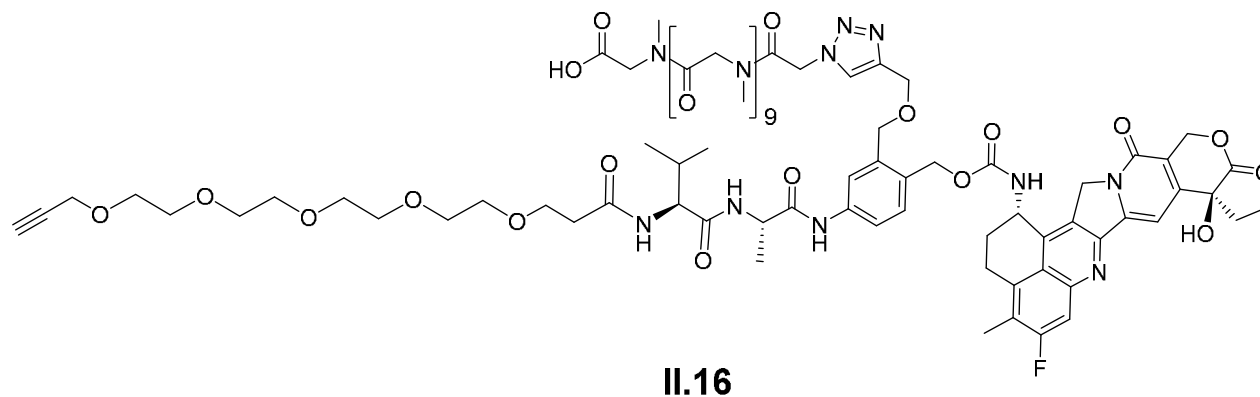
### **Ejemplo 18 - Síntesis del compuesto IV.16**

Síntesis de **I.16**



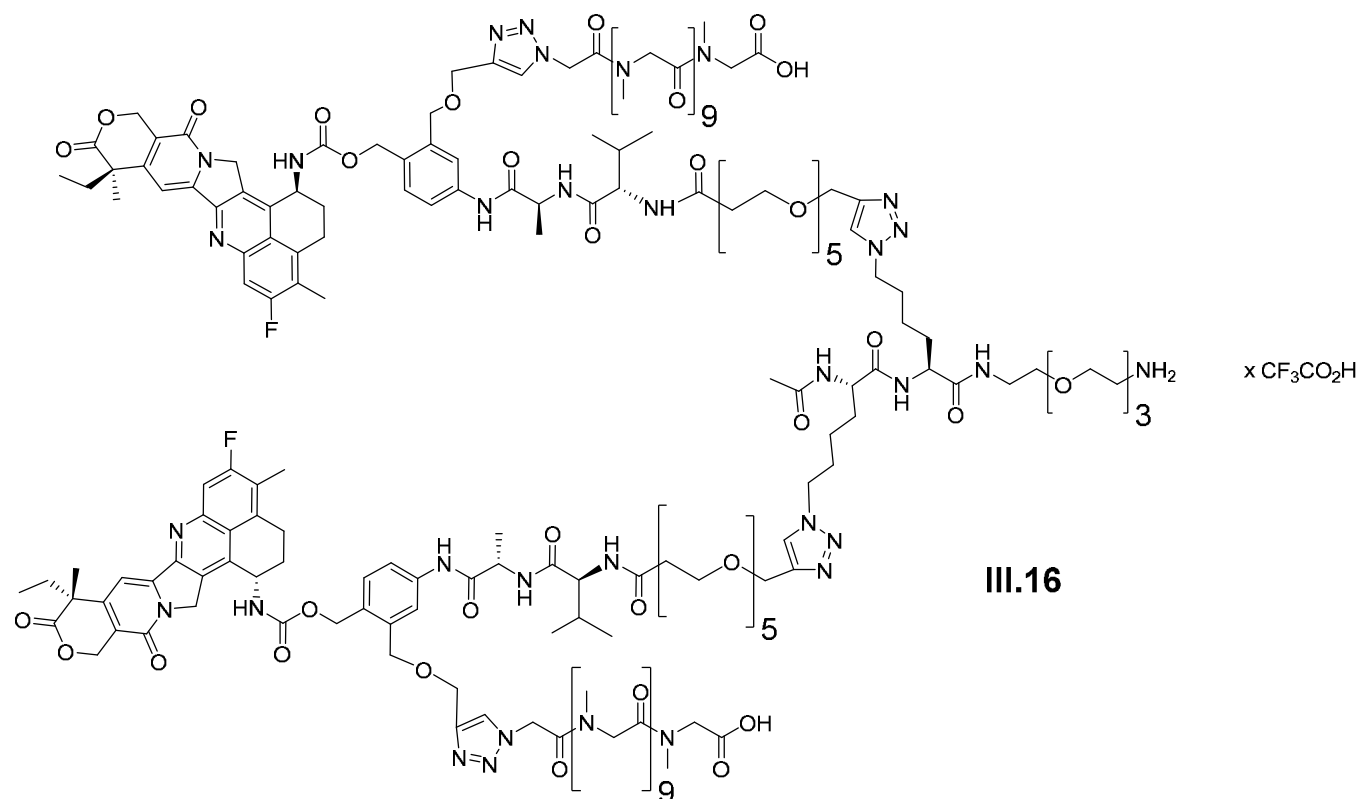
El intermedio **I.16** se sintetizó según el GP1 usando el intermedio **5.1** (30 mg, 37,0  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), el intermedio **1.3** (42,5 mg, 40,7  $\mu\text{mol}$ , 1,1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,85 mg, 7,4  $\mu\text{mol}$ , 0,2 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (4,91 mg, 9,25  $\mu\text{mol}$ , 0,25 equiv.) y ascorbato sódico (3,66 mg, 18,5  $\mu\text{mol}$ , 0,5 equiv.) en DMF/agua (0,33 ml, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **I.16** (51,7 mg, 74 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{91}\text{H}_{110}\text{FN}_{19}\text{O}_{23}$ . HPLC (método A):  $t_R = 11,1$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1855,1  $[\text{M-H}]^-$ ,  $m/z$  calculado= 1854,8  $[\text{M-H}]^-$

## Síntesis de **II.16**



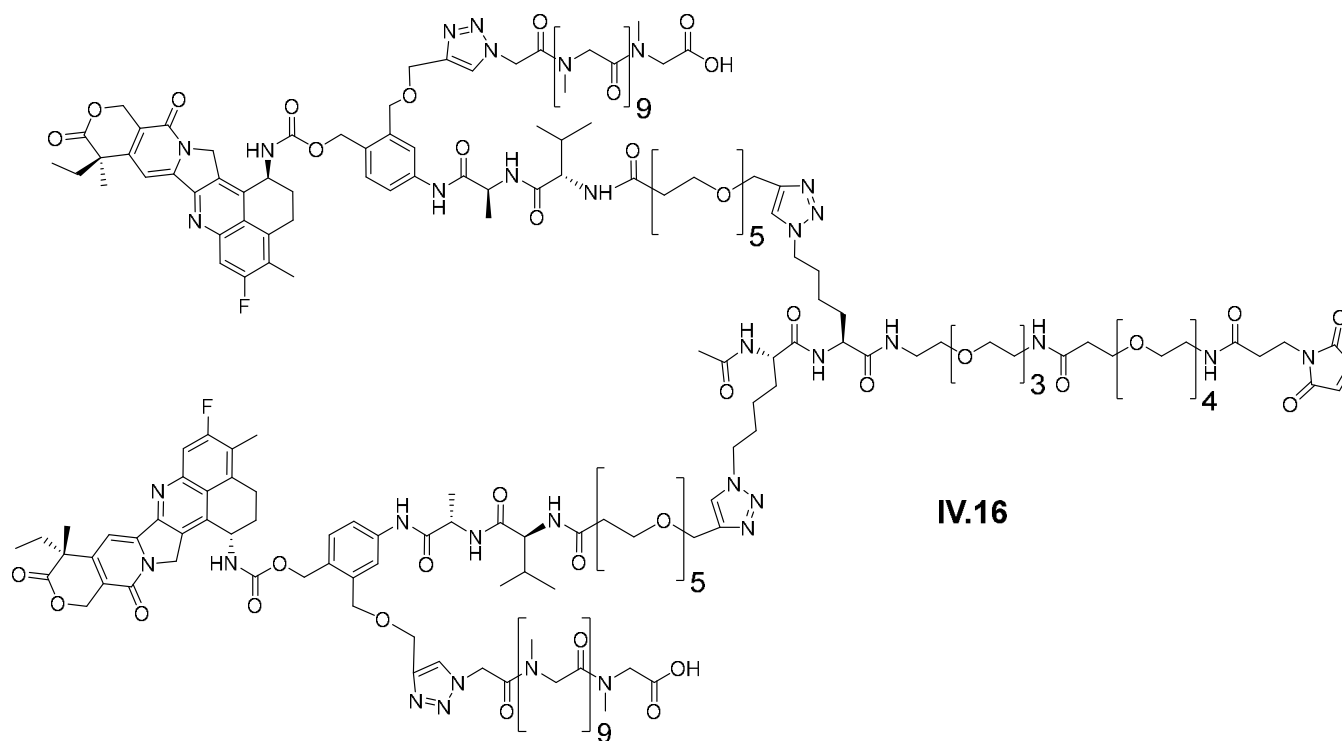
El intermedio **II.16** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermedio **I.16** (51,7 mg, 27,8  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), dietilamina (68,7  $\mu\text{L}$ , 667,0  $\mu\text{mol}$ , 24 equiv.) en 2,5 ml de DMF para la desprotección Fmoc y el **intermedio 3.1** (18,7 mg, 41,7  $\mu\text{mol}$ , 1,5 equiv.), diisopropiletilamina (14,2  $\mu\text{L}$ , 83,4  $\mu\text{mol}$ , 3 equiv.) en DMF (3,44 ml) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **II.16** (43,8 mg, 82 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{90}\text{H}_{122}\text{FN}_{19}\text{O}_{27}$ . HPLC (método A):  $t_R = 9,4$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 961,6  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ,  $m/z$  calculado= 960,9  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

### Síntesis de III.16



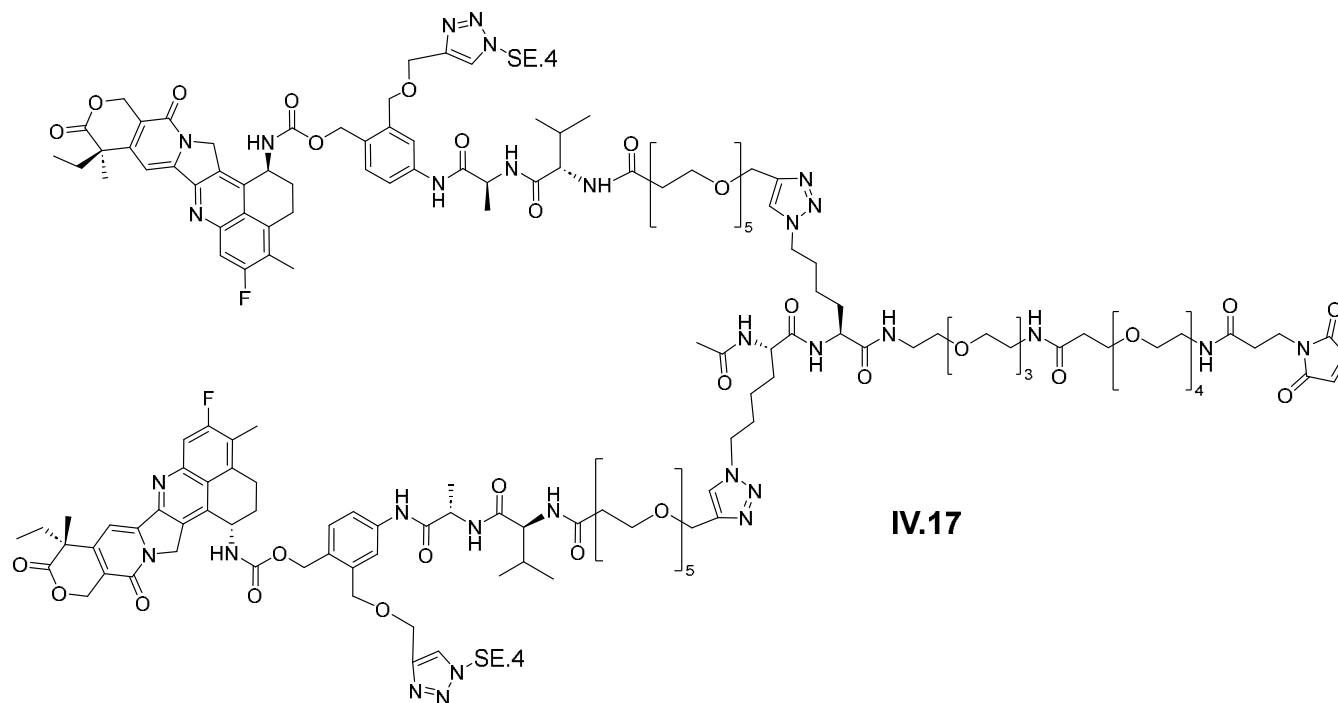
El intermedio **III.16** se sintetizó según el GP2 utilizando el **intermedio 2.1** (2,67 mg, 4,6  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), el intermedio **II.16** (20,4 mg, 10,6  $\mu\text{mol}$ , 2,3 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,44 mg, 5,8  $\mu\text{mol}$ , 1,25 equiv.), Tris(3-hidroxipropil)triazolilmetil)amina (5,02 mg, 11,6  $\mu\text{mol}$ , 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (3,43 mg, 17,3  $\mu\text{mol}$ , 3,8 equiv.) en DMF/agua (0,44 ml, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **III.16** (9,2 mg, 46 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{202}\text{H}_{286}\text{F}_2\text{N}_{48}\text{O}_{60}$ . HPLC (método L):  $t_R$  = 16,8 min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1462,5  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ,  $m/z$  calculado= 1461,7  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$

## Síntesis de IV.16



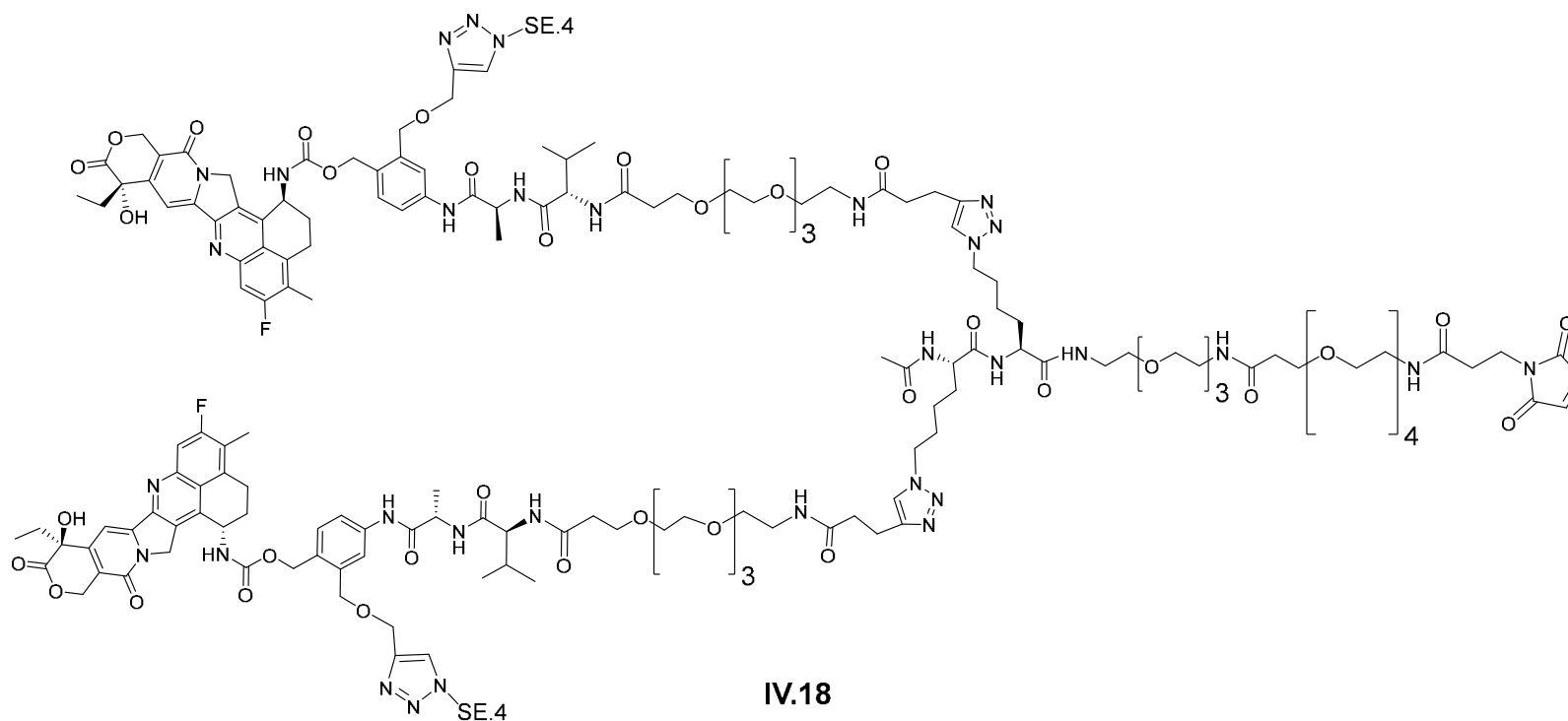
El compuesto **IV.16** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA del intermedio **III.16** (7,4 mg, 1,26  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), *N*-[15-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-il]-2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-propanamida = Mal-PEG4-NHS-éster (0,72 mg, 1,39  $\mu\text{mol}$ , 1,1 equiv.) y DIPEA (0,22  $\mu\text{L}$ , 1,26  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.) en DMF (0,3 ml). La purificación por RP-HPLC proporcionó el compuesto **IV.16** (3,85 mg, 61 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{220}\text{H}_{312}\text{F}_2\text{N}_{50}\text{O}_{68}$ . HPLC (método J):  $t_R = 14,1$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1595,3  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ,  $m/z$  calculado= 1594,4  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$

**Ejemplo 19 - Síntesis del compuesto IV.17**



El compuesto **IV.17** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.16** pero utilizando el intermedio **5.2**. El compuesto **IV.17** (23,5 mg, 75 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{220}H_{314}F_2N_{52}O_{66}$ . HPLC (método J):  $t_R = 13,8$  min. MS (ESI): m/z encontrado= 1594,2  $[M+3H]^{3+}$ , m/z calculado= 1593,8  $[M+3H]^{3+}$

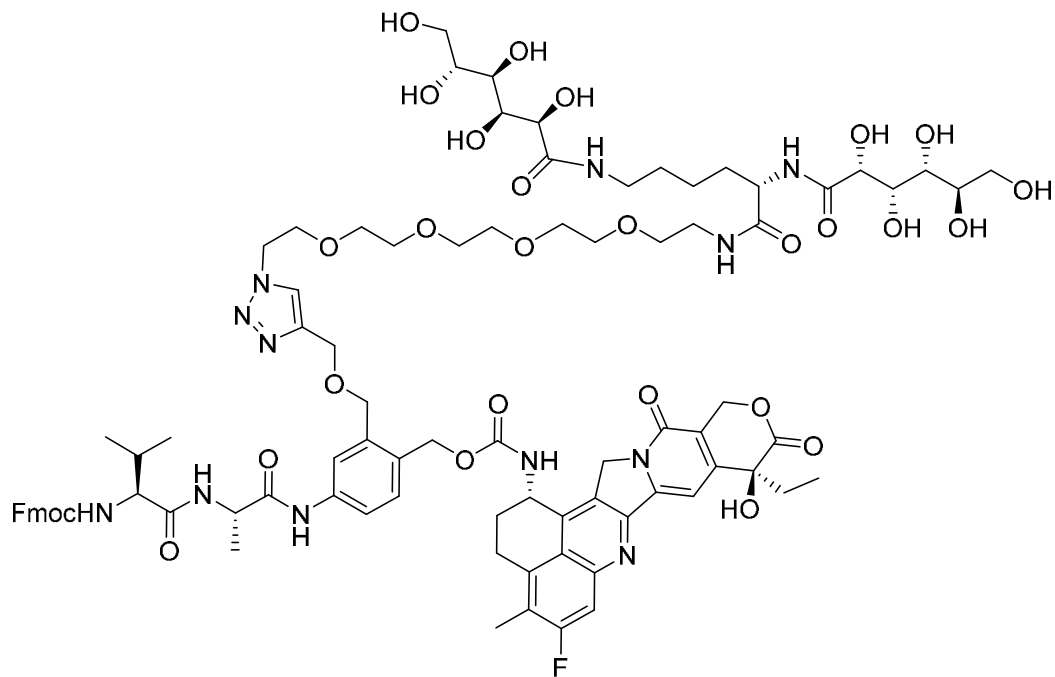
**Ejemplo 20 - Síntesis del compuesto IV.18**



El compuesto **IV.18** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.16** pero utilizando **los intermedios 3.2 y 5.2**. El compuesto **IV.18** (15,9 mg, 57 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{224}H_{320}F_2N_{54}O_{66}$ . HPLC (método J):  $t_R = 12,9$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1621,8  $[M+3H]^{3+}$ ,  $m/z$  calculado= 1621,1  $[M+3H]^{3+}$

### **Ejemplo 21 - Síntesis del compuesto IV.19**

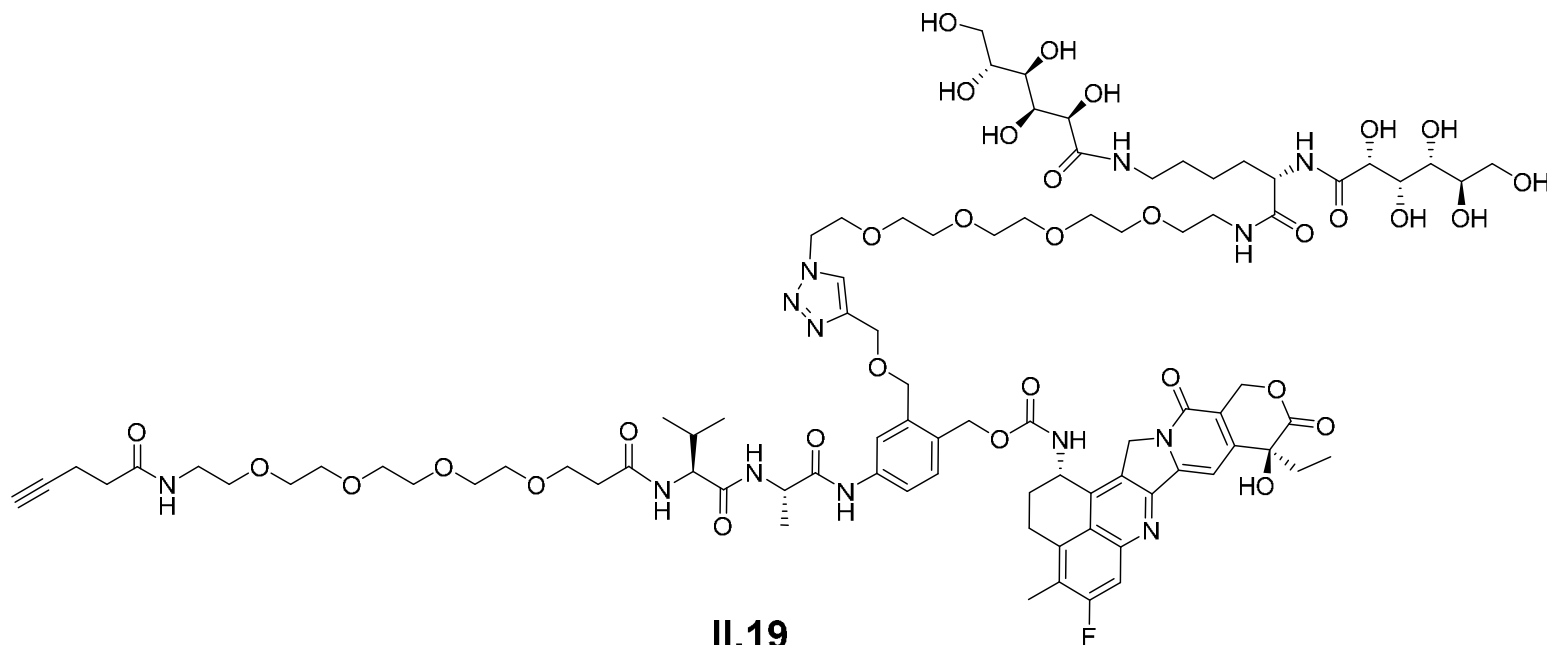
### Síntesis de I.19



## I.19

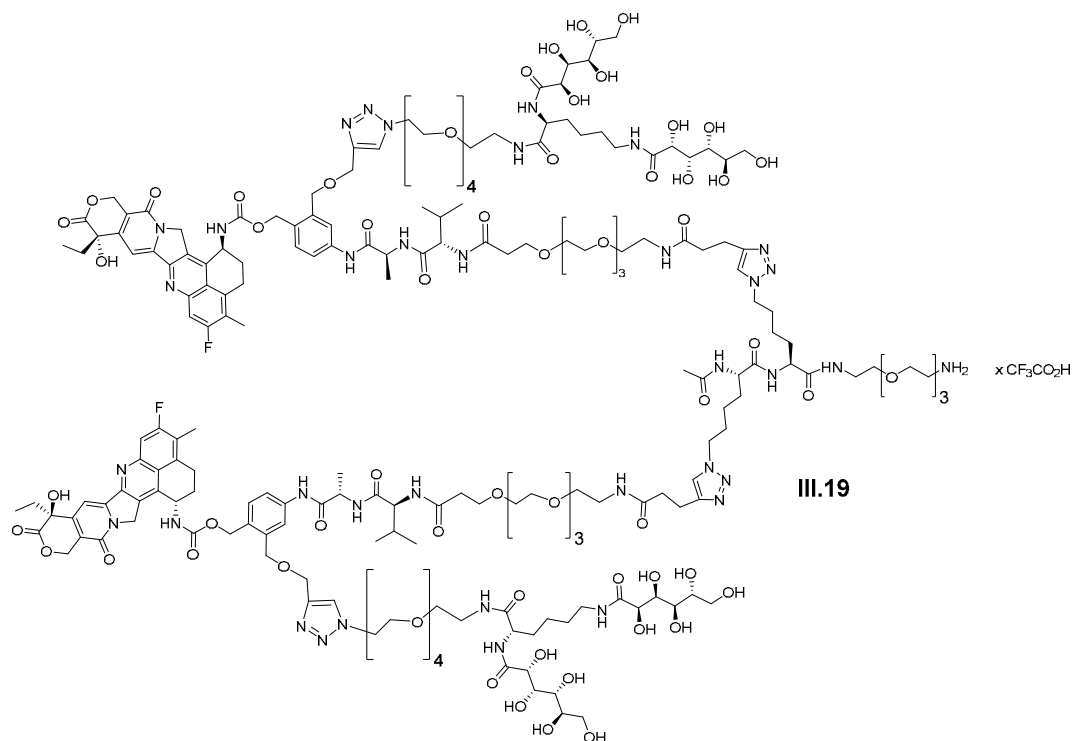
El intermedio **I.19** se sintetizó según el GP1 utilizando el intermedio **6.1** (64,31 mg, 86,11 µmol, 1 equiv.), el intermedio **1.3** (60,0 mg, 57,4 µmol, 1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (14,3 mg, 57,4 µmol, 1 equiv.), THPTA (50,08 mg, 115,2 µmol, 2 equiv.) y ascorbato sódico (34,38 mg, 173,5 µmol, 3 equiv.) en DMF/agua (1,72 ml, 2:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **I.17** (76,18 mg, 74 %) como un sólido amarillento. C<sub>87</sub>H<sub>111</sub>FN<sub>12</sub>O<sub>28</sub>. HPLC (método B): t<sub>R</sub> = 16,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 896,7 [M+2H]<sup>2+</sup>, m/z calculado= 896,4 [M+2H]<sup>2+</sup>

### Síntesis de II.19



El intermedio **II.19** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermedio **I.19** (76,18 mg, 42,51  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), dietilamina (105  $\mu\text{L}$ , 1020  $\mu\text{mol}$ , 24 equiv.) en 5 ml de DMF (abs.) para la desprotección Fmoc y **el intermedio 3.2** (31,28 mg, 63,8  $\mu\text{mol}$ , 1,5 equiv.), diisopropiletilamina (21,7  $\mu\text{L}$ , 127,5  $\mu\text{mol}$ , 3 equiv.) en DMF (1 ml) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **II.19** (38,97 mg, 48 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{88}\text{H}_{126}\text{FN}_{13}\text{O}_{32}$ . HPLC (método N):  $t_R = 16,1$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 949,6  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ,  $m/z$  calculado= 948,9  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

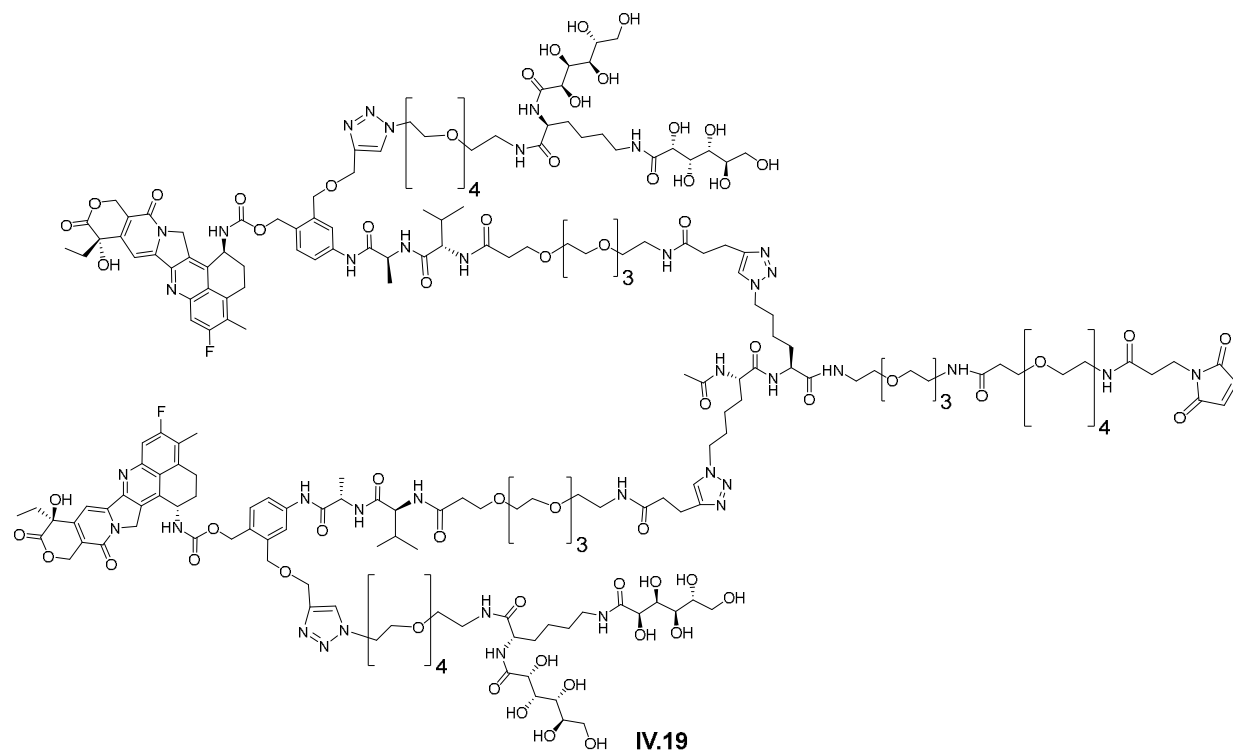
### Síntesis de III.19



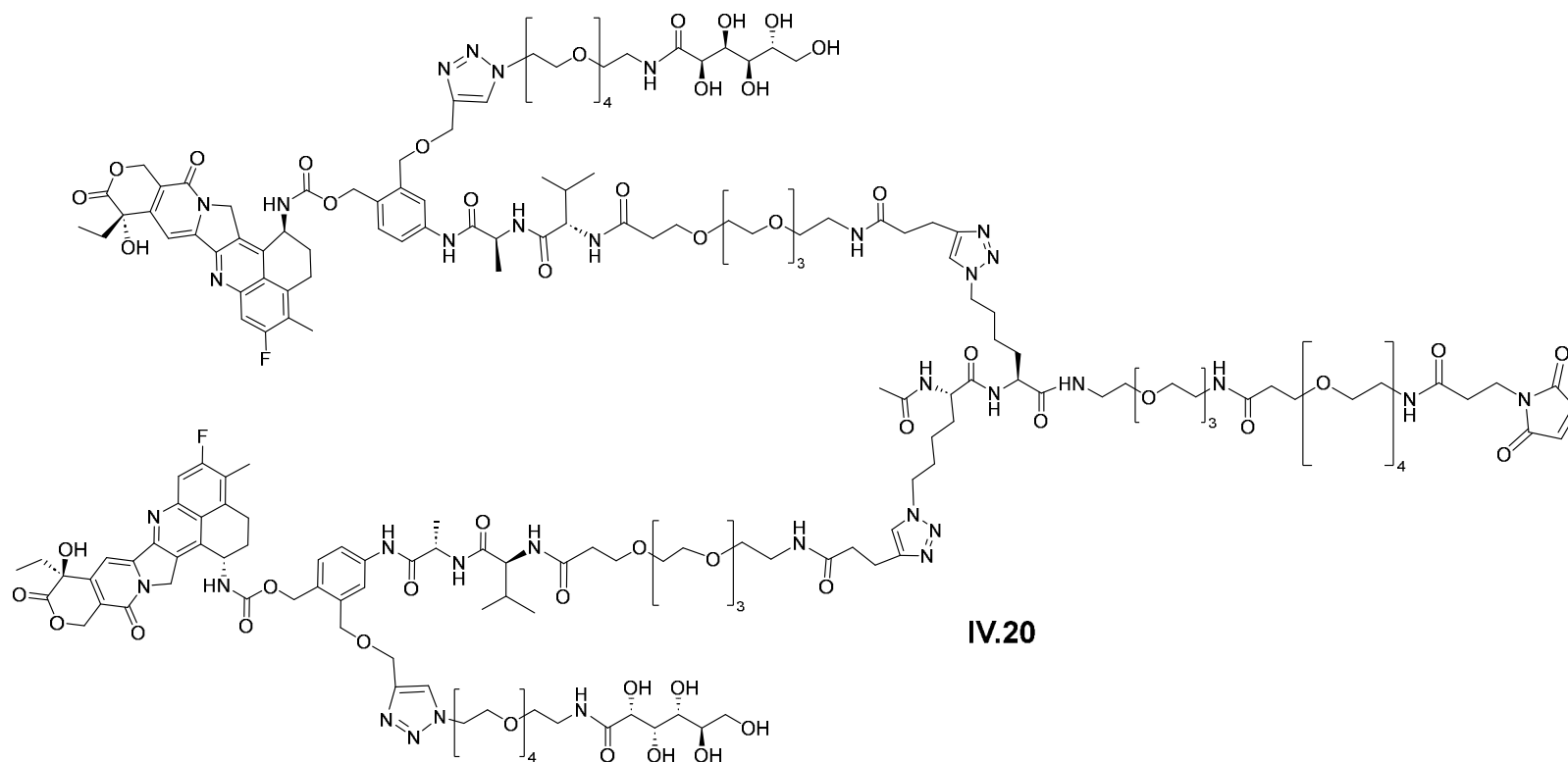
El intermedio **III.19** se sintetizó según el GP2 utilizando el intermedio **2.1** (4,96 mg, 8,6  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), el intermedio **II.19** (38,97 mg, 20,5  $\mu\text{mol}$ , 2,4 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (2,57 mg, 10,3  $\mu\text{mol}$ , 1,2 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (8,95 mg, 20,6  $\mu\text{mol}$ , 2,4 equiv.) y ascorbato sódico (6,10 mg, 30,8  $\mu\text{mol}$ , 3,6 equiv.) en DMF/agua (1,13 ml, 10:1). Después de 3 h, se añadió de nuevo la misma cantidad de catalizador y la solución se agitó durante 40 min más a temperatura ambiente. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermedio **III.19** (29,03 mg, 76 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{198}\text{H}_{294}\text{F}_2\text{N}_{36}\text{O}_{70}$ . HPLC (método O):  $t_R = 12,3$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1446,6  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ,  $m/z$  calculado= 1245,7  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ -----

### **Síntesis de IV.19**

El compuesto **IV.19** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA del intermedio **III.19** (29,03 mg, 6,5  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), *N*-[15-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-il]-2,5-dihidro-2,5-dioxo-1*H*-pirrol-1-propanamida = Mal-PEG4-NHS-éster (13.  $\mu\text{l}$ , 26,1  $\mu\text{mol}$ , 4 equiv.) y DIPEA (4,43  $\mu\text{l}$ , 26,1  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.). 40 mg, 26,1  $\mu\text{mol}$ , 4 equiv.) y DIPEA (4,43  $\mu\text{L}$ , 26,1  $\mu\text{mol}$ , 4 equiv.) en DMF (0,78 ml). Tras 1,5 h, el producto se precipitó en MTBE frío acidificado con TFA (6 equiv.) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto **IV.17** (21,48 mg, 70 %) como un sólido amarillento.  $\text{C}_{216}\text{H}_{320}\text{F}_2\text{N}_{38}\text{O}_{78}$ . HPLC (método J):  $t_R = 13,3$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1578,7  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ,  $m/z$  calculado= 1578,4  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$

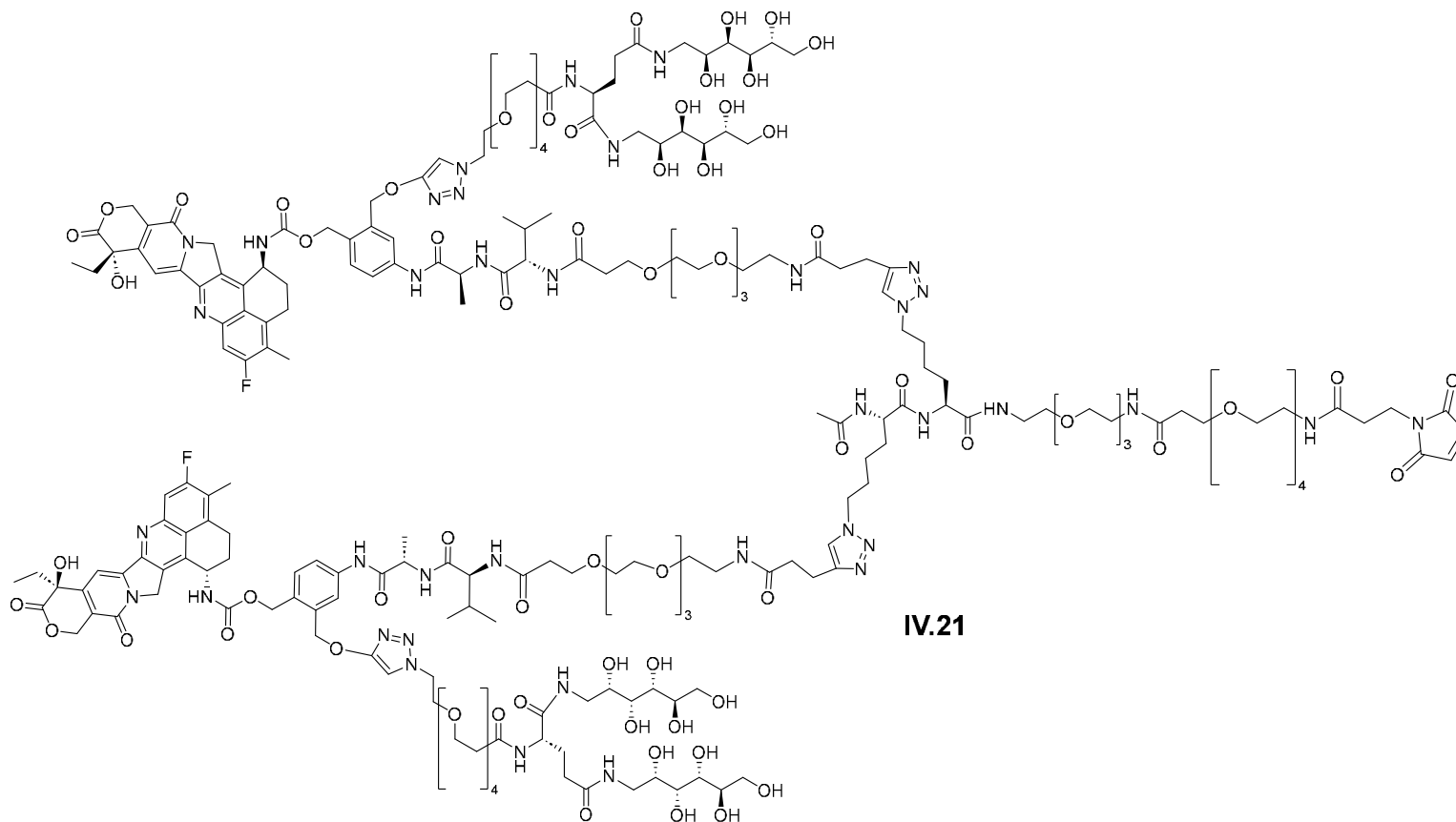


**Ejemplo 22 - Síntesis de IV.20**



El compuesto **IV.20** se sintetizó como se ha descrito para el compuesto **IV.19** pero utilizando **el intermedio 6.2**. El compuesto **IV.20** (14,34 mg, 31 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{192}H_{276}F_2N_{34}O_{64}$ . HPLC (método J):  $t_R = 13,5$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1374,9  $[M+3H]^{3+}$ ,  $m/z$  calculado= 1374,3  $[M+3H]^{3+}$

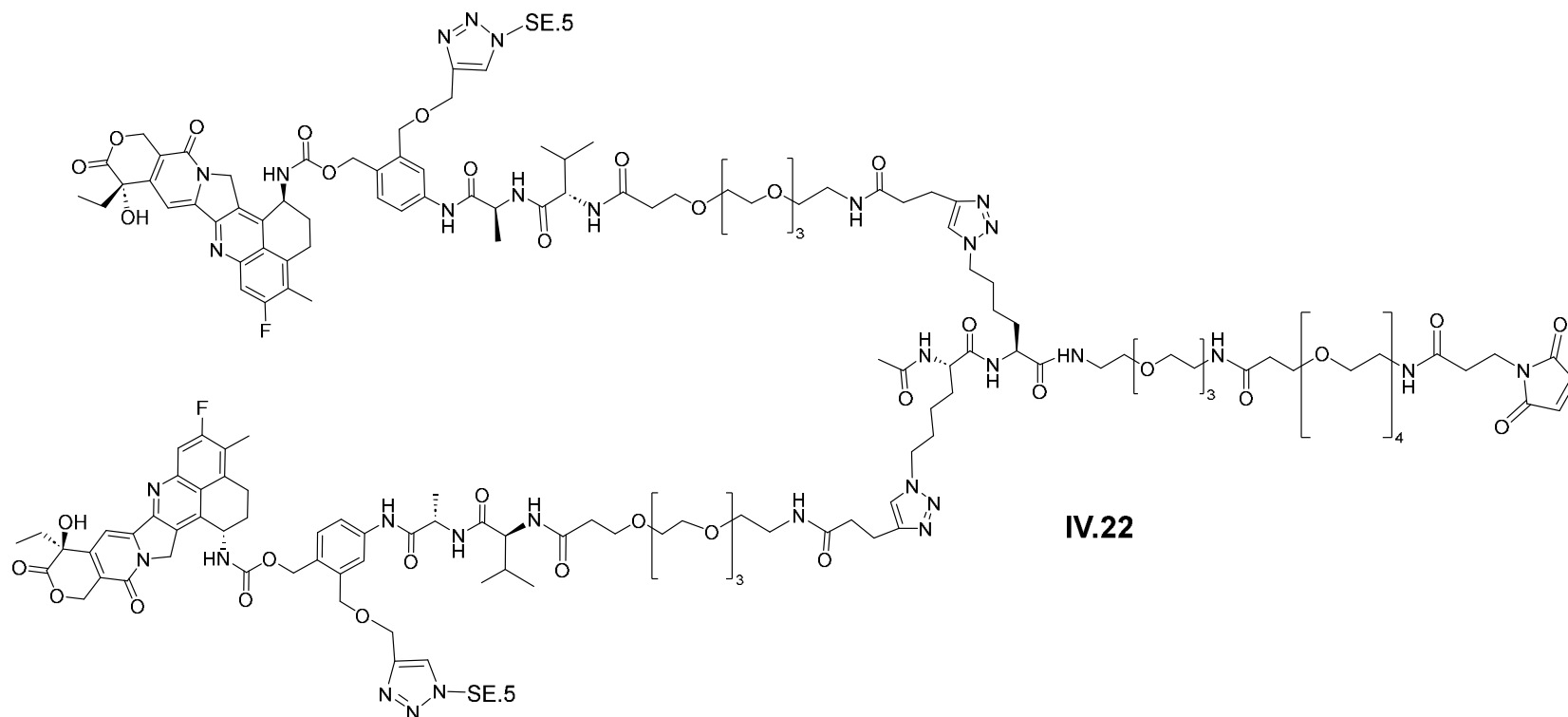
**Ejemplo 23 - Síntesis de IV.21**



**IV.21**

El compuesto **IV.21** se sintetizó como se ha descrito para el compuesto **IV.19** pero utilizando **el intermedio 6.3**. El compuesto **IV.21** (17,83 mg, 64 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{216}H_{320}F_2N_{38}O_{78}$ . HPLC (método J):  $t_R = 13,1$  min. MS (ESI): m/z encontrado= 1579,1  $[M+3H]^{3+}$ , m/z calculado= 1578,4  $[M+3H]^{3+}$

**Ejemplo 24 - Síntesis de IV.22**



El compuesto **IV.22** se sintetizó como se describió para el compuesto **IV.19** pero usando **el intermedio 6.4**. El compuesto **IV.22** (27,9 mg, 55 %) se obtuvo como un sólido amarillento.  $C_{232}H_{352}F_2N_{38}O_{86}$ . HPLC (método J):  $t_R = 13,4$  min. MS (ESI):  $m/z$  encontrado= 1697,0  $[M+3H]^{3+}$ ,  $m/z$  calculado= 1695,8  $[M+3H]^{3+}$

#### **Ejemplo 25 - Ensayos de citotoxicidad in vitro utilizando cultivos celulares 2D y 3D**

La citotoxicidad de los ADC anti-GUCY2C con compuestos modulares enlazadores de la presente divulgación se evaluó mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro* con células HEK293-GUCY2C positivas para la diana y células HEKwt negativas para la diana basado en cultivos celulares 2D y 3D.

Al inicio del ensayo de citotoxicidad 2D, se sembraron  $2 \times 10^3$  células diana-positivas o diana-negativas por pozo en placas de 96 pozos y se incubaron a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Los ADCs indicados se añadieron 24h más tarde a varias concentraciones que oscilaban entre  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1,28 \times 10^{-12}$  M a las células adherentes antes de incubar las placas durante 4 días adicionales a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. La citotoxicidad se evaluó mediante el ELISA de proliferación celular, BrdU (colorimétrico) de Roche.

Al inicio del ensayo de citotoxicidad 3D, se sembraron  $2 \times 10^3$  células diana-positivas o diana-negativas por pozo en placas de 96 pozos de adhesión ultrabaja (ULA) y se incubaron a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Los esferoides se trataron después de 48 h con los ADC indicados a varias concentraciones que oscilaban entre  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1,28 \times 10^{-12}$  M antes de incubar las placas durante otros 5 días a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. La citotoxicidad se evaluó mediante el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo® 2.0 de Promega.

Los ADCs anti-GCC que se utilizaron como controles comprendían las cargas-enlazador (IV.11), (IV.17) y (IV.19) que no forman parte de la presente invención.

#### **Ejemplo 26 - Diseño de estudios en modelos animales in vivo**

Se inocularon ratones NOD SCID hembra por vía subcutánea con  $5 \times 10^6$  células HEK293-GUCY2C-(HDP)-2B3 de riñón embrionario humano con sobreexpresión de GCC en 200 µl de medio RPMI que contenía 50 % de Matrigel sin rojo de fenol por animal en sus flancos derechos. Una vez alcanzado un volumen tumoral medio de aproximadamente 150 mm<sup>3</sup>, los animales se asignaron a los grupos de control o de tratamiento según el tamaño del tumor. El mismo día (día 0) o al día siguiente (día 1), se trató a los animales con una dosis intravenosa única de vehículo control o de ADC anti-GCC conjugado con el respectivo compuesto enlazador modular de la invención, indicado como ("IV.x"), o una vez por semana durante tres semanas. El volumen tumoral se midió dos veces por semana mediante un

calibrador y se determinó paralelamente el peso corporal. Se controlaron diariamente los signos clínicos y la supervivencia. Los animales fueron sacrificados y se les practicó la necropsia cuando surgieron uno o varios criterios de terminación o al finalizar el estudio. La dosificación indicada de los respectivos ADC corresponde a la dosis de ADC total en mg/kg indicada en cada caso.

Numerosas modificaciones y otras modalidades de la presente divulgación vendrán a la mente del experto en la materia a la que pertenece la presente divulgación teniendo en cuenta las enseñanzas presentadas en la descripción anterior y los dibujos asociados. Por lo tanto, debe entenderse que la presente divulgación no debe limitarse a las modalidades específicas divulgadas y que se pretende incluir modificaciones y otras modalidades dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque en el presente documento se emplean términos específicos, se utilizan únicamente en un sentido genérico y descriptivo y no con fines limitativos.

#### **Ejemplo 27 - Ensayo *in vitro* de bystander**

En un ensayo *in vitro* de bystander, células HEKwt negativas, teñidas con CellTracer FarRed, y células HEK-GUCY2C que expresan GUCY2C, teñidas con CFDA, fueron co-cultivadas y tratadas con ADCs anti-GCC. Después de 72 h, se evaluó la muerte accidental de los compuestos analizando las células HEKwt apoptóticas (7AAD+) negativas.

Los tres ADCs anti-GCC mostraron una fuerte actividad de destrucción de transeúntes, mientras que no se observó ningún efecto en células HEKwt sin células HEK-GUCY2C que expresaran la diana (ver fig. 9).