

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 921 236**

51 Int. Cl.:

C07D 207/456 (2006.01)

C07D 403/14 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 491/18 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

C07K 5/027 (2006.01)

C07K 7/02 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

A61K 31/5365 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2017 PCT/CN2017/112958**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2018 WO18095422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2017 E 17873634 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2022 EP 3546448**

54 Título: **Enlazador de amida maleica disustituida para la conjugación de anticuerpo y fármaco y método de preparación y uso del mismo**

30 Prioridad:

25.11.2016 CN 201611093699

22.11.2017 CN 201711169847

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.08.2022

73 Titular/es:

MABWELL (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD.
(50.0%)

Building 3 No.576 Libing Road, Pudong New Area
Shanghai, CN y

JIANGSU MABWELL HEALTH
PHARMACEUTICAL R&D CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

SHEN, JINGKANG;
MENG, TAO;
MA, LANPING;
WANG, XIN;
PENG, HONGLI;
ZHANG, YONGLIANG;
YU, TING;
CHEN, LIN;
DU, ZHIYAN y
WANG, YING

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 921 236 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Enlazador de amida maleica disustituida para la conjugación de anticuerpo y fármaco y método de preparación y uso del mismo

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una clase de novedosos agentes de reticulación para puentes de enlaces disulfuro, macromoléculas, conjugados terapéuticos y métodos de síntesis de los mismos. Específicamente, la presente invención se refiere a conjugados obtenidos mediante la reticulación de fármacos citotóxicos y macromoléculas a través de agentes de reticulación basados en maleamida sustituida para puentes de enlaces disulfuro, métodos de preparación y usos de los mismos. Cualquier referencia a métodos de tratamiento en los párrafos siguientes de esta descripción debe interpretarse como referencia a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico)

Antecedentes de la invención

- 15 Mejorar la eficiencia del suministro de fármacos u otros agentes a las células, tejidos o tumores diana para lograr la máxima efectividad y la mínima toxicidad ha sido el foco de considerables investigaciones durante muchos años. Aunque se han hecho muchos intentos para desarrollar métodos eficaces para importar moléculas biológicamente activas a las células, tanto *in vivo* como *in vitro*, ninguno ha demostrado ser enteramente satisfactorio. La optimización de la asociación de un fármaco con su diana intracelular, al tiempo que minimiza la redistribución intercelular del fármaco, p. ej., a las células vecinas, es a menudo difícil o ineficiente. En la actualidad, la mayoría de los agentes administrados por vía parenteral a los pacientes no están dirigidos, dando como resultado el suministro sistémico de los agentes a las células y tejidos corporales donde no son necesarios. Esto puede dar como resultado efectos secundarios adversos del fármaco y, a menudo, limita la dosis de un fármaco (p. ej., fármacos quimioterapéuticos (anticáncer), citotóxicos, inhibidores de enzimas y antiviricos o antimicrobianos) que pueden administrarse. Aunque la administración oral se considera ser un modo de administración conveniente y económico, por el contrario, comparte la preocupación de la toxicidad no específica para las células no afectadas una vez que el fármaco se ha absorbido en la circulación sistémica. Las complicaciones adicionales implican problemas con la biodisponibilidad oral y la residencia del fármaco en los órganos internos que conducen a una exposición adicional de los órganos internos al fármaco y, por tanto, al riesgo de producir toxicidades en los mismos. Por consiguiente, uno de los principales objetivos del desarrollo de métodos (de suministro de fármacos) ha sido dirigir específicamente los agentes a las células y los tejidos. Los beneficios de dicho tratamiento incluyen evitar los efectos fisiológicos generales resultantes de la administración inadecuada de los agentes a otras células y tejidos, tales como células no infectadas. El direccionamiento intracelular puede lograrse mediante métodos, compuestos y formulaciones que permiten la acumulación o retención de agentes biológicamente activos, es decir, metabolitos activos, dentro de las células.

- 35 El uso de conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC), es decir, inmunoconjugados, para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cánceres, permite la administración dirigida del resto del fármaco a los tumores y la acumulación intracelular en los mismos, mientras que la administración sistémica de estos fármacos no conjugados puede resultar en un nivel inaceptable de toxicidad para las células normales, junto con las células tumorales buscadas para ser eliminadas. Los esfuerzos para mejorar el índice terapéutico, es decir, la efectividad máxima y la toxicidad mínima de los ADC se han centrado en la selectividad de los anticuerpos policlonales y monoclonales (mAb), así como en las propiedades de enlace de fármacos y liberación de fármacos.

- 45 Como novedosos agentes terapéuticos dirigidos, los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) abren una nueva era para el tratamiento de tumores. La filosofía de diseño básica se originó a partir de los conceptos de "bala mágica" y "direccionamiento de fármacos", es decir, suministrar fármacos a las áreas enfermas a través de vehículos adecuados, que fueron propuestos por primera vez por Paul Ehrlich en 1931. Sin embargo, debido a las tecnologías limitadas de anticuerpos y fármacos citotóxicos de alta potencia, no fue sino hasta el año 2000 que el primer fármaco ADC, MalotargTM (para el tratamiento de la leucemia mielocítica aguda, AML), fue aprobado por la FDA. Recientemente, la FDA aprobó dos fármacos ADC, AdcetrisTM (2011) desarrollado por Seattle Genetics para el tratamiento del linfoma de Hodgkin (HL)/linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) y KadcylaTM (2013) desarrollado por Genentech para el tratamiento del cáncer de mama, lo que indica que se acerca una etapa de desarrollo rápido de ADC usados para el tratamiento de tumores.

- 55 Un conjugado de anticuerpo y fármaco generalmente se compone de tres partes: anticuerpo o ligando similar a un anticuerpo, fármaco de molécula pequeña y enlazador que conjuga el fármaco con el ligando. En estructuras de conjugados de anticuerpo y fármaco que han entrado en la etapa de ensayo clínico, los fármacos citotóxicos altamente potentes generalmente se enlazan, a través de enlazadores, a restos de lisina en la superficie de los ligandos o restos de cisteína (obtenidos a través de la reducción parcial de los enlaces disulfuro entre cadenas) en la región bisagra de los anticuerpos, y la proporción óptima de fármaco a anticuerpo (DAR) es 2-4. La gran cantidad de restos de lisina (más de 80) en la superficie del anticuerpo y un modo de conjugación no selectivo dan lugar a incertidumbre sobre los sitios y números de conjugación, lo que a su vez conduce a la heterogeneidad de los conjugados de anticuerpo y

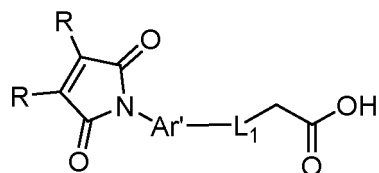
fármaco producidos. Por ejemplo, T-DM1 (con un DAR promedio de 3,5) tiene una distribución de DAR que va de 0 a 8. De forma similar, aunque un anticuerpo contiene solo cuatro enlaces disulfuro entre cadenas en su región bisagra, que debe reducirse parcialmente para lograr un DAR promedio óptimo 2-4. Ya que los agentes reductores generales (DTT, TCEP, etc.) no pueden reducir selectivamente los enlaces disulfuro entre cadenas, los conjugados obtenidos no son productos homogéneos, sino compuestos por diferentes componentes con DAR de 0, 2, 4, 6 y 8. E incluso para un conjugado con un valor DAR específico, puede estar compuesto por isómeros debido a diferentes sitios de conjugación. La heterogeneidad de los productos ADC puede conducir en última instancia a diferentes PK, propiedades de eficacia y toxicidad para diferentes conjugados. Por ejemplo, los conjugados con un DAR más alto se eliminan más rápidamente y pueden dar como resultado una mayor toxicidad en el cuerpo.

Para superar el problema de la alta heterogeneidad con los conjugados de anticuerpo y fármaco, las tecnologías de conjugación dirigida al sitio que controlan la conjugación entre los anticuerpos y los fármacos tanto en sitios como en número han sido puntos calientes recientemente. A pesar de que las tecnologías pueden lograr sitios controlables y el número de fármacos conjugados, los anticuerpos o proteínas usados se obtienen todos por recombinación génica. En cuanto a la tecnología de recombinación de genes, se necesita un trabajo sustancial y un diseño preciso para detectar anticuerpos o proteínas con sitios favorables para la conjugación o pegilación de fármacos. Sin embargo, los anticuerpos/proteínas tras la modificación dirigida al sitio obtenidos a través de las tecnologías actuales de recombinación de genes tienen niveles de expresión bajos. En este sentido, una preparación y producción a gran escala puede llevar mucho tiempo y el coste de la investigación y el desarrollo y la industrialización final es muy alto. Y lo que es más, se necesita trabajo adicional sobre los anticuerpos/proteínas modificados para verificar su efectividad y seguridad *in vivo*. Teniendo en cuenta los problemas anteriores en las tecnologías de conjugación, lograr la conjugación dirigida al sitio en los anticuerpos actuales a través de métodos químicos simples puede ahorrar mucha mano de obra, recursos materiales y financieros y por lo tanto es más atractivo. Los estudios relacionados existentes incluyen: una tecnología de conjugación informada por POLYTHERICS LIMITED en la solicitud de patente N.º CN200480019814.4; soluciones técnicas informadas en la publicación internacional N.º WO2014197871A2 presentada por Igenica Biotherapeutics; soluciones técnicas informadas en la solicitud de patente N.º CN201380025774.3 presentada por CONCORTIS BIOSYSTEMS CORP; soluciones técnicas informadas en la solicitud de patente N.º CN201310025021.4 presentada por NEWBIO THEREAPEUTICS, INC.; y similares. Sin embargo, las tecnologías descritas anteriormente tienen muchos defectos de la siguiente manera: las rutas de síntesis para los reactivos de acoplamiento son demasiado largas, la estabilidad química de los reactivos de acoplamiento es pobre, los electroferogramas de los conjugados de anticuerpos obtenidos son desordenados, lo que indica que pueden existir reacciones secundarias durante el proceso de acoplamiento, y esas soluciones disponibles no evitan el intercambio de grupos sulfhidrilo (una reacción de adición de Michael inversa) en la circulación del cuerpo. Por lo tanto, todavía hay una necesidad de métodos de conjugación química altamente eficientes, sencillos y prácticos que puedan lograr el fin de la conjugación dirigida al sitio y mejorar la estabilidad, seguridad y otras propiedades de los conjugados de anticuerpo y fármaco obtenidos simultáneamente. El documento WO2014100762 describe enlazadores hidrófilos autoinmolantes y su uso en conjugados de fármacos.

Compendio de la invención

Un fin de la presente invención es proporcionar un enlazador que pueda acoplarse de forma sencilla con la mayoría de los anticuerpos.

En el primer aspecto, la presente invención proporciona un enlazador de maleamida sustituido como se muestra en la Fórmula la,



(Ia)

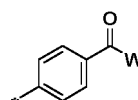
en donde, R es X o ArS-,

X se selecciona de halógeno, preferiblemente bromo o yodo;

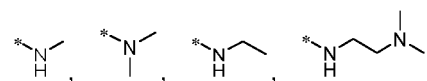
Ar se selecciona del grupo que consiste en arilo C₆-C₁₀ sustituido o no sustituido y heteroarilo de 5-12 miembros sustituido o no sustituido;

preferiblemente, Ar se selecciona del grupo que consiste en fenilo, fenilo sustituido con halógeno, alquilfenilo C₁-C₄,

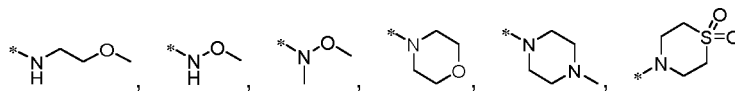
alcoxilfenilo C₁-C₄, 2-piridilo, 2-pirimidinilo, 1-metilimidazol-2-ilo, y



en el cual W es amido R¹ unido



a carbonilo y R¹ se selecciona del grupo que consiste en -NH₂,

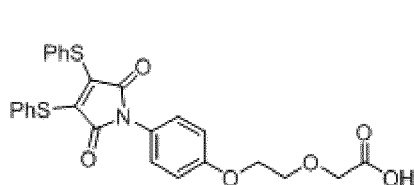


, y similares; en donde alquilfenilo C₁-C₄ es preferiblemente 4-metilfenilo; y en donde alcoxifenilo C₁-C₄ es preferiblemente 4-metoxifenilo.

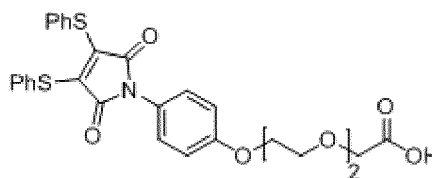
5 Ar' se selecciona del grupo que consiste en arileno C₆-C₁₀ sustituido o no sustituido y heteroarileno de 5-12 miembros sustituido o no sustituido; preferiblemente, Ar' se selecciona del grupo que consiste en fenileno sustituido o no sustituido y piridilo sustituido o no sustituido; y la sustitución significa que el átomo de hidrógeno del grupo está sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en: halógeno, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄, trifluorometilo, ciano, grupo amida y similares.

10 L₁ es -O(CH₂CH₂O)_n- enlazado a Ar', en el cual n es cualquier número entero entre 1 y 20, preferiblemente cualquier número entero entre 1 y 10.

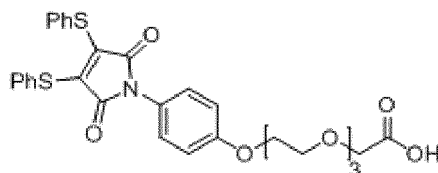
En otra realización preferida, el enlazador tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:



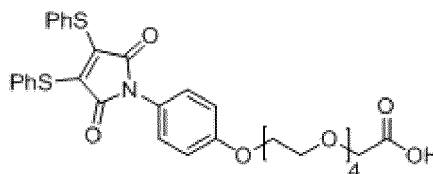
Fórmula 1;



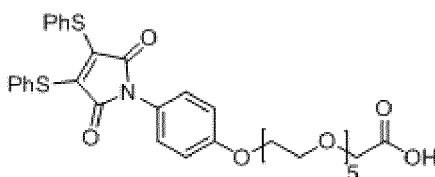
Fórmula 2;



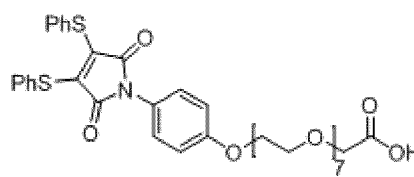
Fórmula 3;



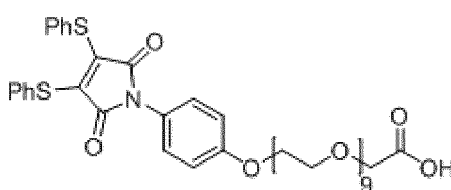
Fórmula 4;



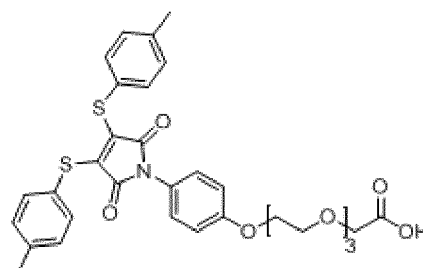
Fórmula 5;



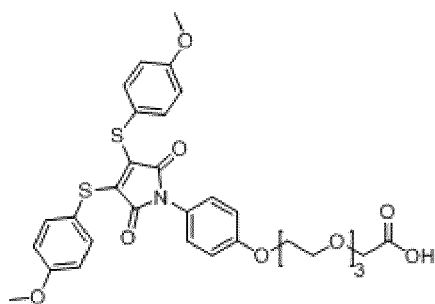
Fórmula 6;



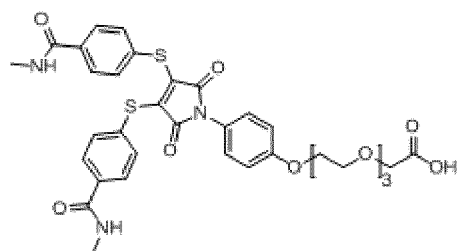
Fórmula 7;



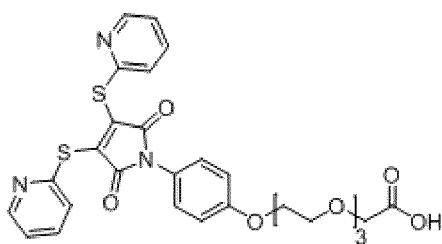
Fórmula 8;



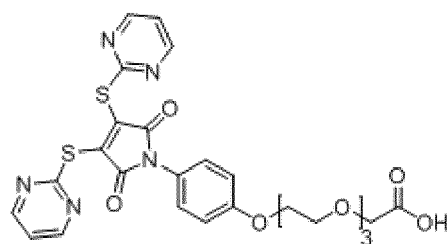
Fórmula 9;



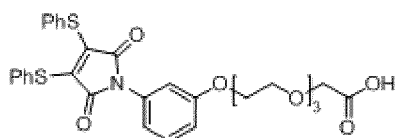
Fórmula 10;



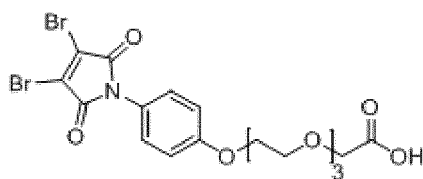
Fórmula 11;



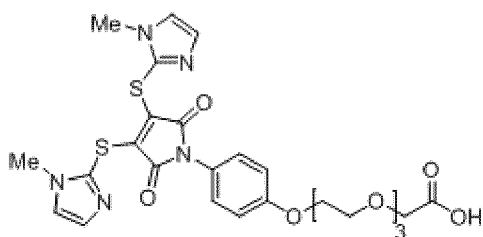
Fórmula 12;



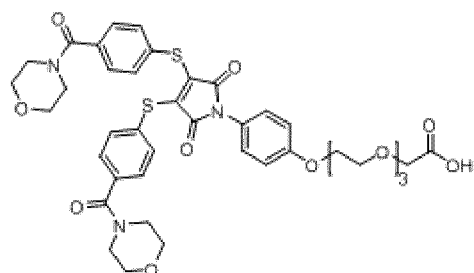
Fórmula 13;



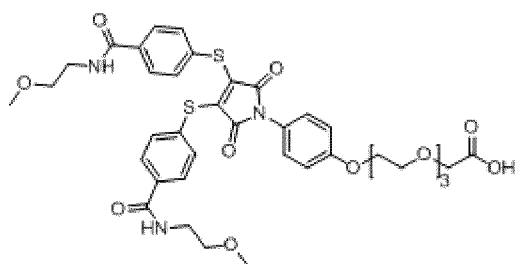
Fórmula 14;



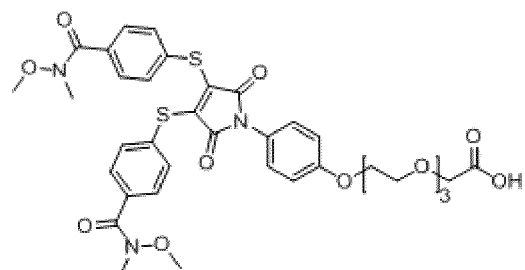
Fórmula 15;



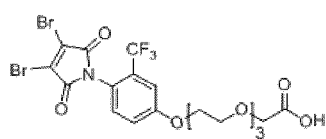
Fórmula 16;



Fórmula 17;

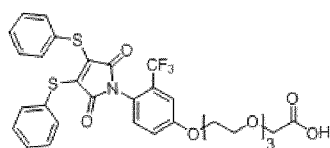


Fórmula 18;



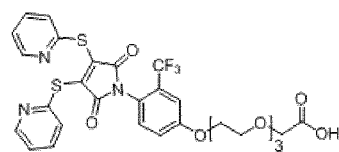
Ia-1

;



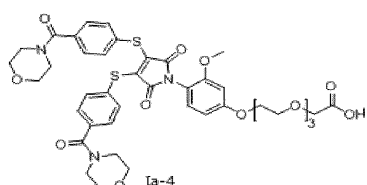
Ia-2

;



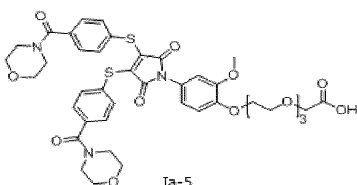
Ia-3

;



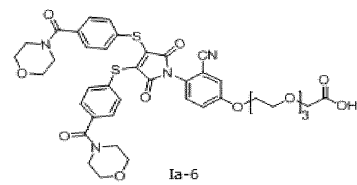
Ia-4

;



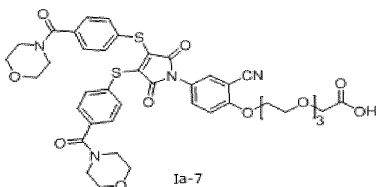
Ia-5

;



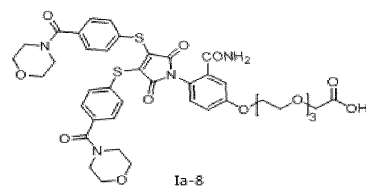
Ia-6

;



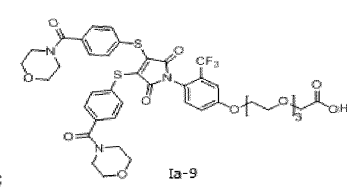
Ia-7

;



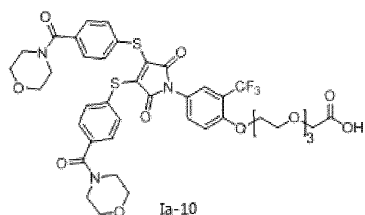
Ia-8

;



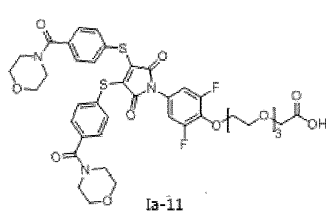
Ia-9

;



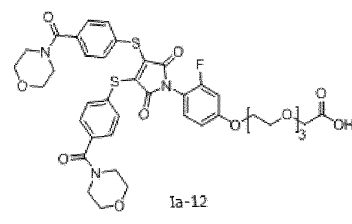
Ia-10

;



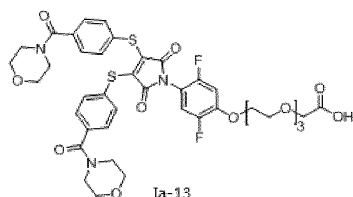
Ia-11

;



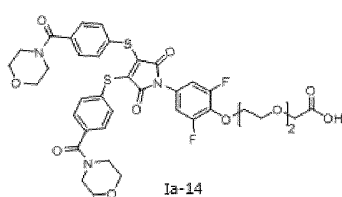
Ia-12

;



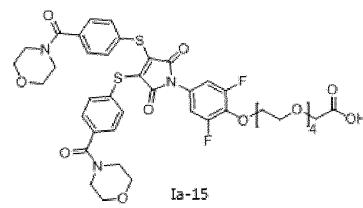
Ia-13

;



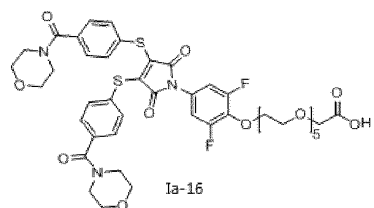
Ia-14

;



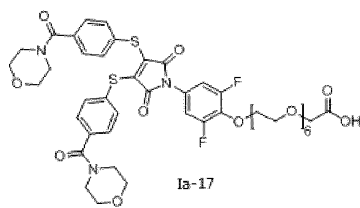
Ia-15

;



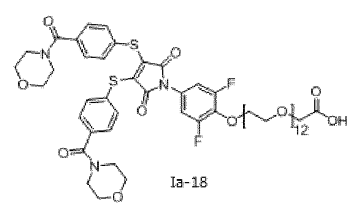
Ia-16

;



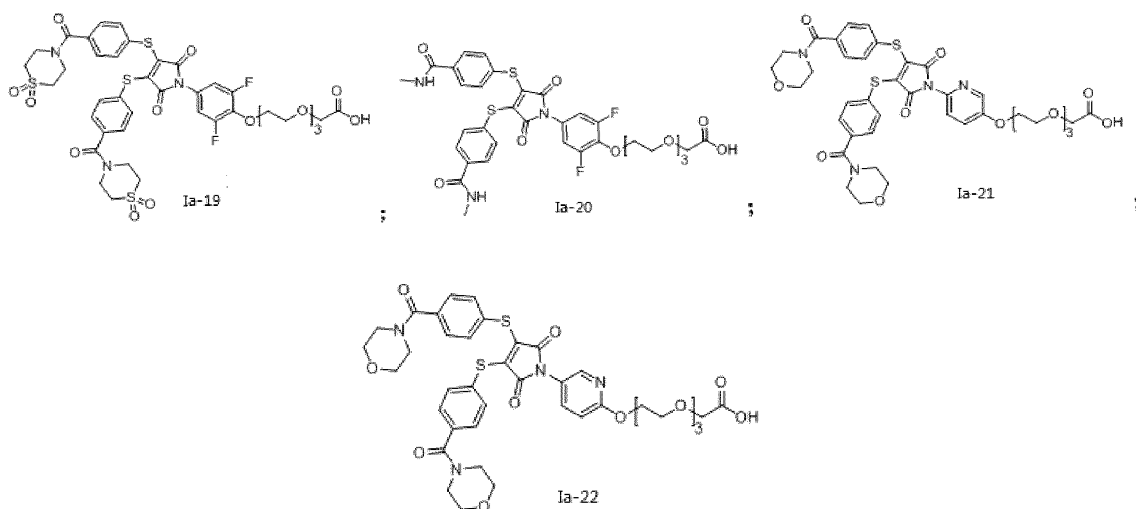
Ia-17

;

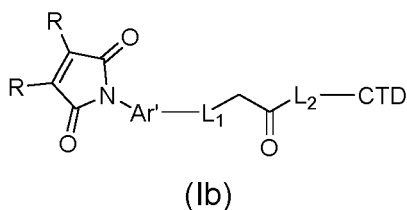


Ia-18

;



En el segundo aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de enlazador de maleamida-fármaco sustituido que contiene el enlazador como se muestra en la Fórmula Ia descrita en el primer aspecto, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, teniendo el conjugado una estructura como la que se muestra en la Fórmula Ib:

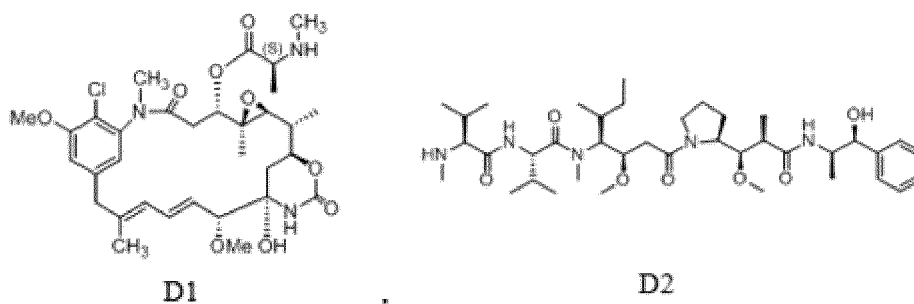


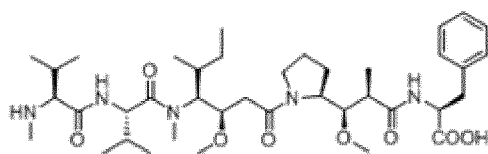
en donde R, Ar' y L₁ se definen como anteriormente;

L₂ es un enlace químico o tiene una estructura de AA-PAB, en la cual AA es un fragmento de dipéptido o tripéptido (es decir, un fragmento formado al enlazar 2-3 aminoácidos a través de enlaces peptídicos), preferiblemente, AA se selecciona del grupo que consiste en Val-Cit (valina - citrulina), Val-Ala (valina - glicina), Phe-Lys (fenilalanina - lisina), Ala-Ala-Asn (glicina - glicina - asparagina), D-Ala-Phe-Lys (D-glicina - fenilalanina - lisina) y similares; y PAB es p-aminobencilcarbamoilo.

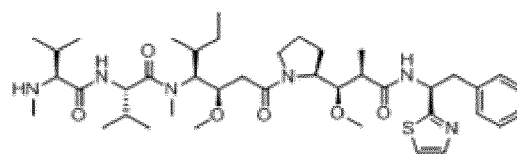
CTD es un fármaco de molécula pequeña citotóxico y/o un fármaco para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y/o inflamación, que está unido a L₂ a través de un enlace amida; preferiblemente, CTD se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de tubulina, inhibidor de topoisomerasa y agente de unión al ADN; más preferiblemente, el inhibidor de tubulina se selecciona del grupo que consiste en maitansina o sus derivados, Monometil auristatina E, Monometilauristatina F, Monometil dolastatina 10, Tubulisina o sus derivados, Criptoficina o sus derivados y Taltobulina; preferiblemente, el agente de unión a ADN se selecciona del grupo que consiste en PBD o sus derivados y duocarmicina o sus derivados; preferiblemente, el inhibidor de topoisomerasa se selecciona del grupo que consiste en el metabolito PNU-159682 de Doxorubicina o sus derivados, metabolito SN38 de irinotecán o sus derivados y Exatecán.

Más específicamente, el CTD tiene una estructura molecular seleccionada del grupo que consiste en D1-D13 y D13' como sigue:





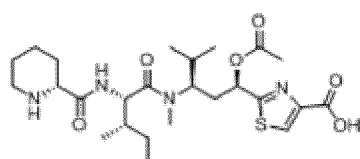
D3



D4

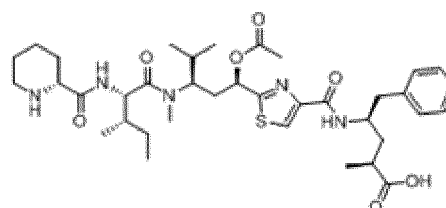
;

;



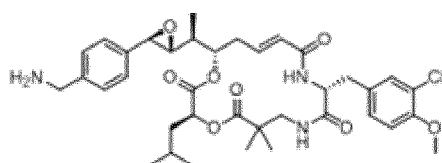
D5

;



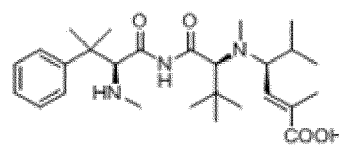
D6

;



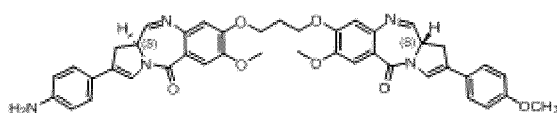
D7

;



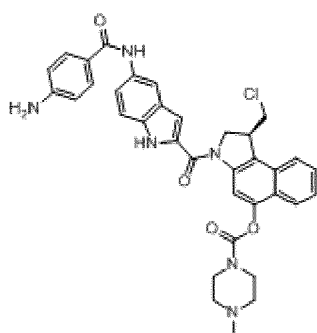
D8

;



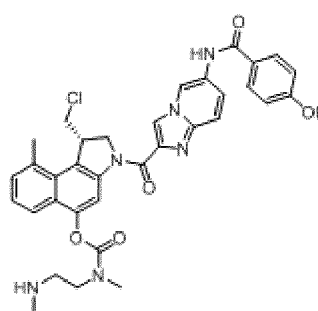
D9

;



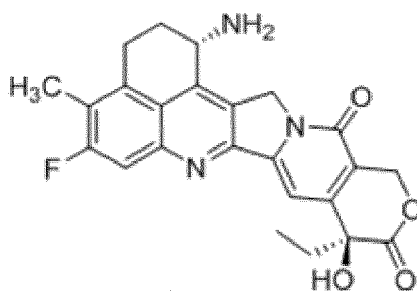
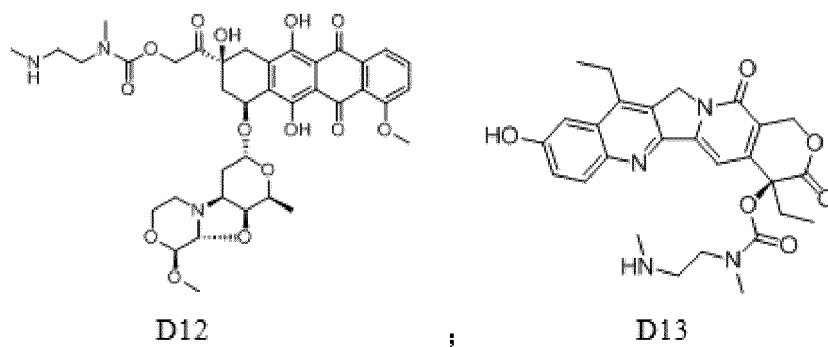
D10

;



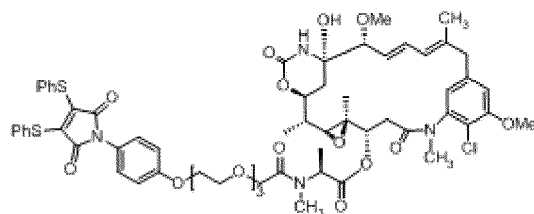
D11

;



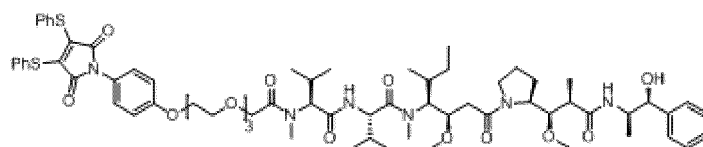
D13'.

En otra realización preferida, el conjugado que se muestra en la Fórmula Ib se selecciona del grupo que consiste en:

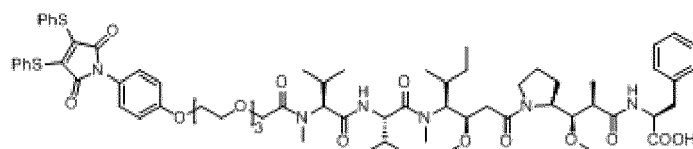


Fórmula 19;

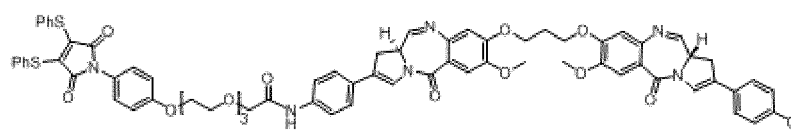
5



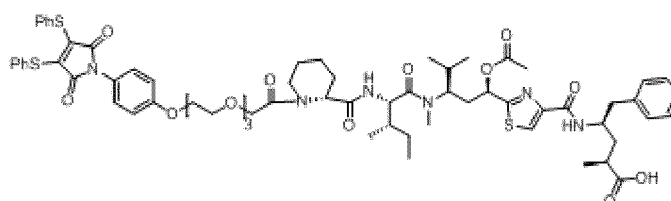
Fórmula 20;



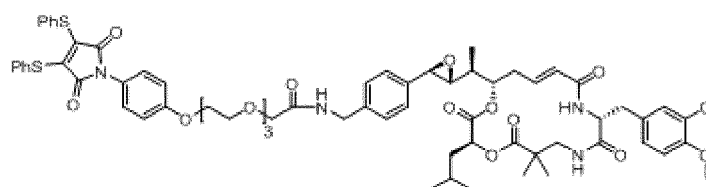
Fórmula 21;



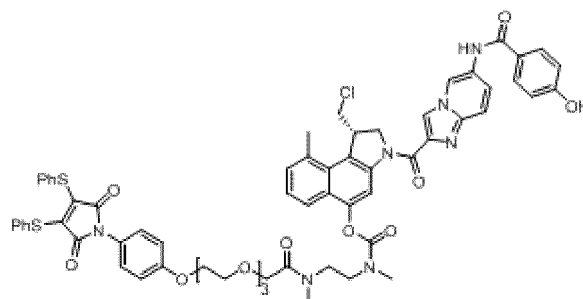
Fórmula 22;



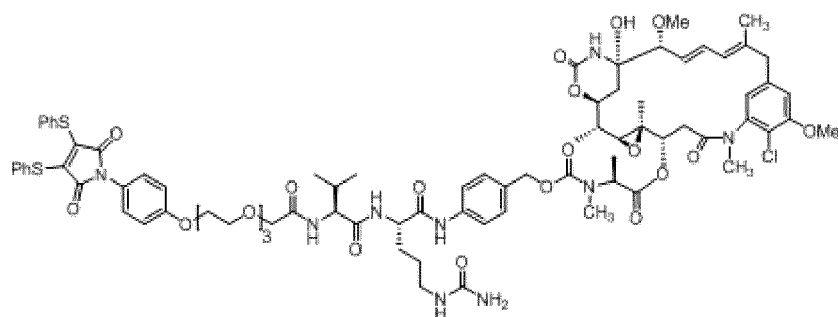
Fórmula 23;



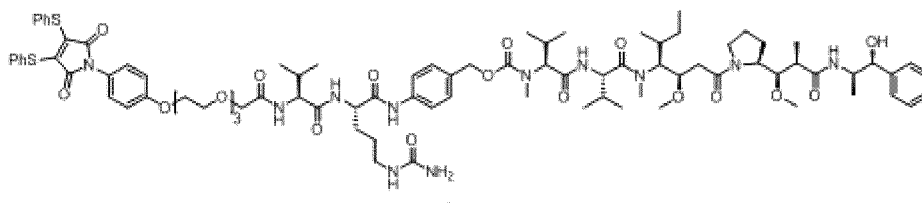
Fórmula 24;



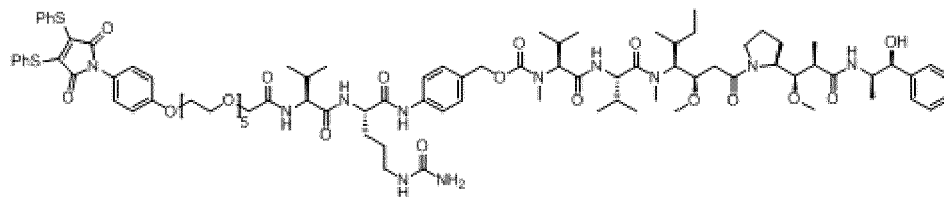
Fórmula 25;



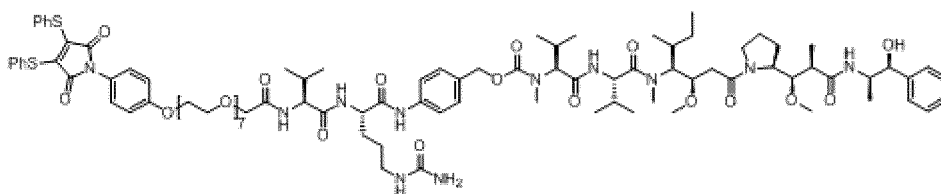
Fórmula 26;



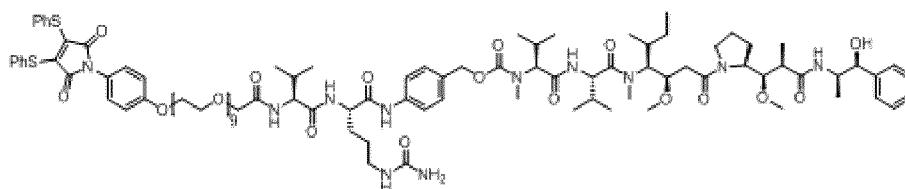
Fórmula 27;



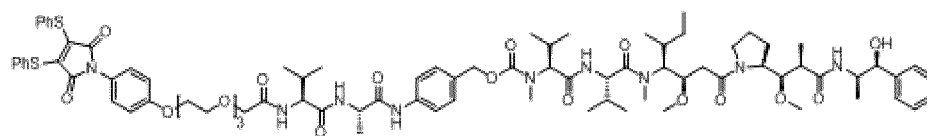
Fórmula 28;



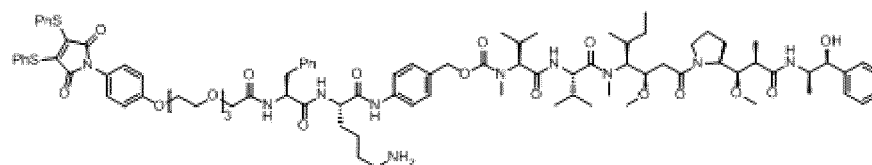
Fórmula 29;



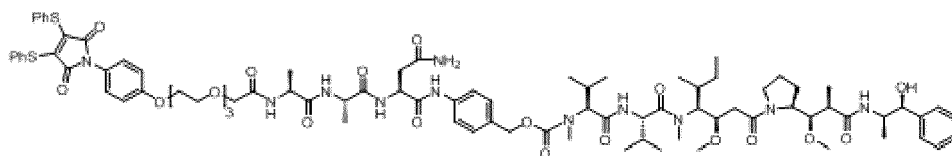
Fórmula 30;



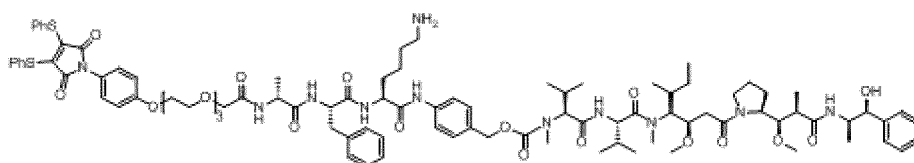
Fórmula 31;



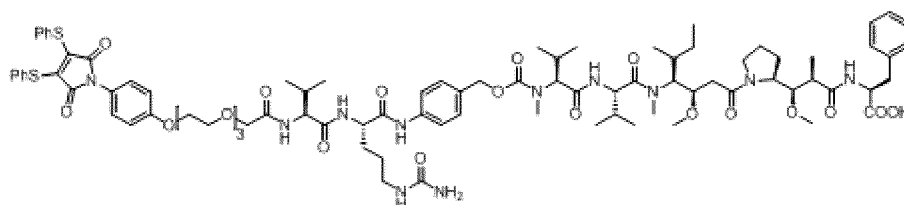
Fórmula 32;



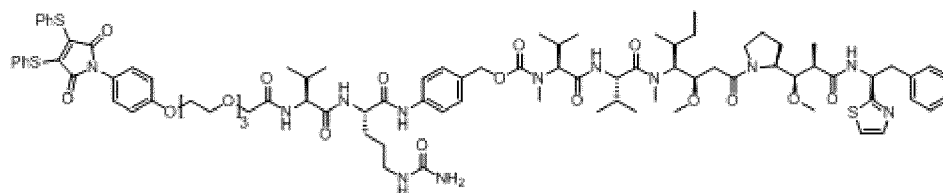
Fórmula 33;



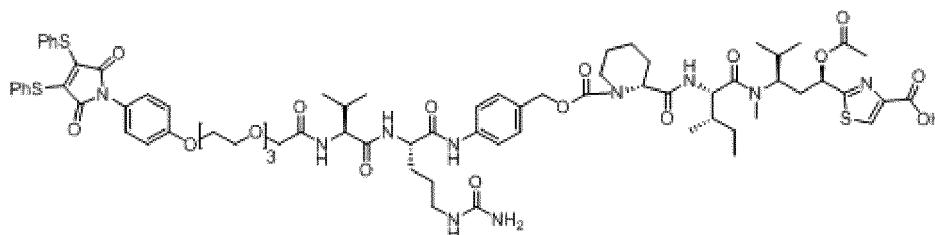
Fórmula 34;



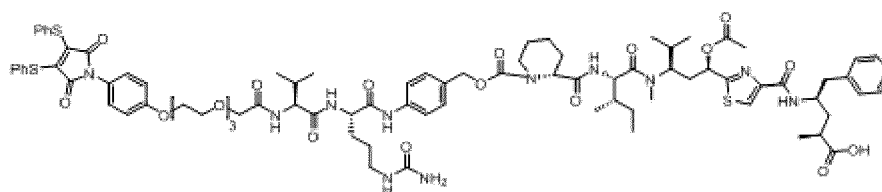
Fórmula 35;



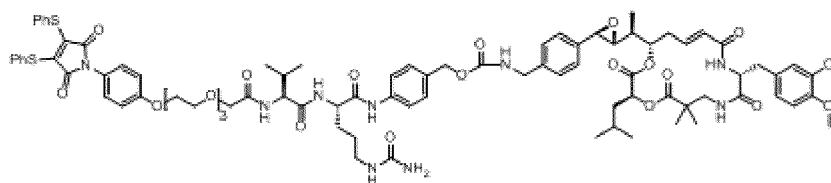
Fórmula 36;



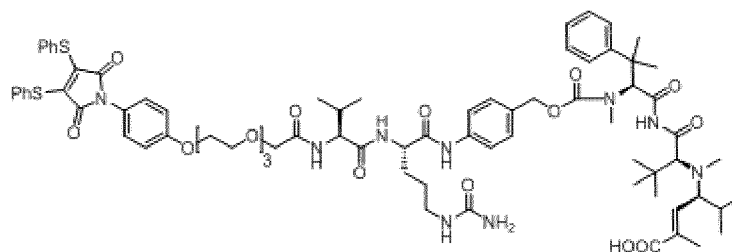
Fórmula 37;



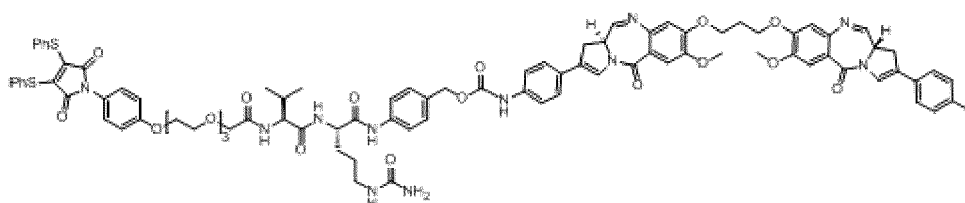
Fórmula 38;



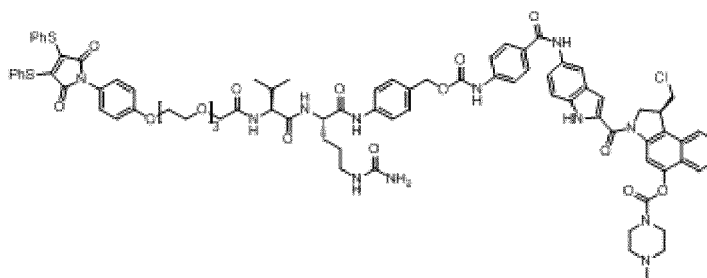
Fórmula 39;



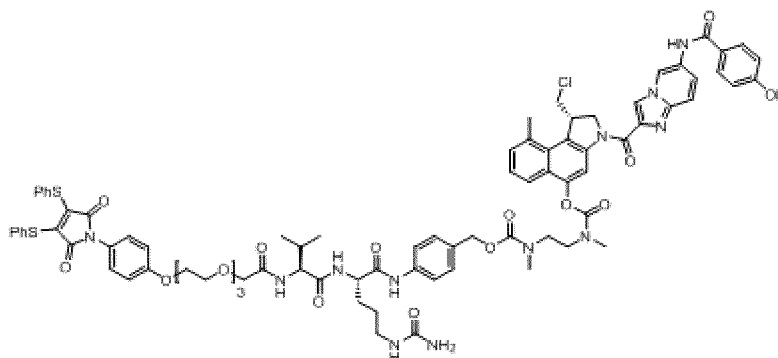
Fórmula 40;



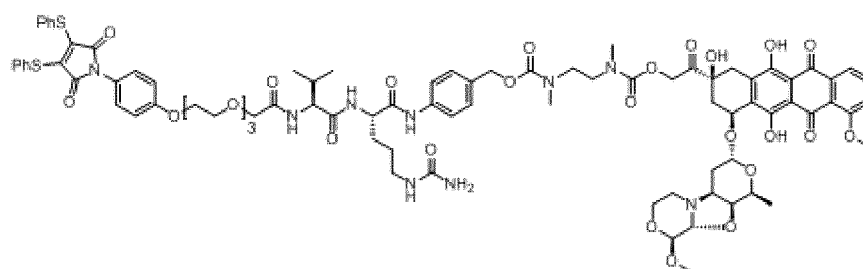
Fórmula 41;



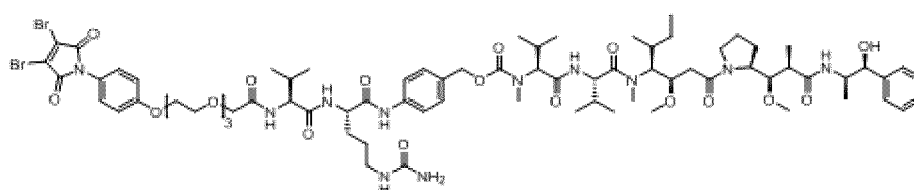
Fórmula 42;



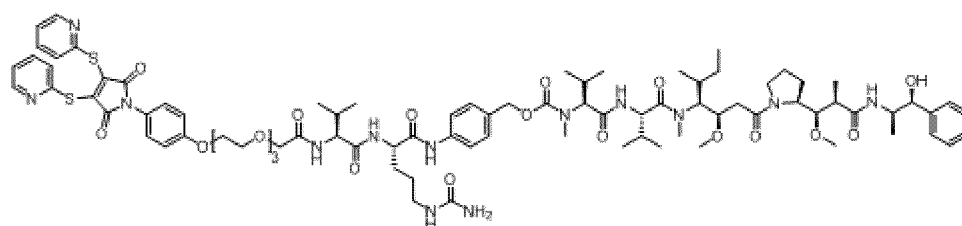
Fórmula 43;



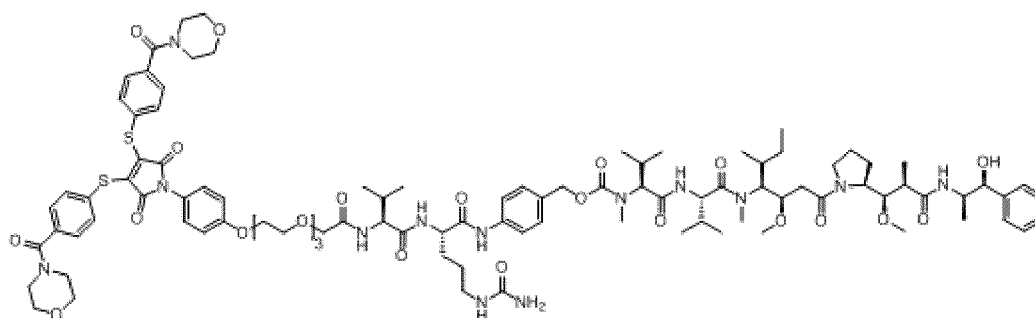
Fórmula 44;



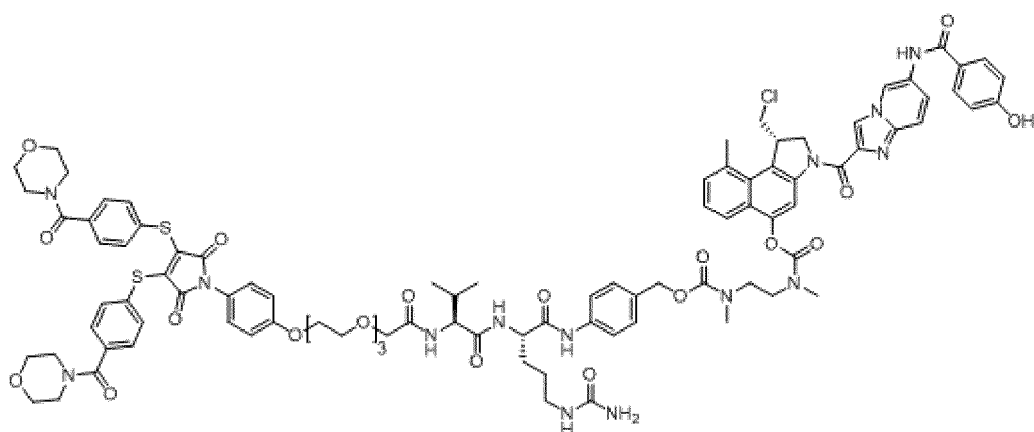
Fórmula 45;



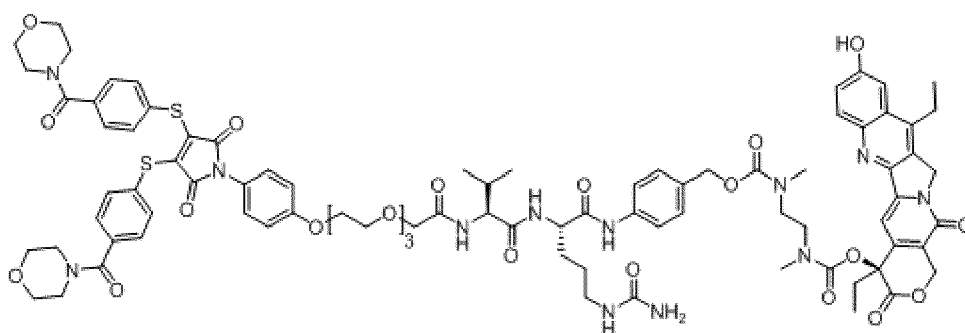
Fórmula 46;



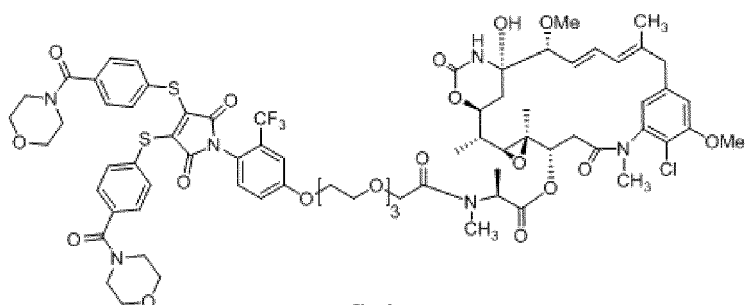
Fórmula 47;



Fórmula 48;



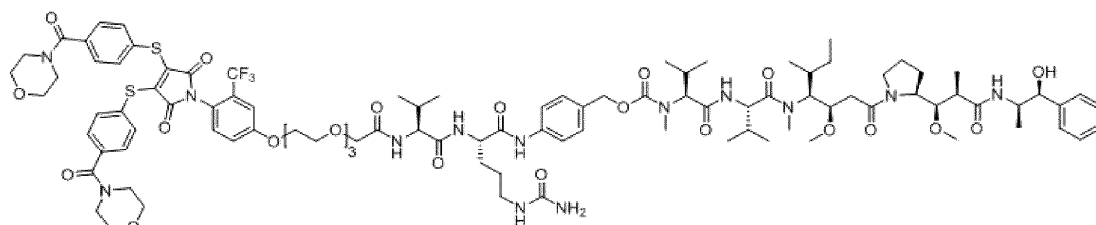
Fórmula 49;



Ib-1

;

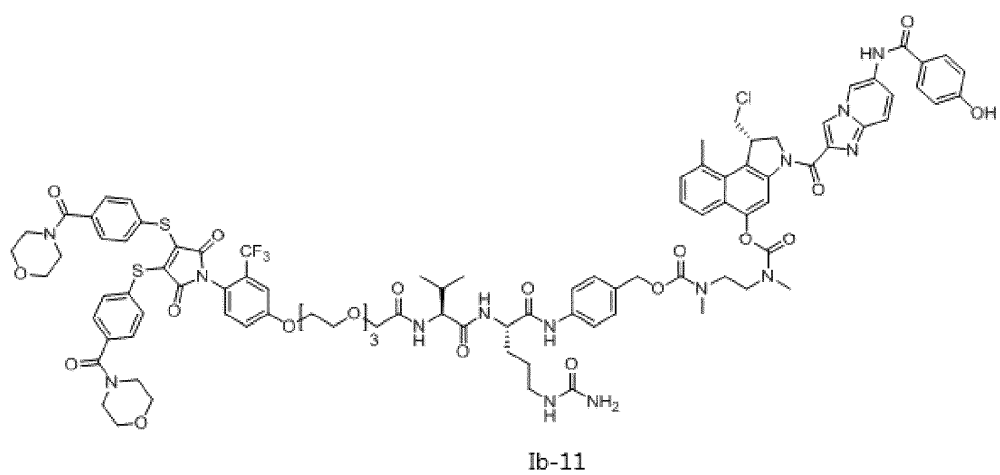
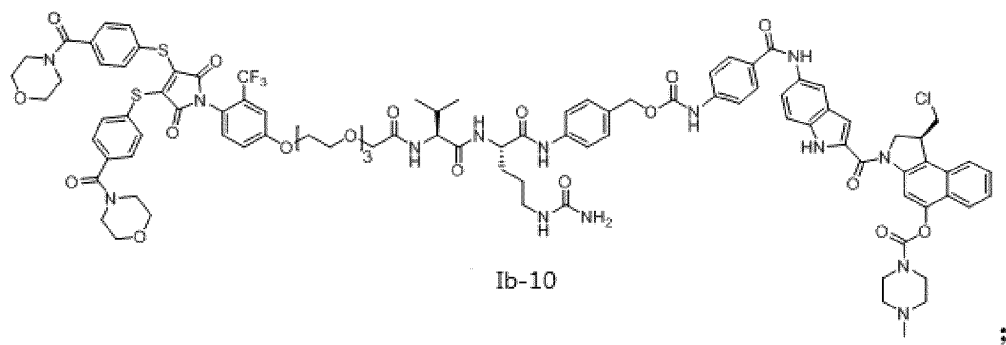
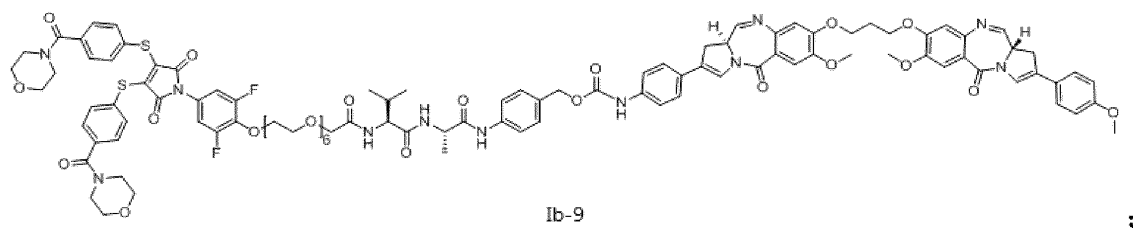
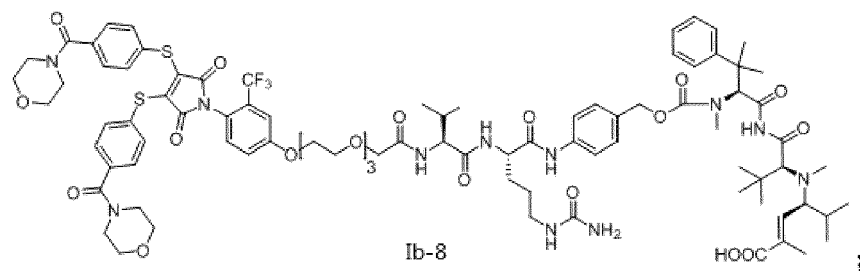
5

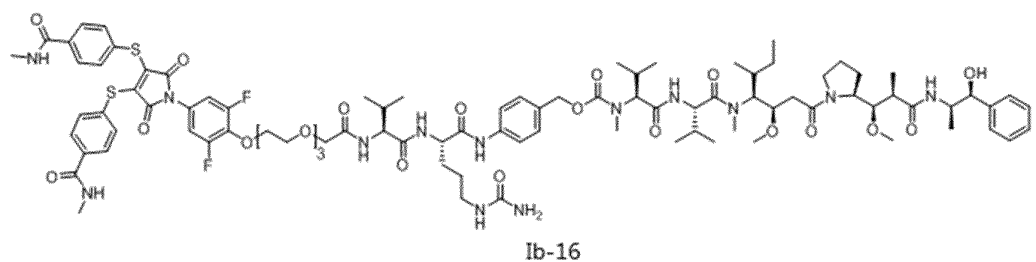
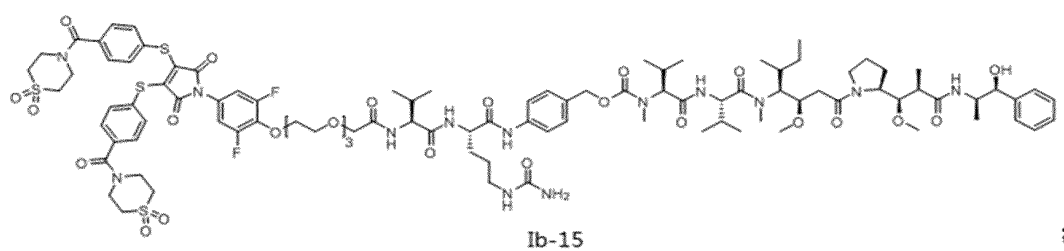
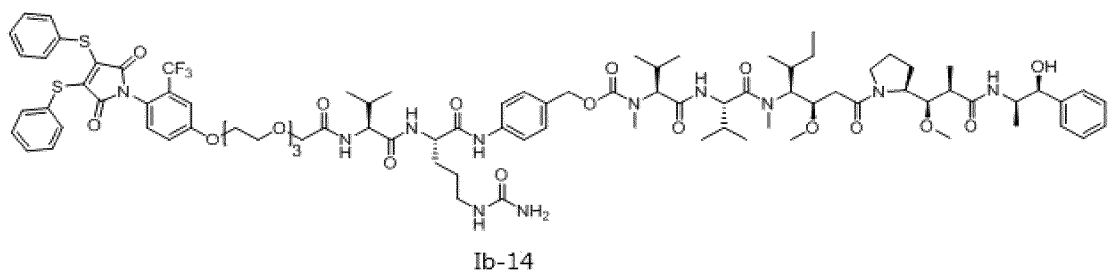
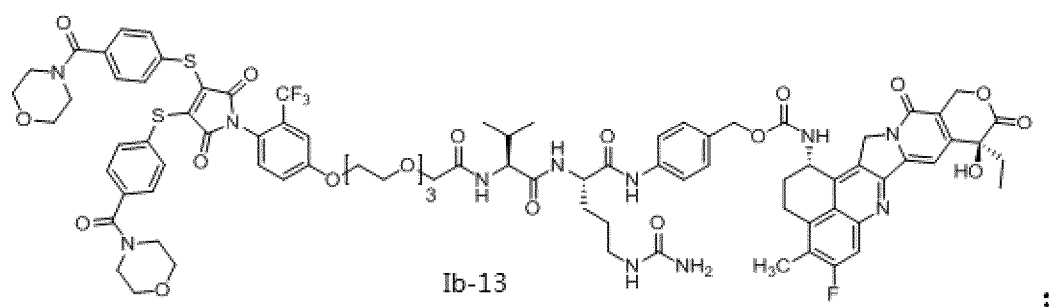
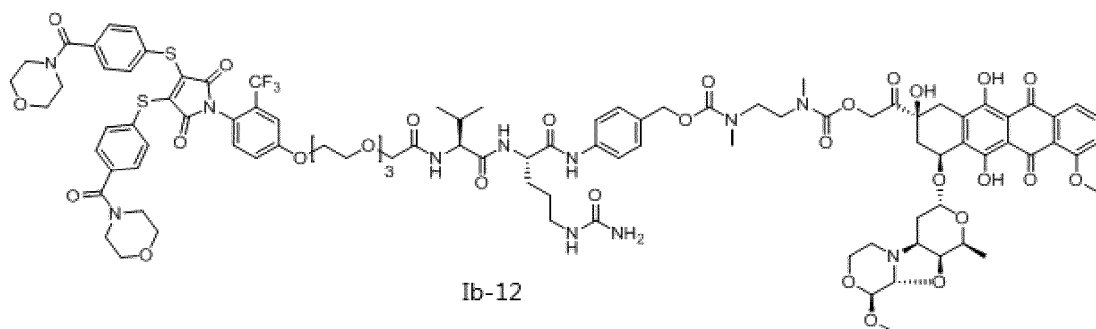


Ib-2

;









lb-17



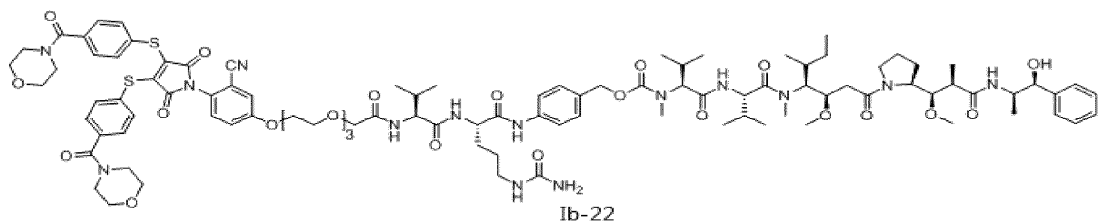
Ib-18



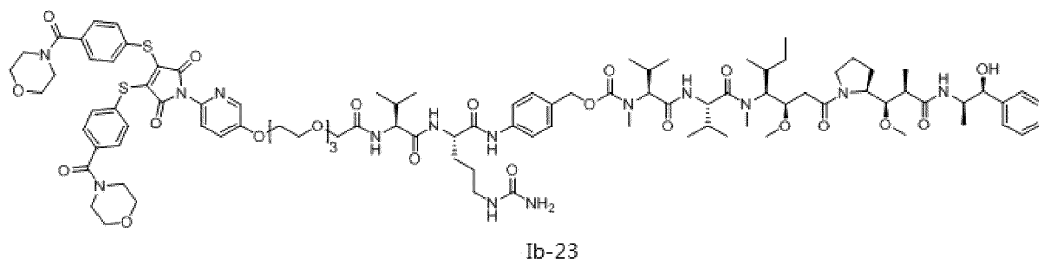
Ib-19

Ib-20

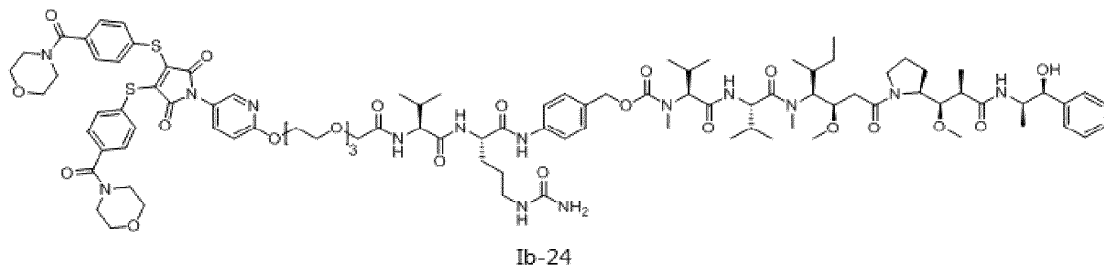
Ib-21



;



;

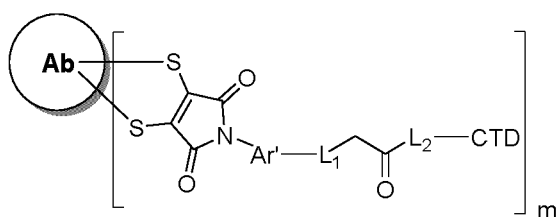


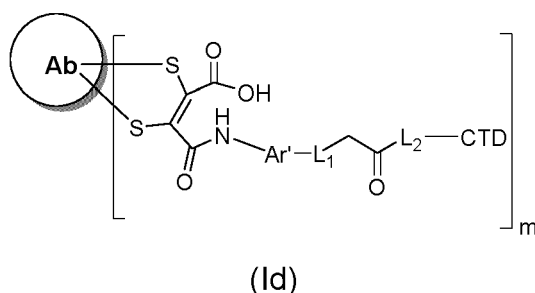
- 5 En el tercer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo y fármaco, formado acoplado un anticuerpo con el conjugado de enlazador de maleamida-fármaco sustituido como se muestra en la Fórmula Ib proporcionada en el segundo aspecto.

En otra realización preferida, el conjugado tiene uno o más componentes del fármaco enlazados covalentemente.

En otra realización preferida, el anticuerpo y el fármaco en el conjugado se conjugan covalentemente (p. ej., se enlazan covalentemente al enlazador respectivamente).

- 10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo y fármaco, que tiene una estructura como se muestra en la Fórmula Ic y/o la Fórmula Id:





en donde Ar', L₁, L₂ y CTD se definen como anteriormente;

m = 1,0-5,0, preferiblemente m = 3,0-4,2;

Ab se selecciona del grupo que consiste en proteína, enzima, anticuerpo, fragmento de anticuerpo y péptido.

- 5 En otra realización preferida, el conjugado que se muestra en la Fórmula Id es un producto tras la apertura del anillo de N-fenil maleamida en la Fórmula Ic.

En otra realización preferida, el anticuerpo o Ab se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo monoclonal, anticuerpo biespecífico, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado y fragmento de anticuerpo (preferiblemente fragmento Fab de un anticuerpo).

- 10 En otra realización preferida, el conjugado de anticuerpo y fármaco se obtiene como sigue: un enlace disulfuro en la región bisagra del anticuerpo o fragmento de anticuerpo se reduce a un par de restos de cisteína y los grupos sulfhidrilo en los restos de cisteína reaccionan con el sulfuro de arilo en la Fórmula Ib a través de sustitución, enlazando de este modo el conjugado enlazador-fármaco como se muestra en la Fórmula Ib al anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

- 15 En otra realización preferida, el CTD es un fármaco citotóxico de molécula pequeña, preferiblemente, es un inhibidor de la tubulina, inhibidor de topoisomerasa y agente de unión al ADN.

En otra realización preferida adicional, el inhibidor de tubulina se selecciona del grupo que consiste en maitansina o sus derivados, Monometil auristatina E (MMAE), Monometilauristatina F (MMAF), Monometil dolastatina 10, Tubulisina o sus derivados, Criptoficina o sus derivados y Taltobulina.

- 20 En otra realización preferida adicional, el agente de unión a ADN se selecciona del grupo que consiste en PBD o sus derivados y duocarmicina o sus derivados.

En otra realización preferida adicional, el inhibidor de topoisomerasa se selecciona del grupo que consiste en el metabolito PNU-159682 de Doxorubicina o sus derivados y el metabolito SN38 de irinotecán (CPT-11) o sus derivados.

- 25 En otra realización preferida, el anticuerpo es uno capaz de unirse a un antígeno asociado a tumores seleccionado del grupo que consiste en:

HER2	HER3	CD19	CD20
CD22	CD30	CD33	CD37
CD45	CD56	CD66e	CD70
CD74	CD79b	CD138	CD147
CD223	EpCAM	Mucina 1	STEAP 1
GNMB	FGF2	FOLR1	EGFR
EGFRvIII	Factor tisular (FT)	c-MET	Nectina 4
AGS-16	Guanilil ciclasa C	Mesotelina	SLC44A4
PSMA	EphA2	AGS-5	GPC-3
c-KIT	RoR1	PD-L1	CD27L
5T4	Mucina 16	NaPi2b	STEAP
SLITRK6	ETBR	BCMA	Trop-2
CEACAM5	SC-16	SLC39A6	Proteína 3 similar a delta (DLL3)
Claudina 18.2			

En otra realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo HER2, además preferiblemente Trastuzumab o Pertuzumab.

En otra realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo EGFR, además preferiblemente Erbitux o Vectibix.

En otra realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo del Factor tisular (TF).

En el cuarto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende: (a) el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención; y (b) un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 En el quinto aspecto, la presente invención proporciona el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera del tercer aspecto de la presente invención para su uso en el tratamiento de un tumor.

En otra realización preferida, el tumor se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovario, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda, linfoma anaplásico de células grandes, mieloma múltiple, cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, glioblastoma, carcinoma de células renales, tumor gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, neuroespongioma y mesotelioma.

Se describe en el presente documento un método para tratar un tumor, incluyendo el método una etapa siguiente: administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de anticuerpo y fármaco como se describe en el tercer aspecto de la presente invención.

- 15 En otra realización preferida, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

En el sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar el conjugado de anticuerpo y fármaco como se describe en el tercer aspecto de la presente invención, incluyendo el método las siguientes etapas:

- (1) hacer reaccionar un anticuerpo con un reactivo reductor en una solución tampón para obtener un anticuerpo reducido;
- 20 (2) reticular un conjugado de fármaco-enlazador con el anticuerpo reducido obtenido en la etapa (1) en una solución mixta de una solución tampón y una cierta cantidad de un disolvente orgánico para obtener el conjugado de fármaco y anticuerpo.

En la etapa (1), el reactivo reductor reduce los enlaces disulfuro entre cadenas en el anticuerpo para producir grupos sulfhidrido.

- 25 En otra realización preferida, el reactivo reductor se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), beta-mercaptoetanol, hidrocloreto de beta-mercaptoetilamina y ditiotreitól (DTT).

En otra realización preferida, la solución tampón se selecciona del grupo que consiste en dihidrógeno fosfato de potasio-hidróxido de sodio ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$)/cloruro de sodio (NaCl)/solución tampón de ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA); solución tampón de fosfato ácido de disodio-ácido cítrico/cloruro de sodio (NaCl)/ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA); solución tampón de ácido bórico-bórax/cloruro de sodio (NaCl)/ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA); solución tampón de histidina-hidróxido de sodio/cloruro de sodio (NaCl)/ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA); y solución tampón de PBS/ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA).

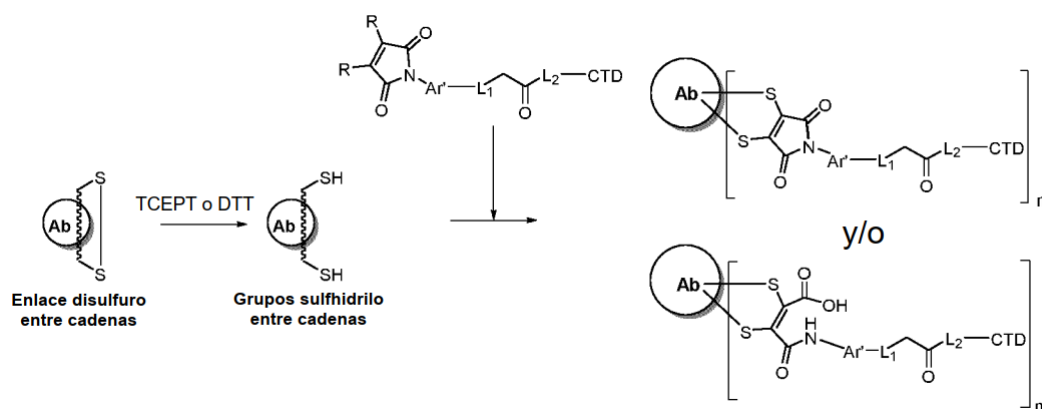
En otra realización preferida, en la etapa (2), el disolvente orgánico en la solución de reacción no supera el 15 % en volumen.

- 35 En otra realización preferida, el disolvente orgánico en la etapa (2) se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo (ACN), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA) y dimetilsulfóxido (DMSO).

En otra realización preferida, en la etapa (2), la reticulación se realiza a una temperatura de 0-37 °C.

En otra realización preferida, si el reactivo reductor usado en la etapa (1) se selecciona de beta-mercaptoetanol, hidrocloreto de beta-mercaptoetilamina o ditiotreitól (DTT), se incluye una etapa adicional después de la etapa (1) y antes de la etapa (2): pasar el producto a través de una columna de desalinización o someter el producto a ultrafiltración después de que se complete la reacción de reducción para retirar el exceso de reactivo reductor.

En otras realizaciones preferidas, el esquema de síntesis del método es el siguiente:



en donde R, Ab, Ar', L₁, L₂, CTD y m se definen como anteriormente.

En otra realización preferida, el método incluye las siguientes etapas:

- 1) Reducción: diluir una solución madre de anticuerpos a 2-10 mg/ml con una solución tampón, añadir una relación molar en exceso de 140-200x de ditioneitol (DTT) o una relación molar en exceso de 6,0-20x de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a la misma y agitar la solución de reacción obtenida a 10-35 °C durante 2-48 horas;
- 2) Acoplamiento: enfriar la solución de reacción obtenida de la etapa 1) a 0-10 °C, añadir un compuesto de maleimida sustituido a la misma y agitar a 0-37 °C durante 2-5 horas.

En otra realización preferida adicional, el método, después de que se complete la reacción de reducción de la etapa 1), incluye además una siguiente etapa: pasar el producto a través de una columna de desalinización o someter el producto a ultrafiltración para retirar el exceso de DTT, si se usa DTT como reactivo reductor en la etapa 1).

En otra realización preferida adicional, el compuesto de maleimida sustituido puede disolverse previamente en un disolvente orgánico y el disolvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo (ACN), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA); además preferiblemente, el compuesto de maleimida sustituida se disuelve con el disolvente orgánico hasta 10 mg/ml en él, mientras tanto, se garantiza que el disolvente orgánico en la solución de reacción no supere el 15 % en volumen.

En otra realización preferida adicional, el método, después de que se complete el acoplamiento de la etapa 2), incluye además una siguiente etapa: purificar la solución de reacción mediante filtración con succinato de sodio/solución tampón de NaCl o histidina-ácido acético/gel de sacarosa y recoger la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280.

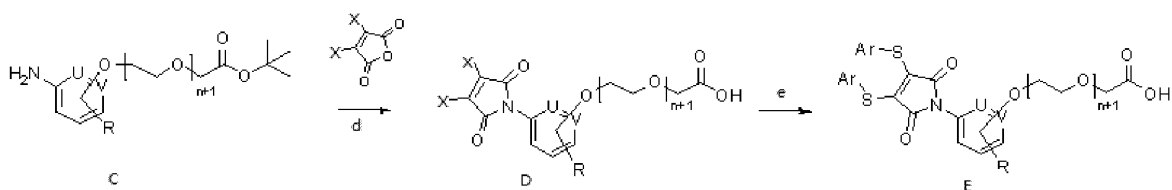
En otra realización preferida adicional, el método, después de que se complete el acoplamiento de la etapa 2), incluye además una siguiente etapa: someter la solución de reacción a ultrafiltración y esterilizar por filtración, antes de que el producto obtenido se almacene a baja temperatura; además preferiblemente, la temperatura de almacenamiento es de -100 a -60 °C; más además preferiblemente, un dispositivo utilizado para la ultrafiltración tiene un tamaño de poro de 0,15 a 0,3 µm.

En otra realización preferida, la etapa 1) se lleva a cabo usando TCEP para reducir, sin necesidad de retirar el exceso de TCEP.

En otra realización preferida, la solución tampón en la etapa 1) puede ser: dihidrogenofosfato potásico-hidróxido sódico 50 mM (KH₂PO₄-NaOH)/cloruro sódico 150 mM (NaCl)/ácido dietilentriamino pentacetato 1 mM (DTPA), pH 6-9; hidrogenofosfato disódico-ácido cítrico 50 mM/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/ácido dietilentriamino pentacetato 1 mM (DTPA), pH 6-9; ácido bórico-bórax 50 mM/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/ácido dietilentriamino pentacetato 1 mM (DTPA), pH 6-9; hidróxido de histidina-sodio 50 mM/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/ácido dietilentriamino pentacetato 1 mM (DTPA), pH 6-9; y PBS/ácido dietilentriamino pentacetato 1 mM (DTPA), pH 6-9.

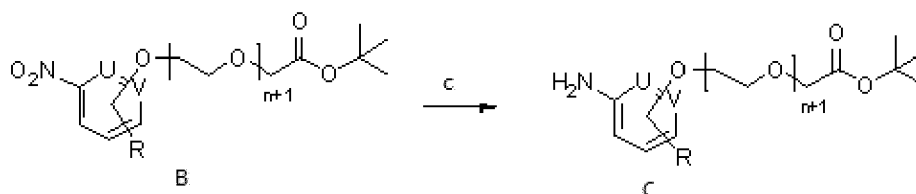
Los conjugados de anticuerpo y fármaco obtenidos tienen una proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) homogénea. Aunque, también pueden obtenerse conjugados de anticuerpo y fármaco con cierta diferencia en la homogeneidad preparándolos con diferentes enlazadores de maleimida sustituidos de la presente invención. Si se desean conjugados con mucha mejor homogeneidad, los conjugados de anticuerpo y fármaco obtenidos pueden aislarse y purificarse aún más mediante un método seleccionado de, pero no limitado a, los siguientes métodos: cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cromatografía de intercambio iónico (IEC).

En el séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar el enlazador de maleimida sustituida (Fórmula E, que es un ejemplo preferido de Fórmula Ia) proporcionado en el primer aspecto: realizar una reacción de ciclación del intermedio C y dihaluro de anhídrido maleico para generar el intermedio D y realizar una reacción de sustitución del intermedio D con aril tiofenol para generar un enlazador como se muestra en la fórmula E. El esquema de síntesis es el siguiente:



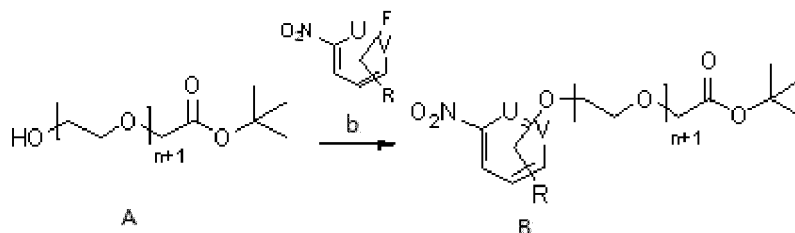
, en donde R y n se definen como anteriormente; X representa halógeno, preferiblemente Br o Cl; y U y V son independientemente N o C.

- 5 En otra realización preferida, el intermedio C puede obtenerse reduciendo el intermedio B y el esquema de síntesis es el siguiente:



en donde R, n, U y V se definen como anteriormente.

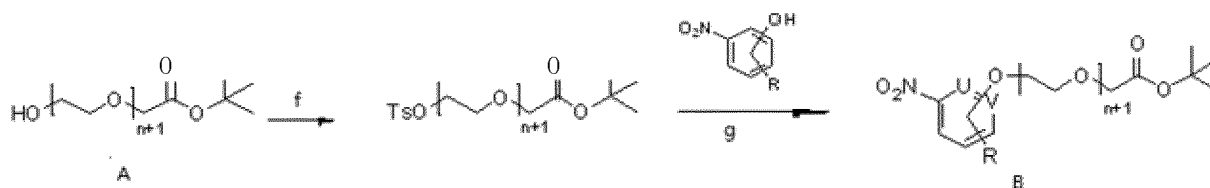
En otra realización preferida adicional, el intermedio B puede obtenerse mediante una reacción de sustitución del compuesto A con fluoronitrobenceno y el esquema de síntesis es el siguiente:



10

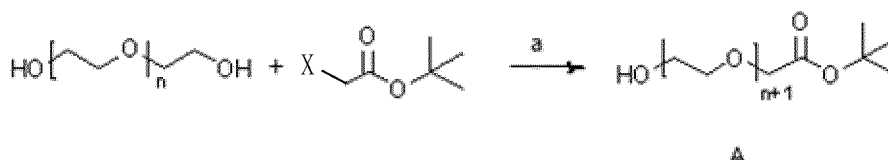
en donde R, n, U y V se definen como anteriormente.

En otra realización preferida adicional, el intermedio B puede prepararse mediante el siguiente esquema de síntesis:



, en donde R, n, U y V se definen como anteriormente.

- 15 En otra realización más preferida adicionalmente, el compuesto A se obtiene haciendo reaccionar n-etilenglicol con haloacetato de *tert*-butilo y el esquema de síntesis es el siguiente:

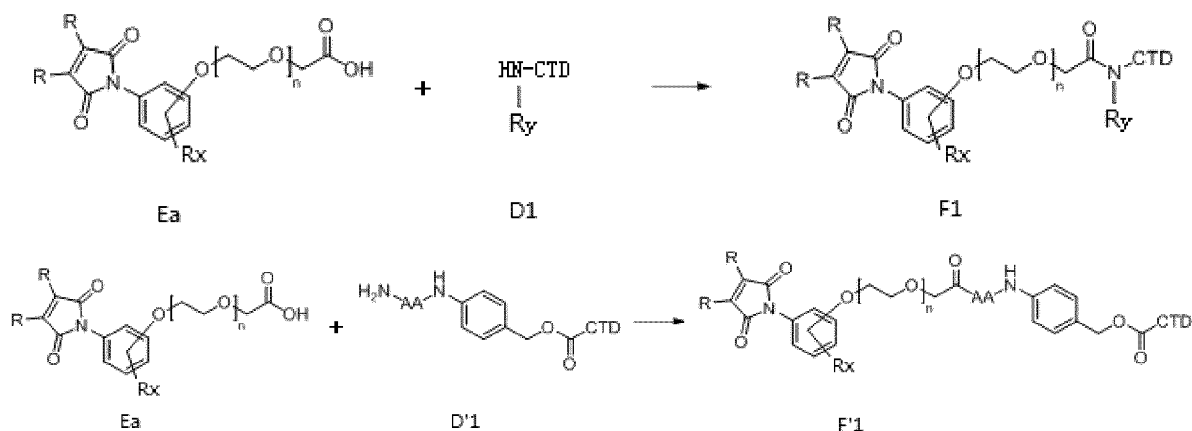


en donde n y X se definen como anteriormente.

- 20 En el octavo aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar el conjugado de fármaco-enlazador de maleimida sustituido (Fórmula F1 o F'1, que es un ejemplo preferido de Fórmula 1b) proporcionado en el segundo aspecto, incluyendo el método: realizar una reacción de condensación de un enlazador de maleimida sustituido (Fórmula Ea, que es un ejemplo preferido de Fórmula 1a) y CTD (un fármaco citotóxico) que contiene un dipéptido o

tripéptido-PAB para generar F1 o F'1 respectivamente.

Los esquemas de síntesis son los siguientes:



- 5 , en donde R se define como Fórmula Ia, Rx representa halógeno, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄, trifluorometilo, grupo ciano o amida, y Ry representa H o alquilo.

Después de haber realizado extensas e intensas investigaciones, los inventores descubrieron una clase de enlazadores que pueden acoplarse de forma cruzada con cadena ligera-cadena pesada y cadena pesada-cadena pesada de un anticuerpo en su totalidad o en parte. Por otra parte, en comparación con los conjugados tradicionales de anticuerpo y fármaco, los conjugados de anticuerpo y fármaco obtenidos mediante el método de conjugación anterior tienen una distribución de proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) más estrecha. Basándose en los descubrimientos anteriores, los inventores completaron la presente invención.

Definición

- 15 Como se emplea en esta memoria, a menos que se especifique otra cosa, la expresión "alquilo C₁-C₄" se refiere a un alquilo lineal o ramificado que contiene 1-4 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *tert*-butilo y similares.

La expresión "alcoxi C₁-C₄" se refiere a un alcoxi lineal o ramificado que contiene 1-4 átomos de carbono, tales como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, *tert*-butoxi y similares.

El término "halógeno" se refiere a F, Cl, Br o I.

- 20 La expresión "arilo C₆-C₁₀" se refiere a un arilo que contiene 6-10 átomos de carbono, tales como fenilo, naftilo y similares; y el arilo puede estar sustituido o no sustituido.

La expresión "heteroarilo de 5-12 miembros" o "heteroarileno de 5-12 miembros" se refiere a un heteroarilo o heteroarileno que contiene 5-12 átomos de carbono y uno o más (preferiblemente 1-3) heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, S y/o N, y se refiere heteroarilo o heteroarileno de 5-8 miembros. El heteroarilo o heteroarileno puede estar sustituido o no sustituido.

En la invención, la expresión ingrediente "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que es adecuada para su uso en seres humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y reacción alérgica), es decir, una sustancia que tiene una relación beneficio/riesgo razonable.

- 30 En la invención, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección diana o exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. La cantidad eficaz precisa para un sujeto dependerá del tamaño y la salud del sujeto, la naturaleza y el alcance de la afección y la terapia o combinación de terapias seleccionadas para la administración. Por lo tanto, no es útil especificar una cantidad eficaz exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad eficaz para una situación dada puede determinarse mediante experimentación de rutina y está dentro del juicio del médico.

- 35 A menos que se especifique otra cosa, todos los compuestos de la invención pretenden incluir todos los posibles isómeros ópticos, tales como compuestos quirales individuales o mezclas de diversos compuestos quirales (es decir, racematos). En los compuestos de la presente invención, cada átomo de carbono quiral puede estar opcionalmente en configuración R o configuración S, o la mezcla de configuración R y configuración S.

- 40 Como se emplea en esta memoria, la expresión "compuesto de la invención" se refiere a un compuesto como se muestra en la Fórmula I. El término también comprende diversas formas cristalinas, sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o solvatos del compuesto de Fórmula I.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales adecuadas para su uso como productos farmacéuticos que se forman mediante el compuesto de la presente invención con ácidos o bases. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales inorgánicas y orgánicas. Un tipo preferido de sales son las sales formadas por los compuestos de la presente invención con ácido. Los ácidos adecuados para formar sales incluyen, pero no se limitan a: ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fluorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; ácidos orgánicos, tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido pícrico, ácido metanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido bencenosulfónico y similares; y aminoácidos tales como ácido aspártico, ácido glutámico y similares.

A menos que se especifique otra cosa, el término "aminoácidos" como se emplea en esta memoria pretende incluir cualquier aminoácido convencional, tales como ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, asparagina, fenilalanina, glutamina, tirosina, serina, metionina, triptófano, glicina, valina, leucina, alanina, isoleucina, prolina, treonina, histidina, lisina y arginina.

Cuando se usa un nombre comercial en esta memoria, se pretende incluir de forma independiente la formulación del producto bajo el nombre comercial, fármaco genérico correspondiente y principio o principios farmacéuticos activos del producto bajo el nombre comercial.

El término "anticuerpo" en esta memoria se usa en su significado más amplio y abarca específicamente anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, dímero, multímero, anticuerpo multiespecífico (p. ej., anticuerpo biespecífico) y fragmento de anticuerpo, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170: 4854-4861). El anticuerpo puede ser un anticuerpo murino, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico o anticuerpo derivado de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5a Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana generalmente tiene numerosos sitios de unión, también llamados epítomos, reconocidos por las CDR en múltiples anticuerpos. Los anticuerpos que se unen específicamente a diferentes epítomos tienen estructuras diferentes. Por lo tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo puede comprender una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, contiene una molécula que se une inmunoespecíficamente a un antígeno o parte del mismo de una diana de interés, que incluye pero no se limita a células cancerosas o células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados a enfermedades autoinmunes. La inmunoglobulina descrita en el presente documento puede ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. La inmunoglobulina puede proceder de cualquier especie. En un aspecto, sin embargo, la inmunoglobulina deriva de humano, murino o conejo.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo de longitud completa, en general la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de un fragmento de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; minicuerpos (Olafsen et al (2004) Protein Eng. Design & Sel. 17(4):315-323); fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab; anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id); CDR (regiones determinantes de la complementariedad); y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos víricos o antígenos microbianos; moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.

El anticuerpo que constituye el conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención preferiblemente retiene la capacidad de unión al antígeno que tiene en su estado nativo, de tipo silvestre. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención son capaces de unirse, preferiblemente de forma específica, a los antígenos. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a tumores (TAA), proteínas receptoras de la superficie celular y otras moléculas de la superficie celular, factores reguladores de la supervivencia celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas (p. ej., conocidas o sospechadas de ser funcionales) asociadas al desarrollo o la diferenciación de tejidos, linfocinas, citocinas, moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular, moléculas implicadas en la vasculogénesis y moléculas asociadas a la vasculogénesis. Por ejemplo, un antígeno al que es capaz de unirse un anticuerpo conocido puede ser una o un subconjunto de las categorías mencionadas anteriormente y otros subconjuntos comprenden otras moléculas/antígenos que tienen características distintas (en comparación con el antígeno de interés).

Los anticuerpos usados en los conjugados de fármacos de anticuerpos incluyen, pero no limitado a, anticuerpos contra receptores de superficie celular y antígenos asociados a tumores. Dichos antígenos asociados a tumores son bien conocidos en la técnica, y sus anticuerpos pueden prepararse mediante métodos e información bien conocidos para la preparación de anticuerpos en la industria. Para descubrir dianas celulares eficaces útiles para el diagnóstico y la terapia del cáncer, los investigadores han tratado de identificar polipéptidos transmembrana o asociados a tumores que se expresen específicamente en la superficie de uno o más tipos de células cancerosas y menos o no expresados en uno o más tipos de células no cancerosas. A menudo, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente en la superficie de las células cancerosas en comparación con las células no cancerosas. La identificación de tales factores asociados al tumor puede mejorar en gran medida la orientación específica de las terapias contra el cáncer basadas en anticuerpos.

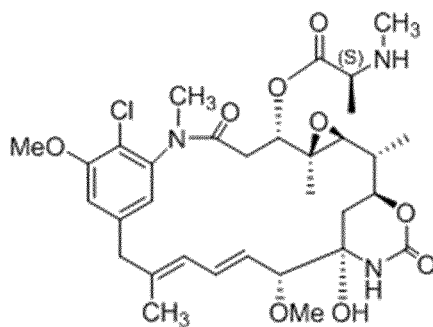
Los antígenos asociados a tumores incluyen, pero no se limitan a, antígenos asociados a tumores (1)-(53) enumerados a continuación. Por conveniencia, la información relevante para estos antígenos, todos ellos conocidos en la industria, se enumeran a continuación e incluyen nombre, nombre alternativo y número de registro de Genbank. Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas correspondientes a los antígenos asociados a tumores están disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank. Los antígenos asociados a tumores dirigidos correspondientemente por anticuerpos incluyen todas las variantes de secuencia de aminoácidos e isoformas que tienen al menos el 70 %, el 80 %, el 85 %, el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia en relación con las secuencias identificadas en las referencias citadas, o exhiben sustancialmente las mismas propiedades y características biológicas que los antígenos asociados a tumores que tienen secuencias encontradas en las referencias citadas.

(1) HER2 (ID de Gen: 2064, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, abreviado como HER2, también conocido como Neu, ErbB-2, CD340 (grupo de diferenciación 340) o p185), una proteína codificada por el gen ERBB2. HER2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ErbB); (2) HER3 (ID de Gen: 2065, receptor 3 del factor epidérmico (ErbB3/HER3), un miembro de la familia de receptores transmembrana del factor de crecimiento epidérmico. Se ha confirmado en los últimos años que ErbB3/HER3 está estrechamente relacionado con la aparición, recurrencia y metástasis, quimioterapia y terapia endocrina del cáncer de mama y se ha convertido en una diana candidata prometedora para el tratamiento; (3) CD19 (ID de Gen: 930); (4) CD20 (ID de Gen: 931); (5) CD22 (ID de Gen: 933); (6) CD30 (ID de Gen: 943); (7) CD33 (ID de Gen: 945); (8) CD37 (ID de Gen: 951); (9) CD45 (ID de Gen: 5788); (10) CD56 (ID de Gen: 4684); (11) CD66e (ID de Gen: 1048); (12) CD70 (ID de Gen: 970); (13) CD74 (ID de Gen: 972); (14) CD79b (ID de Gen: 974); (15) CD138 (ID de Gen: 6382); (16) CD147 (ID de Gen: 682); (17) CD223 (ID de Gen: 3902); (18) EpCAM (ID de Gen: 4072); (19) Mucina 1 (ID de Gen: 4582); (20) STEAP1 (ID de Gen: 26872); (21) GPNMB (ID de Gen: 10457); (22) FGF2 (ID de Gen: 2247); (23) FOLR1 (ID de Gen: 2348); (24) EGFR (ID de Gen: 1956); (25) EGFRvIII (GenBank: GM832119.1); (26) Factor tisular (TF) (ID de Gen: 2152); (27) c-MET (ID de Gen: 4233); (28) Nectina 4 (ID de Gen: 81607); (29) AGS-16; (30) Guanilil ciclasa C (ID de Gen: 2984); (31) Mesotelina (ID de Gen: 10232); (32) SLC44A4 (ID de Gen: 80736); (33) PSMA (ID de Gen: 2346); (34) EphA2 (ID de Gen: 1969); (35) AGS-5; (36) GPC-3 (ID de Gen: 2719); (37) c-KIT (ID de Gen: 3815); (38) RoR1 (ID de Gen: 4919); (39) PD-L1 (ID de Gen: 29126); (40) CD27L (ID de Gen: 970); (41) 5T4 (ID de Gen: 7162); (42) Mucina 16 (ID de Gen: 94025); (43) NaPi2b (ID de Gen: 10568); (44) STEAP (ID de Gen: 26872); (45) SLITRK6 (ID de Gen: 84189); (46) ETBR (ID de Gen: 1910); (47) BCMA (ID de Gen: 608); (48) Trop-2 (ID de Gen: 4070); (49) CEACAM5 (ID de Gen: 1048); (50) SC-16; (51) SLC39A6 (ID de Gen: 25800); (52) Proteína similar a delta3 (DLL3) (ID de Gen: 10683); (53) Claudina 18.2 (ID de Gen: 51208).

Como se emplea en esta memoria, el término "fármaco" se refiere a cualquier compuesto que posea una actividad biológica deseada y un grupo funcional reactivo disponible para preparar el conjugado de la invención. La actividad biológica deseada incluye actividad útil en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad en seres humanos u otros animales. Por lo tanto, siempre que tenga el grupo funcional reactivo necesario, el compuesto implicado en el término "fármaco" incluye fármacos identificados en la Farmacopea china oficial, así como, p. ej., Farmacopea Homeopática oficial de los Estados Unidos, o el Formulario Nacional oficial, o cualquiera de sus suplementos. Los medicamentos ilustrativos se establecen en la Physician's Desk Reference (PDR) y en el Libro naranja mantenido por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA). Continuamente se descubren y desarrollan nuevos fármacos, y la presente invención establece que esos nuevos fármacos también se incorporarán al "fármaco" de los conjugados de fármacos de la presente invención.

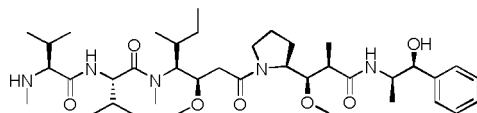
Preferiblemente, el fármaco es: un fármaco citotóxico para la terapia del cáncer; una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada, tal como una toxina, p. ej., abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas y toxina diftérica; cualquier otra proteína adecuada, incluyendo el factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento neuronal, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador tisular del plasminógeno y modificador de la respuesta biológica, por ejemplo, linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos, o cualquier otro factor de crecimiento.

Un fármaco preferido que puede usarse en la presente invención es maitansina o maitansinoides. La maitansina inhibe la proliferación celular al inhibir la formación de microtúbulos a partir de tubulinas. Los maitansinoides son derivados de la maitansina. Tanto la maitansina como los maitansinoides son altamente citotóxicos, pero tienen un uso clínico muy limitado en la terapia del cáncer debido a la baja selectividad por los tumores. Sin embargo, una alta citotoxicidad les permite ser fracciones de fármaco atractivas en ADC. La estructura que se muestra a continuación es desacetil-maitansina.

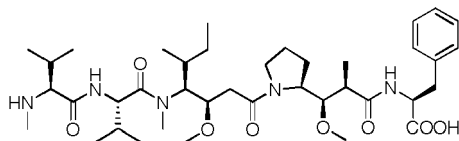


Desacetyl-maitansina

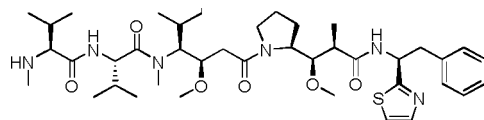
Otro fármaco preferido que puede usarse en la presente invención son las auristatinas. Las auristatinas son análogos sintéticos de la Dolastatina 10, que es un polipéptido aislado del molusco marino *Aplysia* y se descubrió que tiene actividad biológica. La Dolastatina 10 inhibe la polimerización de la tubulina al unirse a la tubulina en el mismo dominio que el fármaco contra el cáncer vincristina. Dolastatina 10, auristatina PE y auristatina E son todos péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, tres de los cuales son exclusivos de los compuestos de la clase dolastatina y un grupo amida C-terminal. Dos auristatinas representativas, monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF), son candidatos de resto de fármaco preferidos para ADC.



Monometil Auristatina E (MMAE)

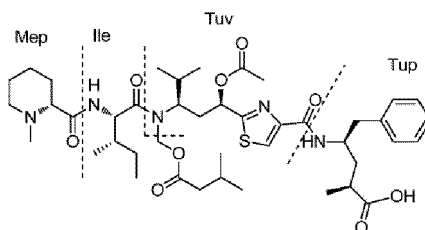


Monometil Auristatina F (MMAF)



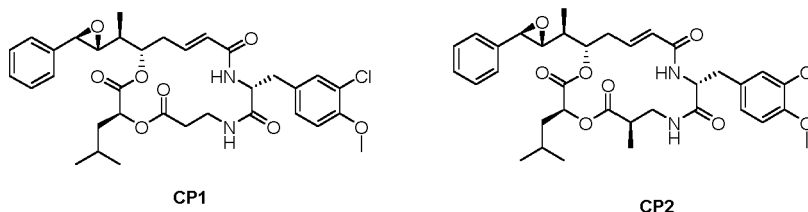
Monometil Dolastatina 10 (MMAD)

Aún otro fármaco preferido que puede usarse en la presente invención son las tubulisin. Las tubulisin, aisladas por primera vez por investigadores de cultivos mixobacterianos, son inhibidores del crecimiento celular excepcionalmente potentes que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina y, por lo tanto, inducen la apoptosis. La tubulina D es la más potente de las tubulisin, teniendo una actividad 10-1000 veces mayor que la mayoría de los otros modificadores de tubulina, incluyendo, epotilona, vinblastina y paclitaxel. El paclitaxel y la vinblastina son tratamientos actuales para una diversidad de cánceres y los derivados de la epotilona están bajo evaluación de actividad en ensayos clínicos. Los derivados sintéticos de la tubulina D proporcionarán información esencial sobre el mecanismo de inhibición y las interacciones de unión clave y, como agentes anticancerígenos, ya sea como entidades aisladas o como ojivas químicas en anticuerpos o ligandos específicos, puede tener propiedades superiores. La Tubulina D es un tetrapéptido complejo que se puede dividir en cuatro regiones, Mep (ácido D-N-metilpípecolínico), Ile (isoleucina), Tuv (tubuvalina) y Tup (tubufenilalanina), como se muestra en la fórmula:

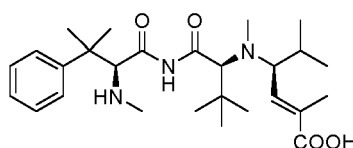


Todavía otro fármaco preferido que puede usarse en la presente invención son los derivados de criptoficina derivados de microbios que inhiben la polimerización de tubulina. La criptoficina es una novedosa sustancia activa antitumoral aislada del cultivo de cianobacterias, que puede inhibir la formación de microtúbulos y es activa contra una diversidad de tumores. La criptoficina es un compuesto liposoluble que contiene 2 enlaces peptídicos, 2 enlaces éster, 5 centros ópticamente activos y un grupo epoxi. Los dos enlaces peptídicos y los dos éster están en una estructura macrocíclica.

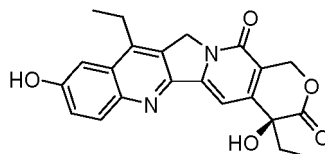
Las estructuras de los derivados de criptoficina CP1 y CP2 se muestran a continuación:



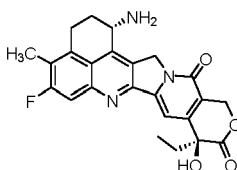
Otro fármaco preferido que puede usarse en la presente invención es un nuevo agente antimicrotúbulo Taltobulina (HTI-286, SPA-110). La taltobulina puede inhibir la multimerización de los microtúbulos purificados, interfiere con el tejido de microtúbulos intracelulares e induce el bloqueo de la mitosis y la apoptosis celular. La taltobulina es un potente inhibidor de la proliferación celular y tiene una CI50 promedio de 2,5 nM para 18 líneas de células tumorales humanas. La taltobulina no es un sustrato adecuado para la glucoproteína p en comparación con los agentes antimicrotúbulos usados tradicionalmente. La estructura de la Taltobulina se muestra de la siguiente manera:



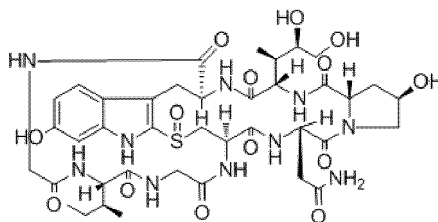
En un aspecto, el fármaco que puede usarse es SN-38, un derivado de las camptotecinas. SN-38 es un metabolito biológicamente activo del hidrocloreto de irinotecán (CPT-11), que pertenece a un inhibidor contra la topoisomerasa. SN-38 muestra una actividad inhibitoria más fuerte contra la topoisomerasa de ADN tipo I, inhibiendo la síntesis de ADN de forma dependiente de la dosis y del tiempo y provocando frecuentes roturas de cadena sencilla de ADN. La estructura de SN-38 se muestra de la siguiente manera:



En otro aspecto, el fármaco que puede usarse es Exatecán, un derivado de las camptotecinas. El Exatecán es un análogo sintetizado de la camptotecina, un inhibidor de la topoisomerasa tipo I, con una actividad más fuerte que SN-38. El Exatecán muestra una actividad inhibitoria más fuerte contra la topoisomerasa de ADN tipo I, inhibiendo la síntesis de ADN de forma dependiente de la dosis y del tiempo y provocando frecuentes roturas de cadena sencilla de ADN. La estructura del Exatecán se muestra de la siguiente manera:

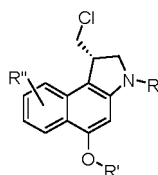


Otro fármaco preferido más que puede usarse en la presente invención son las amanitinas (alfa-Amanitina) con la estructura siguiente. La Alfa-Amanitina es una micotoxina de *Amanita phalloides*, que está formado por dos bucles que consisten en ocho péptidos y puede inhibir la transcripción de la ARN polimerasa II y la ARN polimerasa III eucariotas.

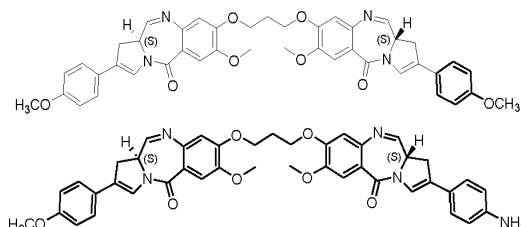


Todavía otro fármaco preferido que puede usarse en la presente invención son los antibióticos de benzodipirrol (duocarmicinas, CC-1065 y similares) y otros derivados de ciclopropapirrolind-4-ona (CPI), ambos de los cuales son potentes agentes alquilantes de unión al surco menor del ADN. Los análogos de ciclopropabenzindol-4-ona (CBI) son químicamente más estables, biológicamente más potentes y sintéticamente más fáciles que sus compuestos originales

que contienen subunidades alquilantes CPI nativas. Un derivado de CBI representativo es el derivado de CBI protegido con grupo hidroxilo fenólico (véase la fórmula a continuación), que ha disminuido la toxicidad del profármaco y ha mejorado la solubilidad en agua (la fórmula a continuación muestra la estructura general de los seco-CBI).

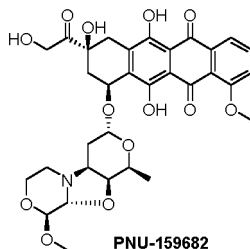


Todavía otro fármaco preferido que puede usarse en la presente invención son las pirrolo [2,1-c][1,4] benzodiazepinas (PBD) o dímeros de PBD. Las PBD son una familia de productos naturales producidos por especies de *Streptomyces* con la característica única de formar aductos covalentes no distorsionantes en el surco menor del ADN, específicamente en las secuencias purina-guanina-purina. Existe un interés creciente en el uso de PBD como parte de una estrategia de molécula pequeña para seleccionar y bloquear secuencias de ADN y también como novedosos agentes anticancerígenos y antibacterianos. El dímero, que se obtiene al unir dos unidades de PBD a través de sus funcionalidades C8/C8'-hidroxilo a través de un enlazador de alquileo flexible, ha aumentado la actividad biológica. Se cree que los dímeros de PBD conducen a lesiones de ADN selectivas de secuencia, como enlaces cruzados entre hebras 5'-Pu-GATC-Py-3' palindrómicos, lo que explica principalmente su actividad biológica. Se ha demostrado que estos compuestos son agentes citotóxicos muy útiles y buenos candidatos a fármacos para los ADC.



Dímeros de PBD

Todavía otro fármaco preferido que puede usarse en la presente invención es PNU-159682 o derivados del mismo. PNU-159682 es un metabolito activo principal de Nemorubicina en microsomas hepáticos humanos, con una actividad 3000 veces mayor en comparación con MMDX y doxorubicina.



PNU-159682

En otro aspecto, los fármacos no se limitan a las categorías mencionadas anteriormente e incluyen todos los que podrían usarse en ADC. Especialmente, los fármacos pueden incluir citotoxinas que, como las citotoxinas que tienen estructuras como se muestra en los anteriores D1-D12, son capaces de coordinarse con un enlazador a través de un enlace amida del enlazador, tal como a través de una amina básica (amina primaria o secundaria) poseída.

Según el mecanismo de liberación del fármaco en las células, los términos y expresiones "enlazador" o "enlazador ADC" pueden dividirse en dos tipos: enlazadores no escindibles y escindibles.

Para ADC con enlazadores no escindibles, el mecanismo de liberación del fármaco es que: cuando un ADC se internaliza en una célula después de unirse a un antígeno, el Ab se digiere enzimáticamente en los lisosomas, dando como resultado la liberación de una molécula activa compuesta con el fármaco de molécula pequeña, el enlazador y los restos de aminoácidos del anticuerpo. Este cambio en la estructura molecular del fármaco no disminuirá la citotoxicidad del fármaco. Una molécula activa tal está, sin embargo, cargada (debido a los restos de aminoácidos) y no puede difundirse en las células vecinas. Por tanto, dichos fármacos activos no pueden destruir las células tumorales adyacentes que no expresan el antígeno diana, es decir, células negativas al antígeno (efecto espectador).

Los enlazadores escindibles, como su nombre indica, podrían escindirse dentro de las células diana y después se liberan los fármacos activos (los propios fármacos de molécula pequeña). Los enlazadores escindibles pueden clasificarse en dos grupos principales: enlazadores químicamente lábiles y lábiles a enzimas. Los enlazadores químicamente lábiles podrían escindirse selectivamente según las propiedades diferenciales entre el plasma y el

citoplasma. Tales propiedades incluyen valor de pH, concentración de glutatión, etc. Los enlazadores sensibles al PH, generalmente se denominan enlazadores escindibles con ácido. Son relativamente estables en el ambiente neutro (pH 7,3-7,5) de la sangre, pero se hidrolizará en endosomas ligeramente ácidos (pH 5,0-6,5) y lisosomas (pH 4,5-5,0). La primera generación de ADC usó en su mayoría este tipo de enlazadores, como hidrazona, carbonato, acetal, cetal, etc. Sin embargo, debido a la estabilidad plasmática limitada de los enlazadores escindibles con ácido, los ADC basados en estos enlazadores tienen una semivida relativamente corta (2-3 días). La semivida más corta, hasta cierto punto, impide la aplicación de enlazadores sensibles al pH en las nuevas generaciones de ADC.

Los enlazadores sensibles al glutatión, también se denominan enlazadores de enlaces disulfuro. La liberación de fármacos de tales ADC basados en enlazadores se atribuye a la diferencia entre la alta concentración de glutatión dentro de una célula (intervalo milimolar) y la concentración relativamente baja de glutatión en la sangre (intervalo micromolar). Esto es especialmente cierto para las células tumorales, donde un estado de hipoxia da como resultado una mayor actividad de las enzimas reductoras y, por lo tanto, concentraciones de glutatión aún más altas. Los enlaces disulfuro son termodinámicamente estables y, por lo tanto, exhiben una buena estabilidad en el plasma.

Los enlazadores lábiles a enzimas, tales como enlazadores peptídicos, son capaces de lograr un mejor control de la liberación del fármaco. Los enlazadores peptídicos pueden escindirse eficazmente mediante proteasas lisosómicas, como Catepsina B o plasmina, presentes en niveles elevados en determinados tejidos tumorales. Se cree que este tipo de enlazadores peptídicos es muy estable en el plasma circulante, ya que las proteasas normalmente no son activas fuera de las células debido al pH desfavorable y la inhibición de los inhibidores de la proteasa sérica. Debido a la alta estabilidad del plasma y la buena selectividad y eficiencia de escisión intracelular, los enlazadores lábiles a enzimas se seleccionan ampliamente como candidatos a enlazadores escindibles en ADC. Los enlazadores lábiles a enzimas típicos incluyen Val-Cit (vc), Phe-Lys, etc.

Un enlazador autoinmolable generalmente se inserta entre el enlazador escindible y el fármaco activo, o él mismo es parte del enlazador escindible. El mecanismo de trabajo del enlazador autoinmolativo es que puede sufrir una reorganización estructural espontáneamente para liberar el fármaco activo unido a él cuando el enlazador escindible se escinde en condiciones adecuadas. Los enlazadores autoinmolantes generales incluyen alcohol p-aminobencílico (PAB) y β -glucuronidos, etc.

Enlazador

El enlazador o reactivo de acoplamiento de la presente invención comprende una unidad de diariltio maleamida y un grupo de acoplamiento. La unidad de diariltiomaleamida se usa para la reticulación con el sulfhidrilo en la cadena intermedia del anticuerpo (tras la reducción), mientras que el grupo de acoplamiento se usa para acoplarse con el fármaco de molécula pequeña o una unidad enlazadora de fármaco. En comparación con los ADC tradicionales con enlazador monodentado, los ADC de la presente invención son homogéneos y tienen una estabilidad más fuerte debida a la unión bidentada entre la unidad de diariltiomaleamida y los dos átomos de azufre del enlace disulfuro de cisteína-cisteína abierto en el anticuerpo. En este sentido, los ADC de la presente invención tendrán semivida *in vivo* aumentada, cantidad reducida de citotoxinas liberadas sistémicamente y tendrán propiedades farmacológicas más seguras que los ADC con enlazador monodentado.

En otro aspecto, las unidades enlazadoras de fármacos podrían acoplarse al anticuerpo a través de los enlazadores, produciendo conjugados parcialmente reticulados entre cadenas. En comparación con los tradicionales, los conjugados de anticuerpo y fármaco preparados mediante el método de la presente invención tienen una distribución de DAR mucho más estrecha y, por lo tanto, tienen homogeneidades estructurales y farmacológicas muy mejoradas.

Los ADC fabricados de esta manera pueden usarse en la administración dirigida de fármacos a poblaciones celulares de interés, por ejemplo, células tumorales. Los conjugados de anticuerpo y fármaco se unirán específicamente a las proteínas de la superficie celular y el complejo de unión se internalizará rápidamente en las células. Una vez internalizado, el fármaco se liberará en forma activa y producirá efectos. El anticuerpo incluye anticuerpo quimérico, humanizado o humano; fragmento de anticuerpo que puede unirse al antígeno; o proteína fusionada con Fc; o proteína. El "fármaco" es un fármaco muy potente (véase Definición) y podría ser polietilenglicol en algunos casos.

Conjugado de anticuerpo y fármaco

El conjugado de anticuerpo y fármaco proporcionado en esta invención está compuesto por anticuerpo, enlazador y fármaco. El enlazador puede ser un enlazador escindible o un enlazador no escindible.

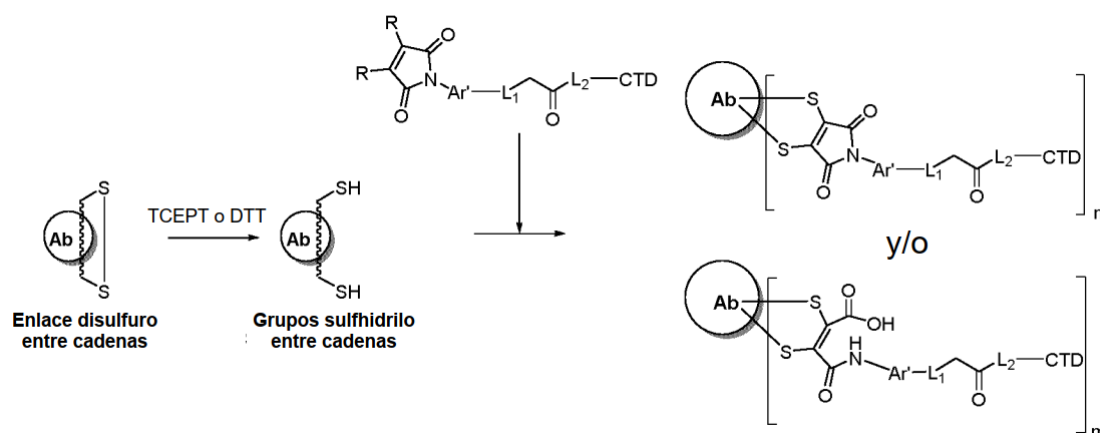
El anticuerpo es una proteína globular que tiene una serie de aminoácidos disponibles para la conjugación de fármaco-enlazador. Debido a las estructuras terciarias y cuaternarias del anticuerpo, solo los aminoácidos accesibles al disolvente serán conjugables. De hecho, la conjugación de alto rendimiento con el anticuerpo a menudo se produce en el grupo ϵ -amino del resto de lisina o en el grupo sulfhidrilo del resto de cisteína.

La gran cantidad de cadenas laterales de lisina en la superficie de la proteína de un anticuerpo proporciona múltiples sitios de enlace para la conjugación de fármacos, lo que conduce a una mezcla de ADC que contienen diferentes cantidades de fármacos conjugados (proporción de fármacos a anticuerpos, DAR) y sitios de conjugación.

El producto de conjugación proporcionado por la invención, aunque sigue siendo una mezcla, tiene una distribución DAR mucho más estrecha, en comparación con los conjugados de anticuerpo y fármaco producidos tradicionalmente. La DAR promedio obtenida es cercana a 4, dentro de un intervalo DAR optimizado de 2-4 de ADC. Además, el producto de conjugación no contiene o contiene un mínimo de anticuerpos desnudos (DAR = 0), que son ineficaces para matar células. También, el producto de conjugación no contiene anticuerpos fuertemente conjugados (DAR = 8), que se eliminarán más rápidamente que aquellos con valores bajos de DAR. Como resultado, el producto ADC proporcionado en la invención muestra una homogeneidad muy mejorada.

Método para preparar el conjugado de anticuerpo y fármaco

A continuación se muestra el esquema de síntesis del conjugado de anticuerpo y fármaco, desde donde puede verse que los enlaces disulfuro entre cadenas en el anticuerpo se reducen para generar 8 grupos sulfhidrilo y después el conjugado de fármaco enlazador de maleamida sustituido se reticula con los grupos sulfhidrilo del anticuerpo reducido para formar el conjugado de fármaco de anticuerpo correspondiente. El conjugado de anticuerpo y fármaco obtenido está presente en una o ambas formas como se muestra a continuación.



Una solución madre de anticuerpo se diluye a 2-10 mg/ml con una solución tampón y después una relación molar en exceso de 140-200x de ditioneitol (DTT) o una relación molar en exceso de 6,0-20x de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) se añade a la misma y la solución de reacción obtenida se agita a 10-35 °C durante 2-48 horas; en la presente memoria, la solución tampón usada puede ser una solución tampón preparada en las siguientes proporciones: dihidrogenofosfato potásico-hidróxido sódico 50 mM (KH₂PO₄-NaOH)/cloruro sódico 150 mM (NaCl)/ácido dietilentríamino pentacetato 1 mM (DTPA), pH 6-9; hidrogenofosfato disódico-ácido cítrico 50 mM/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/ácido dietilentríamino pentacetato 1 mM (DTPA), pH 6-9; ácido bórico-bórax 50 mM/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/ácido dietilentríamino pentacetato 1 mM (DTPA), pH 6-9; hidróxido de histidina-sodio 50 mM/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/ácido dietilentríamino pentacetato 1 mM (DTPA), pH 6-9; y PBS/ácido dietilentríamino pentacetato 1 mM (DTPA), pH 6-9.

La solución de reacción obtenida de lo anterior se enfría a 0-10 °C; y si se usa ditioneitol (DTT) como el reactivo reductor, el exceso de DTT se retira pasando el producto a través de una columna de desalinización o sometiendo el producto a ultrafiltración y después un compuesto de maleamida sustituido (10 mg/ml, predisoluto en acetonitrilo (ACN), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) o dimetilacetamida (DMA)) se añade a la misma. Se garantiza que el disolvente orgánico en la solución de reacción no supere el 15 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agita a 0-37 °C durante 2-4 horas para el acoplamiento. Además, si se usa TCEP para reducir, la reacción de acoplamiento puede llevarse a cabo añadiendo directamente el compuesto de maleamida sustituida sin necesidad de retirar el exceso de TCEP.

La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purifica por filtración con succinato de sodio/solución tampón NaCl o histidina-ácido acético/gel de sacarosa, y luego la muestra en el pico de absorción se recolecta de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. O, la solución de reacción se somete a ultrafiltración varias veces y después se esteriliza por filtración, antes de que el producto obtenido se almacene a baja temperatura. Preferiblemente, la temperatura de almacenamiento es de -100 a -60 °C; más preferiblemente, un dispositivo utilizado para la filtración tiene un tamaño de poro de 0,15 a 0,3 µm.

Los conjugados de anticuerpo y fármaco obtenidos tienen una proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) homogénea. Aunque, también pueden obtenerse conjugados de anticuerpo y fármaco con cierta diferencia en la homogeneidad preparándolos con diferentes enlazadores de maleamida sustituidos de la presente invención. Si se desean conjugados con mucha mejor homogeneidad, los conjugados de anticuerpo y fármaco obtenidos pueden aislarse y purificarse aún más mediante un método seleccionado de, pero no limitado a los siguientes métodos: cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cromatografía de intercambio iónico (IEC).

Composición farmacéutica y método de administración para la misma

El conjugado de anticuerpo y fármaco proporcionado por la presente invención puede dirigirse a una población celular específica y unirse a una proteína específica de la superficie celular (antígeno), liberando de esta manera el fármaco en la célula en una forma activa mediante endocitosis o infiltración del conjugado por el fármaco. Por lo tanto, el

- 5 conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención puede usarse para tratar enfermedades de interés y el conjugado de anticuerpo y fármaco mencionado anteriormente puede administrarse a un sujeto (p. ej., un ser humano) por una vía adecuada en una cantidad terapéuticamente eficaz. Un sujeto que necesita tratamiento puede ser un paciente con riesgo de tener o que se sospeche que tenga una afección asociada con la actividad o cantidad de expresión de un antígeno particular. Dichos pacientes pueden identificarse mediante un examen físico de rutina.
- 10 Los métodos convencionales, conocidos por aquellos con conocimientos ordinarios en la técnica de la medicina, pueden usarse para administrar la composición farmacéutica al sujeto, dependiendo del tipo de enfermedad a tratar o de dónde se encuentre la enfermedad. Una composición tal también puede administrarse por otras vías convencionales, p. ej., administrarse por vía oral, por vía parenteral, por pulverización de inhalación, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal o a través de un depósito implantado. El término "parenteral"
- 15 como se emplea en esta memoria incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasnovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal. Además, puede administrarse al sujeto a través de vías de administración de depósito inyectable, tal como usar materiales y métodos de depósito de 1, 3 o 6 meses inyectables o biodegradables.

- 20 Las composiciones inyectables pueden contener diversos vehículos tales como aceites vegetales, dimetilacetamida, dimetilformamida, lactato de etilo, carbonato de etilo, miristato de isopropilo, etanol y polioles (glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares). Para inyección intravenosa, los anticuerpos hidrosolubles pueden administrarse por método de goteo, mediante el cual se infunde una formulación farmacéutica que contiene un anticuerpo y un excipiente fisiológicamente aceptable. Los excipientes fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, dextrosa al 5 %, solución salina al 0,9 %, solución de Ringer u otros excipientes adecuados. Las preparaciones intramusculares, p. ej.,
- 25 una formulación estéril de una forma de sal soluble adecuada de un anticuerpo, pueden disolverse y administrarse en un excipiente farmacéutico tales como Agua para inyección, solución salina al 0,9 % o solución de glucosa al 5 %.

- 30 Cuando el conjugado de anticuerpo y fármaco como se describe en la presente memoria se usa como el agente terapéutico, puede administrarse mediante métodos convencionales en la técnica. Por ejemplo, puede introducirse en las células mediante liposomas, hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables o microesferas bioadhesivas. Como alternativa, los ácidos nucleicos o los vectores pueden administrarse localmente mediante inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. Otros enfoques incluyen el empleo de diversos sistemas de transporte y vehículo, mediante el uso de conjugados y polímeros biodegradables.

- 35 La composición farmacéutica de la presente invención contiene una cantidad segura y eficaz del conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, solución salina, tampón, glucosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. En general, una preparación farmacéutica debe coincidir con el método de administración, y la composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse como una inyección, por ejemplo, preparada mediante un método convencional usando una solución salina fisiológica o una solución acuosa que contiene glucosa y otros adyuvantes. La composición farmacéutica se fabrica preferiblemente en condiciones asépticas. La dosificación de administración
- 40 del principio activo es una cantidad terapéuticamente eficaz.

- 45 La cantidad eficaz del conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención puede variar dependiendo del modo de administración y la gravedad de la enfermedad a tratar. La elección de la cantidad eficaz preferida puede determinarse por un experto habitual en la técnica en función de diversos factores (p. ej., mediante ensayos clínicos). Tales factores incluyen, pero no se limitan a, parámetros farmacocinéticos del conjugado de anticuerpo bifuncional de la presente invención tales como biodisponibilidad, metabolismo, semivida, etc.; gravedad de la enfermedad a tratar en el paciente, peso del paciente y estado de inmunidad del paciente, vía de administración, etc. En general, cuando el conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención se administra a una dosis de aproximadamente 0,0001 mg a 50 mg/kg de peso corporal del animal (preferiblemente de 0,001 mg a 10 mg/kg de peso corporal del animal) por día, puede obtenerse un resultado satisfactorio. Por ejemplo, según lo requiera con urgencia la situación
- 50 terapéutica, pueden administrarse varias dosis separadas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente.

Las formas de dosificación del compuesto de la invención para administración tópica incluyen pomada, polvo, parche, aerosol e inhalante. El principio activo se mezcla con vehículos fisiológicamente aceptables y cualquier conservante, tampón o propulsor si es necesario, en condiciones estériles.

- 55 El compuesto de la invención puede administrarse solo o en combinación con otros agentes terapéuticos farmacéuticamente aceptables.

Cuando se usa la composición farmacéutica, se aplica una cantidad segura y eficaz del compuesto de la presente invención a un mamífero que lo necesita (tal como un ser humano), en el cual la cantidad aplicada es la cantidad farmacéuticamente eficaz. Para una persona de 60 kg de peso, la dosis diaria suele ser de 1-2000 mg, preferiblemente

de 5-500 mg. Por supuesto, la dosis particular también debe depender de otros factores, tales como la vía de administración, estado de salud del paciente, etc., que están dentro de la habilidad de un médico experto.

Los experimentos han demostrado que las principales ventajas de la presente invención son:

- 5 1. El enlazador novedoso proporcionado por la presente invención puede acoplarse con un anticuerpo a través de un método químico sencillo y la distribución de DAR de los conjugados obtenidos usando el enlazador es muy estrecha en comparación con los convencionales. En este sentido, los conjugados obtenidos por la presente invención tienen alta homogeneidad, en el cual los conjugados con distribución única (con DAR de 4) suponen más del 80 %.
- 10 2. Entre los conjugados proporcionados por la presente invención, los anticuerpos desnudos o los ADC que tienen un bajo grado de reticulación representan casi el cero por ciento (la espectrometría de masas no detecta ningún componente con un DAR de 0 o 1).
- 15 3. El solicitante ha demostrado con un gran número de experimentos que los conjugados de anticuerpo y fármaco proporcionados por la presente invención son seguros y eficaces en el tratamiento de tumores. La hidrofilia impartida por el etilenglicol conjugado puede usarse para regular las propiedades biomoleculares; y, en comparación con los conjugados mcVC-PAB tradicionales, la actividad inhibitoria sobre la proliferación de células tumorales *in vitro*, actividad biológica, estabilidad del metabolismo de fármacos, seguridad y otras farmacoabilidades de los conjugados de la presente invención, se mejoran o se mantienen.
- 20 4. El método de conjugación proporcionado por la presente invención es adecuado para la mayoría de los anticuerpos, que puede evitar la realización de tediosas recombinaciones y modificaciones de cada anticuerpo con el fin de introducir sitios de conjugación dirigidos al sitio y, por lo tanto, tiene una amplia perspectiva de aplicación.
- 25 5. En comparación con los métodos de conjugación de la técnica anterior, el método de conjugación que usa un agente de reticulación basado en maleamida para puentear enlaces disulfuro de la presente invención tiene ventajas que incluyen: la velocidad de reticulación es rápida y la reacción de reticulación puede completarse en 2-4 horas.
6. El puente de enlace disulfuro basado en maleamida tiene una mejor estabilidad, que es menos propenso al intercambio de sulfhidrido-éter en el cuerpo. Y lo que es más, en comparación con el fenilo no sustituido, la introducción de un sustituyente en Ar' puede ralentizar en gran medida la reacción de hidrólisis secundaria que se produce después de que se abre el anillo de la maleimida y, por lo tanto, mejorar aún más la estabilidad del conjugado de anticuerpo y fármaco *in vitro* e *in vivo*.

La presente invención se ilustrará adicionalmente a continuación con referencia a ejemplos específicos. Debe entenderse que estos ejemplos son solo para ilustrar la invención pero no para limitar el alcance de la invención. Si algún método de experimento en los siguientes ejemplos no está especificado por las condiciones detalladas del experimento, debe ajustarse a las condiciones normales, o a aquellas condiciones sugeridas por el fabricante o fabricantes. A menos que se indique otra cosa, las partes y porcentajes se calculan en peso.

Breve descripción de los dibujos

35 La **Figura 1** muestra cromatogramas de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de pertuzumab y conjugado de fármaco de pertuzumab para comparación;

La **Figura 2** muestra cromatogramas de espectro de masas de Pertuzumab y conjugado de fármaco de Pertuzumab para comparación;

La **Figura 3** muestra los resultados del experimento de unión de ADC-2, P-mcVC-MMAE y Pertuzumab contra el antígeno Her 2 en la superficie de células NCI-N87;

40 La **Figura 4** muestra los resultados del experimento de inhibición de la proliferación de ADC-2, P-mcVC-MMAE, Kadcyla y Pertuzumab en células de cáncer de mama humano SK-BR-3;

La **Figura 5** muestra los resultados del experimento de inhibición de la proliferación de ADC-2, P-mcVC-MMAE, Kadcyla y Pertuzumab en células de cáncer de mama humano BT-474;

45 La **Figura 6** muestra los resultados del experimento de inhibición de la proliferación de ADC-2, P-mcVC-MMAE, Kadcyla y Pertuzumab en células de cáncer gástrico humano N87;

La **Figura 7** muestra los resultados del experimento de inhibición de la proliferación de ADC-2 en células de cáncer de ovario humano SKOV-3, células de cáncer de próstata humano Du-145 y células de cáncer de páncreas humano Panc-1;

50 La **Figura 8** muestra los resultados del experimento de inhibición de la proliferación de ADC-2 en células de cáncer de mama humano MCF-7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468;

La **Figura 9-1** muestra los resultados del experimento de inhibición de la proliferación de ADC-4 en células de cáncer

gástrico humano N87;

La **Figura 9-2** muestra los resultados del experimento de inhibición de la proliferación de ADC-2, ADC-3 y ADC-4 en células de cáncer de pulmón humano Calu-3;

5 La **Figura 10** muestra los resultados del estudio sobre la actividad de inhibición de ADC-2, ADC-3, P-mcVC-MMAE y Kadcyla en tumor de xenoinjerto subcutáneo NCI-N87 de cáncer gástrico humano en ratones desnudos;

La **Figura 11-1** muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de Pertuzumab;

La **Figura 11-2** muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) del conjugado ADC-I de pertuzumab-fármaco;

10 La **Figura 11-3** muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) del conjugado ADC-II de pertuzumab-fármaco;

La **Figura 11-4** muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) del conjugado ADC-III de pertuzumab-fármaco;

La **Figura 11-5** muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) del conjugado ADC-IV de pertuzumab-fármaco;

15 La **Figura 11-6** muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) del conjugado ADC-V de pertuzumab-fármaco;

La **Figura 11-7** muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) del conjugado ADC-VI de pertuzumab-fármaco;

20 La **Figura 11-8** muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) del conjugado ADC-VII de pertuzumab-fármaco;

La **Figura 12-1** muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de Trastuzumab;

La **Figura 12-2** muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) del conjugado ADC-VIII de Trastuzumab-fármaco;

La **Figura 13-1** muestra un cromatograma de espectro de masas de Pertuzumab;

25 La **Figura 13-2** muestra un cromatograma de espectro de masas del conjugado ADC-I de Pertuzumab-fármaco;

La **Figura 13-3** muestra un cromatograma de espectro de masas del conjugado ADC-II de Pertuzumab-fármaco;

La **Figura 13-4** muestra un cromatograma de espectro de masas del conjugado ADC-III de Pertuzumab-fármaco;

La **Figura 13-5** muestra un cromatograma de espectro de masas del conjugado ADC-IV de Pertuzumab-fármaco;

La **Figura 13-6** muestra un cromatograma de espectro de masas del conjugado ADC-V de Pertuzumab-fármaco;

30 La **Figura 13-7** muestra un cromatograma de espectro de masas del conjugado ADC-VI de Pertuzumab-fármaco;

La **Figura 13-8** muestra un cromatograma de espectro de masas del conjugado ADC-VII de Pertuzumab-fármaco;

La **Figura 14-1** muestra un cromatograma de espectro de masas de Trastuzumab;

La **Figura 14-2** muestra un cromatograma de espectro de masas del conjugado ADC-VIII de Trastuzumab-fármaco;

35 La **Figura 15** muestra un gráfico de tendencia de los hidrolizados secundarios producidos por el control ADC, ADC-I, ADC-II y ADC-VII, que se detectan usando CL-EM (Q-TOF) el día 0-7 a temperatura ambiente;

La **Figura 16-1** muestra un cromatograma HIC del control ADC el día 0 a temperatura ambiente;

La **Figura 16-2** muestra un cromatograma HIC del control ADC el día 2 a temperatura ambiente;

La **Figura 16-3** muestra un cromatograma HIC del control ADC el día 4 a temperatura ambiente;

La **Figura 16-4** muestra un cromatograma HIC del control ADC el día 7 a temperatura ambiente;

40 La **Figura 17-1** muestra un cromatograma HIC de ADC-I el día 0 a temperatura ambiente;

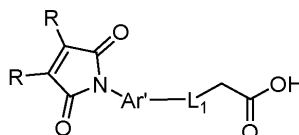
La **Figura 17-2** muestra un cromatograma HIC de ADC-I el día 2 a temperatura ambiente;

- La **Figura 17-3** muestra un cromatograma HIC de ADC-I el día 4 a temperatura ambiente;
- La **Figura 17-4** muestra un cromatograma HIC de ADC-I el día 7 a temperatura ambiente;
- La **Figura 18-1** muestra un cromatograma HIC de ADC-II el día 0 a temperatura ambiente;
- La **Figura 18-2** muestra un cromatograma HIC de ADC-II el día 2 a temperatura ambiente;
- 5 La **Figura 18-3** muestra un cromatograma HIC de ADC-II el día 4 a temperatura ambiente;
- La **Figura 18-4** muestra un cromatograma HIC de ADC-II el día 7 a temperatura ambiente;
- La **Figura 19-1** muestra un cromatograma HIC de ADC-VII el día 0 a temperatura ambiente;
- La **Figura 19-2** muestra un cromatograma HIC de ADC-VII el día 2 a temperatura ambiente;
- La **Figura 19-3** muestra un cromatograma HIC de ADC-VII el día 4 a temperatura ambiente;
- 10 La **Figura 19-4** muestra un cromatograma HIC de ADC-VII el día 7 a temperatura ambiente;
- La **Figura 20** muestra los resultados del experimento de inhibición de la proliferación de ADC-I, ADC-II, ADC-III, ADC-IV, ADC-V, ADC-VI, ADC-VII y Pertuzumab (Perjeta) en células de cáncer gástrico humano NIC-N87;
- La **Figura 21** muestra los resultados del experimento de inhibición de la proliferación de ADC-I, ADC-II, ADC-III, ADC-IV, ADC-V, ADC-VI, ADC-VII y Pertuzumab (Perjeta) en células de cáncer de mama humano BT-474;
- 15 La **Figura 22** muestra los resultados del experimento de inhibición de la proliferación de ADC-VIII y Trastuzumab (Herceptina) en células de cáncer gástrico humano NIC-N87;
- La **Figura 23** muestra los resultados del experimento de inhibición de la proliferación de ADC-VIII y Trastuzumab (Herceptina) en células de cáncer de mama humano BT-474;
- 20 La **Figura 24** muestra los resultados del estudio en la actividad de inhibición de P-mcVC-MMAE (1,0 mg/kg), control ADC (0,5, 1,0 mg/kg), ADC-I (1,0 mg/kg), ADC-IV (1,0 mg/kg), ADC-V (1,0 mg/kg), ADC-VI (1,0 mg/kg) y ADC-VII (0,5, 1,0 mg/kg) en tumor de xenoinjerto subcutáneo de cáncer gástrico humano NCI-N87 en ratones desnudos.

Descripción detallada de las realizaciones

- 25 Después de haber realizado extensas e intensas investigaciones, los inventores descubrieron una clase de enlazadores que pueden acoplarse de forma cruzada con cadena ligera-cadena pesada y cadena pesada-cadena pesada de un anticuerpo en su totalidad o en parte. Por otra parte, en comparación con los conjugados tradicionales de anticuerpo y fármaco, los conjugados de anticuerpo y fármaco obtenidos mediante el método de conjugación anterior tienen una distribución de proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) más estrecha. Basándose en los descubrimientos anteriores, los inventores completaron la presente invención.

- 30 **Uno de los diseños específicos:** preparación y uso del enlazador de maleamida sustituida como se muestra en la fórmula Ia, en donde Ar' se selecciona del grupo que consiste en arileno C₆-C₁₀ no sustituido y heteroarileno de 5-12 miembros no sustituido.

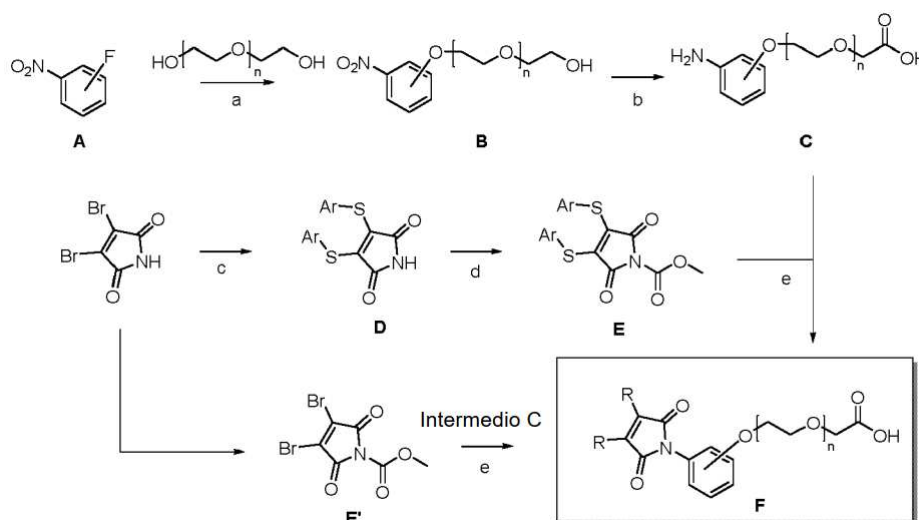


(Ia)

Sección 1: Métodos de síntesis y preparación del enlazador

Solución 1:

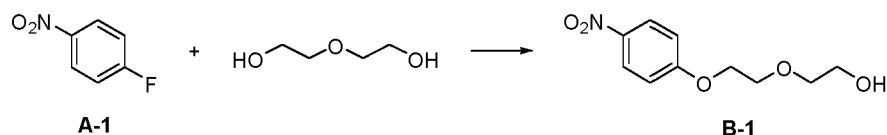
- 35 El enlazador de maleamida sustituido como se muestra en la fórmula Ia, que se proporciona en el primer aspecto de la presente invención, puede sintetizarse mediante el método enumerado en la Solución 1. Específicamente, el intermedio B puede obtenerse a través de una reacción de sustitución entre n-etilenglicol y fluoronitrobenceno, en el cual el nitro se reduce posteriormente para generar el compuesto amino C; el intermedio D puede obtenerse mediante una reacción de sustitución entre 2,3-dibromomaleimida y ariltiofenol y después se hace reaccionar con cloroformiato de metilo para generar el intermedio E; de manera alternativa, la 2,3-dibromomaleimida puede reaccionar directamente con cloroformiato de metilo para generar el intermedio E'; y el intermedio C se hace reaccionar con el intermedio E o el intermedio E' para generar el enlazador F. El esquema de síntesis y los ejemplos específicos son como sigue:
- 40



Ejemplo 1: Síntesis y preparación de compuestos como se muestra en las Fórmulas 1-12

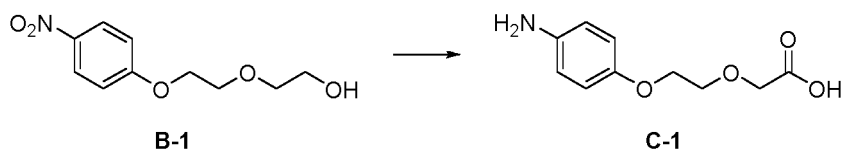
1.1 Síntesis del compuesto F-1 (Fórmula 1)

1.1.1 Síntesis del intermedio B-1 (etapa a)



4-Fluoronitrobenzene (10,0 g, 0,071 mol), dietilenglicol (75,2 g, 0,71 mol) y carbonato potásico (14,7 g, 0,11 mol) se pesaron y se colocaron en un matraz de fondo redondo de 250 ml y se agitaron durante 22 horas a 80 °C bajo la protección de nitrógeno. La mezcla obtenida después se enfrió lentamente a temperatura ambiente, se extrajo con diclorometano, se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico diluido 1 mol/l, agua y agua salada saturada y se secó con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se sometió a cromatografía en columna (gel de sílice, malla 200-300, PE/EtOAC 10:1) para obtener un producto líquido transparente amarillo claro (15,1 g, 94 % de rendimiento). Valor teórico a través de CL-EM (M +): 227,08 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 228,12.

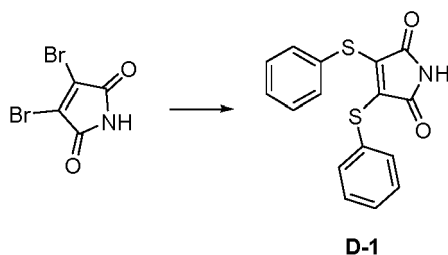
1.1.2 Síntesis del intermedio C-1 (etapa b)



El intermedio B-1 (3,0 g, 9,52 mmol) se disolvió en acetona (30 ml) y se enfrió en agua helada y después se vertió lentamente en el mismo un reactivo de Jones recién preparado (15 ml). La mezcla de reacción obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, se enfrió en agua helada seguido de vertido lento de isopropanol y después se agitó durante 15 minutos en un baño de agua helada. Posteriormente el disolvente orgánico se retiró por evaporación rotatoria. La fase acuosa se extrajo tres veces con éter dietílico y después las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua salada saturada y se secaron con sulfato sódico anhidro y el disolvente que contenía se retiró por evaporación rotatoria. El producto bruto oleaginoso amarillo obtenido se usó en la siguiente etapa directamente sin ser purificado.

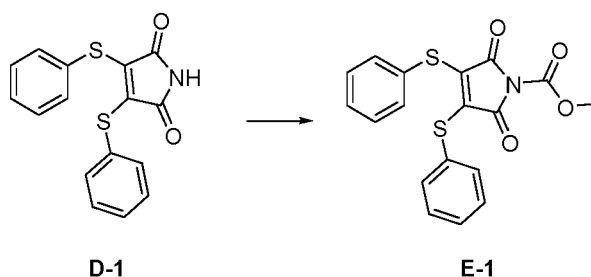
El producto bruto obtenido se disolvió en tetrahidrofurano (30 ml) y después se añadió al mismo paladio sobre carbono al 10 % (300 mg) para permitir una hidrogenación a 30 °C durante 6 horas. Después de retirar el catalizador por filtración por succión, el disolvente se retiró por evaporación rotatoria para dar un producto bruto oleaginoso amarillo parduzco, que se usó en la siguiente etapa directamente sin ser purificado. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 211,08 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 212,05.

1.1.3 Síntesis del intermedio D-1 (etapa c)



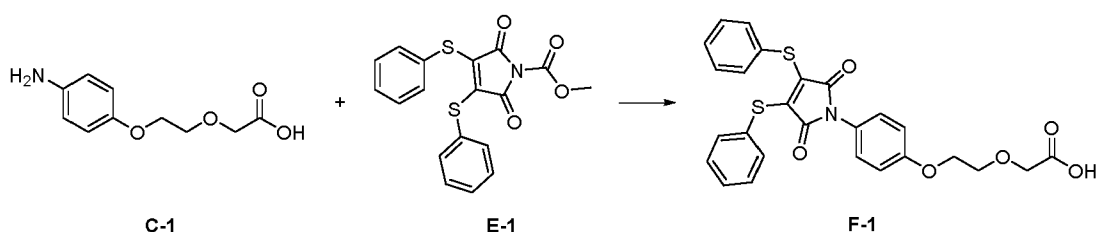
Se disolvió 2,3-dibromomaleimida (7,0 g, 27,69 mmol) en metanol (80 ml) y se le añadieron acetato de sodio (4,5 g, 55,4 mmol) y tiofenol (11,3 ml, 110,7 mmol). La mezcla de reacción obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después el disolvente orgánico se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se extrajo con diclorometano, se lavó sucesivamente con agua y agua salada saturada y se secó con sulfato sódico anhidro y después el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El producto bruto obtenido se cocrystalizó con éter de petróleo/acetato de etilo, se filtró por succión y se secó para obtener un sólido amarillo brillante D-1 (6,5 g, 75 % de rendimiento).

1.1.4 Síntesis del intermedio E-1 (etapa d)



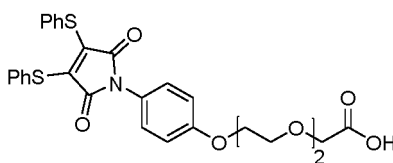
El intermedio D-1 (3,0 g, 9,6 mmol) y N-metilmorfolina (1,37 ml, 12,5 mmol) se disolvieron en acetato de etilo (40 ml) y se enfriaron en agua con hielo seguido de cloroformato de metilo vertido lentamente (1,11 ml, 14,4 mmol) al mismo. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se extrajo con agua añadida, se lavó sucesivamente con agua y agua salada saturada y se secó con sulfato sódico anhidro y después el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El producto bruto obtenido se cocrystalizó con éter de petróleo/acetato de etilo, se filtró por succión y se secó para obtener un sólido amarillo brillante E-1 (3,5 g, 98 % de rendimiento).

1.1.5 Síntesis del intermedio F-1 (etapa e)



El intermedio C-1 (2,0 g, 9,5 mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (40 ml) y después se añadió al mismo el intermedio E-1 (3,5 g, 9,5 mmol). La mezcla de reacción obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas bajo la protección de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche después de la adición de gel de sílice (12 g, malla 200-300). Después el disolvente se retiró por evaporación rotatoria y el residuo se sometió a cromatografía en columna seca (gel de sílice, malla 200-300, diclorometano/metanol 10:1) para obtener F-1, que era un producto oleaginoso naranja (4,1 g, 85 % de rendimiento). Valor teórico a través de CL-EM (M +): 507,08 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H+): 508,11.

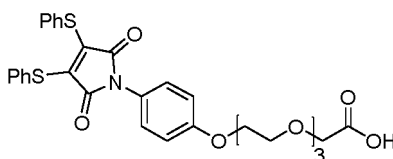
1.2 Síntesis del compuesto F-2 (Fórmula 2)



F-2

El compuesto F-2 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-1 del Ejemplo 1.1, con la excepción de que el dietilenglicol en la etapa a se cambió por trietilenglicol. El producto F-2 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 551,11 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 552,13.

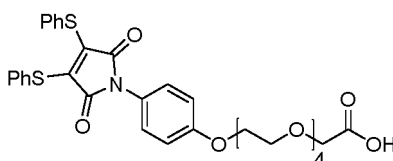
1.3 Síntesis del compuesto F-3 (Fórmula 3)



F-3

El compuesto F-3 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-1 del Ejemplo 1.1, con la excepción de que el dietilenglicol en la etapa a se cambió por tetraetilenglicol. El producto F-3 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 595,13 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 596,14.

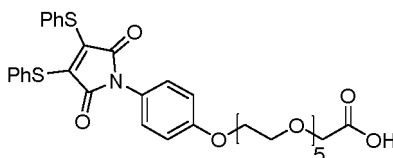
1.4 Síntesis del compuesto F-4 (Fórmula 4)



F-4

El compuesto F-4 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-1 del Ejemplo 1.1, con la excepción de que el dietilenglicol en la etapa a se cambió por pentaetilenglicol. El producto F-4 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 639,16 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 640,18.

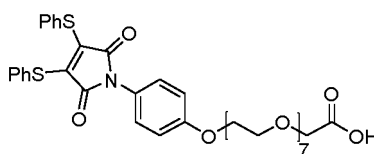
1.5 Síntesis del compuesto F-5 (Fórmula 5)



F-5

El compuesto F-5 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-1 del Ejemplo 1.1, con la excepción de que el dietilenglicol en la etapa a se cambió por hexaetilenglicol. El producto F-5 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 683,19 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 684,21.

1.6 Síntesis del compuesto F-6 (Fórmula 6)

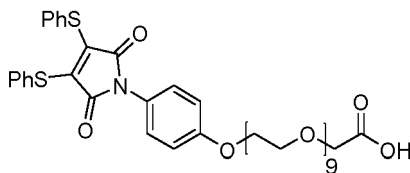


F-6

El compuesto F-6 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-1 del Ejemplo 1.1, con la

excepción de que el dietilenglicol en la etapa a se cambió por octaetilenglicol. El producto F-6 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 771,24 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 772,26.

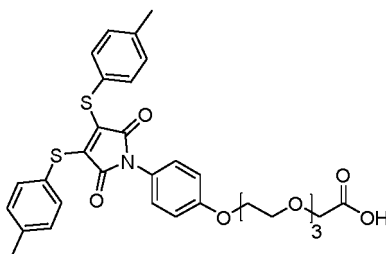
1.7 Síntesis del compuesto F-7 (Fórmula 7)



F-7

El compuesto F-7 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-1 del Ejemplo 1.1, con la excepción de que el dietilenglicol en la etapa a se cambió por decaetilenglicol. El producto F-7 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 895,29 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 896,31.

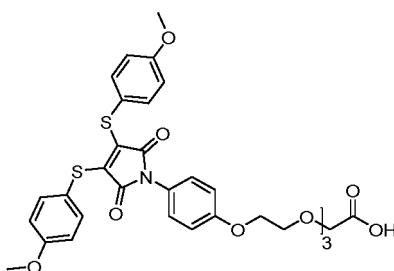
1.8 Síntesis del compuesto F-8 (Fórmula 8)



F-8

El compuesto F-8 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-3 del Ejemplo 1.3, con la excepción de que el tiofenol en la etapa c se cambió por p-metiltiofenol. El producto F-8 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 623,16 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 624,18.

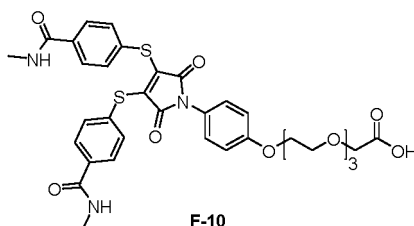
1.9 Síntesis del compuesto F-9 (Fórmula 9)



F-9

El compuesto F-9 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-3 del Ejemplo 1.3, con la excepción de que el tiofenol en la etapa c se cambió por p-metoxitiofenol. El producto F-9 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 655,15 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 656,17.

1.10 Síntesis del compuesto F-10 (Fórmula 10)

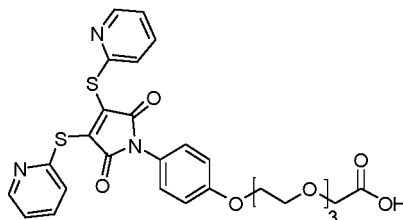


F-10

El compuesto F-10 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-3 del Ejemplo 1.3, con la

excepción de que el tiofenol en la etapa c se cambió por 4-(N-metilformamida) tiofenol. El producto F-10 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 709,18 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 710,23.

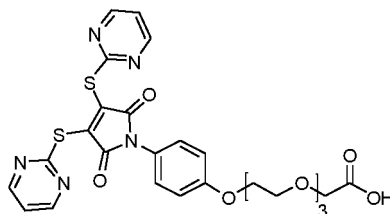
1.11 Síntesis del compuesto F-11 (Fórmula 11)



F-11

El compuesto F-11 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-3 del Ejemplo 1.3, con la excepción de que el tiofenol en la etapa c se cambió por 2-mercaptopiridina. El producto F-11 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 597,12 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 598,13.

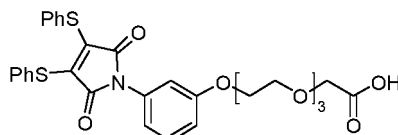
1.12 Síntesis del compuesto F-12 (Fórmula 12)



F-12

El compuesto F-12 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-3 del Ejemplo 1.3, con la excepción de que el tiofenol en la etapa c se cambió por 2-mercaptopirimidina. El producto F-12 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 599,11 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 600,13.

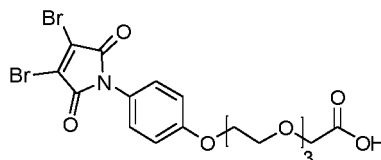
1.13 Síntesis del compuesto F-13 (Fórmula 13)



F-13

El compuesto F-13 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-3 del Ejemplo 1.3, con la excepción de que el 4-fluoronitrobenceno en la etapa a se cambió por 3-fluoronitrobenceno. El producto F-13 obtenido después de 5 etapas de reacción fue un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 595,13 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 596,15.

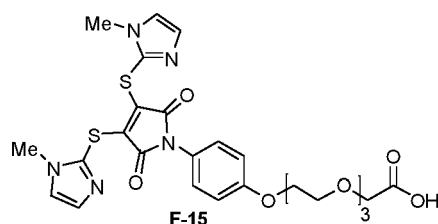
1.14 Síntesis del compuesto F-14 (Fórmula 14)



F-14

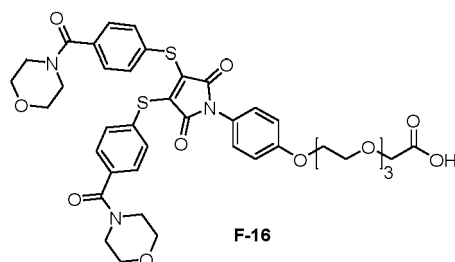
El compuesto F-14 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F-3 del Ejemplo 1.3, con la excepción de que el intermedio E-1 en la etapa e se cambió por el intermedio E' (sustituido con bromo). El producto F-14 obtenido después de 4 etapas de reacción fue un producto oleaginoso incoloro. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 534,95 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 536,01.

1.15 Síntesis del compuesto F-15 (Fórmula 15)



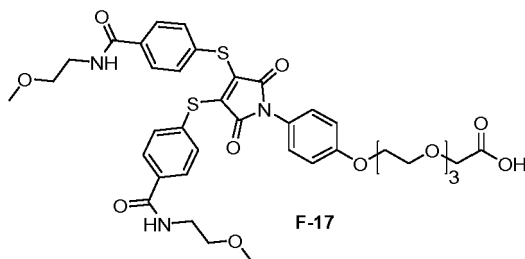
5

1.16 Síntesis del compuesto F-16 (Fórmula 16)



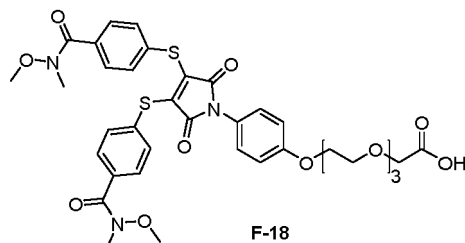
10

1.17 Síntesis del compuesto F-17 (Fórmula 17)



15

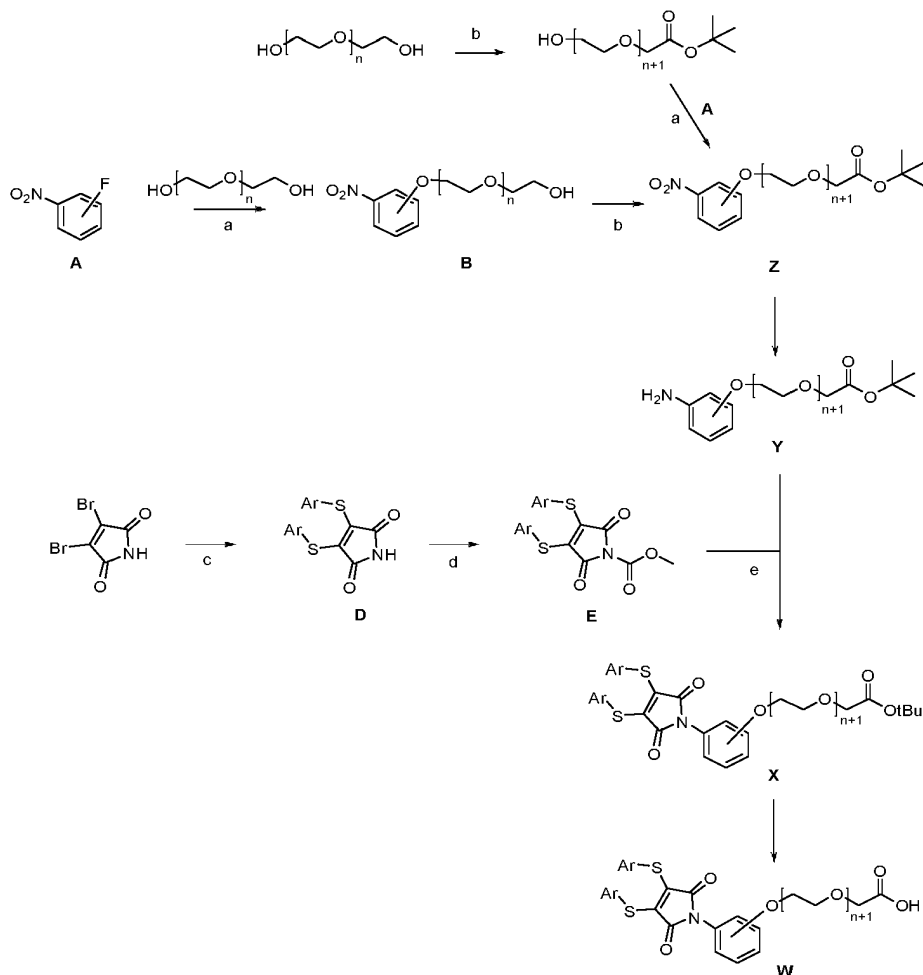
1.18 Síntesis del compuesto F-18 (Fórmula 18)



20

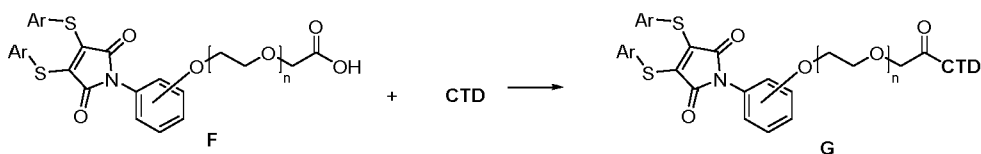
25

- de sustitución entre n-etilenglicol y fluoronitrobenzénico y después se hace reaccionar con bromoacetato de *tert*-butilo para generar el intermedio Z; de manera alternativa, el intermedio Z también puede obtenerse haciendo reaccionar n-etilenglicol con bromoacetato de *tert*-butilo seguido de otra reacción de sustitución con fluoronitrobenzénico; el intermedio Z después se redujo para generar el intermedio Y; el intermedio D puede obtenerse mediante una reacción de sustitución entre 2,3-dibromomaleimida y ariltiofenol y después se hace reaccionar con cloroformiato de metilo para generar el intermedio E; el Intermedio E se hace reaccionar con el intermedio Y para obtener el intermedio X; y el éster de *tert*-butilo en el intermedio X se retira en condiciones ácidas para obtener el enlazador W. Un ejemplo de esquema de síntesis es el siguiente:



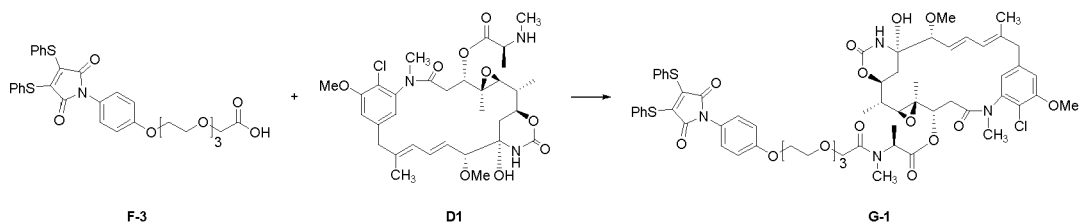
10 Solución 2:

- El conjugado de enlazador-fármaco de maleamida sustituido (Fórmula 19-Fórmula 25) como se muestra en la Fórmula 1b, que se proporciona en el segundo aspecto de la presente invención, puede sintetizarse mediante el esquema de síntesis enumerado en la Solución 2. Específicamente, el compuesto F se condensa y se acopla con un fármaco citotóxico CTD (D1-D11, que están disponibles en el mercado) para obtener una serie de moléculas representadas por la Fórmula G. El esquema de síntesis y los ejemplos específicos son los siguientes:



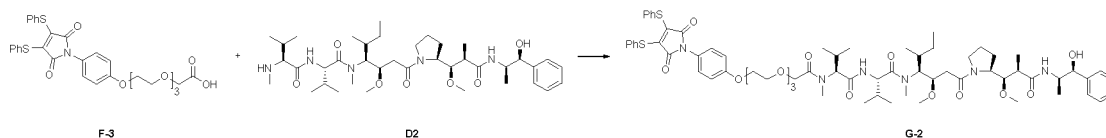
Ejemplo 2: Síntesis y preparación de compuestos como se muestra en las fórmulas 19-25

2.1 Síntesis del compuesto G-1 (Fórmula 19)



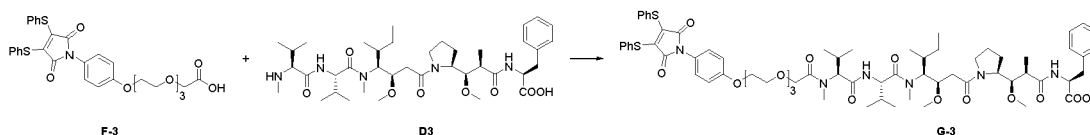
El compuesto F-3 (200 mg, 0,34 mmol) y el compuesto D1 (220 mg, 0,34 mmol) se disolvieron en N,N-dimetilformamida (10 ml) y después hidrocloreuro de 1-etil-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) (77 mg, 0,40 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) (54 mg, 0,40 mmol) se añadieron a los mismos. La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente y después se diluyó con acetato de etilo, se extrajo con adición de agua, se lavó sucesivamente con agua y agua salada saturada y se secó con sulfato sódico anhidro y después el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El producto bruto obtenido se aisló y se purificó usando una columna cromatográfica de gel de sílice (diclorometano/metanol), se filtró por succión y se secó para obtener un sólido amorfo amarillo G-1 (3,5 g, 98 % de rendimiento). Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1226,40 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H+): 1227,42.

2.2 Síntesis del compuesto G-2 (Fórmula 20)



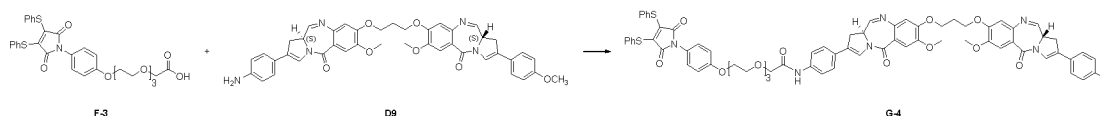
El compuesto G-2 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto G-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1 se cambió por el compuesto D2. El producto G-2 obtenido era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1294.63 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M⁺H⁺): 1295.64.

2.3 Síntesis del compuesto G-3 (Fórmula 21)



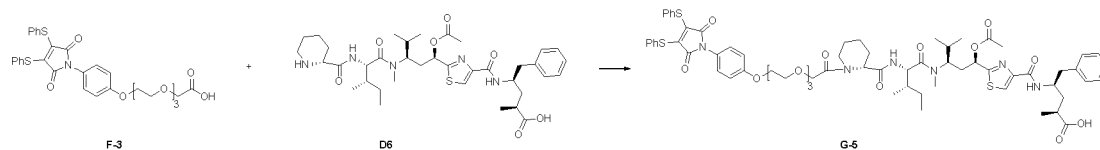
El compuesto G-3 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto G-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1 se cambió por el compuesto D3. El producto G-3 obtenido era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1308.61 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1309.63.

2.4 Síntesis del compuesto G-4 (Fórmula 22)



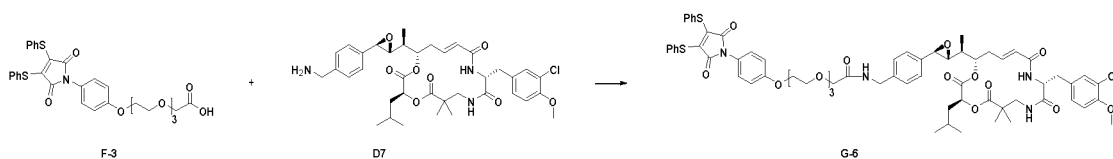
El compuesto G-4 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto G-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1 se cambió por el compuesto D9. El producto G-4 obtenido era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1302.41 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1303.43.

2.5 Síntesis del compuesto G-5 (Fórmula 23)



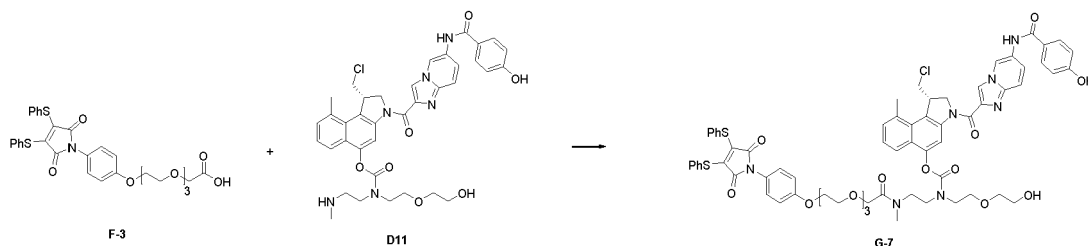
El compuesto G-5 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto G-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1 se cambió por el compuesto D6. El producto G-5 obtenido era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1290.51 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1291.53.

2.6 Síntesis del compuesto G-6 (Fórmula 24)



El compuesto G-6 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto G-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1 se cambió por el compuesto D7. El producto G-6 obtenido era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1274,44 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1275,45.

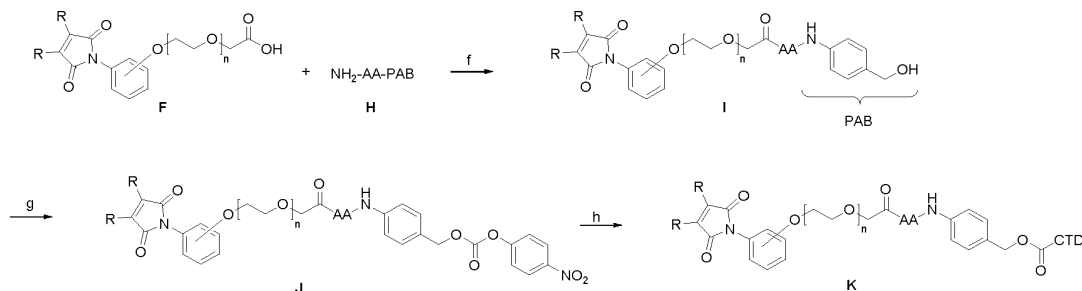
5 2.7 Síntesis del compuesto G-7 (Fórmula 25)



El compuesto G-7 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto G-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1 se cambió por el compuesto D11. El producto G-7 obtenido era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1291,38 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1292,40.

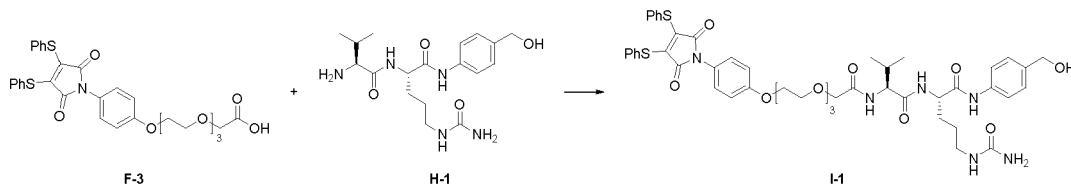
10 Solución 3:

El conjugado de enlazador-fármaco de maleamida sustituido (Fórmula 26-Fórmula 49) como se muestra en la Fórmula Ib, que se proporciona en el segundo aspecto de la presente invención, puede sintetizarse mediante el esquema de síntesis enumerado en la Solución 3. Específicamente, el compuesto F se condensa con un amino en el enlazador dipéptido/tripéptido-PAB (disponible comercialmente) y después el grupo PAB se condensa y se acopla con un fármaco citotóxico CTD (D1-D11) después de activarse por carbonato de bis(p-nitrofenilo), por lo tanto se obtienen una serie de moléculas representadas por la Fórmula K. El esquema de síntesis y los ejemplos específicos son los siguientes:



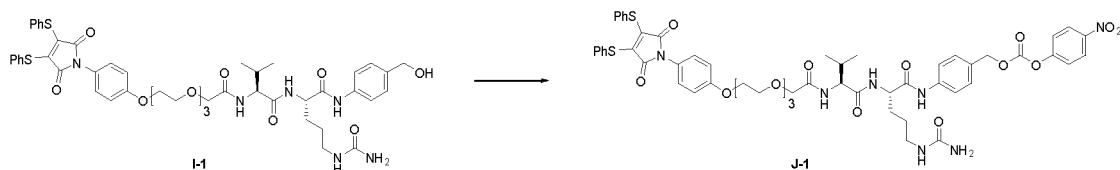
3.1 Síntesis del compuesto K-1 (Fórmula 26)

20 3.1.1 Síntesis del intermedio I-1 (etapa f)



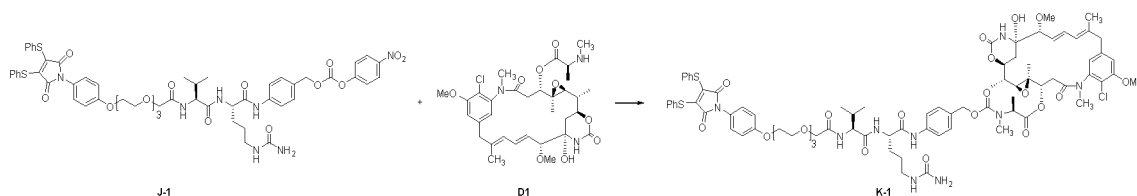
El compuesto F-3 (2,0 g, 3,36 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida anhidra (25 ml) y después en EDCI (963 mg, 5,04 mmol). Se añadieron sucesivamente HOBt (681 mg, 5,04 mmol) y N-metilmorfolina (1,11 ml, 10,08 mmol) bajo la protección de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó bajo la protección de nitrógeno a temperatura ambiente durante 20 minutos y después el compuesto H-1 (Val-Cit-PAB, 1,91 g, 5,04 mmol) se añadió a la misma. La mezcla de reacción se agitó bajo la protección de nitrógeno durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se retiró por evaporación rotatoria y el residuo se sometió a cromatografía en columna seca (gel de sílice, malla 200-300, DCM/MeOH 10:1) para obtener I-1, que era un producto oleaginoso naranja (2,0 g, 62,2 % de rendimiento). Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 956,34 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 957,37.

3.1.2 Síntesis del intermedio J-1 (etapa g)



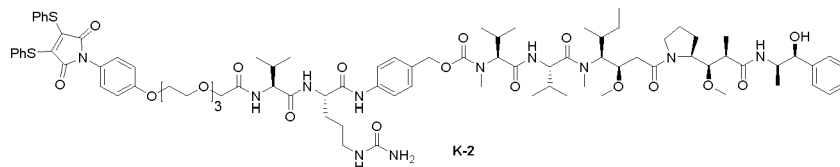
El compuesto I-1 (1,5 g, 1,57 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida anhidra (10 ml) y después N,N-diisopropiletilamina (0,52 ml, 3,14 mmol) y carbonato de bis(p-nitrofenilo) (717 mg, 2,335 mmol) se añadieron sucesivamente al mismo bajo la protección de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas y después el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se sometió a cromatografía en columna seca (gel de sílice, malla 200-300, DCM/MeOH 20:1) para obtener J-1, que era un producto oleaginoso naranja (1,4 g, 79,9 % de rendimiento). Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1121,35 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1122,37.

3.1.3 Síntesis del intermedio K-1 (etapa h)



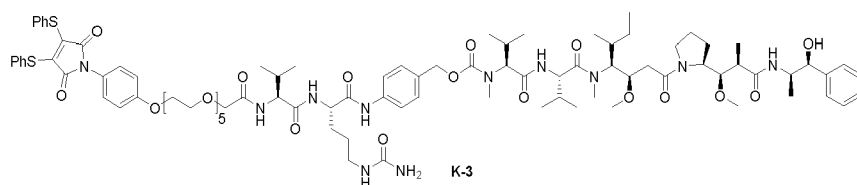
El compuesto J-1 (0,5 g, 0,52 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida anhidra (5 ml) y después N,N-diisopropiletilamina (0,172 ml, 1,04), HOBt (70 mg, 0,52 mmol) y compuesto D1 (340 mg, 0,52 mmol) se añadieron sucesivamente al mismo bajo la protección de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó bajo la protección de nitrógeno durante la noche a temperatura ambiente y después el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se sometió a cromatografía en columna seca (gel de sílice, malla 200-300, DCM/MeOH 10:1) para obtener K-1, que era un sólido amorfo amarillo (310 mg, 36,33 % de rendimiento). Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1631,60 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1632,62.

3.2 Síntesis del compuesto K-2 (Fórmula 27)



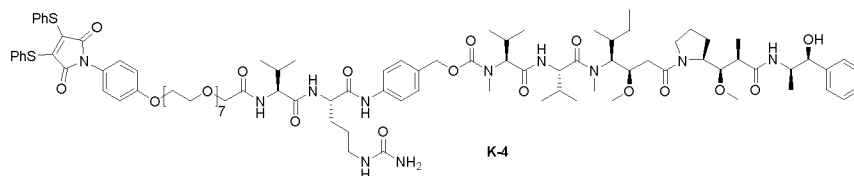
El compuesto K-2 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto D1 en la etapa h se cambió por el compuesto D2 (Monometilauristatina E). El producto K-2 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1699,83 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1610,85.

3.3 Síntesis del compuesto K-3 (Fórmula 28)



El compuesto K-3 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto F-3 en la etapa f se cambió por F-5 y el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D2 (Monometilauristatina E). El producto K-3 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1787,88 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1788,90.

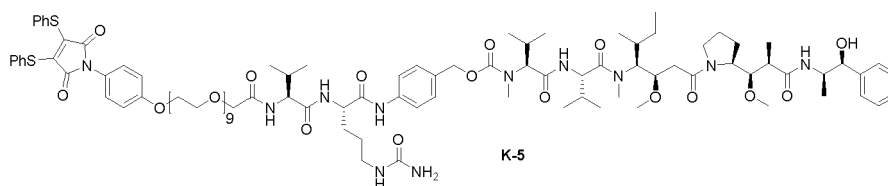
3.4 Síntesis del compuesto K-4 (Fórmula 29)



El compuesto K-4 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto F-3 en la etapa f se cambió por F-6 y el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D2 (Monometilauristatina E). El producto K-4 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo.

5 Valor teórico a través de CL-EM (M^+): 1875,93 y valor medido a través de CL-EM (ESI, $M+H^+$): 1876,95.

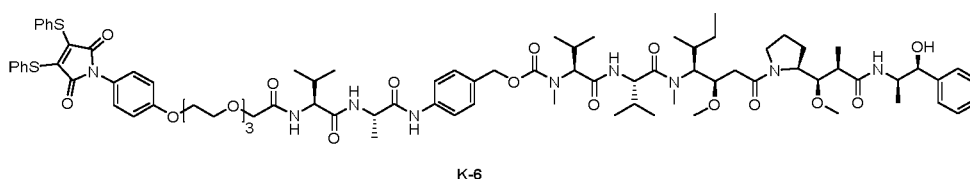
3.5 Síntesis del compuesto K-5 (Fórmula 30)



El compuesto K-5 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto F-3 en la etapa f se cambió por F-7 y el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D2 (Monometilauristatina E). El producto K-5 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo.

10 Valor teórico a través de CL-EM (M^+): 1963,99 y valor medido a través de CL-EM (ESI, $M+H^+$): 1965,01.

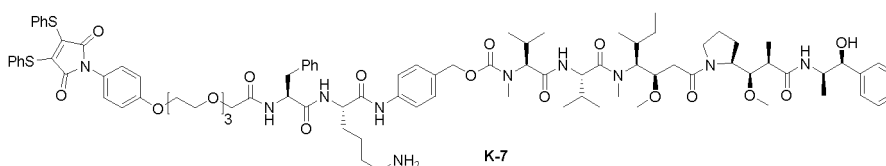
3.6 Síntesis del compuesto K-6 (Fórmula 31)



El compuesto K-6 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto H-1 en la etapa f se cambió por H-2 (Val-Ala-PAB) y el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D2 (Monometilauristatina E). El producto K-6 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M^+): 1613,78 y valor medido a través de CL-EM (ESI, $M+H^+$): 1614,80.

15

3.7 Síntesis del compuesto K-7 (Fórmula 32)

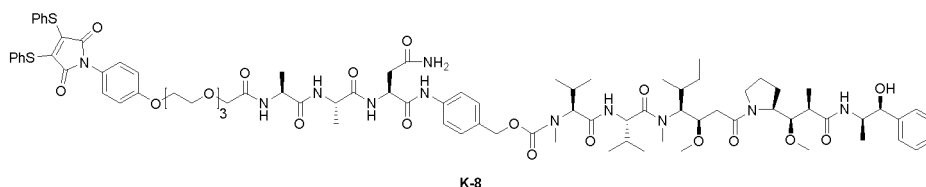


El compuesto K-7 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto H-1 en la etapa f se cambió por H-3 y el compuesto D1 (Phe-Lys-PAB) en la etapa h se cambió por D2 (Monometilauristatina E). El producto K-7 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M^+): 1718,84 y valor medido a través de CL-EM (ESI, $M+H^+$): 1719,86.

20

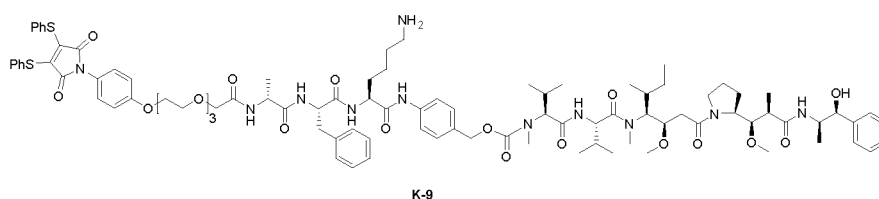
25

3.8 Síntesis del compuesto K-8 (Fórmula 33)



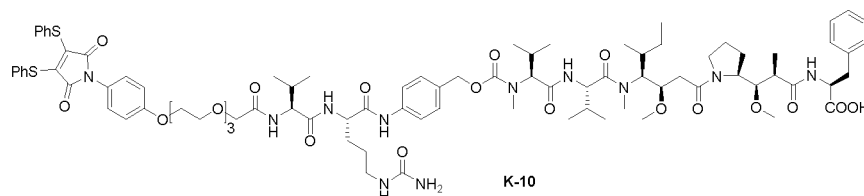
El compuesto K-8 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto H-1 en la etapa f se cambió por H-4 (Ala-Ala-Asn-PAB) y el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D2 (Monometilauristatina E). El producto K-8 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1699,79 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1700,80.

3.9 Síntesis del compuesto K-9 (Fórmula 34)



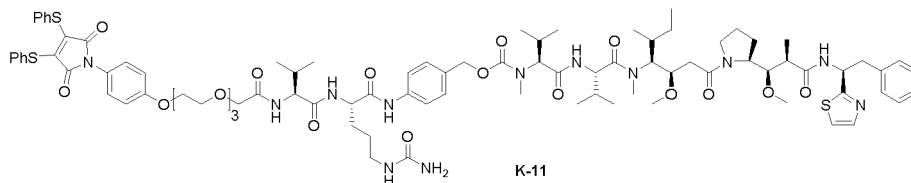
El compuesto K-9 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto H-1 en la etapa f se cambió por H-5 (D-Ala-Phe-Lys-PAB) y el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D2 (Monometilauristatina E). El producto K-9 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1789,88 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1790,90.

3.10 Síntesis del compuesto K-10 (Fórmula 35)



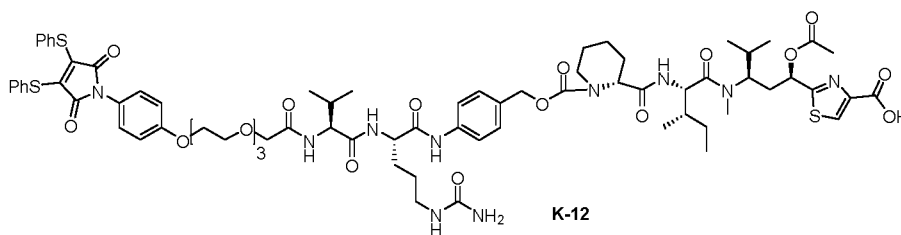
El compuesto K-10 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D3 (Monometilauristatina F). El producto K-10 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1713,81 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1714,83.

3.11 Síntesis del compuesto K-11 (Fórmula 36)



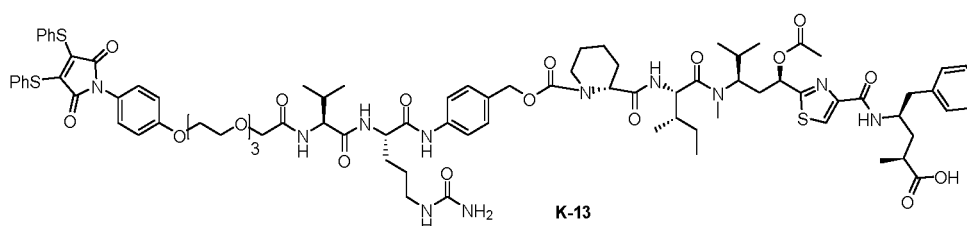
El compuesto K-11 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D4 (Monometil Dolastatina 10, MMAD). El producto K-11 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1752,80 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1753,82.

3.12 Síntesis del compuesto K-12 (Fórmula 37)



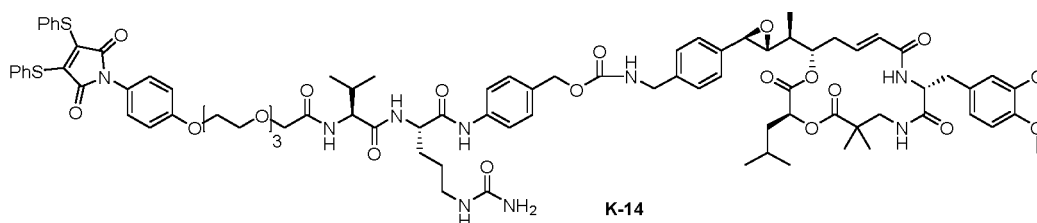
El compuesto K-12 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D5 (derivado de Tubulisina 1). El producto K-12 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1506,59 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1507,61.

3.13 Síntesis del compuesto K-13 (Fórmula 38)



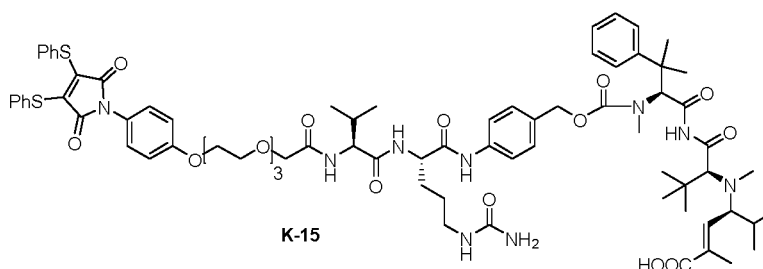
El compuesto K-13 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D6 (derivado de Tubulisina 2). El producto K-13 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1695,71 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1696,73.

3.14 Síntesis del compuesto K-14 (Fórmula 39)

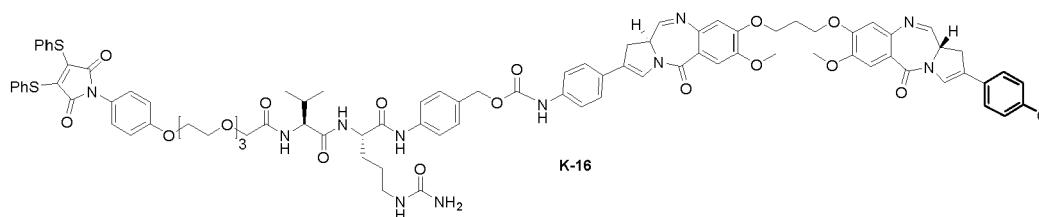


El compuesto K-14 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D6 (derivado de Criptoficina). El producto K-14 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1679,64 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1680,66.

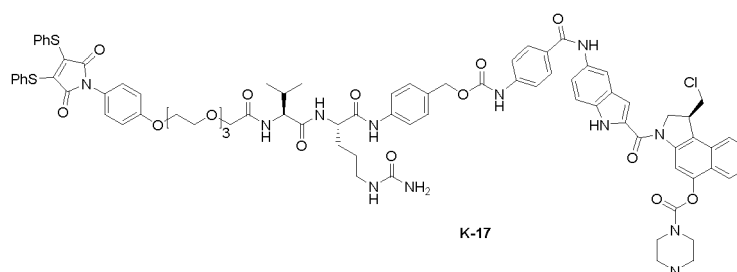
3.15 Síntesis del compuesto K-15 (Fórmula 40)



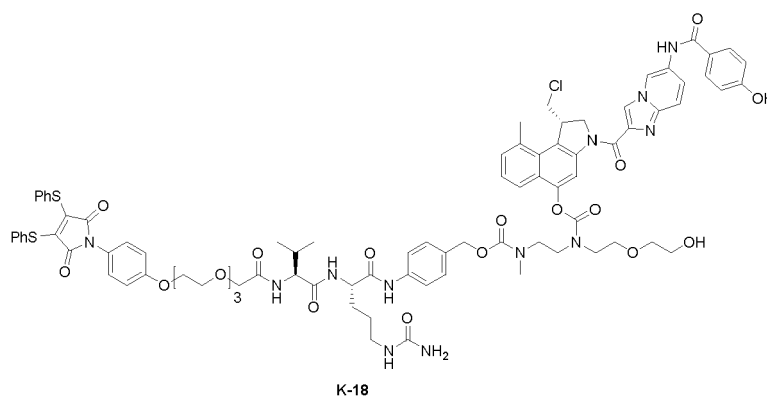
El compuesto K-15 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D8 (Taltobulina). El producto K-15 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo parduzco. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1455,65 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1456,67.

3.16 Síntesis del compuesto K-16 (Fórmula 41)

5 El compuesto K-16 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D9 (dímero de PBD). El producto K-16 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo parduzco. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1707,61 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1708,63.

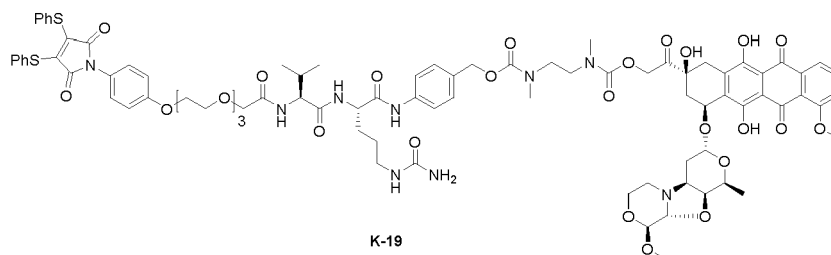
3.17 Síntesis del compuesto K-17 (Fórmula 42)

10 El compuesto K-17 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D10 (derivado de Duocarmicina 1). El producto K-17 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo parduzco. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1618,55 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1619,57.

3.18 Síntesis del compuesto K-18 (Fórmula 43)

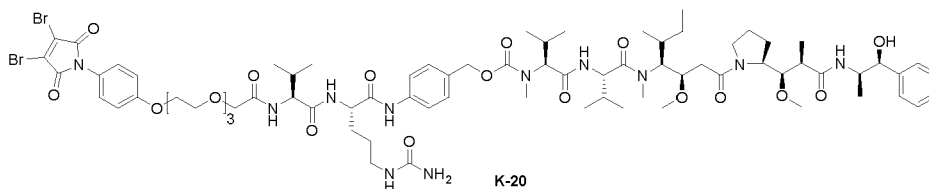
15 El compuesto K-18 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D11 (derivado de Duocarmicina 2). El producto K-18 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo parduzco. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1696,58 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1697,60.

3.19 Síntesis del compuesto K-19 (Fórmula 44)



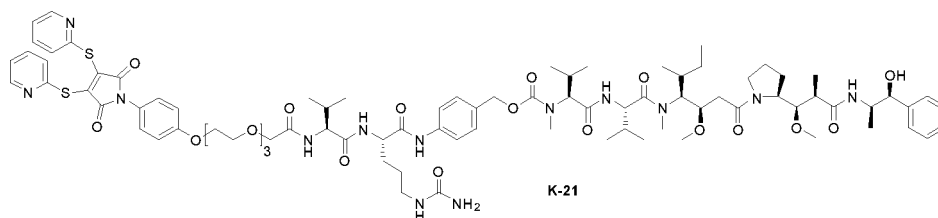
El compuesto K-19 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D12 (derivado de PNU-159682). El producto K-19 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo parduzco. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1737,61 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1738,68.

3.20 Síntesis del compuesto K-20 (Fórmula 45)



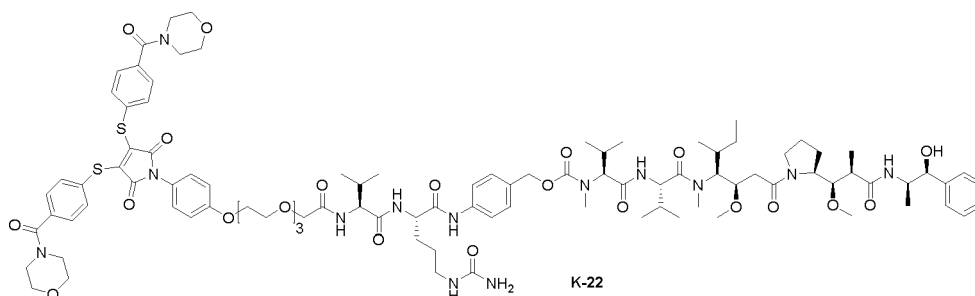
El compuesto K-20 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el intermedio F-3 en la etapa f se cambió por el intermedio F-14. El producto K-20 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1639,64 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1640,61.

3.21 Síntesis del compuesto K-21 (Fórmula 46)



El compuesto K-21 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el intermedio F-3 en la etapa f se cambió por el intermedio F-11. El producto K-21 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1701,82 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1702,86.

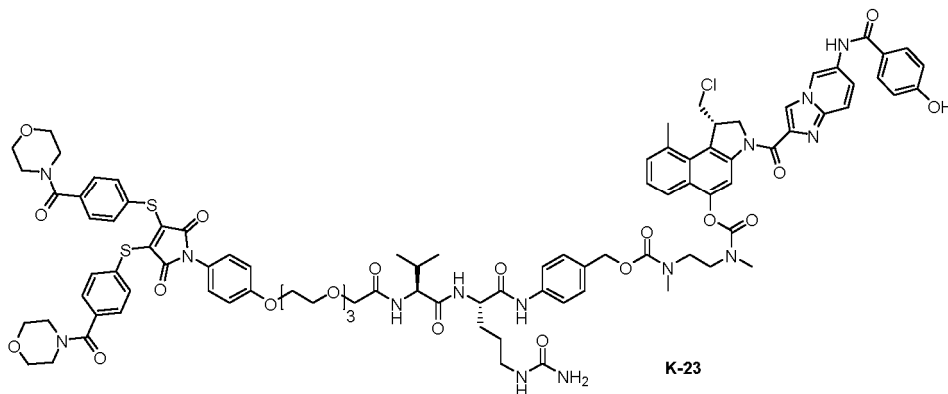
3.22 Síntesis del compuesto K-22 (Fórmula 47)



El compuesto K-22 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el intermedio F-3 en la etapa f se cambió por el intermedio F-16. El producto K-22 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1925,92 y valor medido

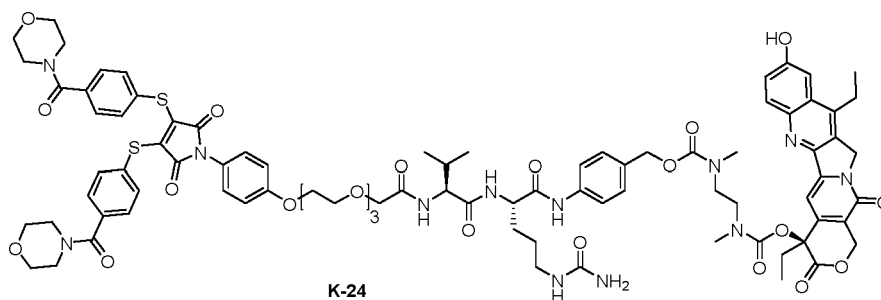
a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1926,88.

3.23 Síntesis del compuesto K-23 (Fórmula 48)



- 5 El compuesto K-23 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el intermedio F-3 en la etapa f se cambió por el intermedio F-16 y el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D11 (derivado de Duocarmicina 2). El producto K-23 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1848,64 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1849,58.

3.24 Síntesis del compuesto K-24 (Fórmula 49)



- 10 El compuesto K-24 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto K-1 del Ejemplo 3.1, con la excepción de que el intermedio F-3 en la etapa f se cambió por el intermedio F-16 y el compuesto D1 en la etapa h se cambió por D13 (derivado de SN38). El producto K-24 obtenido después de 3 etapas de reacción era un sólido amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1714,64 y valor medido a través de CL-EM (ESI, M+H⁺): 1715,61.

15 Sección 2: Preparación y detección del conjugado de anticuerpo y fármaco

Ejemplo 1: preparación de ADC-1

- 20 Una solución madre de pertuzumab se diluyó a 5 mg/ml con dihidrógeno fosfato de potasio-hidróxido sódico 50 mM (KH₂PO₄-NaOH)/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/solución tampón de reacción de ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA) 1 mM con un pH de 7,4 y, a continuación, una relación molar en exceso de 6,0x de hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) se añadió a la misma. La solución de reacción obtenida se agitó a 35 °C durante 10 horas.

Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 8 °C y se añadió una cantidad adecuada de dimetilsulfóxido (DMSO) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto G-2 (10 mg/ml, disuelto previamente en DMSO) y se aseguró que el DMSO en el sistema de reacción no fuera superior al 15 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 37 °C durante 3 horas para el acoplamiento.

- 25 La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 6,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recogida se esterilizó a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,15 µm y el producto obtenido se almacenó a -60 °C.

Ejemplo 2: preparación de ADC-2

- 30 Una solución madre de pertuzumab se diluyó a 5 mg/ml con dihidrógeno fosfato de potasio-hidróxido sódico 50 mM

($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$)/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/solución tampón de reacción de ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA) 1 mM con un pH de 7,4 y, a continuación, una relación molar en exceso de 10x de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) se añadió a la misma. La solución de reacción obtenida se agitó a 10 °C durante 4 horas.

Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 5 °C y se añadió una cantidad adecuada de dimetilacetamida (DMA) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto K-2 (10 mg/ml, disuelto previamente en DMA) y se aseguró que el DMA en el sistema de reacción no fuera superior al 10 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 25 °C durante 2,5 horas para el acoplamiento.

La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 6,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recogida se esterilizó a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,22 μm y el producto obtenido se almacenó a -80 °C.

Ejemplo 3: preparación de ADC-3

Una solución madre de pertuzumab se diluyó a 5 mg/ml con dihidrógeno fosfato de potasio-hidróxido sódico 50 mM ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$)/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/solución tampón de reacción de ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA) 1 mM con un pH de 7,4 y, a continuación, una relación molar en exceso de 20x de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) se añadió a la misma. La solución de reacción obtenida se agitó a 15 °C durante 2 horas.

Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 10 °C y se añadió una cantidad adecuada de acetonitrilo (ACN) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto K-3 (10 mg/ml, disuelto previamente en ACN) y se aseguró que el ACN en el sistema de reacción no fuera superior al 10 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 10 °C durante 4 horas para el acoplamiento.

La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 6,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recolectada se esterilizó por filtración y el producto obtenido se almacenó a baja temperatura. Por ejemplo, las muestras recogidas se esterizaron a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,20 μm y el producto obtenido se almacenó a -90 °C.

Ejemplo 4: preparación de ADC-4

Una solución madre de pertuzumab se diluyó a 5 mg/ml con dihidrógeno fosfato de potasio-hidróxido sódico 50 mM ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$)/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/solución tampón de reacción de ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA) 1 mM con un pH de 7,4 y, a continuación, una relación molar en exceso de 8x de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) se añadió a la misma. La solución de reacción obtenida se agitó a 25 °C durante 48 horas.

Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió una cantidad adecuada de dimetilformamida (DMF) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto K-4 (10 mg/ml, disuelto previamente en DMF) y se aseguró que el DMF en el sistema de reacción no fuera superior al 8 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 0 °C durante 2 horas para el acoplamiento.

La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 6,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recogida se esterilizó a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,3 μm y el producto obtenido se almacenó a -100 °C.

El producto obtenido del Ejemplo 1 y pertuzumab se compararon mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) (Figura 1) y espectrometría de masas (Figura 2). Los resultados mostraron que, los conjugados obtenidos usando el enlazador proporcionado por la presente invención tenían una distribución muy estrecha de valores de DAR, cuyo promedio fue cercano a 4. En este sentido, los conjugados obtenidos por la presente invención tienen alta homogeneidad, en el cual los conjugados con distribución única (con DAR de 4) suponen más del 80 %. Se identificó que el valor de m estaba entre 3,0 y 4,2. Se obtuvieron los mismos resultados cuando los productos obtenidos de los Ejemplos 2-4 se analizaron con los mismos métodos, en los cuales m estaba entre 1,0 y 5,0.

Sección 3: Detecciones biológicas del conjugado de anticuerpo y fármaco

1. Ensayo de unión molecular

El principio del instrumento Biacore para detectar la afinidad intermolecular de las proteínas se basa en la tecnología de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR, por sus siglas en inglés). SPR es un fenómeno físico óptico. Una onda de plasma superficial se genera en la interfaz entre un prisma y una película de metal (Au) cuando un haz polarizado P incide sobre una cara del prisma en un cierto intervalo de ángulo. La resonancia de los electrones libres en la película metálica se produce cuando la constante de propagación del haz incidente coincide con la constante de propagación de la onda de plasma superficial. Así que para el análisis, en primer lugar, se fija una película de reconocimiento biomolecular en la superficie de un chip sensor y, a continuación, se permite que la muestra que se va a analizar fluya

a través de la superficie del chip sensor. Si hay una molécula en la muestra que puede interactuar con la película de reconocimiento biomolecular en la superficie del chip sensor, el índice de refracción de la superficie de la película de Au cambia por consiguiente, dando como resultado cambios en el ángulo SPR finalmente. La información tal como concentración, afinidad, constante cinética y especificidad de un analito pueden obtenerse detectando los cambios en el ángulo SPR.

Las afinidades de unión de tres muestras de anticuerpos monoclonales que comprenden Pertuzumab, ADC-2 y ADC-4 para ErbB2 humana se detectaron mediante un experimento de unión usando Biacore.

Tabla 1 parámetros cinéticos y de afinidad de las tres muestras de anticuerpos monoclonales con ErbB2 humano

Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
Pertuzumab	1,902E+05	1,239E-03	6,517E-10
ADC-2	2,232E+05	1,294E-04	5,799E-10
ADC-4	1,956E+05	1,310E-04	6,969E-10

En este experimento, las actividades de unión de tres muestras de anticuerpos monoclonales Pertuzumab, ADC-2 y ADC-4 para ErbB2 humano se caracterizaron mediante el uso de tecnología de resonancia de plasmón superficial y las tres muestras mostraron unión a ErbB2 humano. Los resultados del experimento mostraron que las tres muestras de anticuerpos monoclonales anteriores tenían una afinidad similar a ErbB2 humano, todo en un intervalo de 0,5-0,7 nM.

2. Ensayo de unión celular de ADC-2 a Her2

Materiales experimentales usados en el siguiente experimento: medio RPMI1640, tripsina-EDTA al 0,25 %, suero bovino fetal, 100 x piruvato sódico y 100 x penicilina-estreptomina se obtuvieron de Gibco; El anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se adquirió de Invitrogen; y las células de cáncer gástrico NCI-N87 se obtuvieron del Banco de Células de Kunming de la Academia de Ciencias de China. Todos los demás reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Se usó el citómetro de flujo FACSCalibur (BD).

En este ejemplo, las afinidades de unión de ADC-2, P-mcVC-MMAE y Pertuzumab a células que expresan altamente Her2 se investigaron.

En este Ejemplo se usaron células NCI-N87 de cáncer gástrico humano que expresan altamente Her2. Las células NCI-N87 se incubaron en medio RPMI1640 que contenía suero bovino fetal al 10 % en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C. Las células que se subcultivaron durante 4 a 5 días se contaron y después se recogieron en un tubo de centrífuga de 15 ml, se lavaron dos veces con PBS frío y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min a 4 °C. Las células obtenidas se resuspendieron en PBS que contenía suero bovino fetal al 5 %, se incubaron a 37 °C durante 30 min, después se centrifugaron a 1000 °C durante 5 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Las células obtenidas se resuspendieron en PBS frío, se dispensaron en tubos EP a 1x10⁶ células/1,5 ml, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Posteriormente, 0,5 ml de ADC-2, P-mcVC-MMAE, Pertuzumab e IgG humana en diferentes concentraciones se añadieron a los tubos EP, que después se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min a 4 °C después de colocarse en hielo durante 40 min. Los residuos obtenidos se lavaron dos veces con 1 ml de PBS frío y después se añadieron a cada tubo 200 µl de anticuerpo secundario marcado con FITC. Los tubos EP se colocaron en hielo durante 40 minutos en la oscuridad, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Las células obtenidas se lavaron dos veces con 1 ml de PBS frío y después se resuspendieron mediante la adición de 0,5 ml de PBS frío, colocados en hielo en la oscuridad. La intensidad de fluorescencia media (IFM) de la unión de cada uno de ADC-2, P-mcVC-MMAE y Pertuzumab en diferentes concentraciones para las células se detectó usando el citómetro de flujo FACSCalibur. La intensidad de fluorescencia de la unión de IgG humana fue de unión no específica.

Como se muestra en la Figura 3, ADC-2, P-mcVC-MMAE y Pertuzumab se unieron al antígeno Her2 en la superficie de las células NCI-N87 y, con el aumento de la concentración, las uniones de ADC-2, P-mcVC-MMAE y Pertuzumab a Her2 se aumentaron. Y lo que es más, las afinidades de unión de los anticuerpos monoclonales a Her2 de células NCI-N87 fueron comparables y no se observaron diferencias significativas.

3. Ensayo de actividad biológica de proliferación celular *in vitro*

Materiales experimentales usados en el siguiente experimento: DMEM, medio RPMI1640, DMEM/F12K, tripsina-EDTA al 0,25 %, suero bovino fetal, 100 x piruvato sódico y 100 x penicilina-estreptomina se obtuvieron de Gibco; sulforhodamina B (SRB) se obtuvo de Sigma; células de cáncer de mama humano BT-474, células de cáncer de mama humano SK-RB-3, células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y células de cáncer gástrico humano NCI-N87 se obtuvieron del Banco de células de Kunming de la Academia de Ciencias de China; células de cáncer de páncreas humano Panc-1, células de cáncer de mama humano MDA-MB-468 y células de cáncer de mama humano MCF-7 se obtuvieron de Cell Bank en los Institutos de Ciencias Biológicas de Shanghai; y las células de cáncer de ovario humano SKOV-3 y las células de cáncer de próstata humano Du-145 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Todos los demás reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Se usaron Poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Corning, N.º de catálogo 3599) y lector de microplacas Synergy 2 (Bio-Tek).

En este ejemplo, los efectos de ADC-2, ADC-4, P-mcVC-MMAE, Kadcyla y Pertuzumab sobre la proliferación de líneas de células tumorales se investigaron.

En este ejemplo se usó un método colorimétrico basado en sulforodamina B (SRB) para evaluar el efecto antiproliferativo de los fármacos. SRB es un colorante aniónico rosa que es fácilmente soluble en agua y puede unirse específicamente a los aminoácidos básicos que forman las proteínas en las células en condiciones ácidas. Proporciona un pico de absorción a 510 nm y la absorbancia se correlaciona lineal y positivamente con la cantidad de células. En este sentido, el método puede usarse en una detección cuantitativa del número de células.

Las líneas celulares usadas en este Ejemplo fueron: BT-474, SK-RB-3, MDA-MB-231, MDA-MB-468, células de cáncer de mama humano MCF-7, células de cáncer gástrico humano NCI-N87, células de cáncer de ovario humano SKOV-3, células de cáncer de próstata humano Du-145 y de cáncer de páncreas humano Panc-1.

BT-474, células SK-BR-3 y NCI-N87 en medio RPMI 1640 que contiene suero fetal bovino al 10 %, SKOV-3, Du-145, Panc-1, células MCF-7 y MDA-MB-231 se incubaron en DMEM que contenía un 10 % de suero bovino fetal y células MDA-MB-468 en DMEM/F12 que contenía un 10 % de suero bovino fetal hasta la fase de crecimiento logarítmico en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C. Las células anteriores en la fase de crecimiento logarítmico se inocularon en placas de 96 pocillos a una densidad de 2x10³ a 9x10³ células por pocillo, 100 µl por pocillo, se cultivaron durante 24 horas y después se les añadieron diferentes concentraciones de fármacos durante 5 días. Específicamente, cada fármaco se preparó en nueve concentraciones diluyéndolas en 3, 4 o 5 veces, cada concentración se fijó en pocillos duplicados y también se fijó la concentración correspondiente de pocillos de control de vehículo y pocillos de control de medio sin células. Al final de la acción del fármaco, las soluciones de cultivo se decantaron y se añadieron a cada pocillo 100 µl de una solución de ácido tricloroacético (30 %, p/v) preenfriada a 4 °C y las células se fijaron a 4 °C durante 1 hora. Posteriormente, las células se lavaron con agua desionizada 5 veces, se secaron a temperatura ambiente y después se añadieron a cada pocillo 100 µl de colorante SRB al 0,4 % (p/v) (Sigma, preparado con ácido acético glacial al 1 %). Después de incubarse y teñirse a temperatura ambiente durante 30 minutos, las células se lavaron con ácido acético glacial al 1 % durante 4 veces para retirar los colorantes no unidos y después se secaron a temperatura ambiente. En lo sucesivo, se añadieron 100 µl de solución de Tris 10 mM por pocillo. Después de incubarse y teñirse a temperatura ambiente durante 15 minutos, las células se lavaron con ácido acético glacial al 1 % durante 5 veces para retirar SRB no unido y después se secaron a temperatura ambiente. Los colorantes unidos a las proteínas en las células se disolvieron mediante la adición de tampón Tris 10 mM (pH = 10,5) por pocillo, y la absorbancia (valor de DO) se midió a longitudes de onda de 510 nm y 690 nm usando el lector de microplacas Synergy 2 (Bio-Tek). A = DO₅₁₀-DO₆₉₀.

$$\text{Tasa de inhibición (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{fármaco}}) / A_{\text{control}} \times 100 \%$$

En este experimento, los efectos de ADC-2, ADC-4, P-mcVC-MMAE, Kadcyla y Pertuzumab en la proliferación de diversas líneas de células tumorales de alta expresión de Her2 *in vitro* cultivadas se investigaron. Al mismo tiempo, los efectos de ADC-2 en la proliferación de diversas líneas de células tumorales que no expresan mucho Her2 *in vitro* en cultivo también se estudiaron. Como se muestra en las Figuras 4-6, pudo observarse una inhibición significativa de la proliferación de células tumorales con Her2 que expresa altamente SK-BR-3, células de cáncer de mama humano BT-474 y células de cáncer gástrico humano NCI-N87 que se trataron con ADC-2, P-mcVC-MMAE y Kadcyla. Específicamente, la actividad inhibidora de ADC-2 y P-mcVC-MMAE sobre la proliferación de células tumorales fue significativamente mayor que la de Kadcyla y la actividad inhibidora de ADC-2 sobre la proliferación de células tumorales fue esencialmente comparable a la de P-mcVC-MMAE. Sin embargo, ADC-2 tenía una actividad inhibitoria ligeramente mayor sobre la proliferación de células tumorales BT-474 que P-mcVC-MMAE. Además, en comparación con Pertuzumab que estaba desnudo, los conjugados de anticuerpo y fármaco, incluyendo ADC-2, P-mcVC-MMAE y Kadcyla tenían una actividad inhibidora significativamente mayor sobre la proliferación de células tumorales. Como se muestra en la Figura. 7, ADC-2 también mostró buenos efectos inhibitorios sobre la proliferación de células de cáncer de ovario humano SKOV-3, células de cáncer de próstata humano Du-145 y células de cáncer de páncreas humano Panc-1 que no expresaban mucho Her2. Por el contrario, las actividades inhibitorias de ADC-2 sobre la proliferación del cáncer de mama humano MCF-7, células MDA-MB-231 y MDA-MB-468 que no expresaban Her2 eran significativamente más bajas (Figura 8). Los resultados anteriores indican que el conjugado de anticuerpo y fármaco ADC-2 esencialmente no tiene efectos sobre las células que no expresan el antígeno diana y, por lo tanto, los efectos tóxicos y secundarios de ADC-2 serán significativamente menores. Como se muestra en la Figura 9-1, ADC-4 mostró un potente efecto de inhibición de la proliferación en células de cáncer gástrico humano NCI-N87 que expresaban Her2 altamente. Y como se muestra en la Figura 9-1, ADC-2, ADC-3 y ADC-4 mostraron potentes efectos de inhibición de la proliferación en células de cáncer de pulmón humano Calu-3 que expresaban Her2 moderadamente.

4. Ensayo de efectividad antitumoral *in vivo*

La efectividad de los conjugados de la presente invención puede detectarse *in vivo*. Resumiendo, puede implantarse un aloinjerto o xenoinjerto de células cancerosas en roedores y después los tumores implantados se tratan con los conjugados. A los ratones probados se les puede administrar tratamiento farmacológico o tratamiento de control, monitorizarse durante semanas o más para observar el tiempo de duplicación del tumor, log de destrucción y supresión de tumores.

1) Animales de experimentación

se obtuvieron ratones BALB/cA-desnudos de 6-7 semanas (♀) de Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd. Número de licencia de producción: SCXK (Shanghái) 2013-0018; número de certificado de animal: 2013001815683; y entorno de alimentación: nivel SPF.

2) Etapas experimentales

Esos ratones desnudos se inocularon por vía subcutánea con células de cáncer gástrico humano NCI-N87 y después se dividieron aleatoriamente en grupos (D0) cuando los tumores crecieron a 100-250 mm³. Las dosis y el régimen de administración se proporcionan en la Figura 10. El volumen del tumor se midió 2-3 veces por semana, se pesaron los ratones y se registraron los datos correspondientes. El volumen del tumor (V) se calculó como:

$V = 1/2 \times a \times b^2$; en los cuales a y b representan el largo y el ancho respectivamente.

$T/C(\%) = (T-T_0)/(C-C_0) \times 100$, en los cuales T y C representan los volúmenes tumorales al final del experimento; T₀ y C₀ representan los volúmenes tumorales al comienzo del experimento.

3) Resultados del experimento

La Figura 10 muestra que ADC-2 (0,5, 1, 2 mg/kg, IV, una vez por semana, 2 veces en total) puede inhibir el crecimiento de xenoinjertos subcutáneos NCI-N87 de cáncer gástrico humano en ratones desnudos de forma significativa y dependiente de la dosis y las tasas de inhibición tumoral son del 59 %, el 94 % y el 200 % respectivamente. Específicamente, en el grupo tratado con 1 mg/kg, los tumores de 3/6 ratones retrocedieron parcialmente; y en el grupo tratado con 2 mg/kg, los tumores de 6/6 ratones experimentaron una regresión completa. Las tasas de inhibición de ADC3 (0,5, 1, 2 mg/kg, IV, una vez por semana, 2 veces en total) en NCI-N87 son el 65 %, el 69 % y el 185 % respectivamente. Específicamente, en el grupo tratado con 2 mg/kg, el tumor de 1/6 ratón retrocedió parcialmente y los tumores de 5/6 ratones retrocedieron completamente. La tasa de inhibición de P-vcMMAE (1 mg/kg, IV, una vez por semana, 2 veces en total) en NCI-N87 es el 94 %. Específicamente, los tumores de 2/6 ratones retrocedieron parcialmente. Las tasas de inhibición del fármaco de referencia Kadcyly (2 mg/kg, IV, una vez por semana, 2 veces en total) son el 77 %. Y lo que es más, esos ratones con tumores tenían buena tolerancia a los medicamentos y no se presentó ningún síntoma, como pérdida de peso.

Otro de diseños específicos: preparación y uso del enlazador de maleamida sustituida como se muestra en la fórmula la, en donde Ar' se selecciona del grupo que consiste en arileno C₆-C₁₀ sustituido y heteroarileno de 5-12 miembros sustituido.

El primer grupo de Ejemplos: Métodos de síntesis y preparación del compuesto

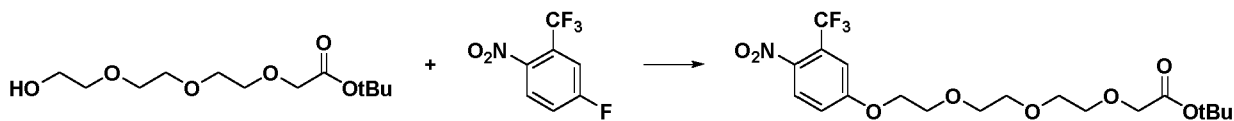
1.1 Síntesis del compuesto E-1 (Fórmula la-1)

1.1.1 Síntesis del intermedio A-1 (etapa a)



Se disolvió trietilenglicol (92 g, 613 mmol) en tBuOH (200 ml). La solución obtenida se colocó en baño de hielo, KOtBu (22,91 g, 204 mmol) se añadió a la misma y se agitó durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió gota a gota bromoacetato de *tert*-butilo (39,8 g, 204 mmol) disuelto en tBuOH (40 ml) bajo la protección de argón y la mezcla obtenida se agitó durante la noche a temperatura ambiente. TLC del día siguiente indicó que la reacción se había completado. El *tert*-butanol se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se añadió a 400 ml de diclorometano y la fase orgánica se lavó con 400 ml de agua. La fase acuosa obtenida se extrajo una vez con 300 ml de diclorometano. Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron una vez con agua salada saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y después el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El producto bruto obtenido se sometió a cromatografía en columna (éter de petróleo: acetato de etilo = 3:1-> 1:1) para obtener el intermedio A-1 (24 g, 44,5 % de rendimiento), que era un producto oleaginoso amarillo.

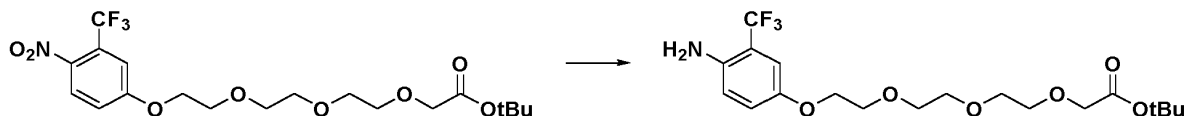
1.1.2 Síntesis del intermedio B-1 (etapa b)



El intermedio A-1 (7,8 g, 29,5 mmol), 5-fluoro-2-nitrobenzotrifluoruro (9,26 g, 44,3 mmol) y K₂CO₃ en polvo (6,12 g, 44,3 mmol) se colocaron en un matraz de reacción de fondo redondo de 250 ml. Bajo la protección de nitrógeno, la mezcla obtenida se calentó a 80 °C y se agitó durante 48 horas. TLC indicó que solo quedaba una pequeña cantidad de materiales de partida.

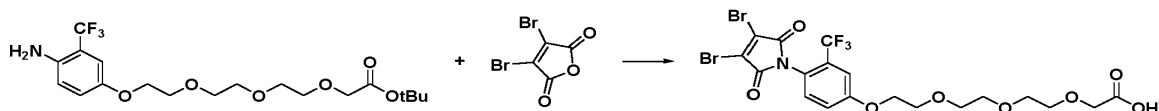
Después se enfrió a temperatura ambiente, se extrajo con 500 ml de diclorometano. La fase orgánica se lavó una vez con 400 ml de ácido clorhídrico diluido 1 N, una vez con 400 ml de agua y una vez con 400 ml de agua salada saturada y se secó con sulfato sódico anhidro y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, malla 200-300), se enjuagó con éter de petróleo: acetato de etilo 30:1-10:1, para obtener el intermedio B-1 (7,5 g, 56,1 % de rendimiento), que era un producto oleaginoso amarillo.

1.1.3 Intermedio C-1



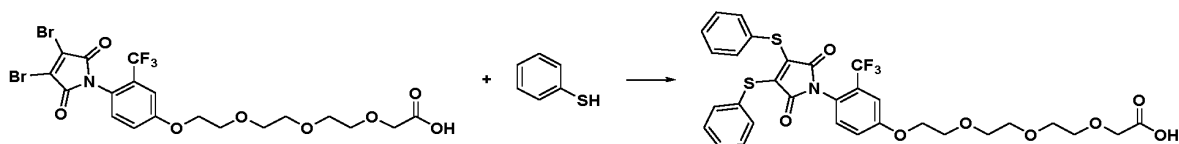
El intermedio B-1 (6 g, 13,23 mmol) se disolvió en 100 ml de etanol anhidro y después la solución obtenida se añadió a un matraz de reacción que contenía 1,2 g de Pd-C al 10 %. Se llevó a cabo una reacción de hidrogenación durante 6 horas (1 atm, 38 °C) y la TLC indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se filtró a través de tierra de diatomeas, la torta del filtro se enjuagó con etanol y el filtrado se evaporó rotatoriamente para obtener el intermedio C-1 (5 g, 89 % de rendimiento), que era un producto oleaginoso amarillo.

1.1.4 Compuesto E-1



Se pesó el intermedio C-1 (0,8 g, 1,889 mmol) y se colocó en un tubo de reacción paralelo, después se le añadió AcOH (3 ml) bajo la protección de nitrógeno y se agitó para disolver. Después, se añadió anhídrido 3,4-dibromomaleico (0,483 g, 1,889 mmol) al tubo y la mezcla de reacción obtenida se calentó a 110 °C y se agitó durante la noche bajo la protección de nitrógeno. La reacción se detectó por TLC. En lo sucesivo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se sometió a evaporación rotatoria adicional dos veces mediante la adición de tolueno, obteniendo de esta manera el compuesto E-1, que era un producto oleaginoso de color pardo y se usó en la siguiente etapa directamente sin ser purificado.

1.2 Síntesis del compuesto E-2 (Fórmula Ia-2) (etapa e)



El compuesto E-1 (2,0 g, 1,35 mmol) se pesó y se colocó en un matraz de fondo redondo de 100 ml, después se añadieron 30 ml de diclorometano anhidro bajo la protección de nitrógeno y se agitó para disolver. Después, se pesaron 297 mg de tiofenol y se añadieron bajo la protección de nitrógeno. Después de que se disolviera el tiofenol, se añadió gota a gota lentamente DIPEA (0,44 ml, 2,70 mmol) al matraz que estaba en un baño de hielo. En lo sucesivo, la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos y después se retiró el baño de hielo. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo la protección de nitrógeno, TLC indicó que la reacción se había completado.

El disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se aisló y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice de malla 200-300). La columna se cargó y se enjuagó con diclorometano y después se enjuagó con metanol cuya polaridad aumentó lentamente del 2 % al 10 %. Se recogió el eluyente y se evaporó el disolvente para obtener E-2 (0,92 g, 79 % de rendimiento), que era un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 595,13 y valor medido: 596,15 (ESI, M+H+).

1.3 Síntesis del compuesto E-3 (Fórmula Ia-3)

El compuesto E-3 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-2 del Ejemplo 1.2, con la excepción de que el tiofenol en la etapa e se cambió por 2-mercaptopiridina. El producto E-3 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.4 Síntesis del compuesto E-4 (Fórmula Ia-4)

El compuesto E-4 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-2 del Ejemplo 1.2, con la excepción de que el 5-fluoro-2-nitrobenzotrifluoruro en la etapa b se cambió por 4-fluoro-2-metoxi-1-nitrobenzoceno y el tiofenol en la etapa e se cambió por 4-(N-morfolineformamida) tiofenol. El producto E-4 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.5 Síntesis del compuesto E-5 (Fórmula Ia-5)

El compuesto E-5 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-2 del Ejemplo 1.2, con la excepción de que el 5-fluoro-2-nitrobenzotrifluoruro en la etapa b se cambió por 1-fluoro-2-metoxi-4-nitrobenzoceno y el tiofenol en la etapa e se cambió por 4-(N-morfolineformamida) tiofenol. El producto E-5 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.6 Síntesis del compuesto E-6 (Fórmula Ia-6)

El compuesto E-6 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-2 del Ejemplo 1.2, con la excepción de que el 5-fluoro-2-nitrobenzotrifluoruro en la etapa b se cambió por 5-fluoro-2-nitrobenzonitrilo y el tiofenol en la etapa e se cambió por 4-(N-morfolineformamida) tiofenol. El producto E-6 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.7 Síntesis del compuesto E-7 (Fórmula Ia-7)

El compuesto E-7 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-2 del Ejemplo 1.2, con la excepción de que el 5-fluoro-2-nitrobenzotrifluoruro en la etapa b se cambió por 2-fluoro-5-nitrobenzonitrilo y el tiofenol en la etapa e se cambió por 4-(N-morfolineformamida) tiofenol. El producto E-7 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.8 Síntesis del compuesto E-8 (Fórmula Ia-8)

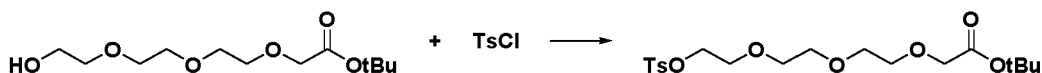
El compuesto E-8 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-2 del Ejemplo 1.2, con la excepción de que el 5-fluoro-2-nitrobenzotrifluoruro en la etapa b se cambió por 5-fluoro-2-nitrobenzamida y el tiofenol en la etapa e se cambió por 4-(N-morfolineformamida) tiofenol. El producto E-8 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.9 Síntesis del compuesto E-9 (Fórmula Ia-9)

El compuesto E-9 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-2 del Ejemplo 1.2, con la excepción de que el 5-fluoro-2-nitrobenzotrifluoruro en la etapa b se cambió por 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometil)benzoceno y el tiofenol en la etapa e se cambió por 4-(N-morfolineformamida) tiofenol. El producto E-9 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.10 Síntesis del compuesto E-10 (Fórmula Ia-10)

El compuesto E-10 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-2 del Ejemplo 1.2, con la excepción de que el 5-fluoro-2-nitrobenzotrifluoruro en la etapa b se cambió por 1-fluoro-4-nitro-2-(trifluorometil)benzoceno y el tiofenol en la etapa e se cambió por 4-(N-morfolineformamida) tiofenol. El producto E-10 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

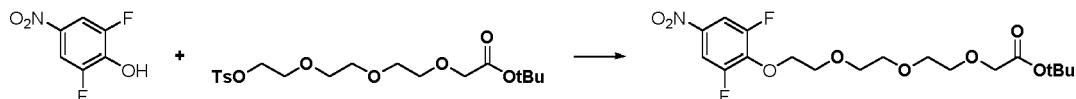
1.11 Síntesis del compuesto E-11 (Fórmula Ia-11)**1.11.1 Intermedio F-11 (etapa f)**

En un matraz de fondo redondo de 250 ml, el intermedio A-1 (4 g, 15,13 mmol), trietilamina (2,53 ml, 18,16 mmol) y dimetilaminopiridina (0,370 g, 3,03 mmol) se disolvieron en 100 ml de diclorometano, se secaron con tamiz molecular y después se agitaron. Posteriormente, se añadió cloruro de 4-toluenosulfonilo (3,17 g, 16,65 mmol) por lotes en un baño de hielo y el sistema de reacción obtenido se agitó bajo la protección de argón a temperatura ambiente durante la noche.

Al sistema de reacción, se añadieron 100 ml de diclorometano para la extracción y después la fase orgánica se lavó una vez con 200 ml de ácido clorhídrico diluido 1 N, dos veces con 200 ml de agua y una vez con 200 ml de salmuera saturada y se secó con sulfato sódico anhidro y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se aisló por cromatografía en columna, en el cual la columna se rellenó con gel de sílice de malla 200-300 y se eluyó con PE:EA = 5:1-2:1. El eluyente recogido se retiró por evaporación rotatoria para obtener el intermedio F-11 (2,8 g, 44,2 %

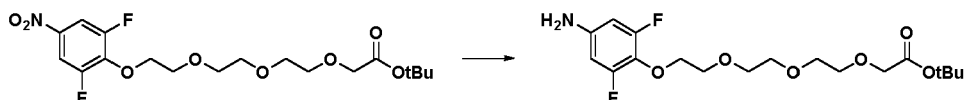
de rendimiento).

1.11.2 Intermedio B-11 (etapa g)



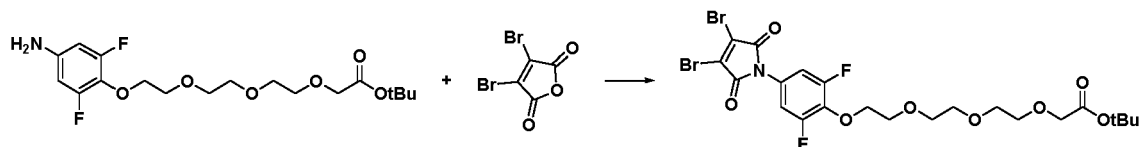
El intermedio F-11 (1 g, 2,389 mmol) y 2,6-difluoro-4-nitrofenol (0,315 g, 1,797 mmol) se disolvieron en 20 ml de DMF y después K_2CO_3 (0,497 g, 3,59 mmol) se le añadió. La mezcla obtenida se calentó a 100 °C y se agitó durante 5 horas. El disolvente se retiró por evaporación rotatoria y después el residuo se disolvió en 200 ml de diclorometano para la extracción. La fase orgánica se lavó después una vez con 200 ml de ácido clorhídrico diluido 1 N, una vez con 200 ml de agua y una vez con 200 ml de agua salada saturada y se secó con sulfato sódico anhidro y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se purificó por cromatografía en columna, en el cual la columna se rellenó con gel de sílice de malla 200-300 y se eluyó con PE:EA = 5:1-3:1. El eluyente recogido se retiró por evaporación rotatoria para obtener el intermedio B-11 (600 mg, 79 % de rendimiento).

1.11.3 Intermedio C-11



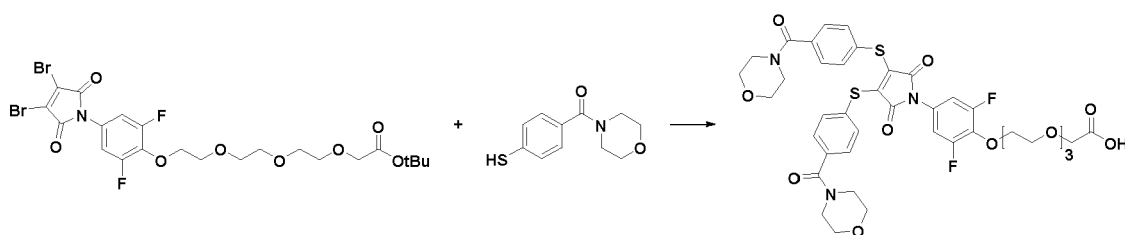
El intermedio B-11 (600 mg, 1,42 mmol) se disolvió en 100 ml de etanol anhidro y después la solución obtenida se añadió a un matraz de reacción que contenía 120 mg de Pd-C al 10 %. Se llevó a cabo una reacción de hidrogenación durante 6 horas (1 atm, 38 °C) y la TLC indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se filtró a través de tierra de diatomeas, la torta del filtro se enjuagó con etanol y el filtrado se evaporó rotatoriamente para obtener el intermedio C-11 (450 mg, 81 % de rendimiento), que era un producto oleaginoso amarillo.

1.11.4 Intermedio D-11



Se pesó el intermedio C-11 (0,40 g, 1,02 mmol) y se colocó en un tubo de reacción paralelo, después se le añadió AcOH (3 ml) bajo la protección de nitrógeno y se agitó para disolver. Después, se añadió anhídrido 3,4-dibromomaleico (0,261 g, 1,02 mmol) al tubo y la mezcla de reacción obtenida se calentó a 110 °C y se agitó durante la noche bajo la protección de nitrógeno. La reacción se detectó por TLC. En lo sucesivo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. El residuo se sometió a evaporación rotatoria adicional dos veces mediante la adición de tolueno, obteniendo de esta manera el intermedio D-11, que era un producto oleaginoso de color pardo y se usó en la siguiente etapa directamente sin ser purificado.

1.11.5 Intermedio E-11



El compuesto D-11 (600 mg, 0,95 mmol) se pesó y se colocó en un matraz de fondo redondo de 100 ml, después se añadieron 30 ml de diclorometano anhidro bajo la protección de nitrógeno y se agitó para disolver. Después, se pesaron 425 mg (1,91 mmol) de 4-(N-morfolinformamida) tiofenol y se añadieron bajo la protección de nitrógeno. Después de disolver el 4-(N-morfolinformamida) tiofenol, se añadió gota a gota lentamente DIPEA (0,36 ml, 1,91 mmol) al matraz que estaba en un baño de hielo. En lo sucesivo, la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos y después se retiró el baño de hielo. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo la protección de

nitrógeno, TLC indicó que la reacción se había completado.

El disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se aisló y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice de malla 200-300). La columna se cargó y se enjuagó con diclorometano y después se enjuagó con metanol cuya polaridad aumentó lentamente del 2 % al 10 %. Se recogió el eluyente y se evaporó el disolvente para obtener E-11 (0,62 g, 76 % de rendimiento), que era un producto oleaginoso naranja. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 857,21 y valor medido: 858,23 (ESI, M+H+).

1.12 Síntesis del compuesto E-12 (Fórmula Ia-12)

El compuesto E-12 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-11 del Ejemplo 1.11, con la excepción de que el 2,6-difluoro-4-nitrofenol en la etapa g se cambió por 3-fluoro-4-nitrofenol. El producto E-12 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.13 Síntesis del compuesto E-13 (Fórmula Ia-13)

El compuesto E-13 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-11 del Ejemplo 1.11, con la excepción de que el 2,6-difluoro-4-nitrofenol en la etapa g se cambió por 2,5-difluoro-4-nitrofenol. El producto E-13 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.14 Síntesis del compuesto E-14 (Fórmula Ia-14)

El compuesto E-14 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-11 del Ejemplo 1.11, con la excepción de que el trietilenglicol en la etapa a se cambió por dietilenglicol. El producto E-14 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.15 Síntesis del compuesto E-15 (Fórmula Ia-15)

El compuesto E-15 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-11 del Ejemplo 1.11, con la excepción de que el trietilenglicol en la etapa a se cambió por tetraetilenglicol. El producto E-15 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.16 Síntesis del compuesto E-16 (Fórmula Ia-16)

El compuesto E-16 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-11 del Ejemplo 1.11, con la excepción de que el trietilenglicol en la etapa a se cambió por pentaetilenglicol. El producto E-16 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.17 Síntesis del compuesto E-17 (Fórmula Ia-17)

El compuesto E-17 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-11 del Ejemplo 1.11, con la excepción de que el trietilenglicol en la etapa a se cambió por hexaetilenglicol. El producto E-17 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.18 Síntesis del compuesto E-18 (Fórmula Ia-18)

El compuesto E-18 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-11 del Ejemplo 1.11, con la excepción de que el trietilenglicol en la etapa a se cambió por dodecaetilenglicol. El producto E-18 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.19 Síntesis del compuesto E-19 (Fórmula Ia-19)

El compuesto E-19 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-11 del Ejemplo 1.11, con la excepción de que el 4-(N-morfolinformamida) tiofenol en la etapa e se cambió por tiomorfolina-1,1-dióxido. El producto E-19 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.20 Síntesis del compuesto E-20 (Fórmula Ia-20)

El compuesto E-20 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-11 del Ejemplo 1.11, con la excepción de que el 4-(N-morfolinformamida) tiofenol en la etapa e se cambió por 4-(N-metilformamida) tiofenol. El producto E-20 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.21 Síntesis del compuesto E-21 (Fórmula Ia-21)

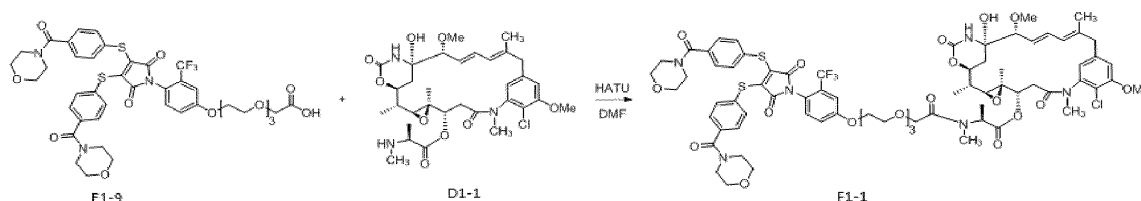
El compuesto E-21 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-2 del Ejemplo 1.2, con la excepción de que el 5-fluoro-2-nitrobenzotrifluoruro en la etapa b se cambió por 5-fluoro-2-nitropiridina y el tiofenol en la etapa e se cambió por 4-(N-morfolineformamida) tiofenol. El producto E-21 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

1.22 Síntesis del compuesto E-22 (Fórmula Ia-22)

El compuesto E-22 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto E-2 del Ejemplo 1.2, con la excepción de que el 5-fluoro-2-nitrobenzotrifluoruro en la etapa b se cambió por 2-fluoro-5-nitropiridina y el tiofenol en la etapa e se cambió por 4-(N-morfolineformamida) tiofenol. El producto E-21 obtenido fue un producto oleaginoso naranja.

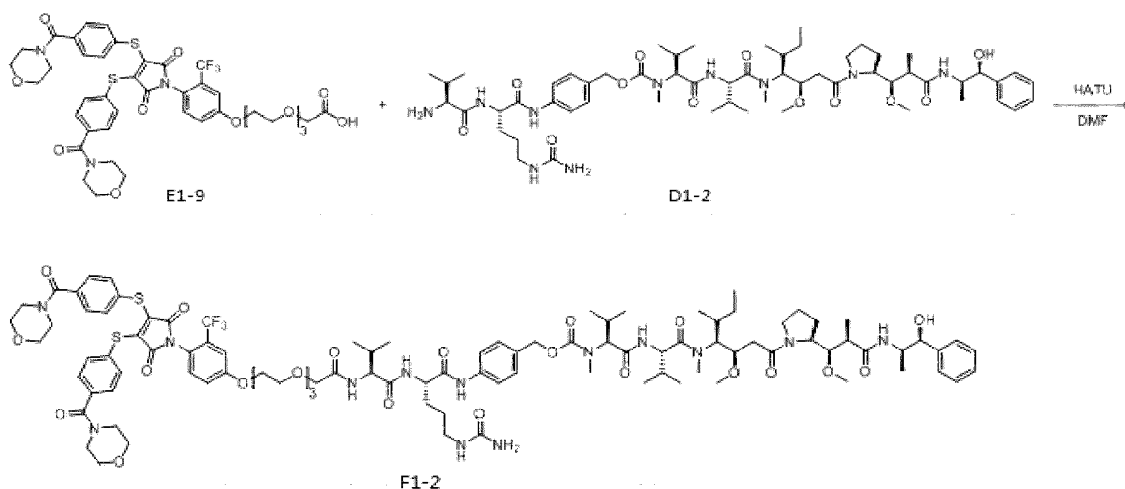
5 El segundo grupo de ejemplos: Síntesis y preparación de compuestos como se muestra en las fórmulas Ib-1-Ib-24

2.1 Síntesis del compuesto F1-1 (Fórmula Ib-1)



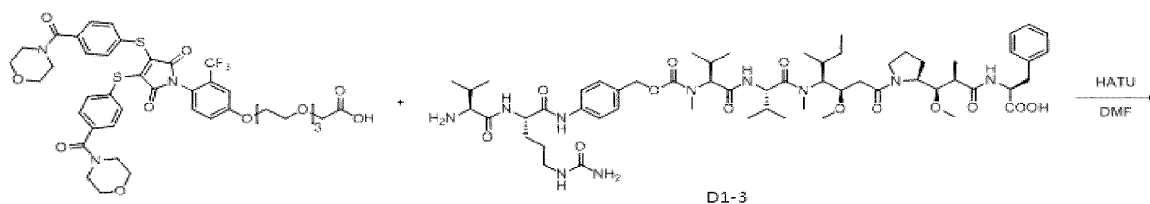
El compuesto E1-9 (300 mg, 0,337 mmol) se pesó y se colocó en un matraz de fondo redondo de 100 ml y se agitó para disolver mediante la adición de DMF anhidra (20 ml) bajo la protección de nitrógeno. En lo sucesivo, HATU (154 mg, 0,404 mmol) y DIEA (0,11 ml, 0,674 mmol) se pesaron y se añadieron al matraz sucesivamente. La mezcla obtenida se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se le añadió el compuesto D1-1 (219 mg, 0,337 mmol). La mezcla de reacción obtenida se agitó durante la noche a temperatura ambiente con la protección de nitrógeno. TLC y HPLC indicaron que la materia prima E9 desapareció con la reacción durante la noche. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se analizó cuantitativamente y después se aisló y purificó por HPLC de fase inversa para obtener un producto en polvo amorfo amarillo F1-1 (0,350 g, 0,230 mmol, 68,2 % de rendimiento). Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1520,48 y valor medido: 1521,51 (ESI, M+H+).

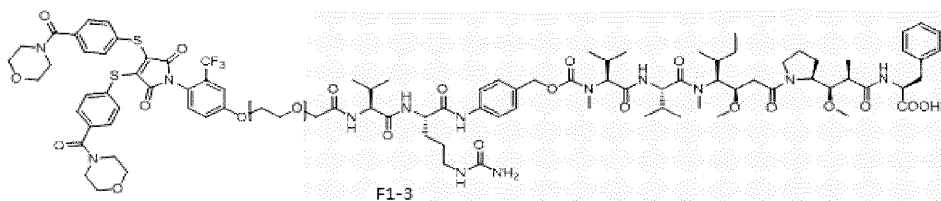
2.2 Síntesis del compuesto F1-2 (Fórmula Ib-2)



El compuesto F1-2 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1-1 se cambió por el compuesto D1-2. El producto F1-2 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1993,91 y valor medido: 1994,93 (ESI, M+H+).

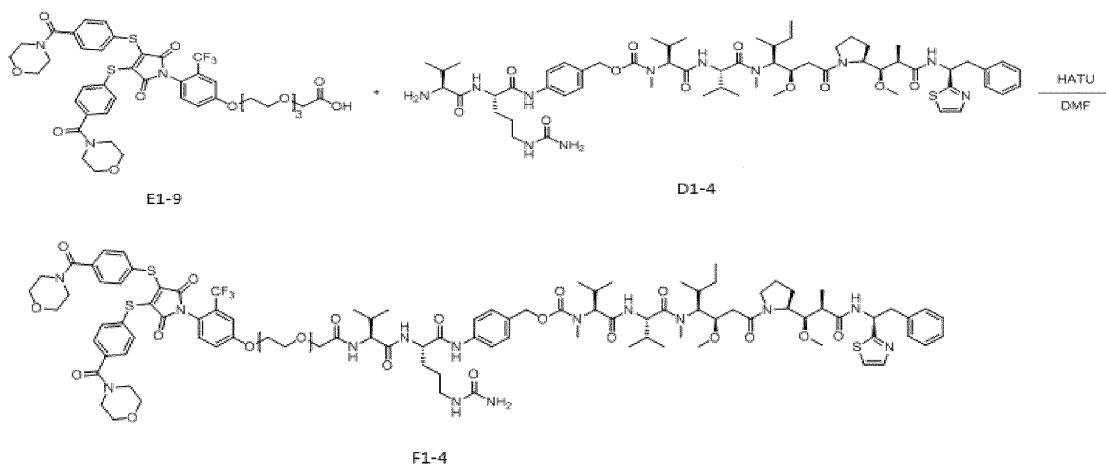
2.3 Síntesis del compuesto F1-3 (Fórmula Ib-3)





El compuesto F1-3 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1-1 se cambió por el compuesto D1-3. El producto F1-3 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 2007,89 y valor medido: 2008,91 (ESI, M+H+).

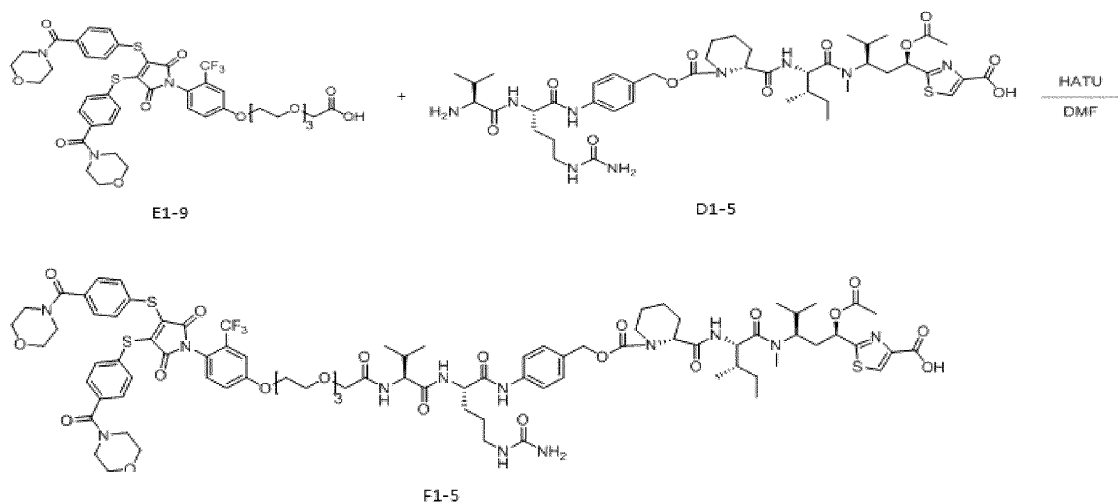
5 2.4 Síntesis del compuesto F1-4 (Fórmula Ib-4)



El compuesto F1-4 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1-1 se cambió por el compuesto D1-4. El producto F1-4 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 2046,88 y valor medido: 2047,86 (ESI, M+H+).

10

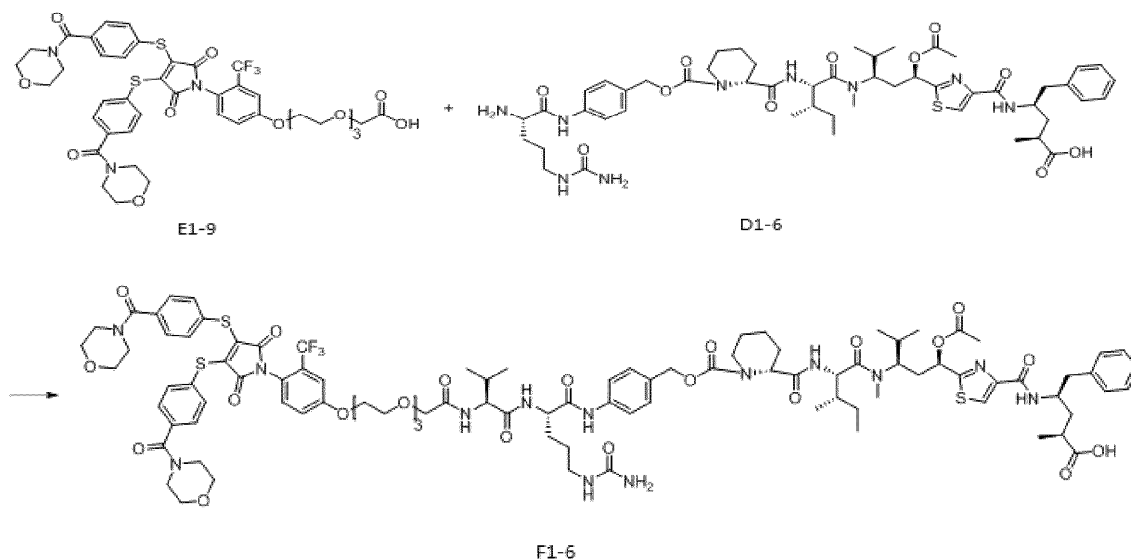
2.5 Síntesis del compuesto F1-5 (Fórmula Ib-5)



El compuesto F1-5 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1-1 se cambió por el compuesto D1-5. El producto F1-5 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1800,67 y valor medido: 1801,65 (ESI, M+H+).

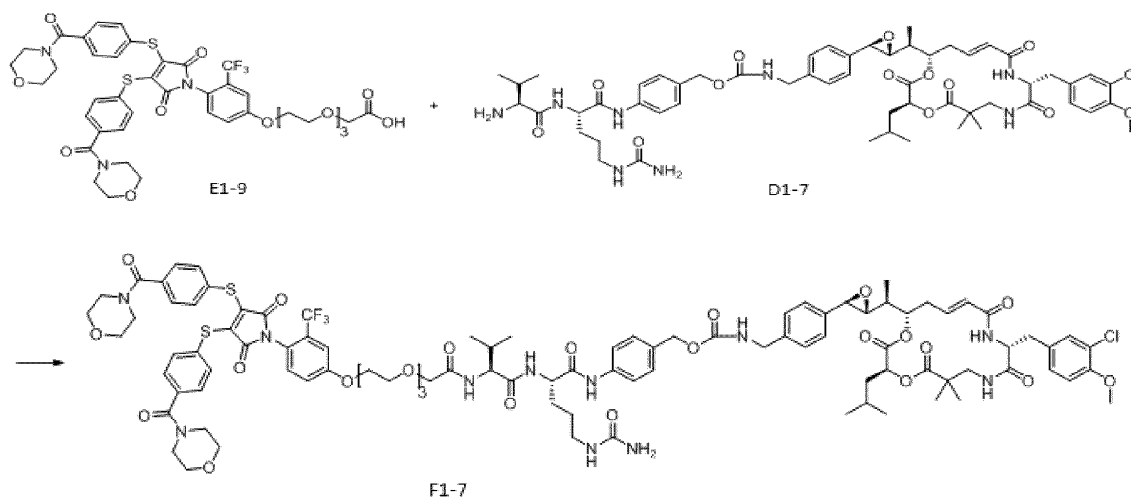
15

2.6 Síntesis del compuesto F1-6 (Fórmula Ib-6)



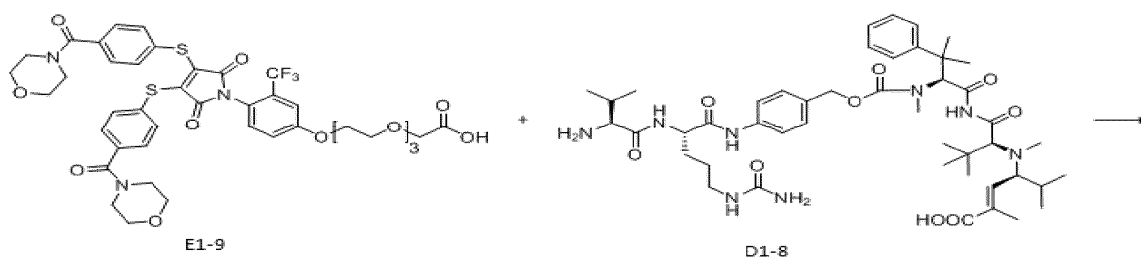
El compuesto F1-6 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1-1 se cambió por el compuesto D1-6. El producto F1-6 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1989,79 y valor medido: 1990,80 (ESI, M+H+).

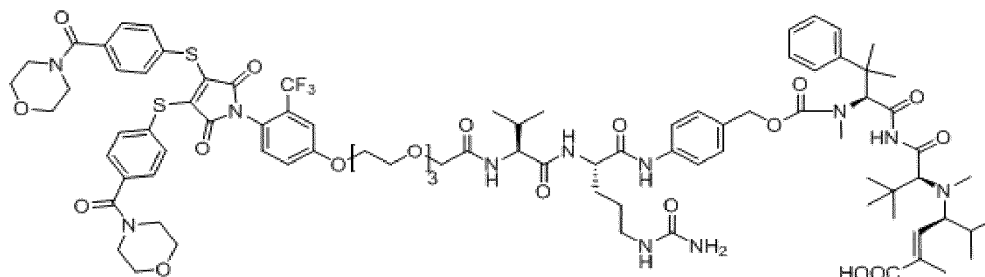
2.7 Síntesis del compuesto F1-7 (Fórmula Ib-7)



El compuesto F1-7 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1-1 se cambió por el compuesto D1-7. El producto F1-7 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1973,72 y valor medido: 1974,72 (ESI, M+H+).

2.8 Síntesis del compuesto F1-8 (Fórmula Ib-8)

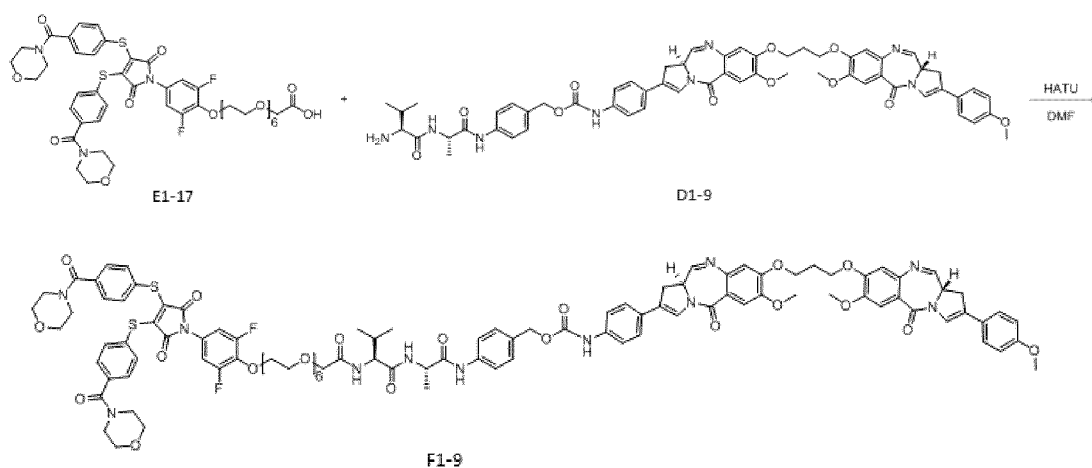




F1-8

El compuesto F1-8 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1-1 se cambió por el compuesto D1-8. El producto F1-8 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1749,73 y valor medido: 1750,75 (ESI, M+H+).

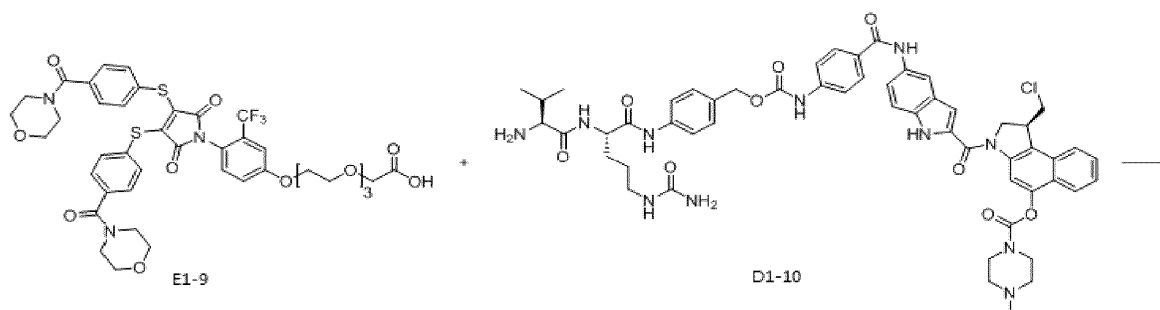
5 2.9 Síntesis del compuesto F1-9 (Fórmula Ib-9)

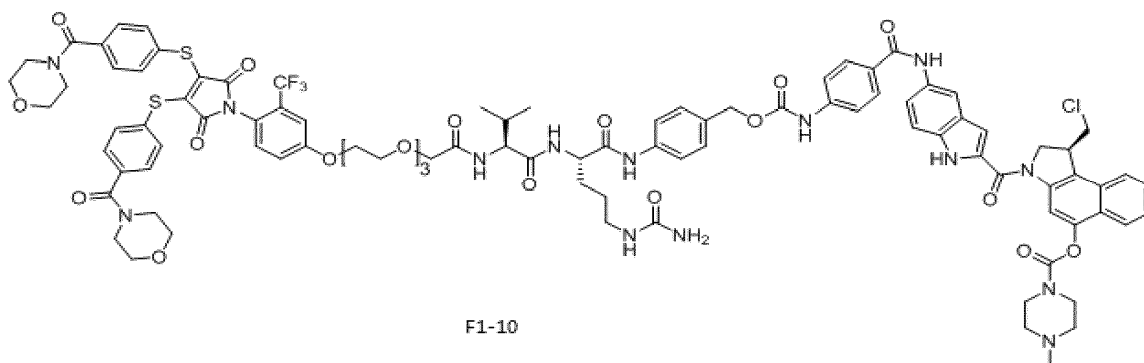


F1-9

El compuesto F1-9 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que los compuestos E1-9 y D1-1 se cambiaron por los compuestos E1-17 y D1-9 respectivamente. El producto F1-9 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 2015,72 y valor medido: 2016,73 (ESI, M+H+).

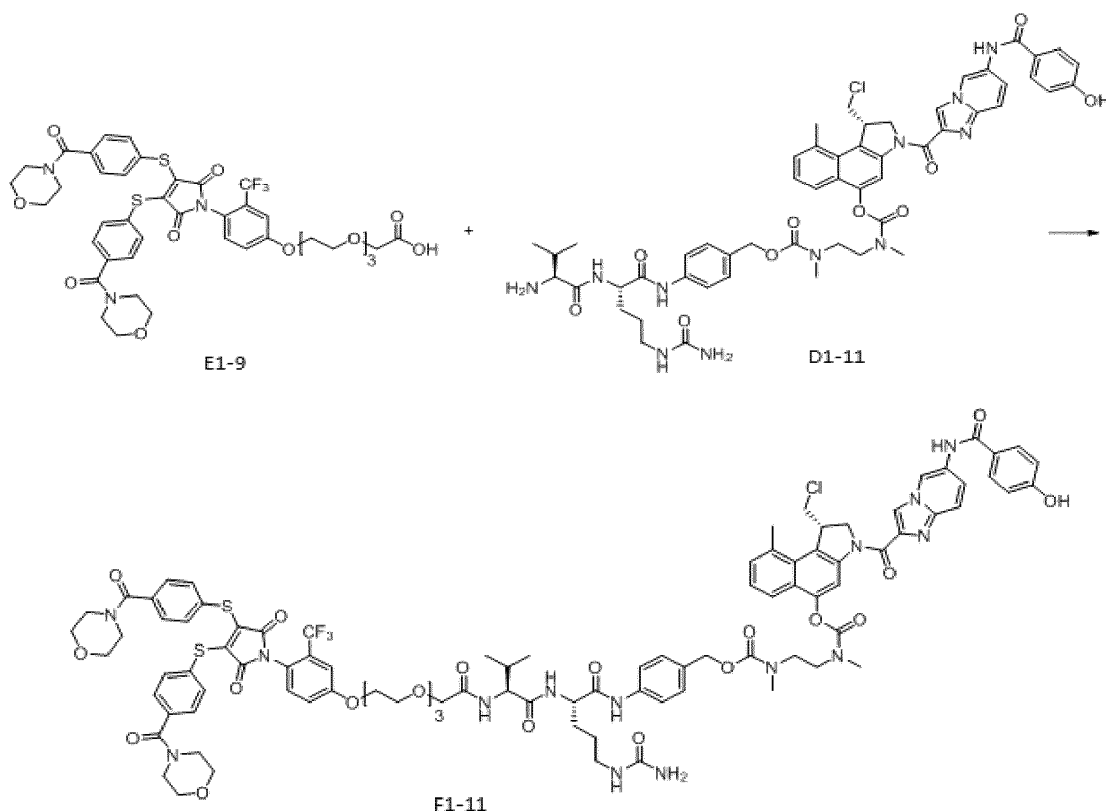
2.10 Síntesis del compuesto F1-10 (Fórmula Ib-10)





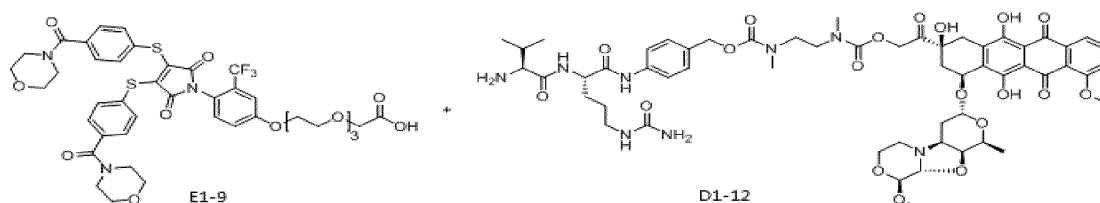
El compuesto F1-10 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1-1 se cambió por el compuesto D1-10. El producto F1-10 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1912,63 y valor medido: 1913,65 (ESI, M+H+).

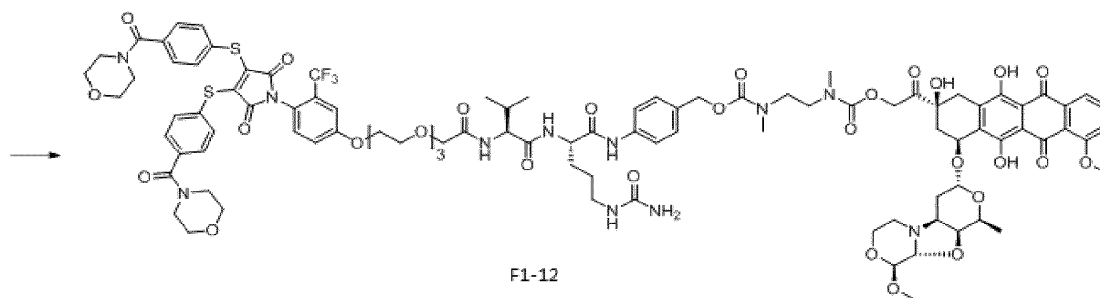
5 2.11 Síntesis del compuesto F1-11 (Fórmula Ib-11)



El compuesto F1-11 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1-1 se cambió por el compuesto D1-11. El producto F1-11 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1916,63 y valor medido: 1917,61 (ESI, M+H+).

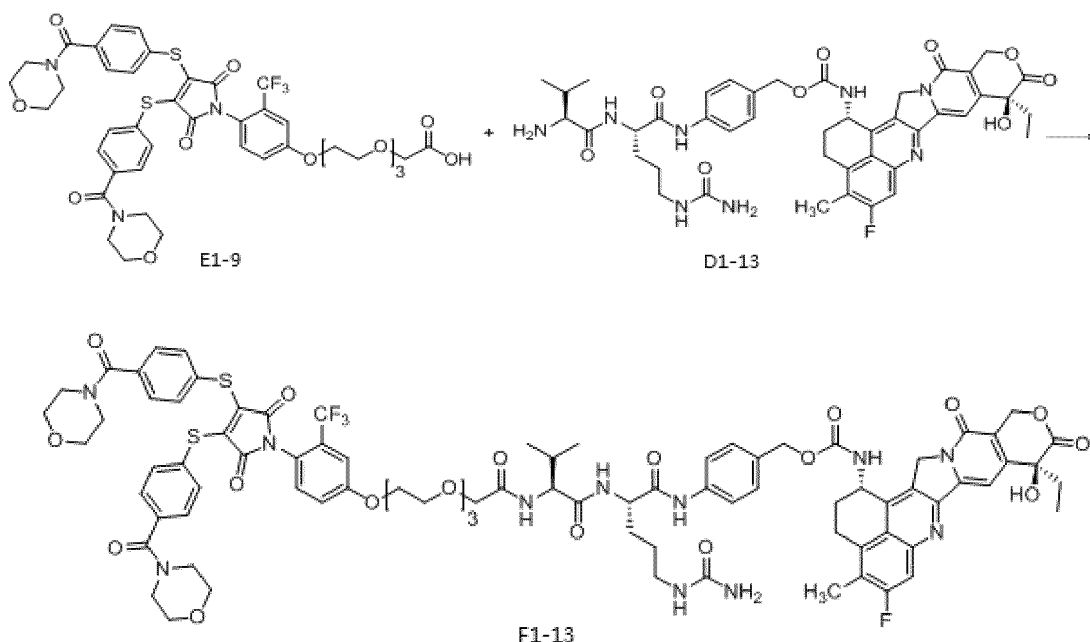
2.12 Síntesis del compuesto F1-12 (Fórmula Ib-12)





El compuesto F1-12 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1-1 se cambió por el compuesto D1-12. El producto F1-12 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 2031,70 y valor medido: 2032,71 (ESI, M+H+).

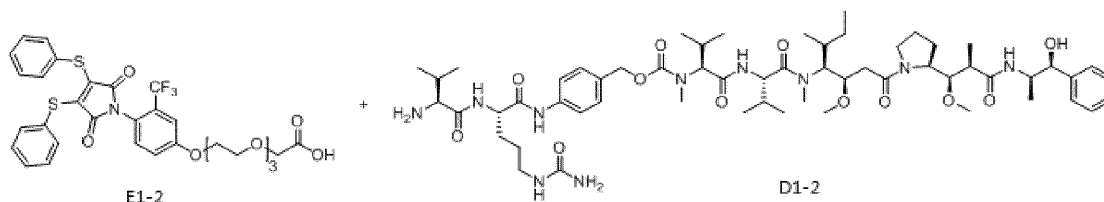
5 2.13 Síntesis del compuesto F1-13 (Fórmula Ib-13)

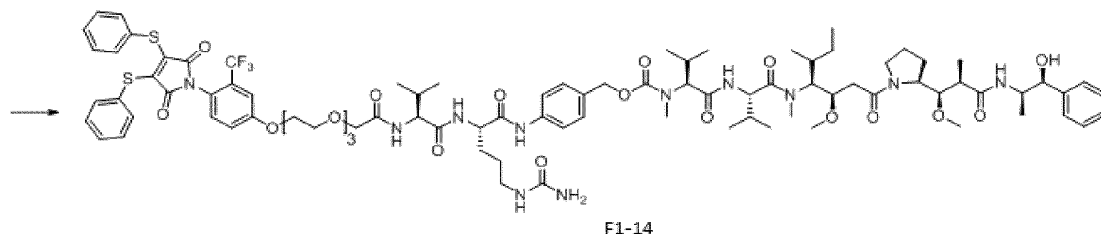


El compuesto F1-13 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que el compuesto D1-1 se cambió por el compuesto D1-13. El producto F1-13 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M +): 1711,57 y valor medido: 1712,55 (ESI, M+H+).

10

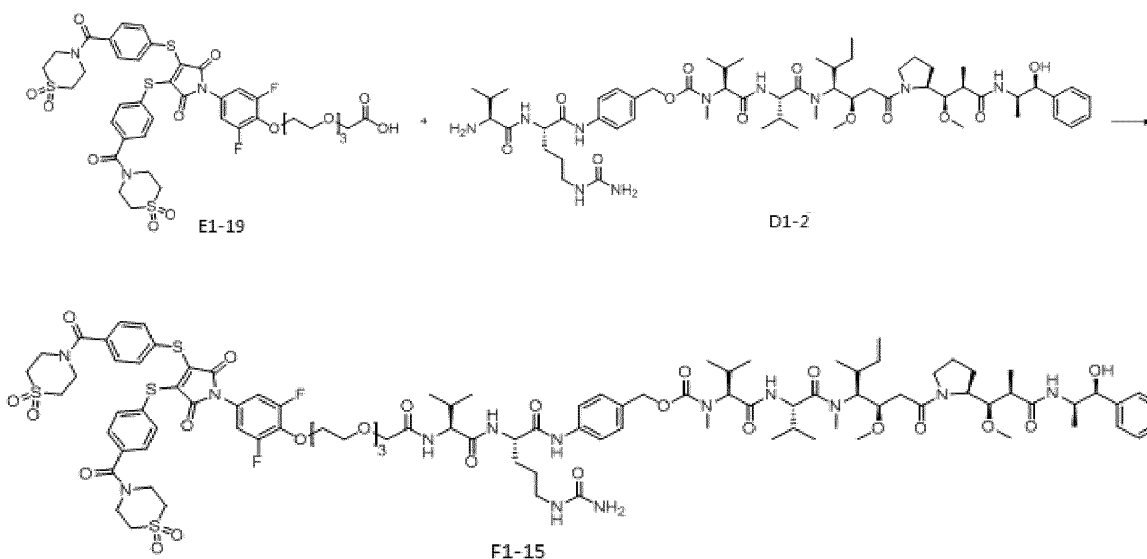
2.14 Síntesis del compuesto F1-14 (Fórmula Ib-14)





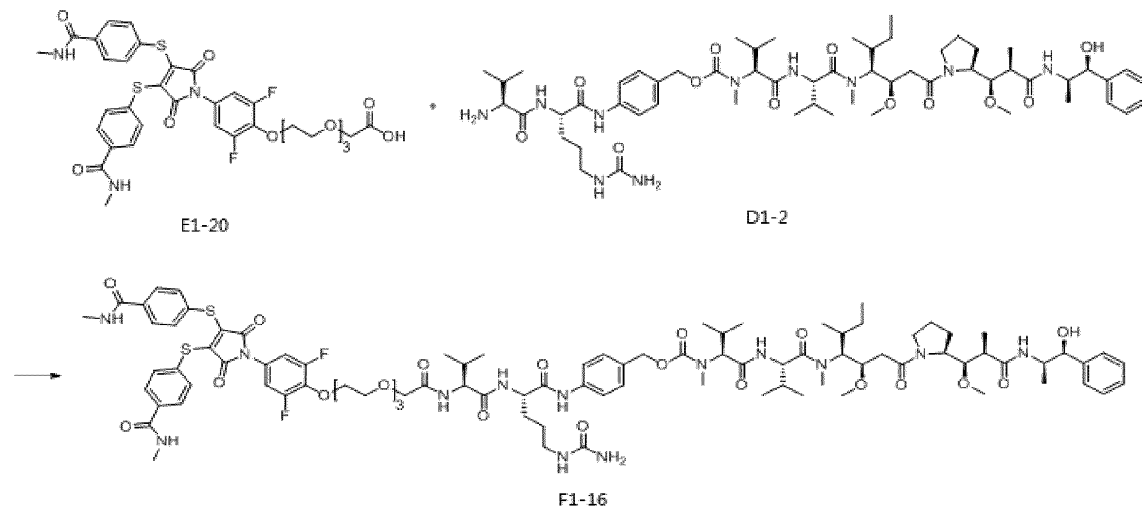
El compuesto F1-14 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que los compuestos E1-9 y D1-1 se cambiaron por los compuestos E1-2 y D1-2 respectivamente. El producto F1-14 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1767,82 y valor medido: 1768,83 (ESI, M+H⁺).

2.15 Síntesis del compuesto F1-15 (Fórmula Ib-15)



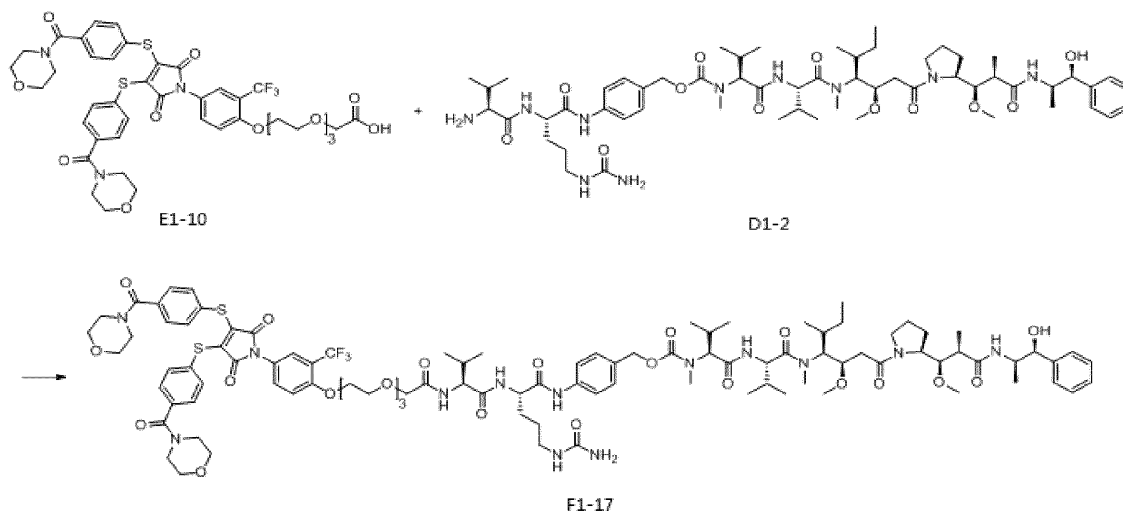
El compuesto F1-15 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que los compuestos E1-9 y D1-1 se cambiaron por los compuestos E1-19 y D1-2 respectivamente. El producto F1-15 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 2057,84 y valor medido: 2058,87 (ESI, M+H⁺).

2.16 Síntesis del compuesto F1-16 (Fórmula Ib-16)



El compuesto F1-16 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que los compuestos E1-9 y D1-1 se cambiaron por los compuestos E1-20 y D1-2 respectivamente. El producto F1-16 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1849,85 y valor medido: 1850,83 (ESI, M⁺H⁺).

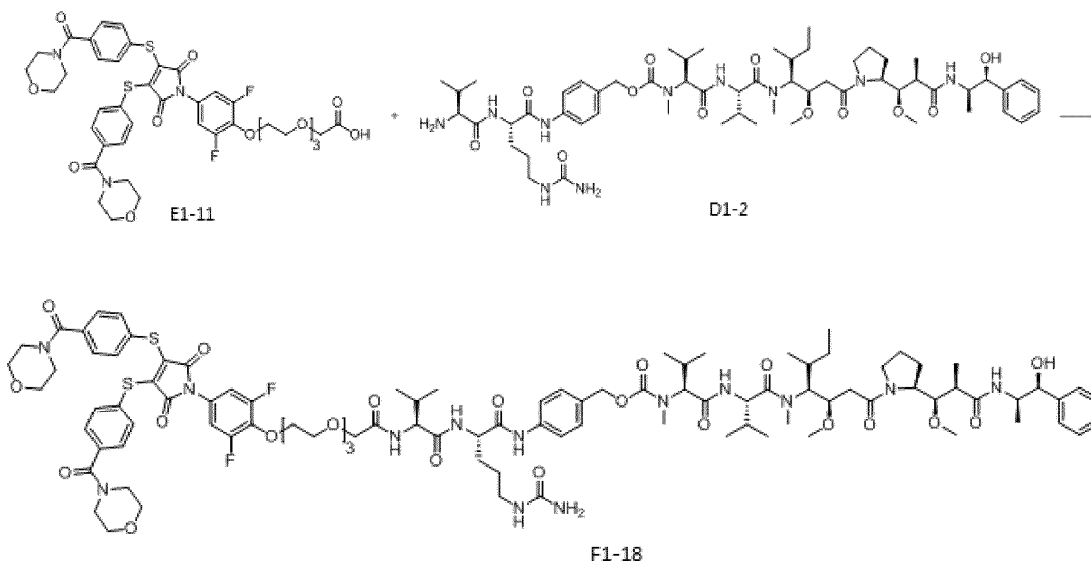
5 2.17 Síntesis del compuesto F1-17 (Fórmula Ib-17)



El compuesto F1-17 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que los compuestos E1-9 y D1-1 se cambiaron por los compuestos E1-10 y D1-2 respectivamente. El producto F1-17 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1993,91 y valor medido: 1994,90 (ESI, M⁺H⁺).

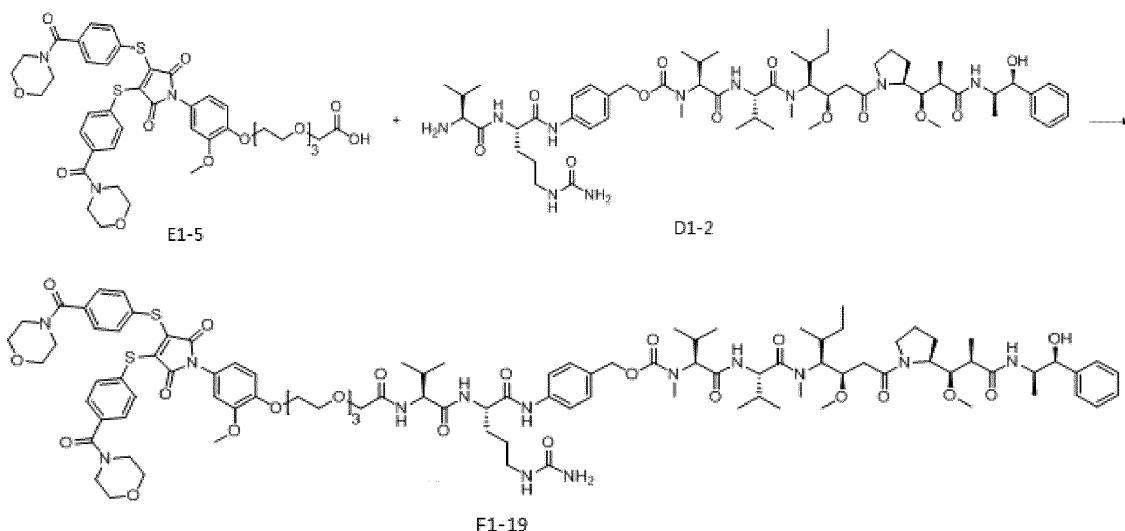
10

2.18 Síntesis del compuesto F1-18 (Fórmula Ib-18)



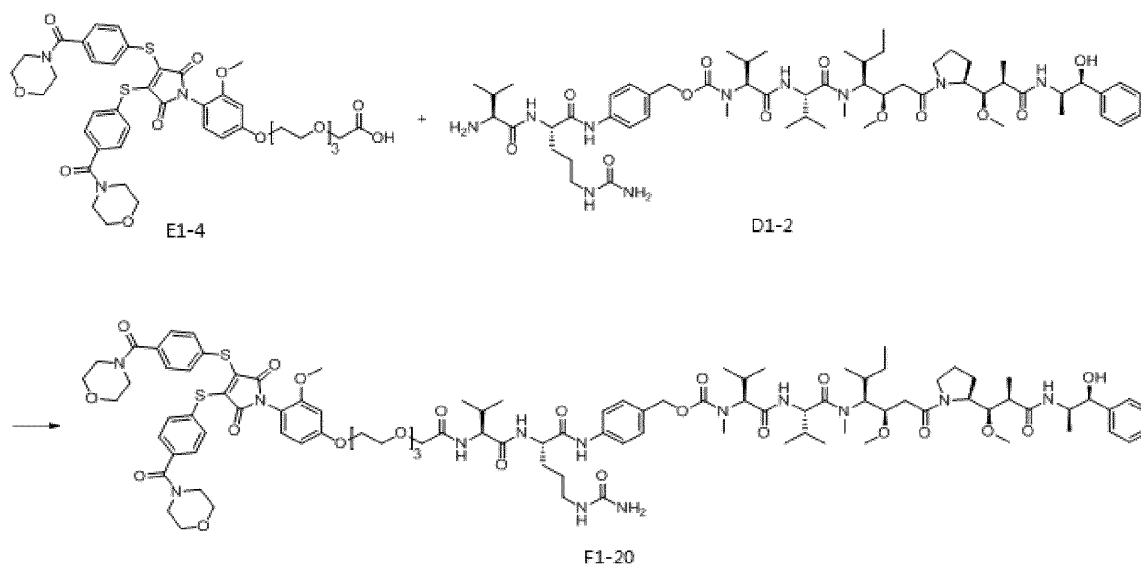
15 El compuesto F1-18 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que los compuestos E1-9 y D1-1 se cambiaron por los compuestos E1-11 y D1-2 respectivamente. El producto F1-18 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1961,90 y valor medido: 1962,91 (ESI, M⁺H⁺).

2.19 Síntesis del compuesto F1-19 (Fórmula Ib-19)



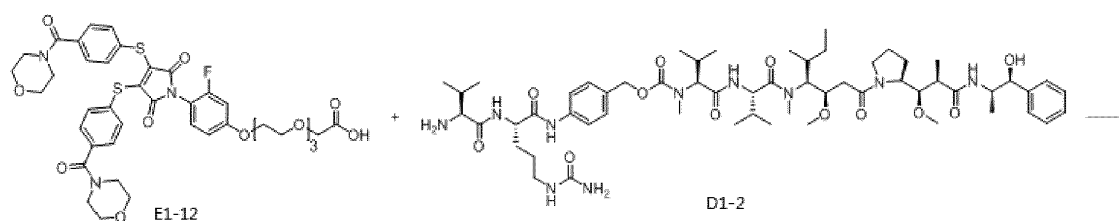
5 El compuesto F1-19 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que los compuestos E1-9 y D1-1 se cambiaron por los compuestos E1-5 y D1-2 respectivamente. El producto F1-19 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1955,93 y valor medido: 1956,95 (ESI, M+H⁺).

2.20 Síntesis del compuesto F1-20 (Fórmula Ib-20)



10 El compuesto F1-20 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que los compuestos E1-9 y D1-1 se cambiaron por los compuestos E1-4 y D1-2 respectivamente. El producto F1-20 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1955,93 y valor medido: 1956,95 (ESI, M+H⁺).

2.21 Síntesis del compuesto F1-21 (Fórmula Ib-21)



15



5

2.22 Síntesis del compuesto F1-22 (Fórmula Ib-22)



10

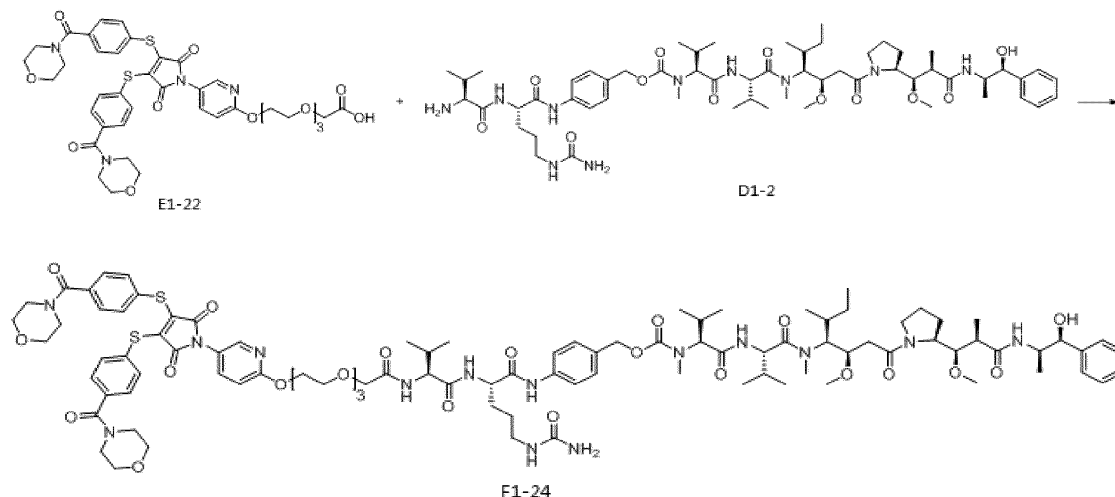
2.23 Síntesis del compuesto F1-23 (Fórmula Ib-23)



15

1927,93 (ESI, M+H+).

2.24 Síntesis del compuesto F1-24 (Fórmula Ib-24)



- 5 El compuesto F1-24 se sintetizó mediante las mismas etapas para sintetizar el compuesto F1-1 del Ejemplo 2.1, con la excepción de que los compuestos E1-9 y D1-1 se cambiaron por los compuestos E1-22 y D1-2 respectivamente. El producto F1-24 obtenido era un polvo amorfo amarillo. Valor teórico a través de CL-EM (M⁺): 1926,92 y valor medido: 1927,93 (ESI, M+H⁺).

El tercer grupo de Ejemplos: Preparación del conjugado de anticuerpo y fármaco

10 1. Preparación de ADC-I

Una solución madre de pertuzumab se diluyó a 2 mg/ml con dihidrógeno fosfato de potasio-hidróxido sódico 50 mM (KH₂PO₄-NaOH)/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/solución tampón de reacción de ácido dietilentríamino pentacetato (DTPA) 1 mM con un pH de 7 y, a continuación, una relación molar en exceso de 6.0x de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) se añadió a la misma. La solución de reacción obtenida se agitó a 35 °C durante 2,5 horas.

- 15 Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 8 °C y se añadió una cantidad adecuada de dimetilsulfóxido (DMSO) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto F1-17 (10 mg/ml, disuelto previamente en DMSO) y se aseguró que el DMSO en el sistema de reacción no fuera superior al 15 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 37 °C durante 3 horas para el acoplamiento.

- 20 La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 6,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recogida se esterilizó a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,15 µm y el producto obtenido se almacenó a -60 °C.

2. Preparación de ADC-II

- 25 Una solución madre de pertuzumab se diluyó a 5 mg/ml con dihidrógeno fosfato de potasio-hidróxido sódico 50 mM (KH₂PO₄-NaOH)/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/solución tampón de reacción de ácido dietilentríamino pentacetato (DTPA) 1 mM con un pH de 6 y, a continuación, una relación molar en exceso de 10x de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) se añadió a la misma. La solución de reacción obtenida se agitó a 10 °C durante 40 horas.

- 30 Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 5 °C y se añadió una cantidad adecuada de dimetilacetamida (DMA) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto F1-2 (10 mg/ml, disuelto previamente en DMA) y se aseguró que el DMA en el sistema de reacción no fuera superior al 10 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 25 °C durante 2,5 horas para el acoplamiento.

- 35 La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 6,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recogida se esterilizó a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,22 µm y el producto obtenido se almacenó a -80 °C.

3. Preparación de ADC-III

Una solución madre de pertuzumab se diluyó a 5 mg/ml con PBS // solución tampón de reacción de ácido dietilentríamino pentacetato (DTPA) 1 mM con un pH de 7,4 y después una relación molar en exceso de 20x de

hidrocloruro de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) se añadió a la misma. La solución de reacción obtenida se agitó a 15 °C durante 2 horas.

Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 10 °C y se añadió una cantidad adecuada de acetonitrilo (ACN) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto F1-20 (10 mg/ml, disuelto previamente en ACN) y se aseguró que el ACN en el sistema de reacción no fuera superior al 10 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 10 °C durante 4 horas para el acoplamiento.

La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 8,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recogida se esterilizó a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,20 µm y el producto obtenido se almacenó a -90 °C.

4. Preparación de ADC-IV

Una solución madre de pertuzumab se diluyó a 8 mg/ml con dihidrógeno fosfato de potasio-hidróxido sódico 50 mM (KH₂PO₄-NaOH)/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/solución tampón de reacción de ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA) 1 mM con un pH de 7 y, a continuación, una relación molar en exceso de 8x de hidrocloruro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) se añadió a la misma. La solución de reacción obtenida se agitó a 25 °C durante 25 horas.

Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 5 °C y se añadió una cantidad adecuada de dimetilformamida (DMF) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto F1-19 (10 mg/ml, disuelto previamente en DMF) y se aseguró que el DMF en el sistema de reacción no fuera superior al 8 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 0 °C durante 2 horas para el acoplamiento.

La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 6,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recogida se esterilizó a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,3 µm y el producto obtenido se almacenó a -80 °C.

5. Preparación de ADC-V

Una solución madre de pertuzumab se diluyó a 6 mg/ml con histidina-hidróxido sódico 50 mM/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/solución tampón de reacción de ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA) 1 mM con un pH de 7,4 y, a continuación, una relación molar en exceso de 8x de hidrocloruro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) se añadió a la misma. La solución de reacción obtenida se agitó a 35 °C durante 15 horas.

Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 10 °C y se añadió una cantidad adecuada de dimetilformamida (DMF) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto F1-22 (10 mg/ml, disuelto previamente en DMF) y se aseguró que el DMF en el sistema de reacción no fuera superior al 8 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 0 °C durante 5 horas para el acoplamiento.

La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 6,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recogida se esterilizó a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,15 µm y el producto obtenido se almacenó a -100 °C.

6. Preparación de ADC-VI

Una solución madre de pertuzumab se diluyó a 10 mg/ml con solución de tampón de reacción ácido bórico-bórax 50 mM/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/ácido dietilentriamino pentacetato 1 mM (DTPA) con un pH de 9; y después se le añadió una proporción molar en exceso de 8x de hidrocloruro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP). La solución de reacción obtenida se agitó a 25 °C durante 10 horas.

Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 10 °C y se añadió una cantidad adecuada de dimetilformamida (DMF) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto F1-21 (10 mg/ml, disuelto previamente en DMF) y se aseguró que el DMF en el sistema de reacción no fuera superior al 8 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 0 °C durante 4 horas para el acoplamiento.

La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 6,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recogida se esterilizó a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,2 µm y el producto obtenido se almacenó a -60 °C.

7. Preparación de ADC-VII

Una solución madre de pertuzumab se diluyó a 3 mg/ml con dihidrógeno fosfato de potasio-hidróxido sódico 50 mM (KH₂PO₄-NaOH)/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/solución tampón de reacción de ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA) 1 mM con un pH de 8 y, a continuación, una relación molar en exceso de 8x de hidrocloruro de tris(2-

carboxietil)fosfina (TCEP) se añadió a la misma. La solución de reacción obtenida se agitó a 15 °C durante 48 horas.

Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió una cantidad adecuada de dimetilformamida (DMF) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto F1-18 (10 mg/ml, disuelto previamente en DMF) y se aseguró que el DMF en el sistema de reacción no fuera superior al 8 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 0 °C durante 3 horas para el acoplamiento.

La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 6,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recogida se esterilizó a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,3 µm y el producto obtenido se almacenó a -70 °C.

8. Preparación de ADC-VIII

Una solución madre de trastuzumab se diluyó a 5 mg/ml con hidrógeno fosfato disódico-cloruro sódico (NaCl) 50 mM/cloruro sódico (NaCl) 150 mM/solución tampón de reacción de ácido dietilentriamino pentacetato (DTPA) 1 mM con un pH de 7,4 y, a continuación, una relación molar en exceso de 8x de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) se añadió a la misma. La solución de reacción obtenida se agitó a 25 °C durante 5 horas.

Posteriormente, sin ser purificada, la solución de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió una cantidad adecuada de dimetilformamida (DMF) y una proporción molar en exceso de 6x del compuesto F1-2 (10 mg/ml, disuelto previamente en DMF) y se aseguró que el DMF en el sistema de reacción no fuera superior al 8 % en volumen. La solución de reacción obtenida se agitó a 0 °C durante 2 horas para el acoplamiento.

La solución de reacción después de la reacción de acoplamiento se purificó por filtración con una columna de desalinización usando gel de histidina-ácido acético/sacarosa (pH 6,0) y después se recogió la muestra en el pico de absorción de acuerdo con el valor de absorción ultravioleta UV280. La muestra recogida se esterilizó a través de un dispositivo de filtración con un tamaño de poro de 0,3 µm y el producto obtenido se almacenó a -80 °C.

El cuarto grupo de Ejemplos: estudio de detección y estabilidad del conjugado de anticuerpo y fármaco

Mediante análisis de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en fármacos conjugados con anticuerpos, puede obtenerse información importante tal como el número y la posición de los sitios de acoplamiento y la relación fármaco-anticuerpo (DAR). En este sentido, los inventores realizaron análisis HIC en los productos ADC anteriores basándose en las siguientes condiciones y los cromatogramas obtenidos se muestran en las Figuras 11-1 a 11-8 y las Figuras 12-1 a 12-2.

Agilent 1290 Infinity

Columna cromatográfica: Waters Protein-Pak Hi Res HIC (4,6*100 mm, 2,5 µm) Fase móvil: Sulfato de amonio 2,5 M (que contiene tampón fosfato 125 mM): tampón fosfato 125 mM: isopropanol;
Caudal: 0,7 ml/min, temperatura de la columna: 25 °C.

Además, La tecnología CL-EM se ha usado para analizar la estructura y composición de los ADC, evaluar la estabilidad de los enlazadores en los ADC y analizar y determinar proporciones relativas entre componentes que tienen diferentes DAR. En este sentido, los inventores realizaron análisis CL-EM en los productos ADC anteriores basándose en las siguientes condiciones y los cromatogramas obtenidos se muestran en las Figuras 13-1 a 13-8 y las Figuras 14-1 a 14-2.

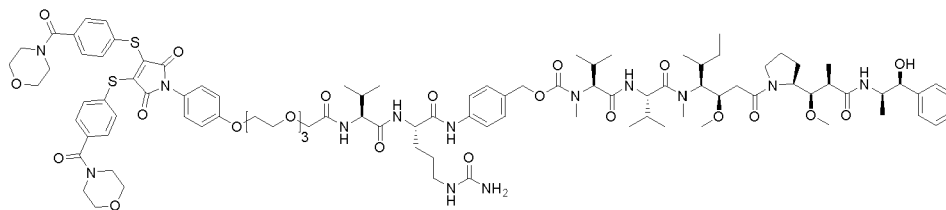
Instrumento: Agilent 6520 Q-TOF

Columna cromatográfica: Polihidroxietil-A (PHEA) (PolyLC, Columbia, MD) 2,1 mm*200 mm; partículas de 5 µm con poros de 300 Å

Fase móvil: acetato de amonio 200 mM Caudal: 0,1 ml/min;

Temperatura de la columna: 25 °C

El puente de enlace disulfuro basado en maleamida tiene una mejor estabilidad, que es menos propenso al intercambio de sulfhidrido-éter en el cuerpo. Para demostrar aún más que la introducción de un sustituyente en Ar' puede ralentizar en gran medida la reacción de hidrólisis secundaria que se produce después de que se abre el anillo de la maleamida y también mejorar la estabilidad del conjugado de anticuerpo y fármaco en comparación con el fenilo no sustituido, los inventores habían preparado un ADC control en este experimento. El ADC control se obtuvo acoplando pertuzumab y un compuesto en el cual Ar' es simplemente un fenilo sustituido en 1,4 (como se muestra en la siguiente fórmula) a través del mismo método de acoplamiento que para preparar ADC-I.



Se seleccionaron los conjugados de anticuerpo y fármaco ADC-1, ADC-II y ADC-VII para compararlos con el ADC control. Específicamente, las muestras de ADC que tenían la misma concentración de anticuerpos y se almacenaron en tampones, se colocaron a 25 °C y después se tomaron muestras los días 0, 2, 4 y 7 respectivamente.

- 5 La cantidad correspondiente de hidrolizado secundario formado en cada muestra de conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) se determinó mediante CL-EM (Q-TOF), se extrajo el pico característico en el espectro de masas del hidrolizado secundario y se calculó el área del pico. La tendencia cambiante en las cantidades de hidrolizados secundarios en cada muestra de ADC se obtuvo comparando el cambio en las áreas de los picos del día 0 al 7, y vea los siguientes datos y la Figura 15 para obtener detalles. A partir de los siguientes datos, puede verse que las
- 10 las cantidades de hidrolizados secundarios formados en la muestra de ADC control son significativamente más altas que las formadas en las muestras de ADC-I, ADC-II y ADC-VII.

Días	ADC control	ADC-I	ADC-VII	ADC-II
Día 0	61779,22	12978,85	24559,1	0
Día 2	1335141	513786,8	679699,3	11842,82
Día 4	2876314	1204614	1561592	34018,8
Día 7	4835396	1933476	3061651	79192,73

- Además, los cambios de cada muestra de ADC en los días 0, 2, 4 y 7 también se determinaron por HIC. Como puede verse en las Figuras 16-1 a 16-4, en el cromatograma del ADC control muestreado el día 7, apareció un pico de impurezas en la posición en la que el tiempo de retención era 6,904. Sin embargo, como se muestra en las Figuras
- 15 17-1 a 17-4, Figuras 18-1 a 18-4 y Figuras 19-1 a 19-4, los cromatogramas de las muestras ADC-I, ADC-II y ADC-VII que se muestrearon del día 0 al 7 no mostraron cambios sustanciales.

El quinto grupo de Ejemplos: Detecciones biológicas del conjugado de anticuerpo y fármaco

1. Ensayo de actividad biológica de proliferación celular *in vitro*

- 20 Materiales experimentales usados en el siguiente experimento: DMEM, DMEM/F12K, medio RPMI 1640, tripsina-EDTA al 0,25 %, suero bovino fetal, 100 x piruvato sódico y 100 x penicilina-estreptomicina se obtuvieron de Gibco; sulforhodamina B (SRB) se obtuvo de Sigma; y células de cáncer gástrico humano NCI-N87 y células de cáncer de mama humano BT-474 se compraron del Banco de células de Kunming de la Academia de Ciencias de China. Todos los demás reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Se usaron Poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Corning, N.º de catálogo 3599) y lector de microplacas Synergy 2 (Bio-Tek).

- 25 En este ejemplo, los efectos de ADC-I, ADC-II, ADC-III, ADC-IV, ADC-V, ADC-VI, ADC-VII y ADC-VIII sobre la proliferación de líneas de células tumorales se investigaron.

- En este ejemplo se usó un método colorimétrico basado en sulforodamina B (SRB) para evaluar el efecto antiproliferativo de los fármacos. SRB es un colorante aniónico rosa que es fácilmente soluble en agua y puede unirse específicamente a los aminoácidos básicos de las proteínas en las células en condiciones ácidas. Proporciona un pico
- 30 de absorción a 510 nm y la absorbancia se correlaciona lineal y positivamente con la cantidad de células. En este sentido, el método puede usarse en una detección cuantitativa del número de células.

Las líneas celulares usadas en este Ejemplo son: células de cáncer de mama humano BT-474 y células de cáncer gástrico humano NCI-N87.

- 35 Células BT-474 y NCI-N87 se incubaron en medio RPMI 1640 que contenía un 10 % de suero bovino fetal hasta la fase de crecimiento logarítmico en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C. Las células anteriores en la fase de crecimiento logarítmico se inoculaban en placas de 96 pocillos a una densidad de 2x10³ a 9x10³ células por pocillo, 100 µl por pocillo, se cultivaron durante 24 horas y después se les añadieron diferentes concentraciones de fármacos durante 5 días. Específicamente, cada fármaco se preparó en nueve concentraciones diluyéndolas en 3, 4 o 5 veces, cada concentración se fijó en pocillos duplicados y también se fijó la concentración correspondiente de pocillos de control de vehículo y pocillos de control sin células. Al final de la acción del fármaco, las soluciones de cultivo se decantaron y se añadieron a cada pocillo 100 µl de una solución de ácido tricloroacético (30 %, p/v) preenfriada a 4 °C y las células se fijaron a 4 °C durante 1 hora. Posteriormente, las células se lavaron con agua desionizada 5 veces, se secaron a temperatura ambiente y después se añadieron por pocillo 100 µl de colorante SRB al 0,4 % (p/v) (Sigma, preparado con ácido acético glacial al 1 %). Después de incubarse y teñirse a temperatura ambiente durante
- 40

30 minutos, las células se lavaron con ácido acético glacial al 1 % durante 4 veces para retirar los colorantes no unidos y después se secaron a temperatura ambiente. En lo sucesivo, se añadieron 100 µl de solución de Tris 10 mM por pocillo. Después de incubarse y teñirse a temperatura ambiente durante 15 minutos, las células se lavaron con ácido acético glacial al 1 % durante 5 veces para retirar SRB no unido y después se secaron a temperatura ambiente. Los colorantes unidos a las proteínas en las células se disolvieron mediante la adición de tampón Tris 10 mM (pH = 10,5) por pocillo, y la absorbancia (valor de DO) se midió a longitudes de onda de 510 nm y 690 nm usando el lector de microplacas Synergy 2 (Bio-Tek). $A = DO_{510} - DO_{690}$.

$$\text{Tasa de inhibición (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{fármaco}}) / A_{\text{control}} \times 100 \%$$

En este experimento, los efectos de ADC-I, ADC-II, ADC-III, ADC-IV, ADC-V, ADC-VI, ADC-VII y ADC-VIII en la proliferación de diversas líneas de células tumorales de alta expresión de Her2 *in vitro* cultivadas se investigaron. Como se muestra en la siguiente tabla, la proliferación de células de cáncer gástrico humano NCI-N87 de alta expresión de Her2 y células de cáncer de mama humano BT-474 se inhibió significativamente después de ser tratadas con ADC-I, ADC-II, ADC-III, ADC-IV, ADC-V, ADC-VI, ADC-VII y ADC-VIII en comparación con el tratado con anticuerpos desnudos Perjeta y Herceptina. Las curvas de inhibición de la proliferación correspondientes se muestran en la Figura 20-23.

Muestra	CI ₅₀ , µg/ml 120 h	
	NCI-N87	BT-474
Perjeta	> 10	> 10
Herceptina	0,440	0,0986
ADC-I	0,000140	0,000183
ADC-II	0,000690	0,000469
ADC-III	0,001562	0,000905
ADC-IV	0,000623	0,000364
ADC-V	0,001645	0,001255
ADC-VI	0,000612	0,000607
ADC-VII	0,000534	0,000421
ADC-VIII	0,00159	0,000431

2. Ensayo de efectividad antitumoral *in vivo*

La efectividad de los conjugados de la presente invención puede detectarse *in vivo*. Resumiendo, puede implantarse un aloinjerto o xenoinjerto de células cancerosas en roedores y después los tumores implantados se tratan con los conjugados. A los ratones probados se les puede administrar tratamiento farmacológico o tratamiento de control, monitorizarse durante semanas o más para observar el tiempo de duplicación del tumor, log de destrucción y supresión de tumores.

1) Animales de experimentación

Los ratones BALB/cA-desnudos de 6-7 semanas (♀) se obtuvieron de Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd. Número de licencia de producción: SCXK (Shanghái) 2013-0018; número de certificado de animal: 2013001815683; y entorno de alimentación: nivel SPF.

2) Etapas experimentales

Esos ratones desnudos se inocularon por vía subcutánea con 6×10^6 células de cáncer gástrico humano NCI-N87 y después de que los tumores crecieran a 100-250 mm³, los ratones se dividieron en grupos (D0) según los volúmenes tumorales. Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa (IV), cada uno con un volumen de administración de 10 ml/kg; a los ratones del grupo de control con vehículo se les administró el mismo volumen de "vehículo" (solución salina fisiológica que contenía 0,1 % de BSA). Las dosis y el régimen de administración se proporcionan en la Figura 24. El volumen del tumor se midió 2 veces por semana, se pesaron los ratones y se registraron los datos correspondientes.

El fin de este experimento fue investigar el efecto de los fármacos sobre el crecimiento tumoral usando indicadores específicos T/C% o valor de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) (%).

Los diámetros de los tumores se midieron dos veces por semana con un calibre Vernier. El volumen del tumor (V) se calculó como:

$V = 1/2 \times a \times b^2$; en los cuales a y b representan el largo y el ancho respectivamente.

$T/C(\%) = (T - T_0) / (C - C_0) \times 100$, en los cuales T y C representan los volúmenes tumorales al final del experimento; T₀ y C₀ representan los volúmenes tumorales al comienzo del experimento.

El valor de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) (%) = 100 - T/C (%).

Cuando el tumor retrocede, el valor de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) (%) = 100 - (T - T₀)/T₀ × 100.

Si el tumor tuviera un volumen menor del que tenía inicialmente, es decir, $T < T_0$ o $C < C_0$, se definió parcialmente

regresivo (PR); mientras que si el tumor desapareciera por completo, se definió completamente regresivo (CR).

Cuando finalizó el experimento (D21), cuando se llegó al final del experimento, o cuando el volumen de un tumor llegó a 15000 mm³, el ratón correspondiente se sacrificó con narcosis de dióxido de carbono y se diseccionó, y el tumor se extrajo y se fotografió.

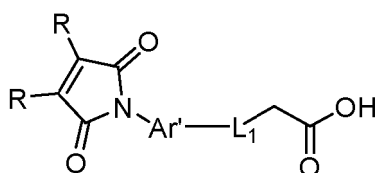
5 3) Resultados del experimento

Las efectividades de los fármacos sobre los xenoinjertos subcutáneos NCI-N87 de cáncer gástrico humano en ratones desnudos se muestran en la siguiente Tabla y Figura 24. Y lo que es más, esos ratones con tumores tenían buena tolerancia a los medicamentos y no se presentó ningún síntoma, como pérdida de peso.

				Tumor medio		Tumor medio		%	%				número de ratones por grupo	número de ratones por grupo
				volumen (mm ³)		volumen (mm ³)		T/C	TGI	valor de p	Parcial	completo	al principio	al final de
Grupo		Administración	Vía	DO	SEM	D23	SEM	D23	D23	D23	regresión	regresión	del experimento	experimento
control de vehículo		DO	IV	102,3	±1,1	643,6	±57,1	-	-	-	0	0	12	12
P-mcVC- MMAE	1,0 mg/kg	DO	IV	103,5	±3,1	194,6	±77,7	17	83	0,000	3	0	6	6
ADC control	0,5 mg/kg	DO	IV	105,4	±3,9	330,5	±48,5	42	58	0,003	0	0	6	6
ADC control	1,0 mg/kg	DO	IV	107,6	±4,6	107,8	±40,5	0	100	0,000	3	1	6	6
ADC-I	1,0 mg/kg	DO	IV	103,6	±3,8	74,6	±32,8	-28	128	0,000	3	2	6	6
ADC-IV	1,0 mg/kg	DO	IV	109,5	±4,0	180,1	±42,6	13	87	0,000	1	0	6	6
ADC-V	1,0 mg/kg	DO	IV	105,8	±1,0	78,7	±17,3	-26	126	0,000	3	1	6	6
ADC-VI	1,0 mg/kg	DO	IV	107,9	±3,7	116,0	±22,5	1	99	0,000	3	0	6	6
ADC-VII	0,5 mg/kg	DO	IV	104,2	±2,2	233,2	±58,1	24	76	0,000	2	0	6	6
ADC-VII	1,0 mg/kg	DO	IV	107,0	±3,6	46,8	±20,8	-56	156	0,000	3	2	6	6

REIVINDICACIONES

1. Un enlazador de maleamida sustituido como se muestra en la fórmula la,



(Ia)

en donde, R es X o ArS-,

X se selecciona de halógeno;

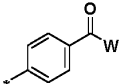
Ar se selecciona del grupo que consiste en arilo C₆-C₁₀ sustituido o no sustituido y heteroarilo de 5-12 miembros sustituido o no sustituido;

Ar' se selecciona del grupo que consiste en arileno C₆-C₁₀ sustituido o no sustituido y heteroarileno de 5-12 miembros sustituido o no sustituido;

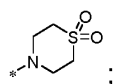
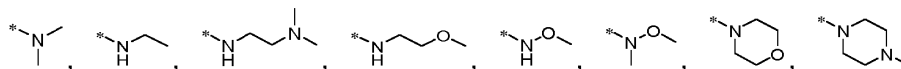
L₁ es -O(CH₂CH₂O)_n- enlazado a Ar', en el cual n es cualquier número entero entre 1 y 20.

2. El enlazador de maleamida sustituido según la reivindicación 1, en donde

A) Ar se selecciona del grupo que consiste en fenilo, fenilo sustituido con halógeno, alquilfenilo C₁-C₄, alcoxifenilo C₁-

C₄, 4-metilfenilo, 4-metoxifenilo, 2-piridilo, 2-pirimidinilo, 1-metilimidazol-2-ilo, y , en el cual W es amido

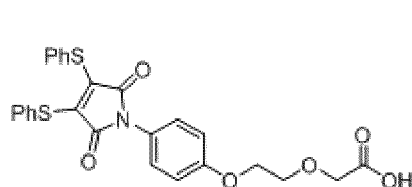
R¹ unido a carbonilo y R¹ se selecciona del grupo que consiste en -NH₂, ,



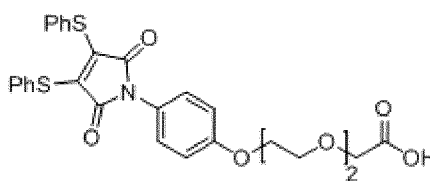
y/o,

B) Ar' se selecciona de fenileno y piridilo sustituidos y la sustitución significa que el átomo de hidrógeno del grupo se sustituye por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en: halógeno, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄, trifluorometilo, ciano y grupo amida.

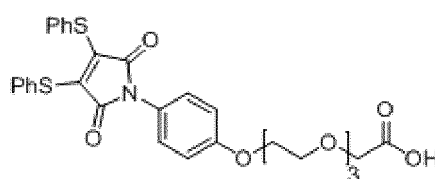
3. El enlazador de maleamida sustituido según la reivindicación 1, en donde el enlazador tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:



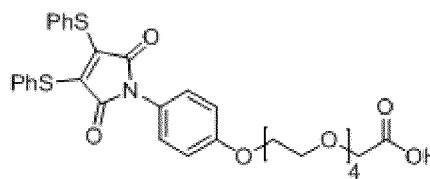
Fórmula 1;



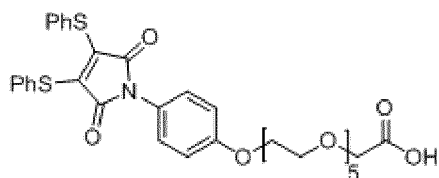
Fórmula 2;



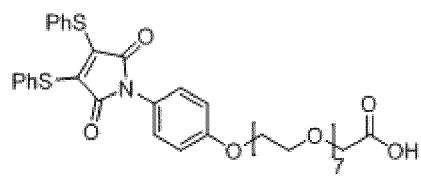
Fórmula 3;



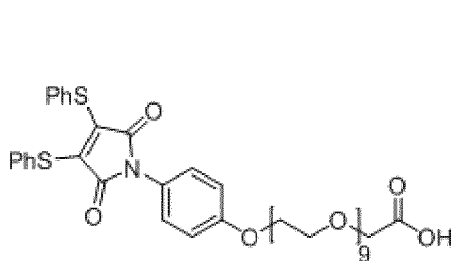
Fórmula 4;



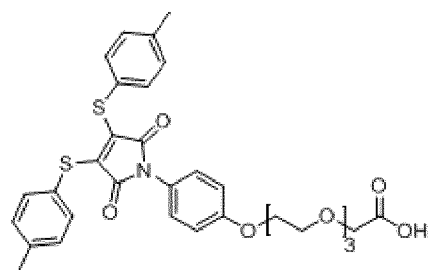
Fórmula 5;



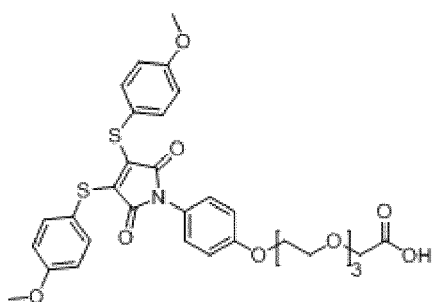
Fórmula 6;



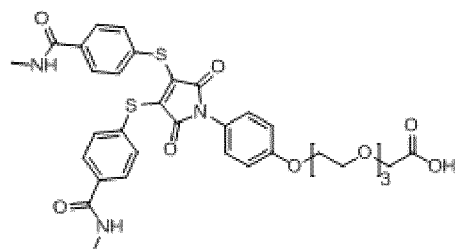
Fórmula 7;



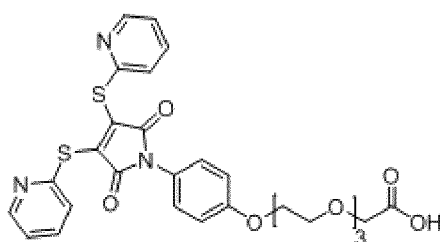
Fórmula 8;



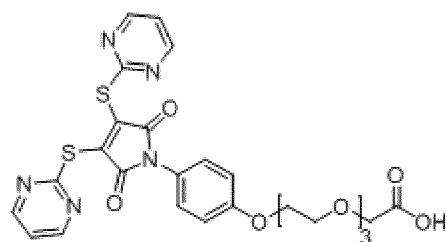
Fórmula 9;



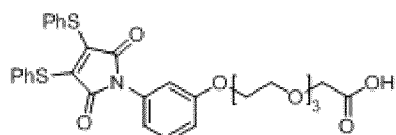
Fórmula 10;



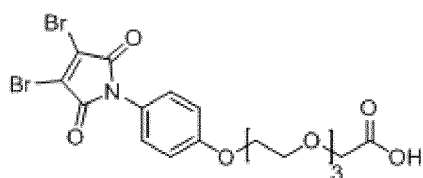
Fórmula 11;



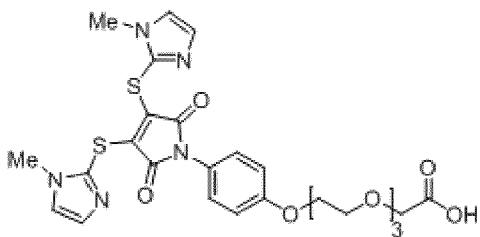
Fórmula 12;



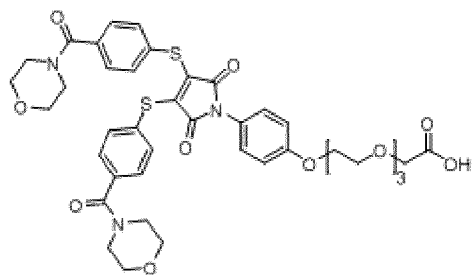
Fórmula 13;



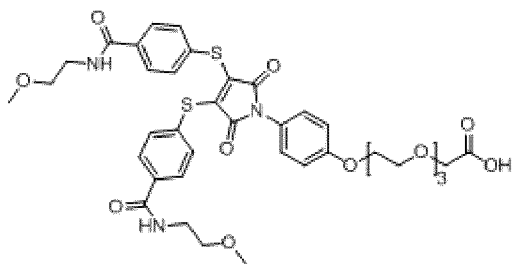
Fórmula 14;



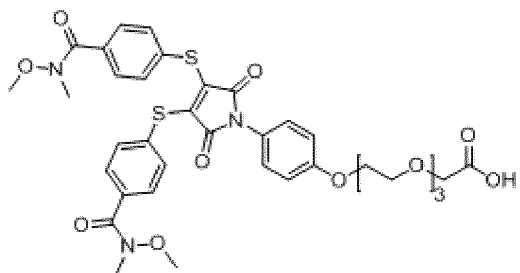
Fórmula 15;



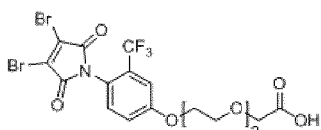
Fórmula 16;



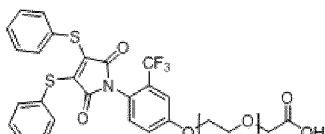
Fórmula 17;



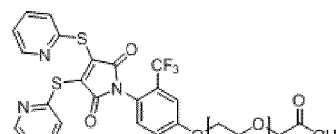
Fórmula 18;



13-1

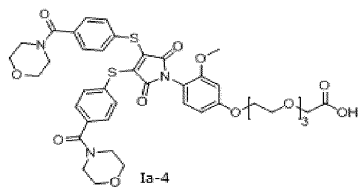


la-2

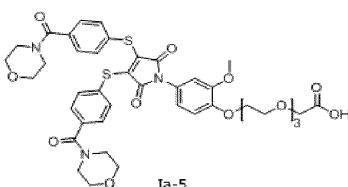


La-3

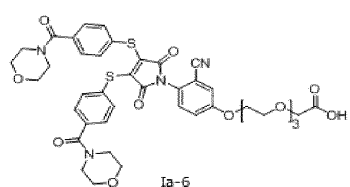
5



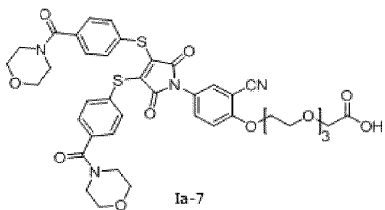
Ia-4



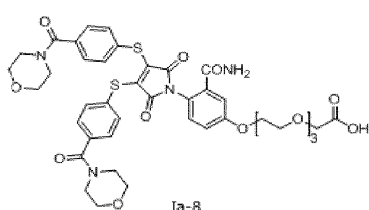
1a-5



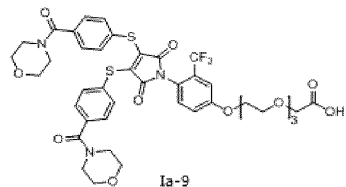
Ia-6



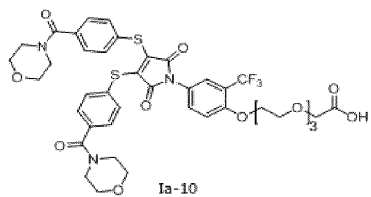
Ia-7



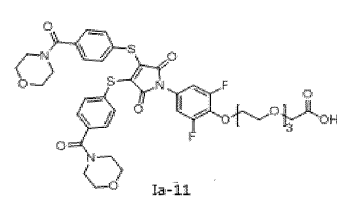
La-8



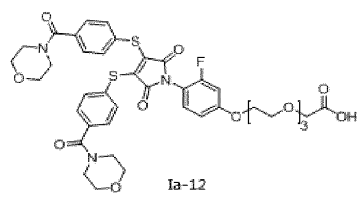
1a-9



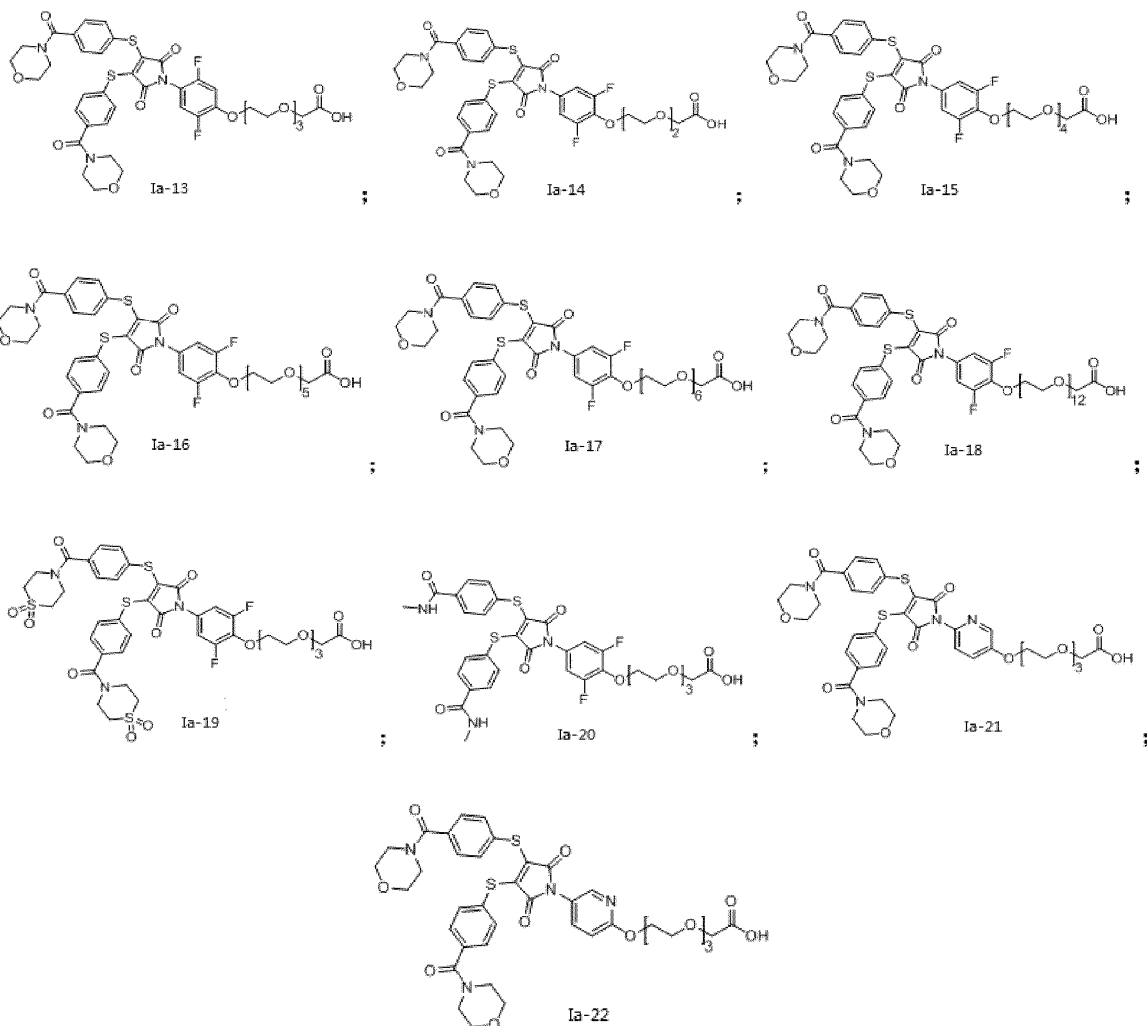
La-10



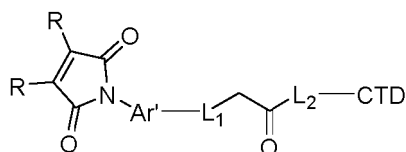
1a-11



1a-12



- 5 4. Un conjugado de enlazador de maleamida-fármaco sustituido, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, teniendo el conjugado una estructura como la que se muestra en la Fórmula Ib:



(Ib)

en donde R, Ar' y L₁ se definen como la reivindicación 1;

L₂ es un enlace químico o tiene una estructura de AA-PAB, en el cual AA es un fragmento de dipéptido o tripéptido y PAB es p-aminobencilcarbamoilo;

CTD es un fármaco de molécula pequeña citotóxico y/o un fármaco para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y/o inflamación, que está unido a L₂ a través de un enlace amida.

5. El conjugado de enlazador de maleamida-fármaco sustituido, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo según la reivindicación 4, en donde

A) AA se selecciona del grupo que consiste en Val-Cit, Val-Ala, Phe-Lys, Ala-Ala-Asn y D-Ala-Phe-Lys;

o,

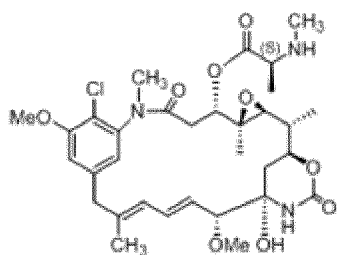
B) el CTD se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de tubulina, inhibidor de topoisomerasa y agente de unión al ADN;

preferiblemente, B1) el inhibidor de tubulina se selecciona del grupo que consiste en maitansina o sus derivados, Monometil auristatina E, Monometilauristatina F, Monometil dolastatina 10, Tubulisina o sus derivados, Criptoficina o sus derivados y Taltobulina;

o B2) el agente de unión a ADN se selecciona del grupo que consiste en PBD o sus derivados y duocarmicina o sus derivados;

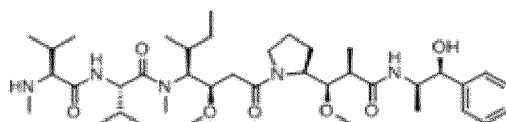
o B3) el inhibidor de topoisomerasa se selecciona del grupo que consiste en el metabolito PNU-159682 de Doxorubicina o sus derivados, metabolito SN38 de irinotecán o sus derivados y Exatecán.

- 5 6. El conjugado de enlazador de maleamida-fármaco sustituido, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo según la reivindicación 4, en donde el CTD tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en D1-D13':



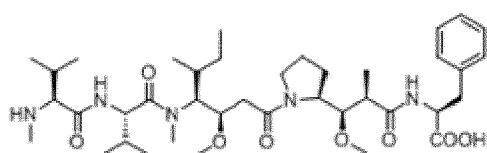
D1

;



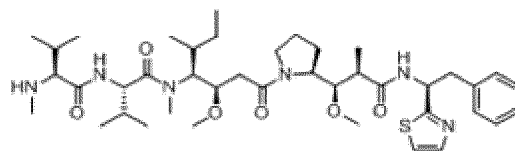
D2

;



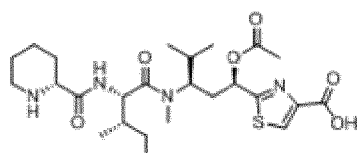
D3

;



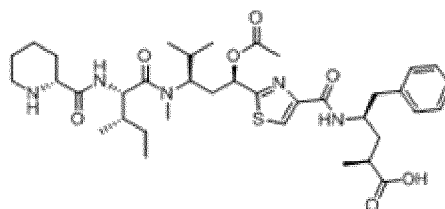
D4

;



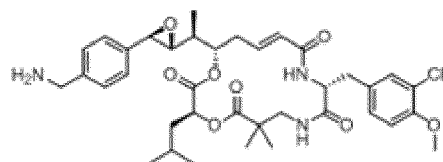
D5

;



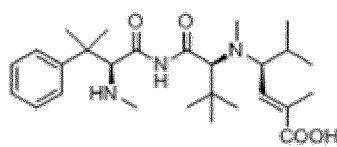
D6

;



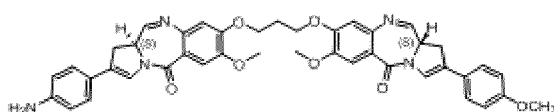
D7

;



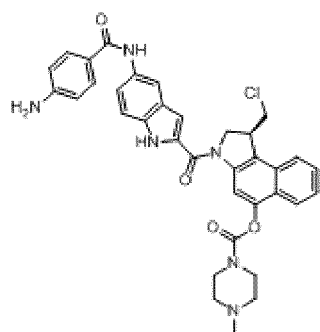
D8

;



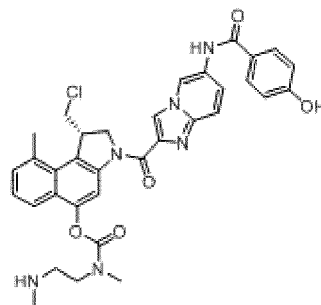
D9

;



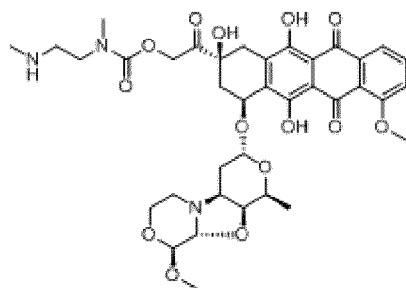
D10

;



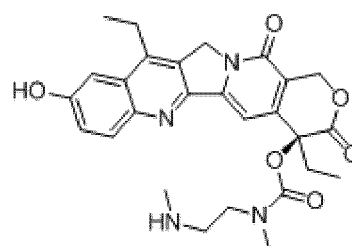
D11

;

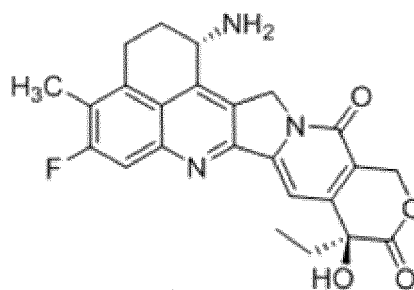


D12

;

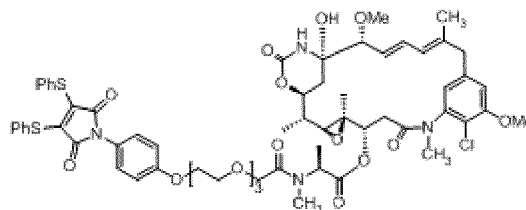


D13

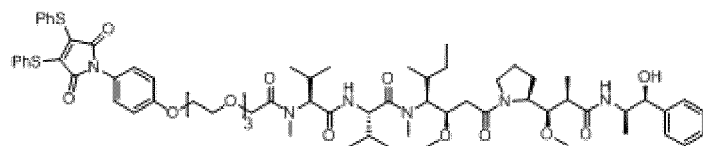


D13'.

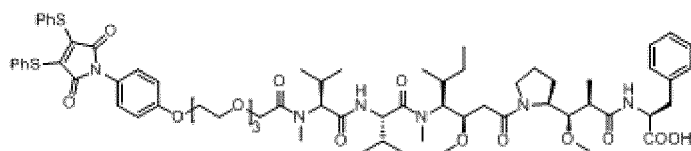
- 5 7. El conjugado de enlazador de maleamida-fármaco sustituido, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo según la reivindicación 4, en donde el conjugado que se muestra en la Fórmula Ib se selecciona del grupo que consiste en:



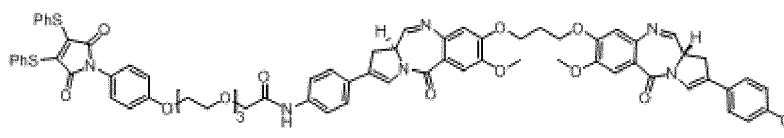
Fórmula 19;



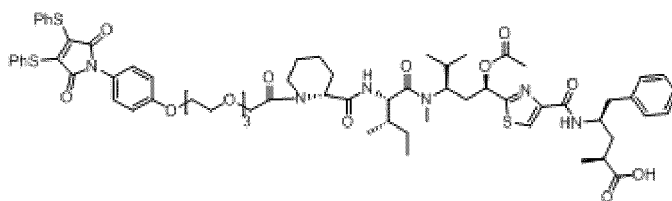
Fórmula 20;



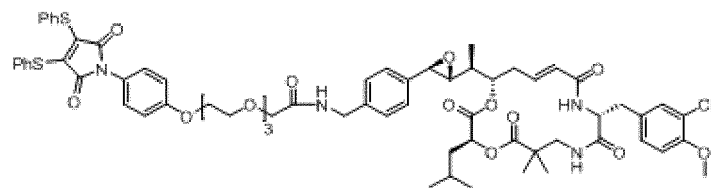
Fórmula 21;



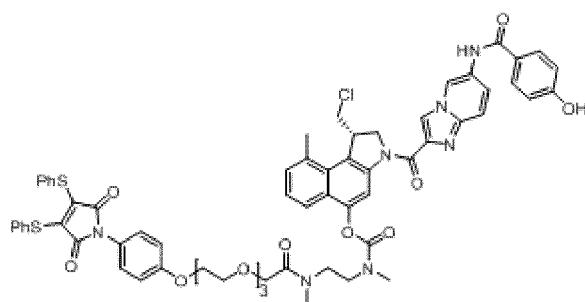
Fórmula 22;



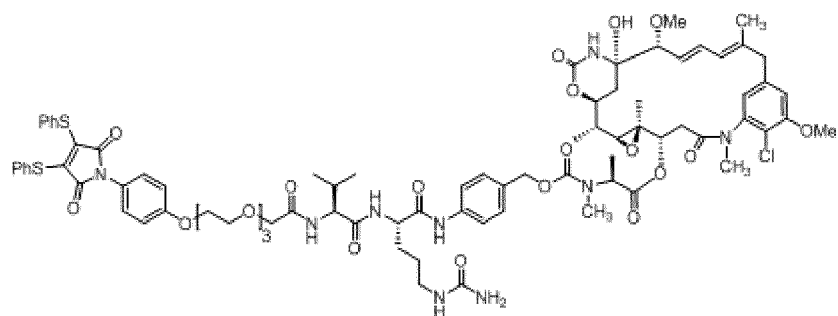
Fórmula 23;



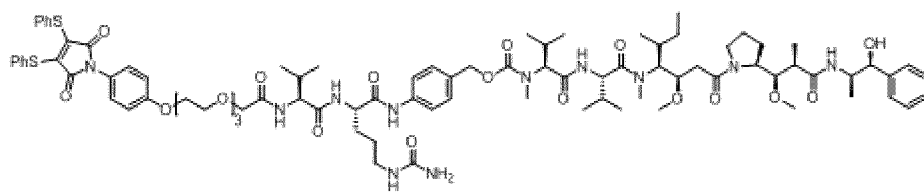
Fórmula 24;



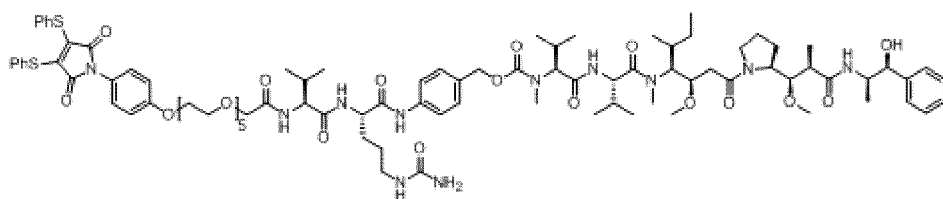
Fórmula 25;



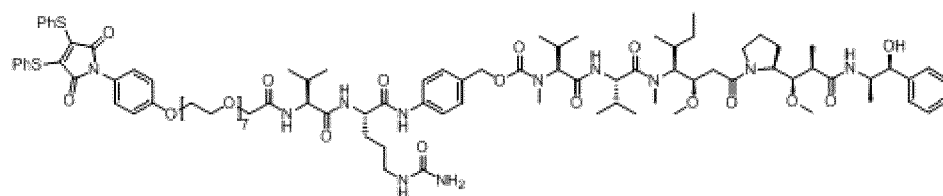
Fórmula 26;



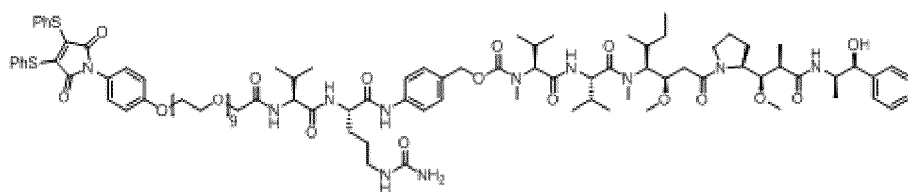
Fórmula 27;



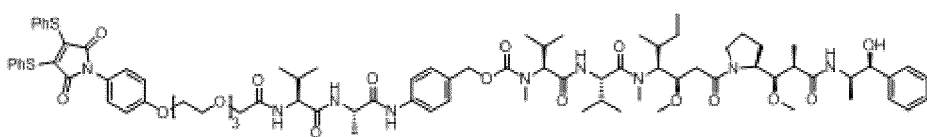
Fórmula 28;



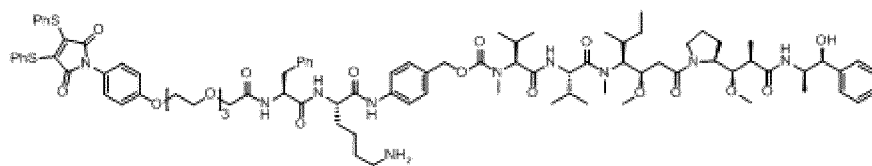
Fórmula 29;



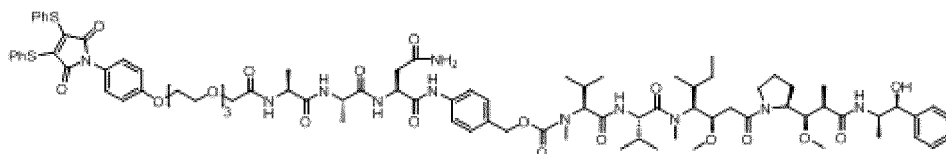
Fórmula 30;



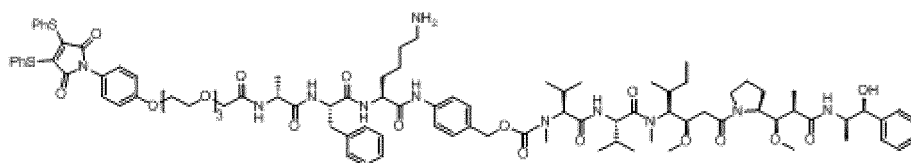
Fórmula 31;



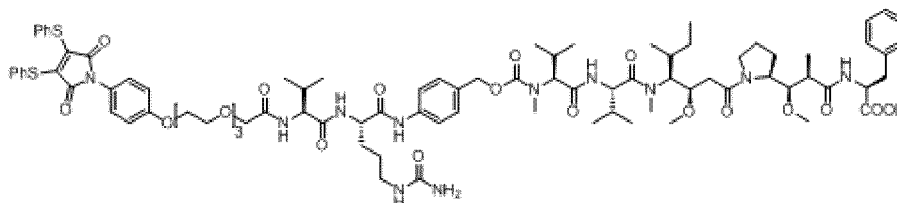
Fórmula 32;



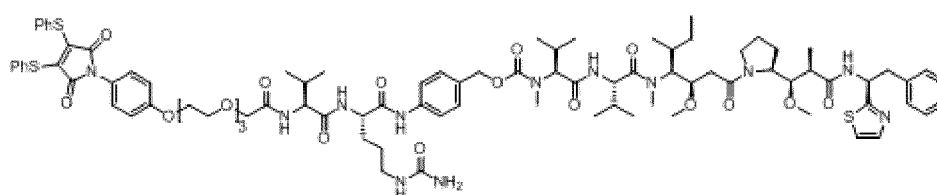
Fórmula 33;



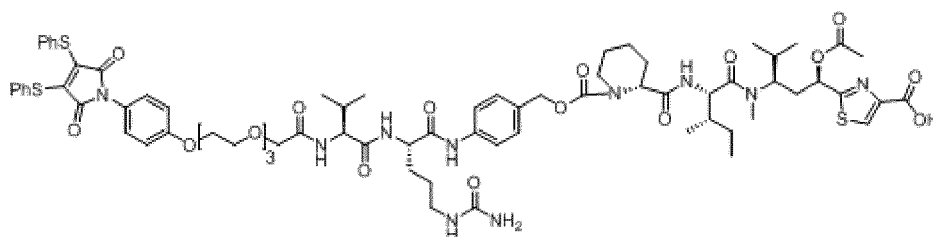
Fórmula 34;



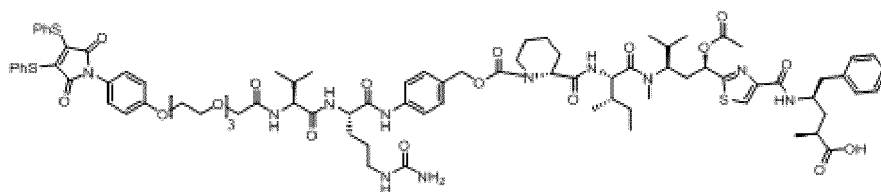
Fórmula 35;



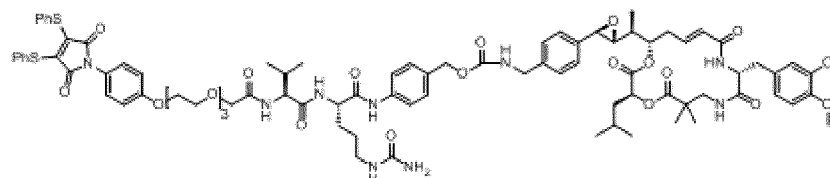
Fórmula 36;



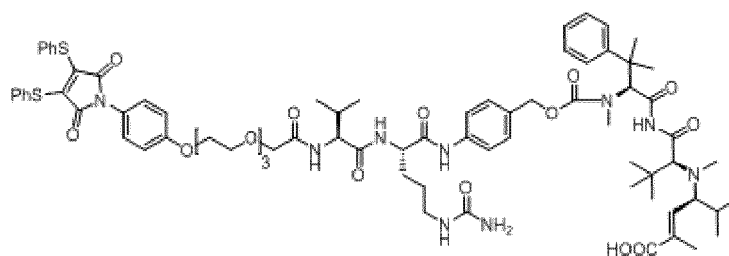
Fórmula 37;



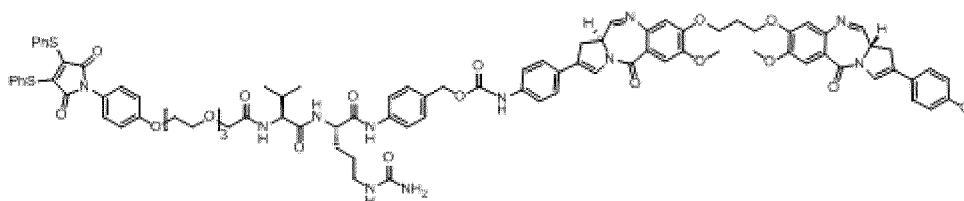
Fórmula 38;



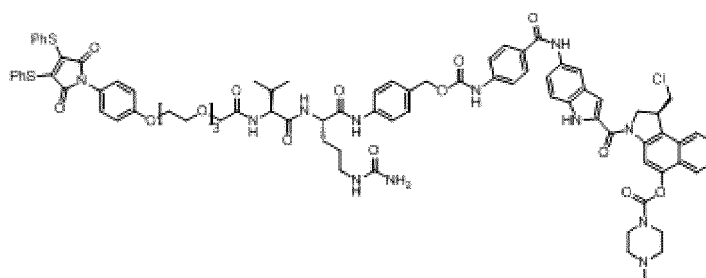
Fórmula 39;



Fórmula 40;



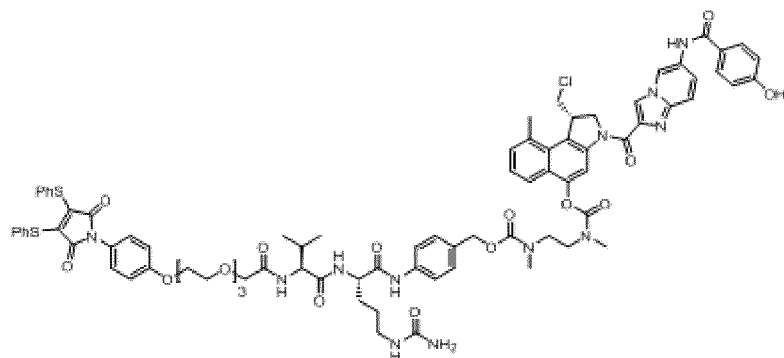
Fórmula 41;



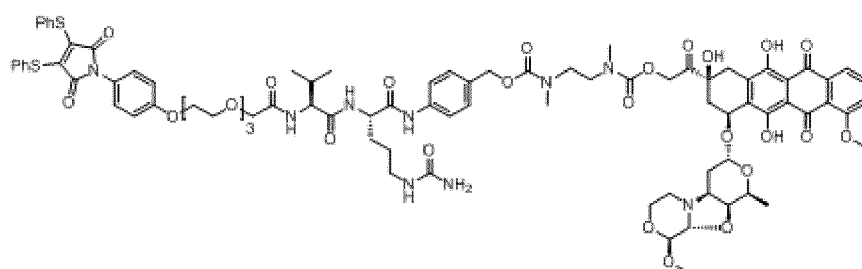
Fórmula 42;

5

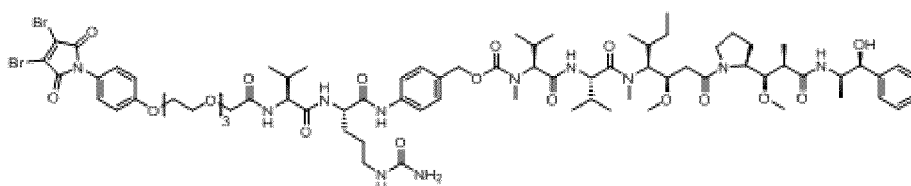
10



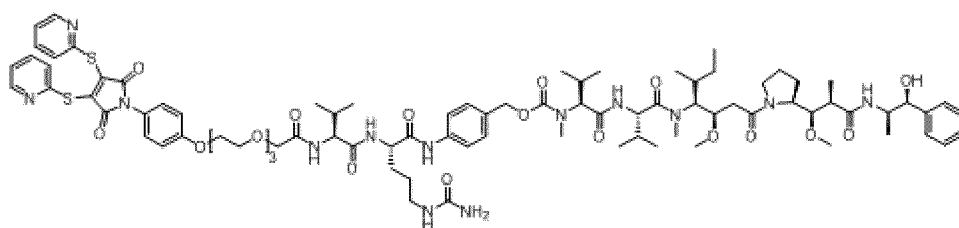
Fórmula 43;



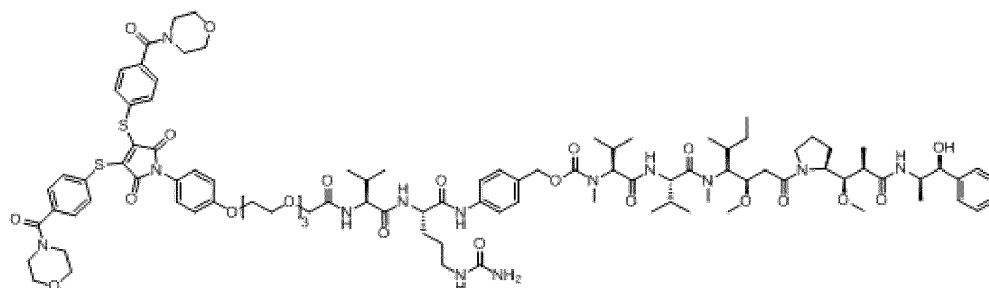
Fórmula 44;



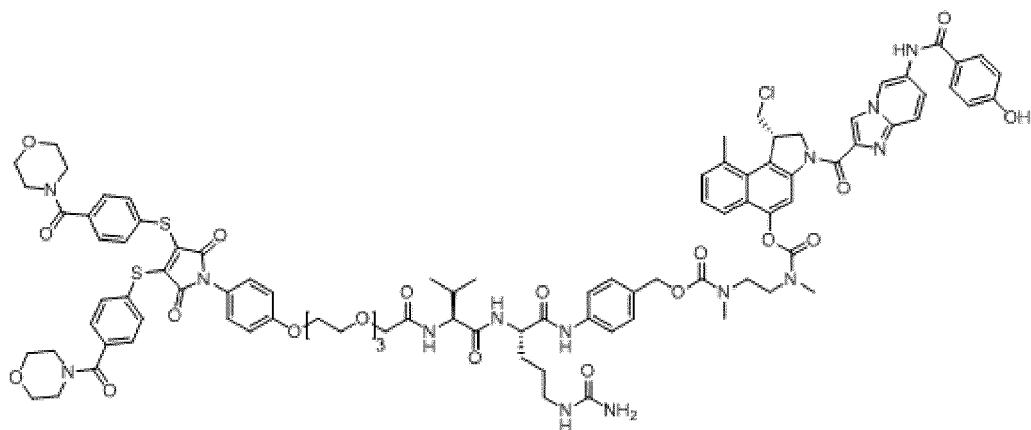
Fórmula 45;



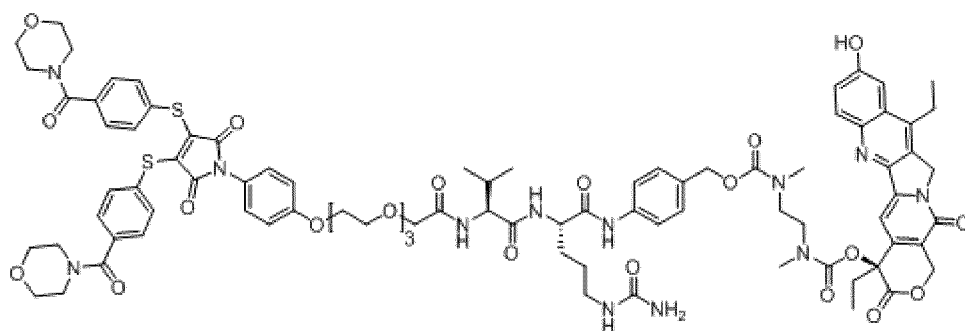
Fórmula 46;



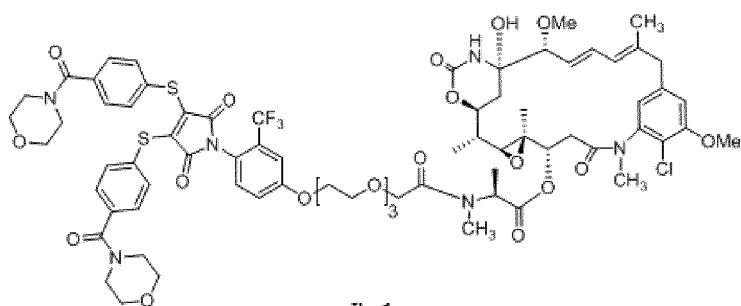
Fórmula 47;



Fórmula 48;



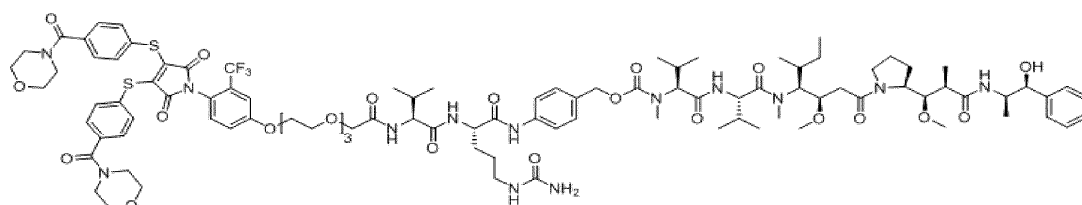
Fórmula 49;



Ib-1

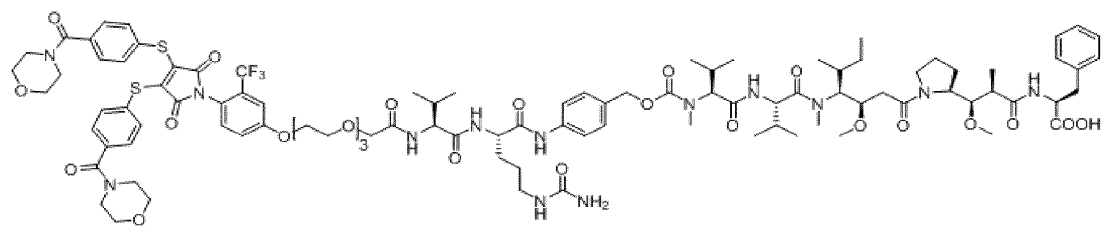
;

5



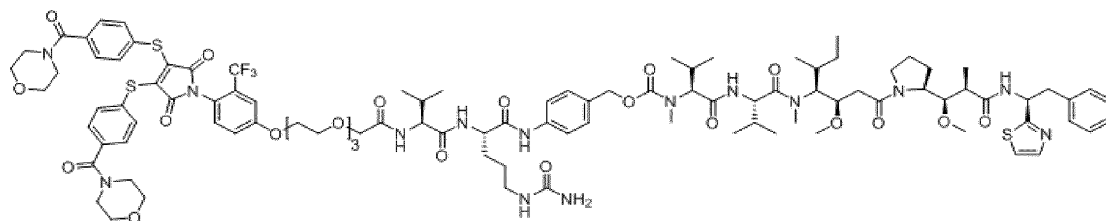
Ib-2

;



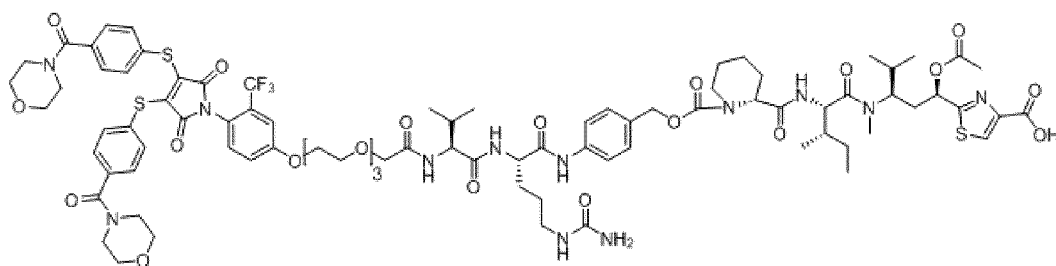
Ib-3

;



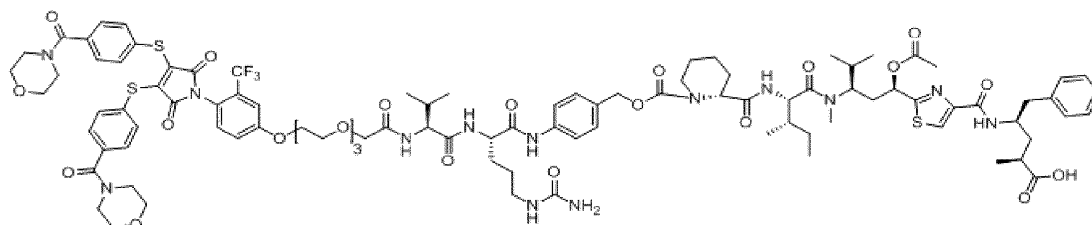
Ib-4

;



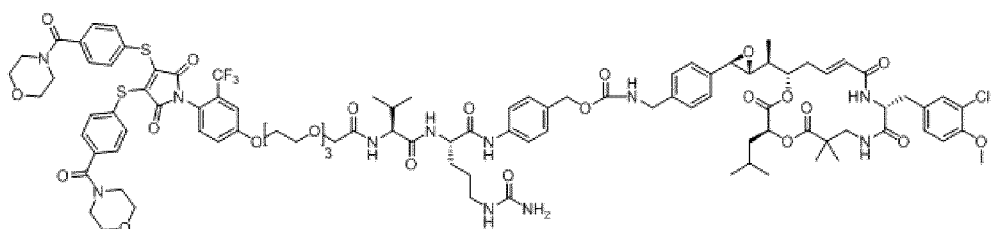
Ib-5

:



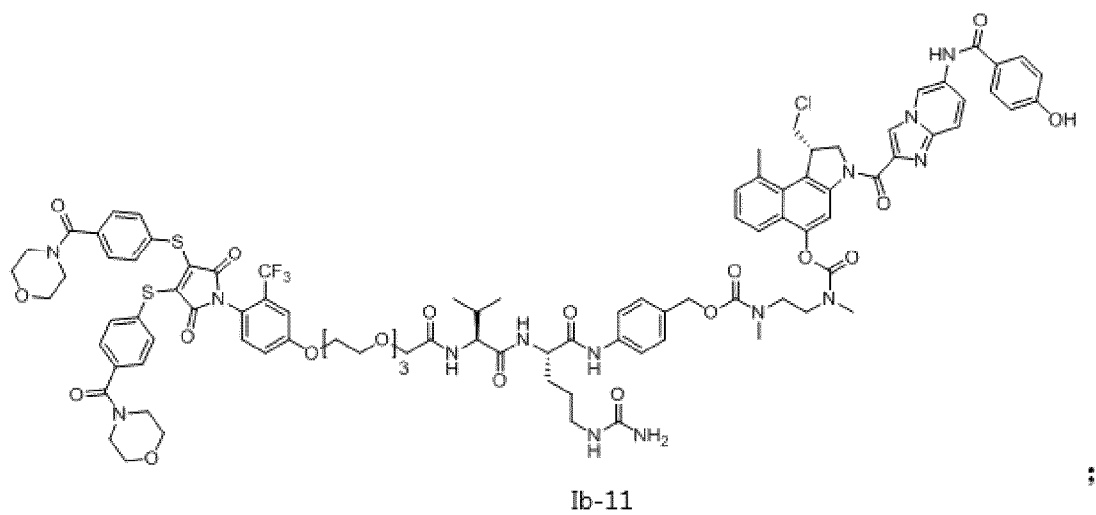
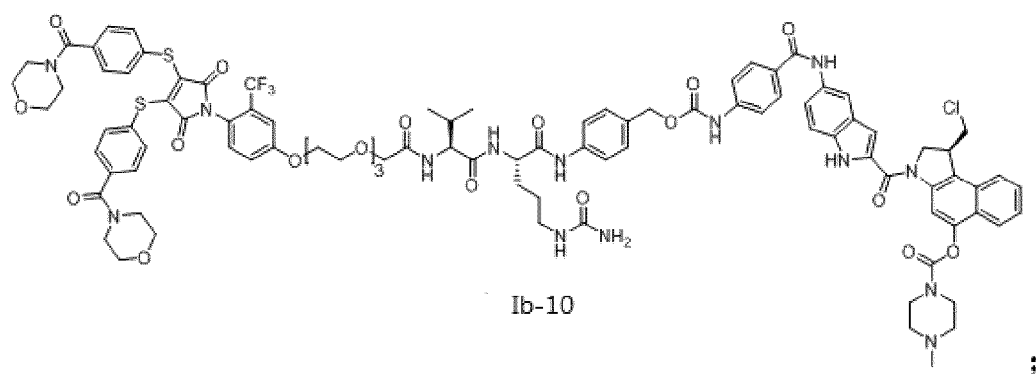
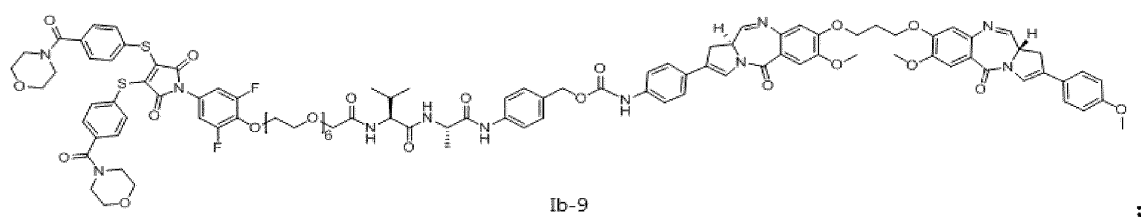
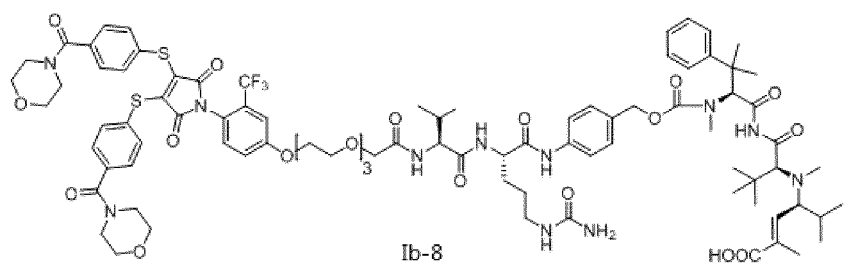
Ib-6

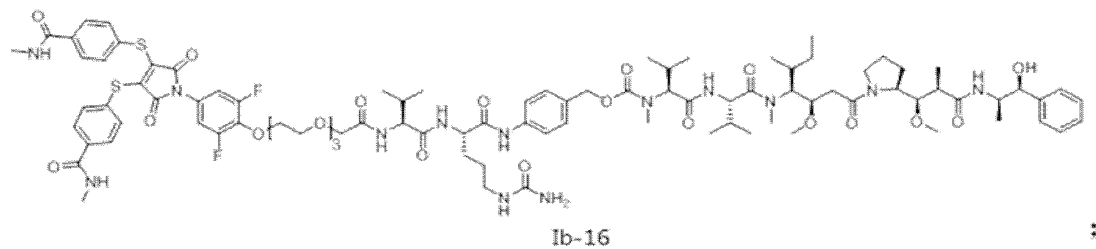
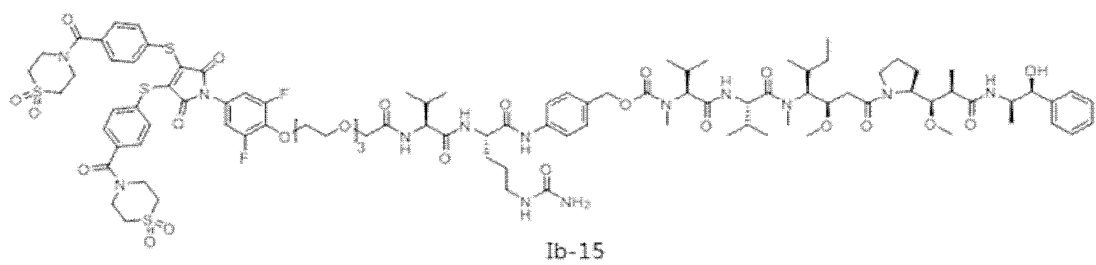
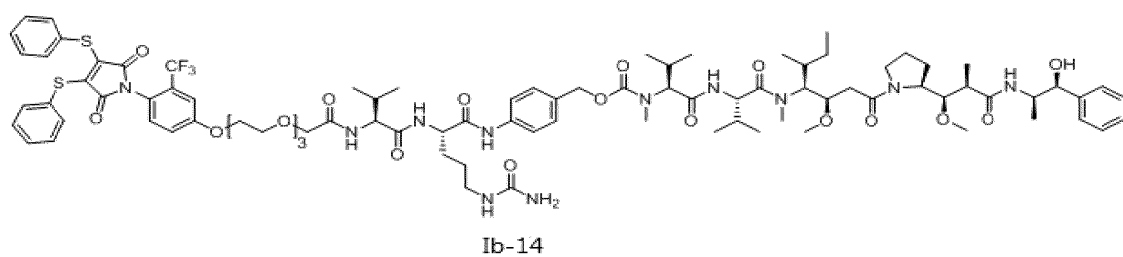
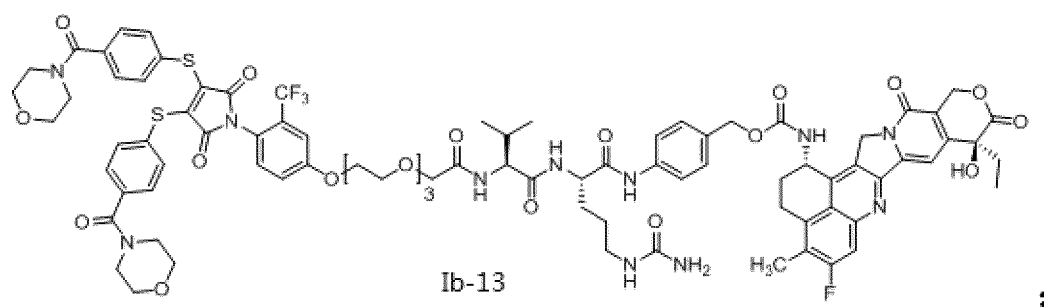
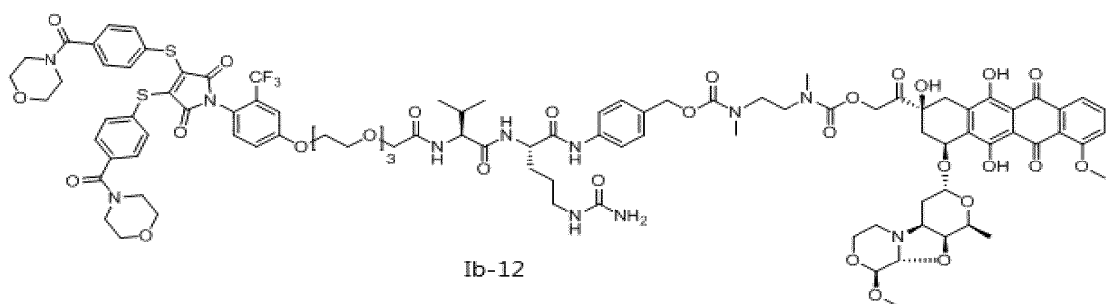
;

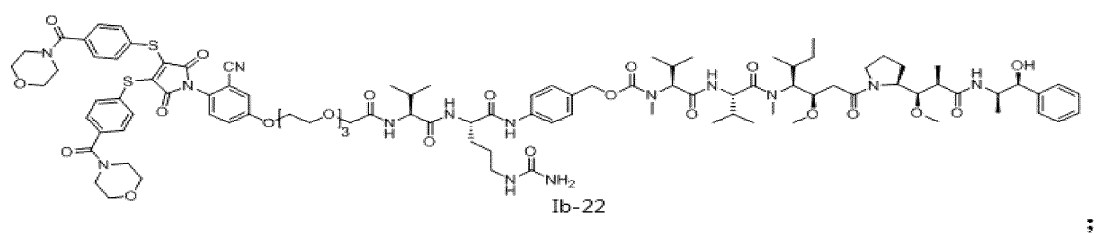
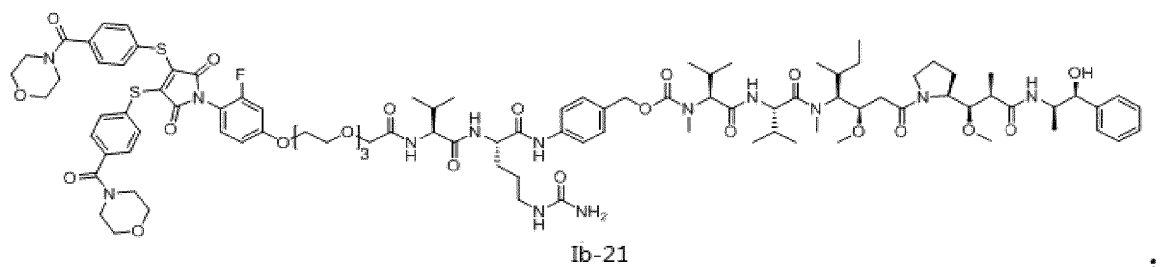
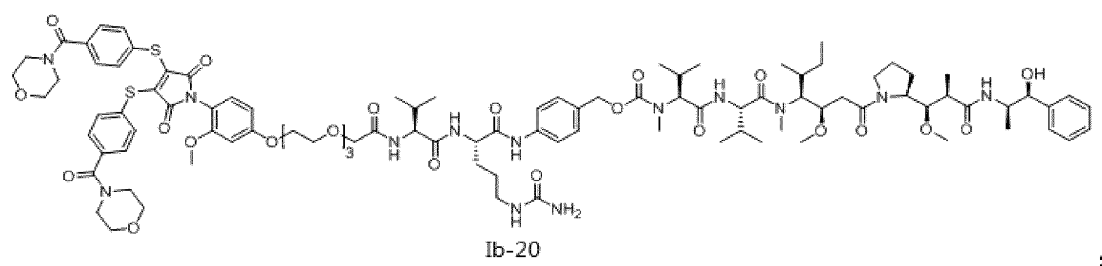
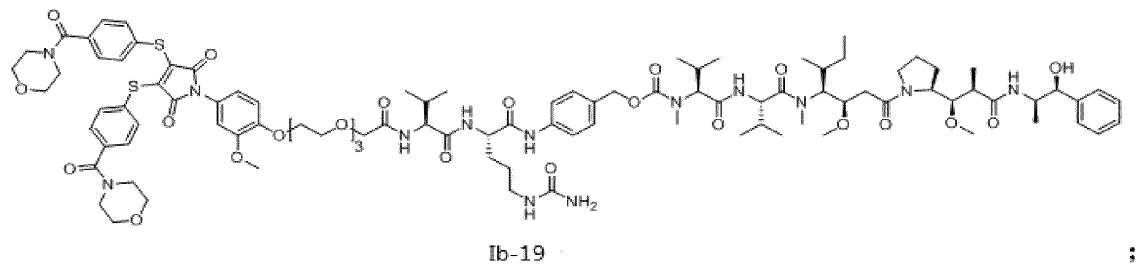
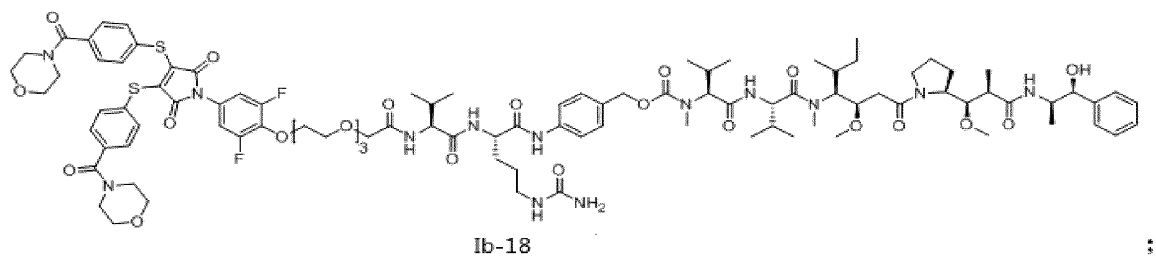
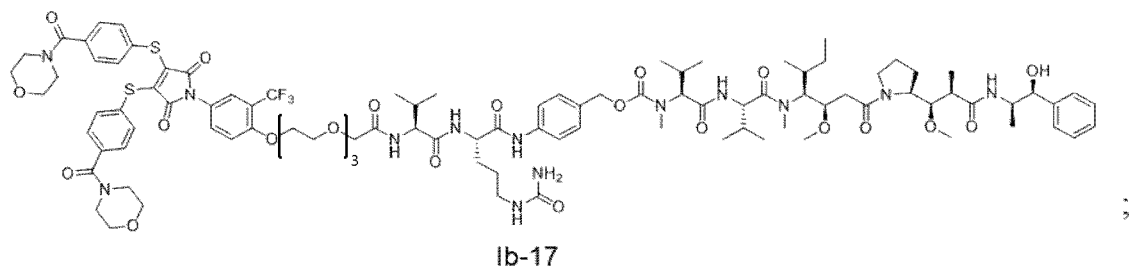


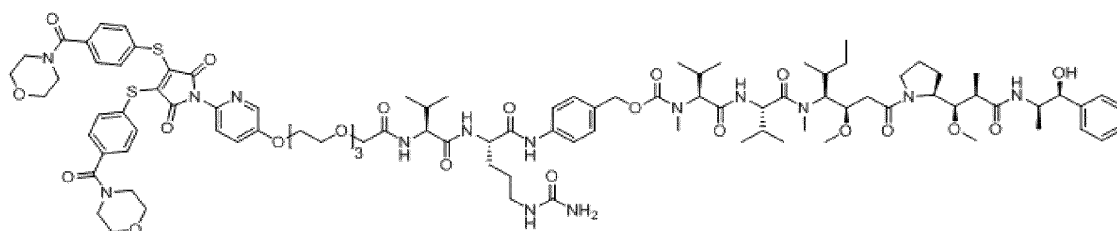
Ib-7

;



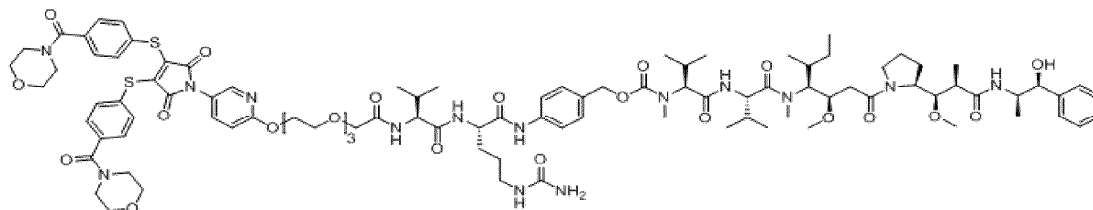






Ib-23

;

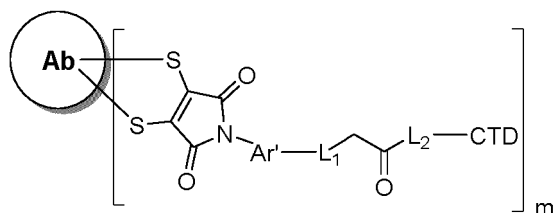


Ib-24

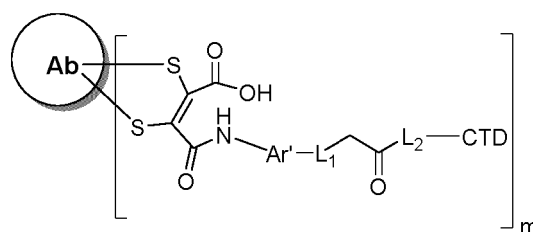
8. Un conjugado de anticuerpo y fármaco, formado por el acoplamiento de un anticuerpo con el conjugado de enlazador de maleamida-fármaco sustituido, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 4-7.

9. El conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 8, en donde

A) el conjugado tiene una estructura como se muestra en la Fórmula Ic y/o Fórmula Id:



(Ic)



(Id)

en donde Ar', L₁, L₂ y CTD se definen como la reivindicación 4;

m = 1,0-5,0;

Ab se selecciona del grupo que consiste en proteína, enzima, anticuerpo, fragmento de anticuerpo y péptido o;

B) el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo monoclonal, anticuerpo biespecífico, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado y fragmento de anticuerpo o;

C) el anticuerpo es capaz de unirse a un antígeno asociado a tumores seleccionado del grupo que consiste en HER2, HER3, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD45, CD56, CD66e, CD70, CD74, CD79b, CD138, CD147, CD223, EpCAM, Mucina 1, STEAP1, GPNMB, FGF2, FOLR1, EGFR, EGFRvIII, Factor tisular, c-MET, Nectina 4, AGS-16, Guanilil ciclasa C, Mesotelina, SLC44A4, PSMA, EphA2, AGS-5, GPC-3, c-KIT, RoR1, PD-L1, CD27L, 5T4, Mucina 16, NaPi2b, STEAP, SLITRK6, ETBR, BCMA, Trop-2, CEACAM5, SC-16, SLC39A6, proteína similar a delta3 y Claudina 18.2;

preferiblemente, el anticuerpo HER2 se selecciona de Trastuzumab o Pertuzumab; o el anticuerpo EGFR se selecciona de Eribix o Vectibix.

10. Una composición farmacéutica, que comprende: (a) el conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9; y (b) un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

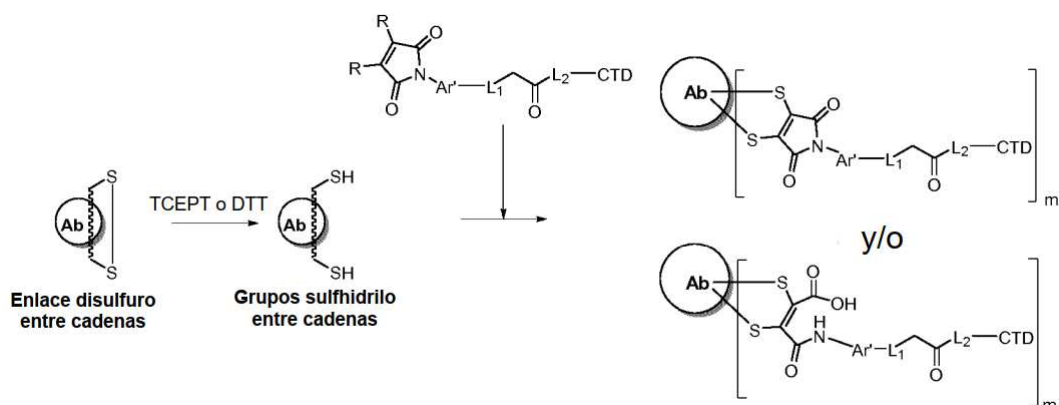
11. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 para su uso en el tratamiento de un tumor.

5 12. Un método para preparar el conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, incluyendo el método las siguientes etapas:

(1) hacer reaccionar un anticuerpo con un reactivo reductor en una solución tampón para obtener un anticuerpo reducido;

10 (2) reticular un conjugado de fármaco-enlazador con el anticuerpo reducido obtenido en la etapa (1) en una solución mixta de una solución tampón y un disolvente orgánico para obtener el conjugado de fármaco y anticuerpo.

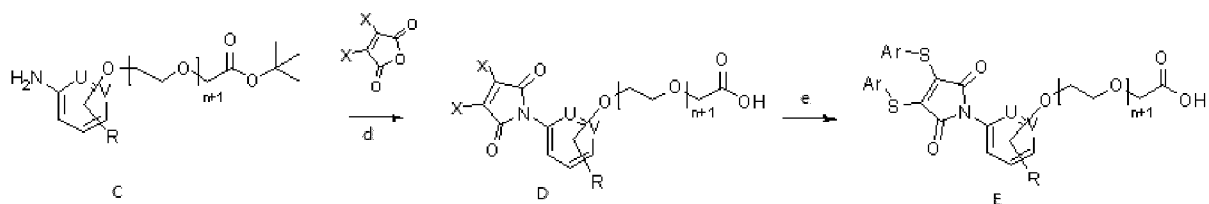
13. El método para preparar el conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 12, en donde el esquema de síntesis del método es el siguiente:



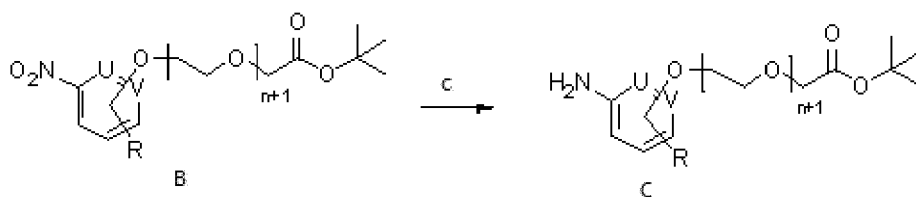
en donde R, Ab, Ar', L₁, L₂, CTD y m se definen como la reivindicación 9.

15 14. Un método para preparar el enlazador de maleamida sustituido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, incluyendo el método las siguientes etapas:

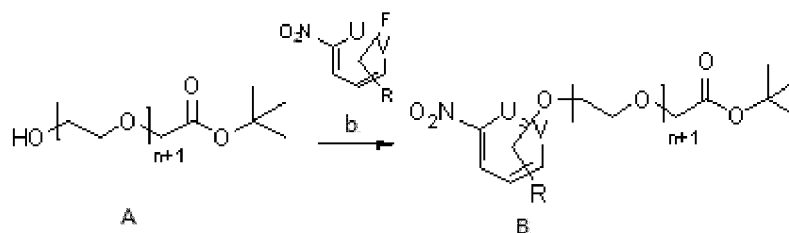
realizar una reacción de ciclación del intermedio C y dihaluro de anhídrido maleico para generar el intermedio D y realizar una reacción de sustitución del intermedio D con aril tiofenol para generar un enlazador como se muestra en la fórmula E y el esquema de síntesis es el siguiente:



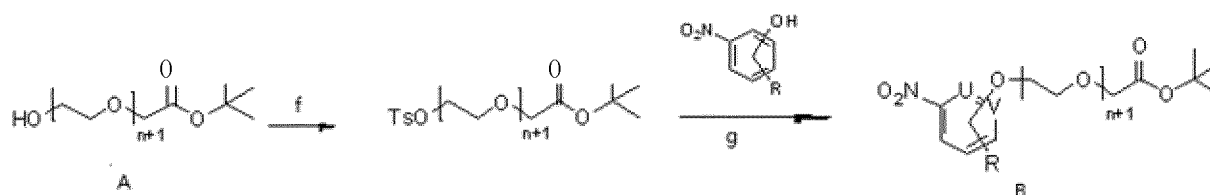
en donde R y n se definen como la reivindicación 1; X representa halógeno, preferiblemente Br o Cl; y U y V son independientemente N o C; opcionalmente, el intermedio C se obtiene reduciendo el intermedio B y el esquema de síntesis es el siguiente:



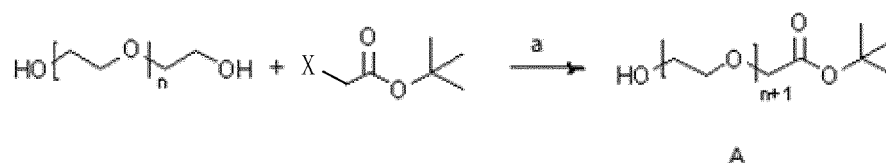
25 en donde R, n, U y V se definen como la reivindicación 14; opcionalmente, el intermedio B se obtiene mediante una reacción de sustitución del compuesto A con fluoronitrobenceno y el esquema de síntesis es el siguiente:



en donde R, n, U y V se definen como la reivindicación 14;
opcionalmente, el intermedio B se prepara como sigue:

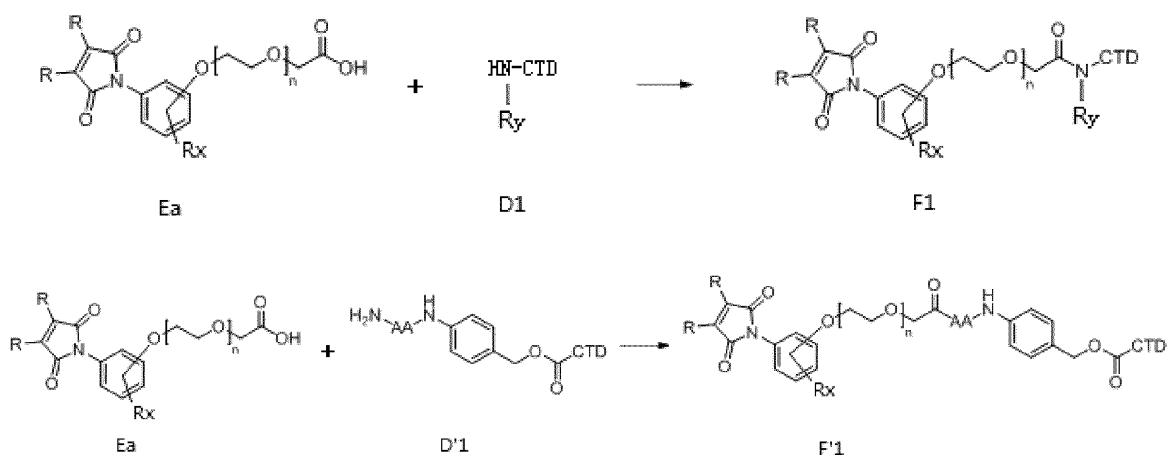


- 5 en donde R, n, U y V se definen como la reivindicación 14;
opcionalmente, el compuesto A se obtiene haciendo reaccionar n-etilenglicol con haloacetato de *terc*-butilo y el esquema de síntesis es el siguiente:



en donde n y X se definen como la reivindicación 14.

- 10 15. Un método para preparar el conjugado de enlazador de maleamida sustituido-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, incluyendo el método: realizar una reacción de condensación de un enlazador de maleimida sustituido y CTD que contiene un dipéptido/tripéptido-PAB para generar F1 o F'1 respectivamente; y los esquemas de síntesis son los siguientes:



- 15 en donde R se define como la reivindicación 1, Rx representa halógeno, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄, trifluorometilo, grupo ciano o amida y Ry representa H o alquilo.

Fig. 1

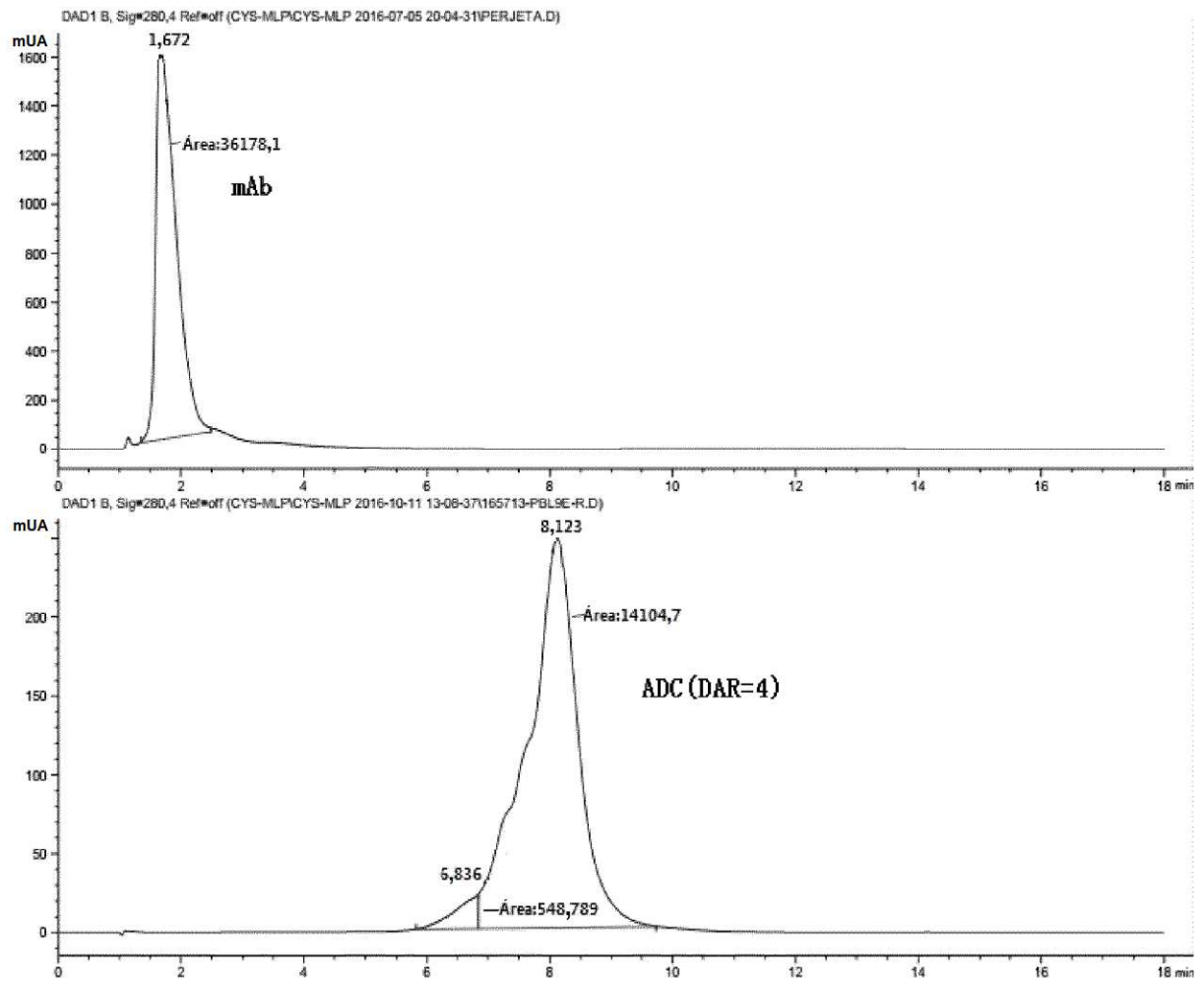


Fig. 2

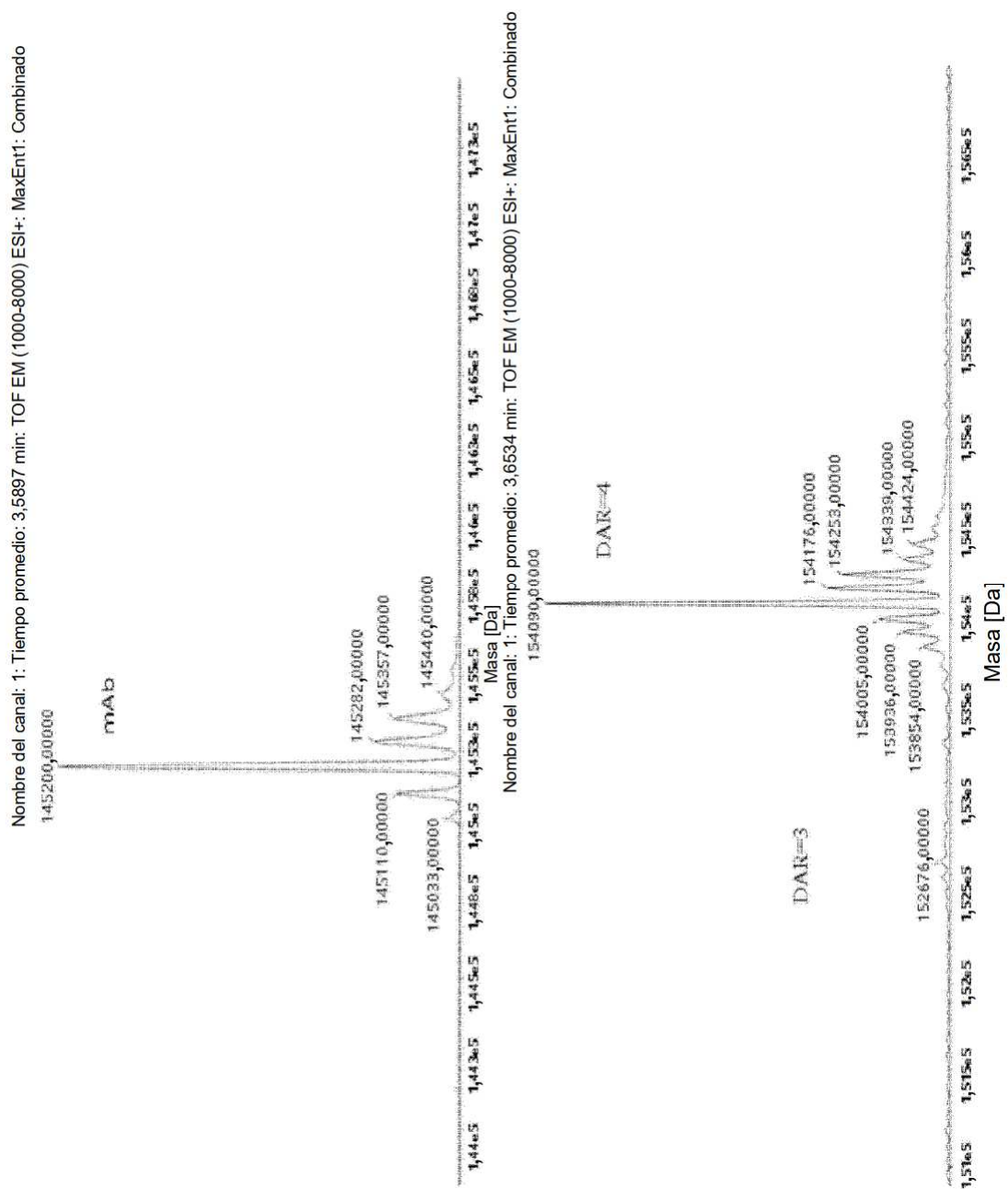


Fig. 3

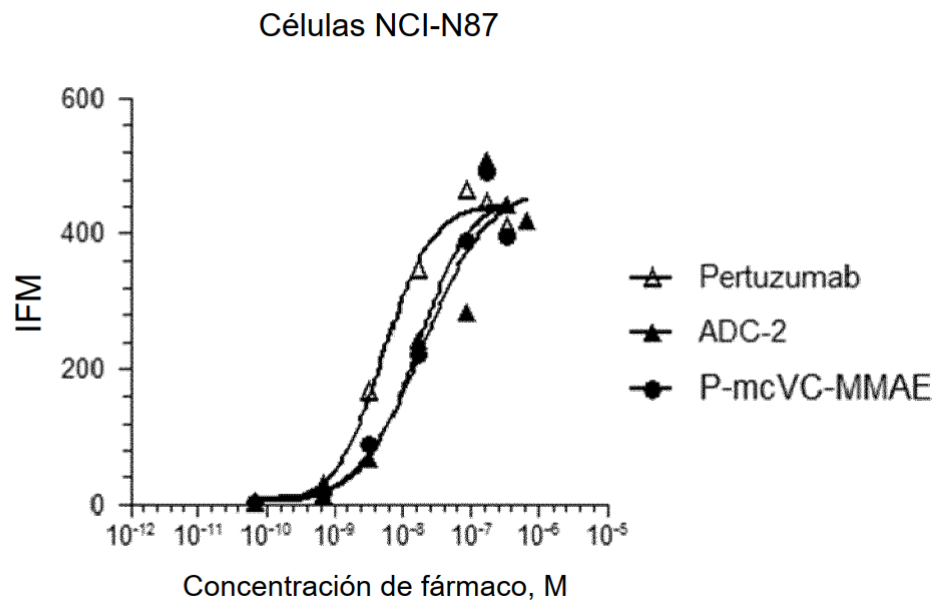


Fig. 4

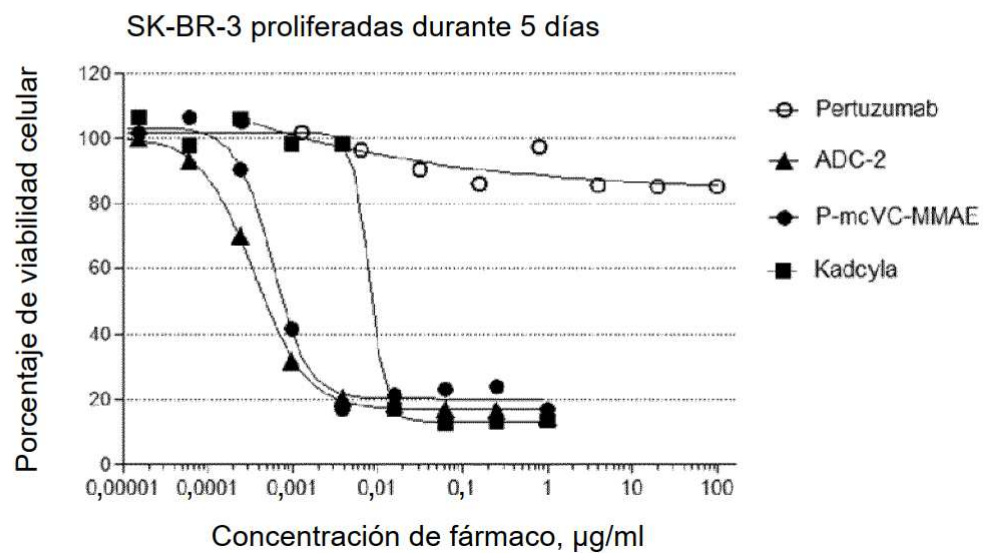


Fig. 5

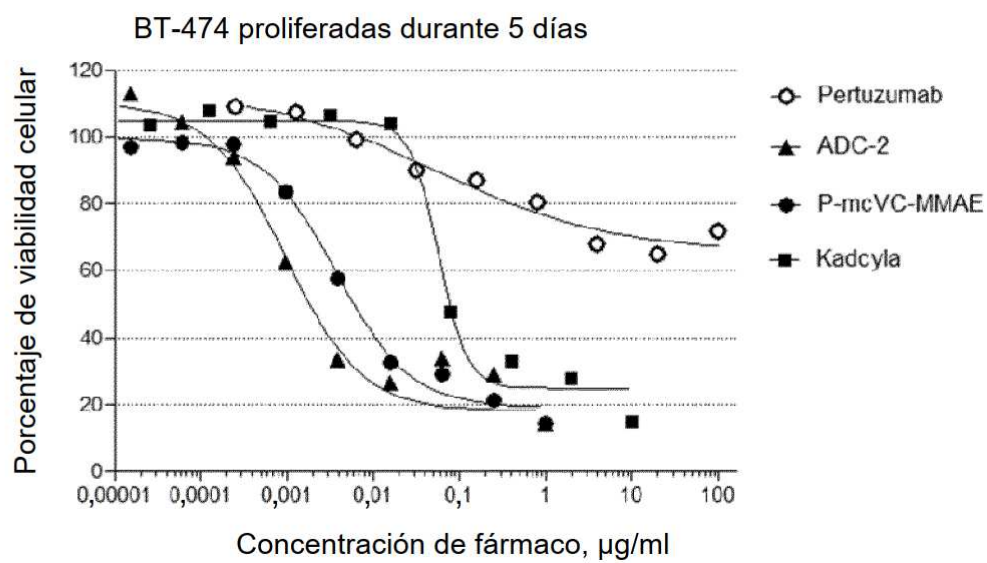


Fig. 6

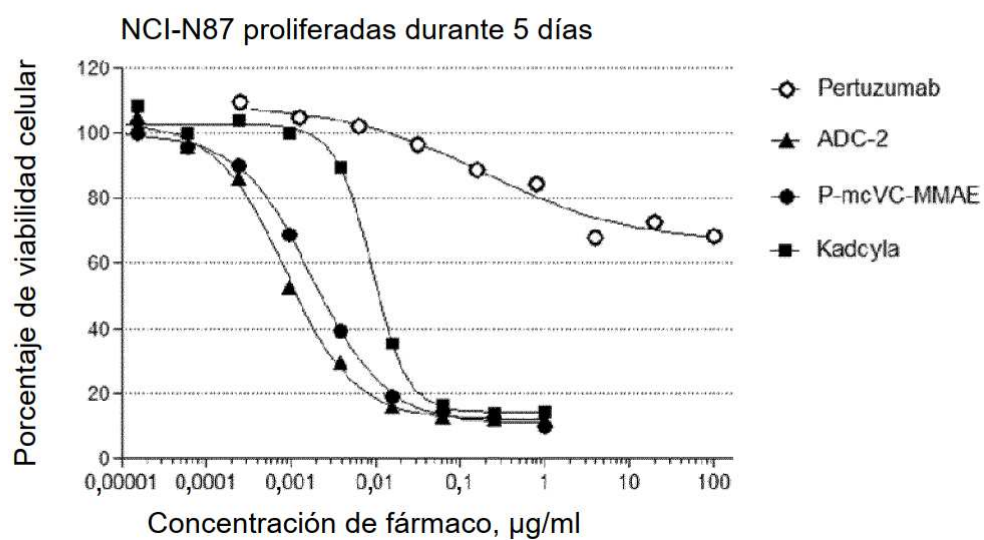


Fig. 7

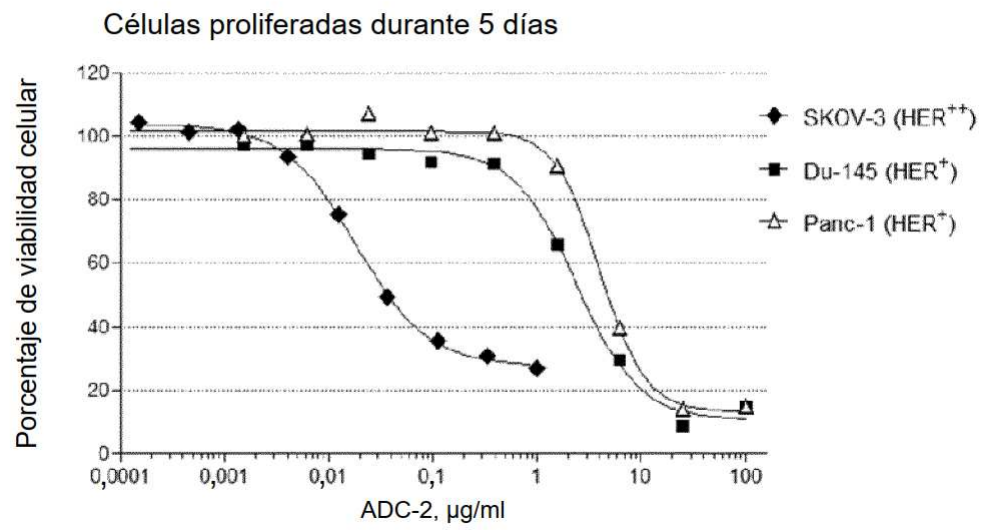


Fig. 8

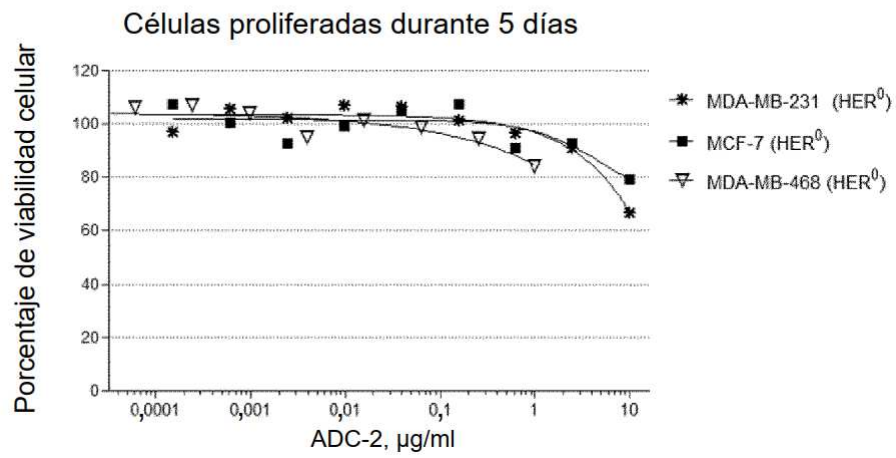


Fig. 9-1

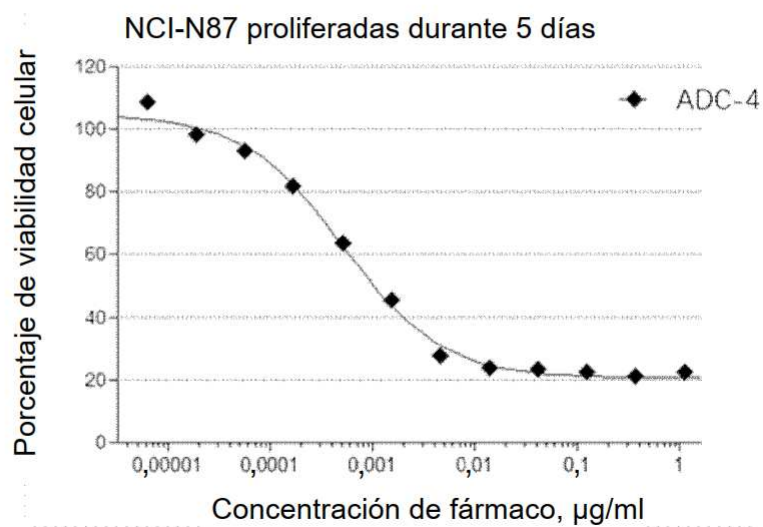


Fig. 9-2

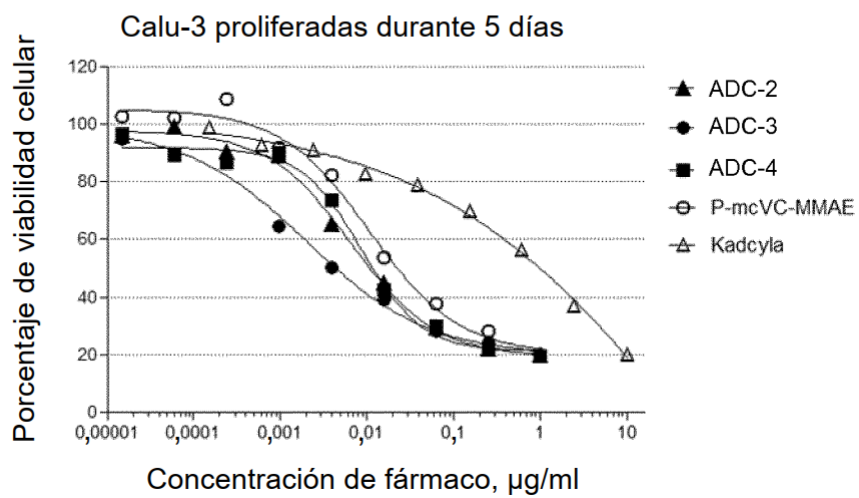


Fig. 10

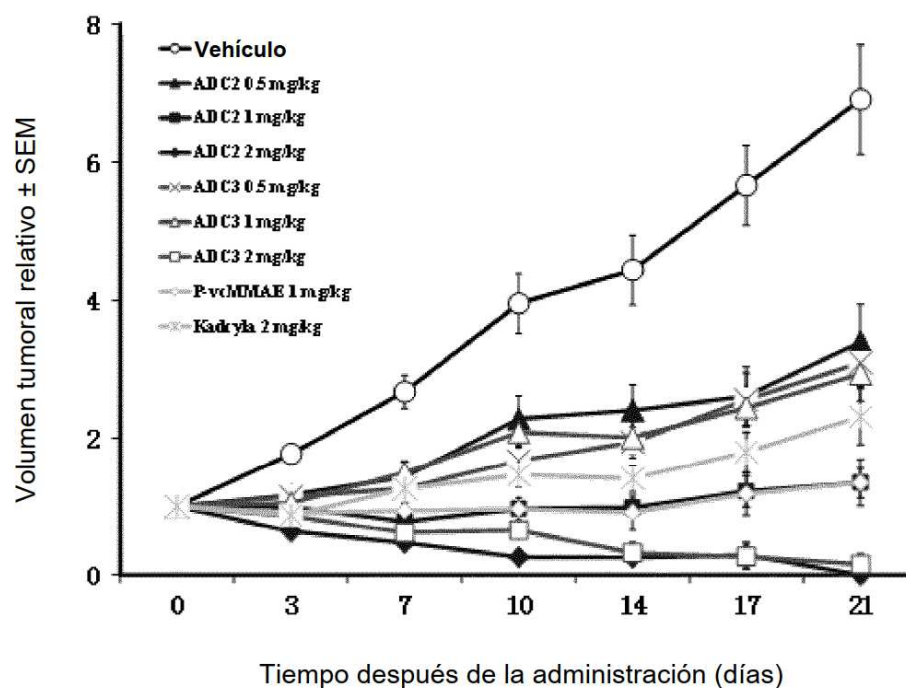


Fig. 11-1

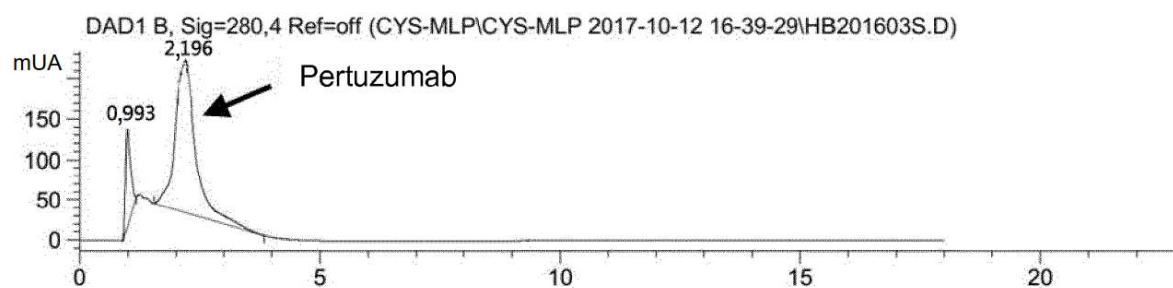


Fig. 11-2

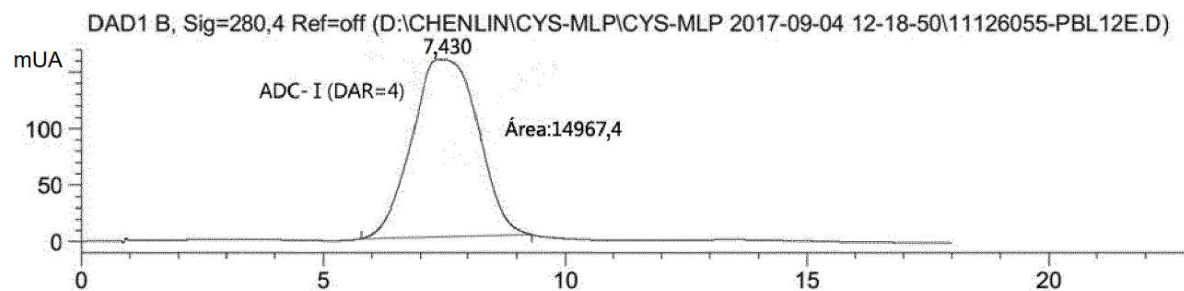


Fig. 11-3

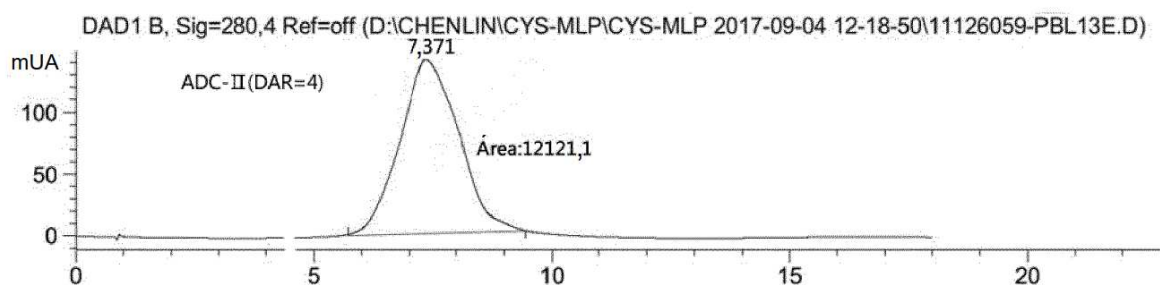


Fig. 11-4

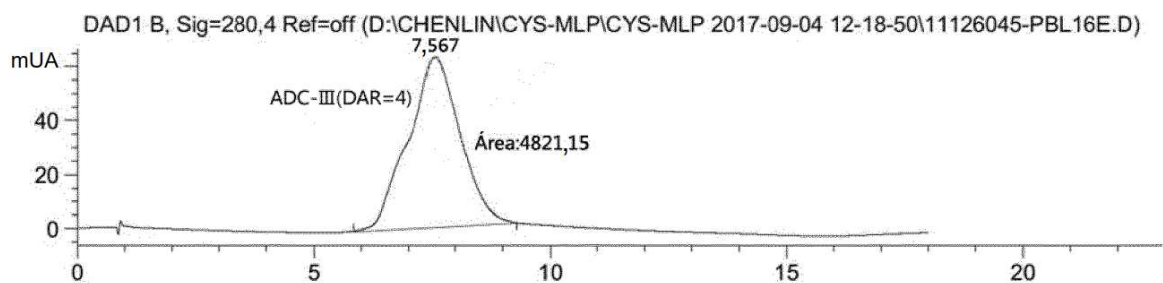


Fig. 11-5

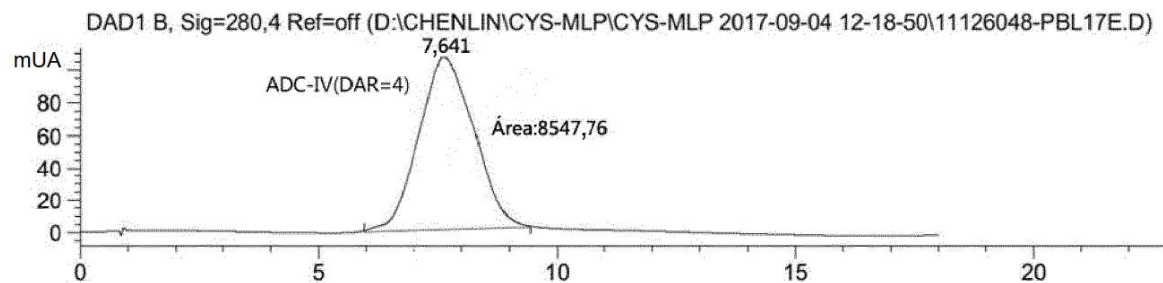


Fig. 11-6

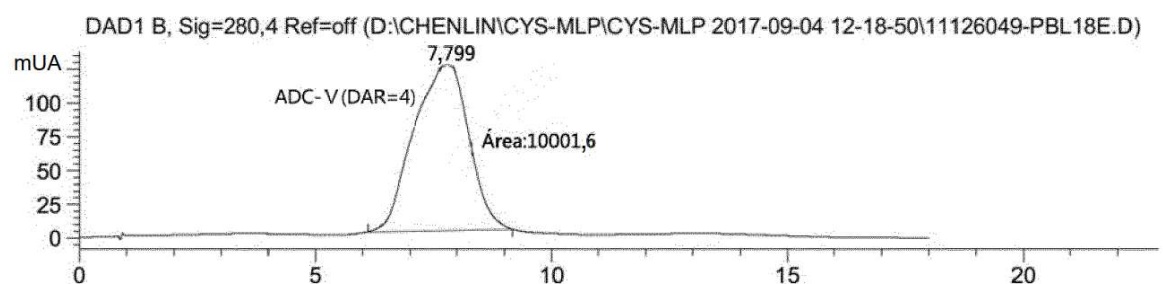


Fig. 11-7

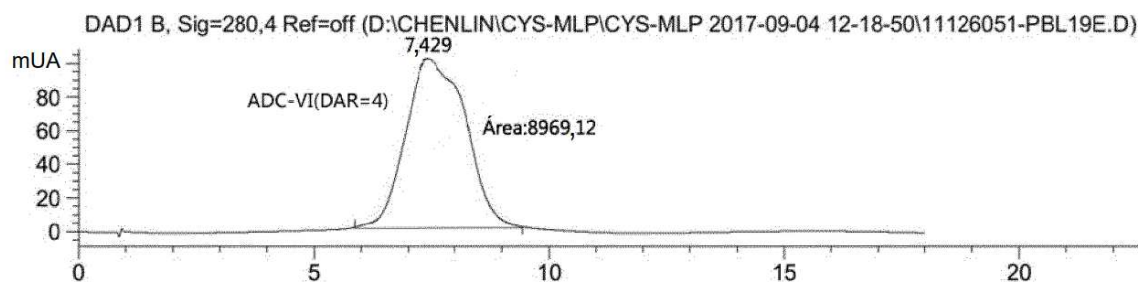


Fig. 11-8

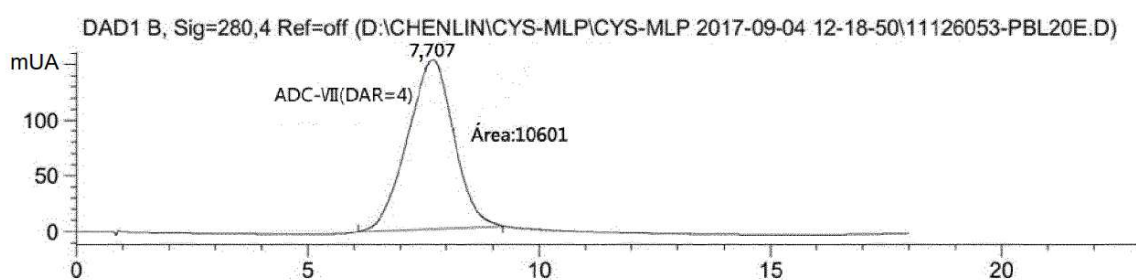


Fig. 12-1

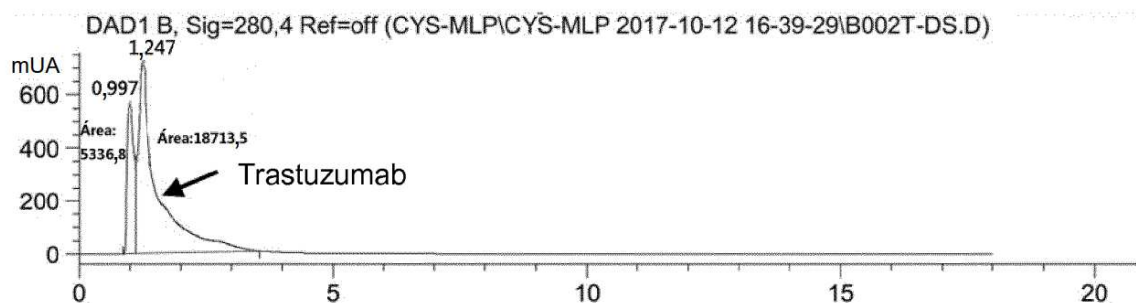


Fig. 12-2

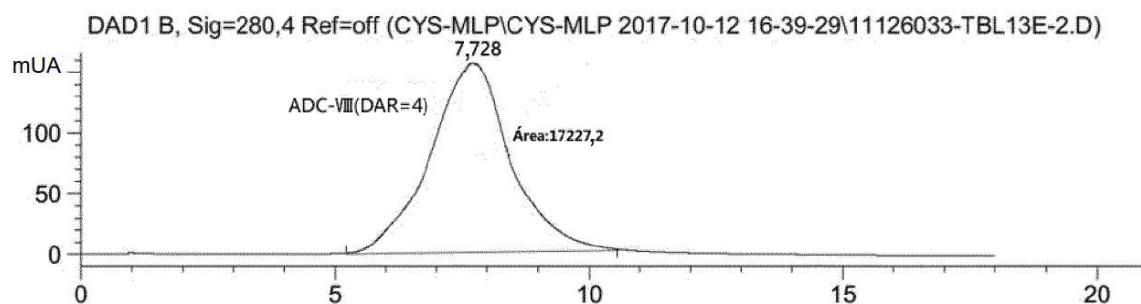


Fig. 13-1

a)
Pertuzumab
Anticuerpo
desnudo

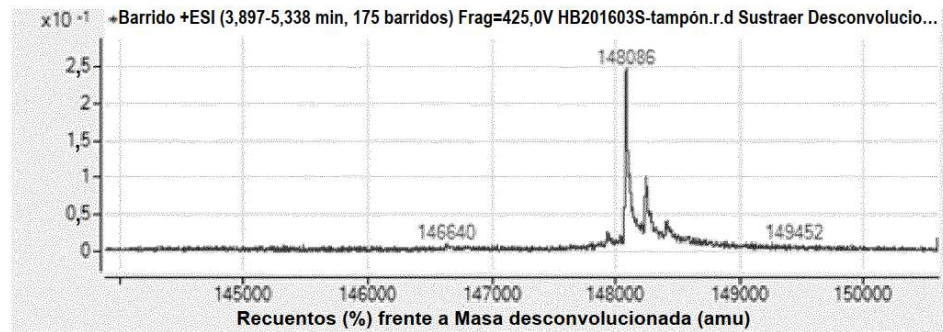


Fig. 13-2

b) ADC-I

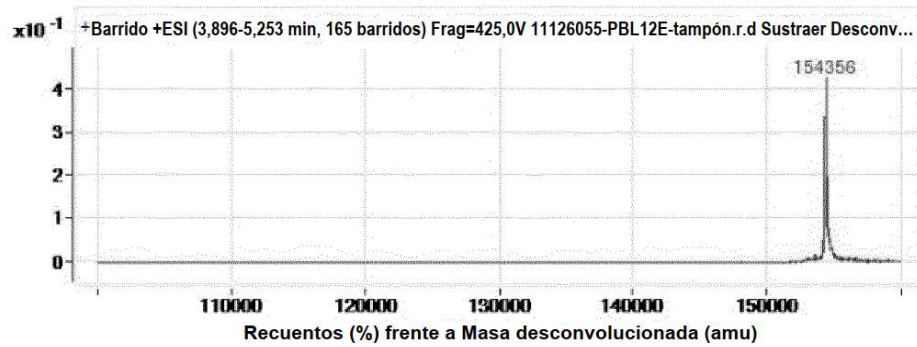


Fig. 13-3

c) ADC-II

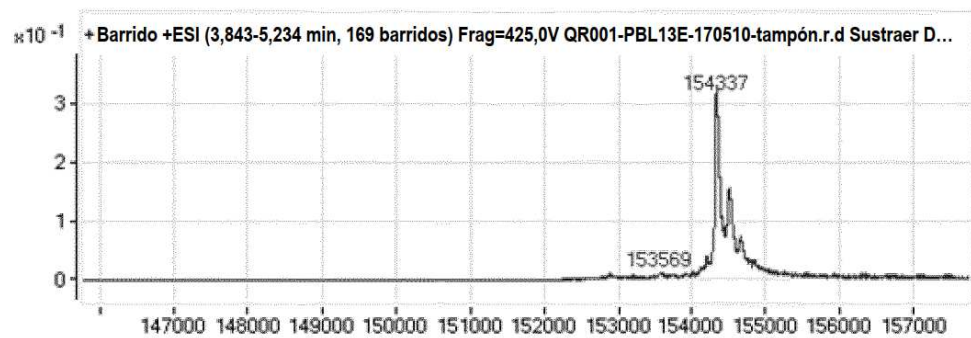


Fig. 13-4

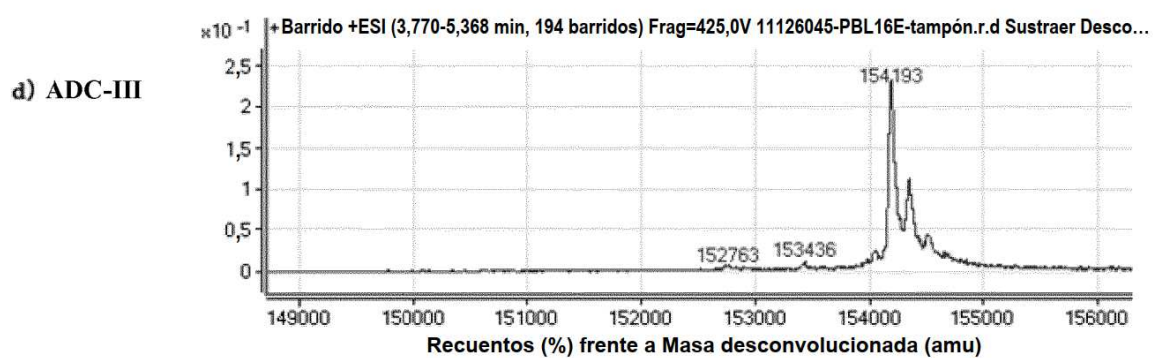


Fig. 13-5

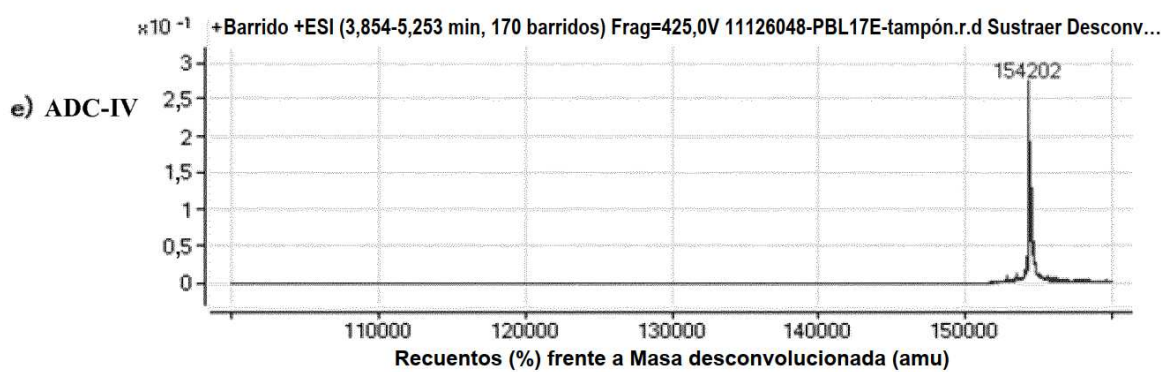


Fig. 13-6

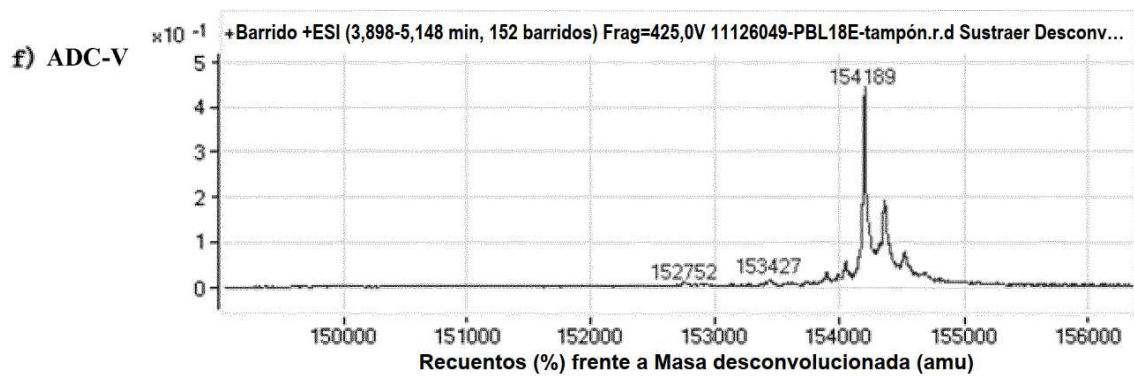


Fig. 13-7

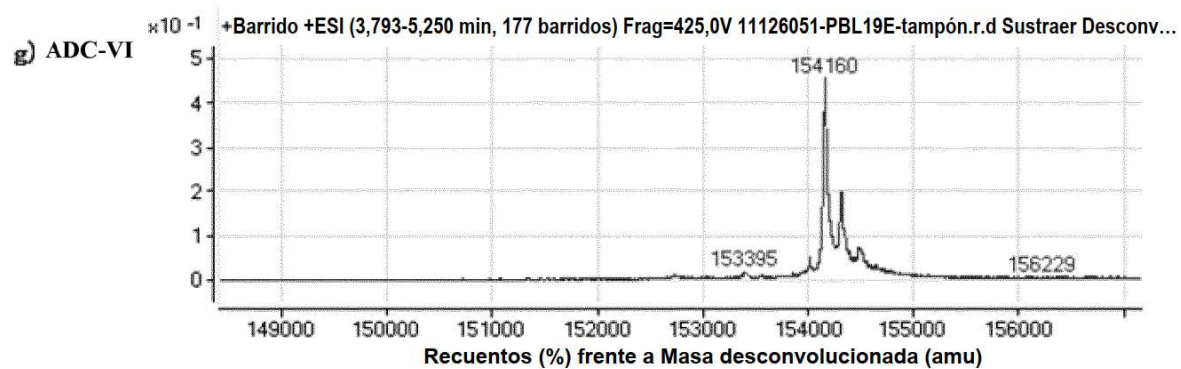


Fig. 13-8

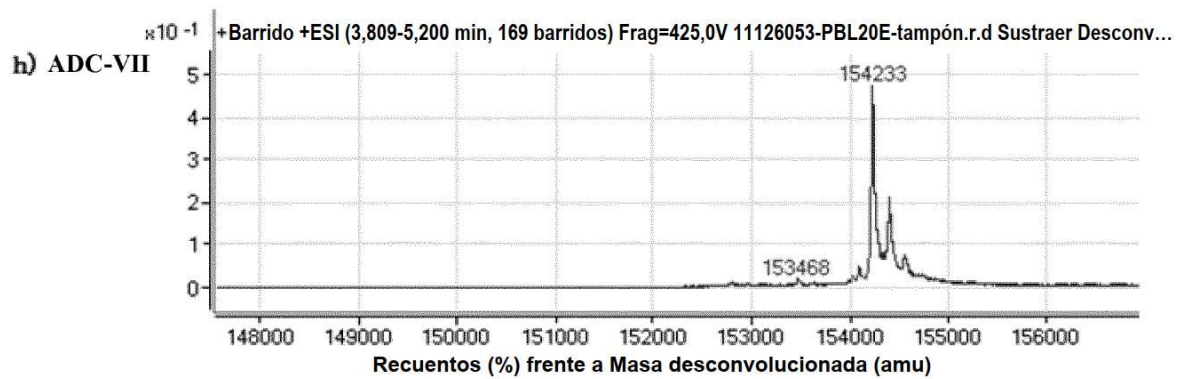


Fig. 14-1

a) **Trastuzumab** Anticuerpo desnudo

$\times 10^1$ +Barrido +ESI (5,220-6,892 min, 203 barridos) Frag=425,0V B002T-DS-tampón.r.d Sustraer...

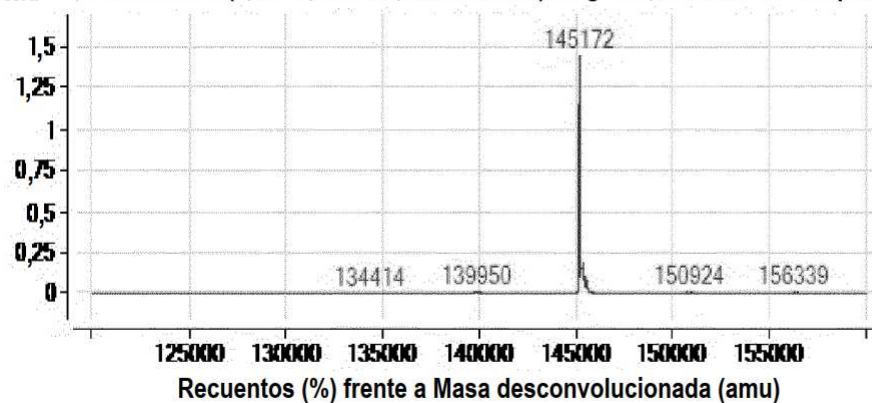


Fig. 14-2

b) **ADC-VIII(Trastuzumab ADC)**

+Barrido +ESI (4,417-5,799 min, 168 barridos) Frag=425,0V 11126033-TBL13E-2.d Sust...

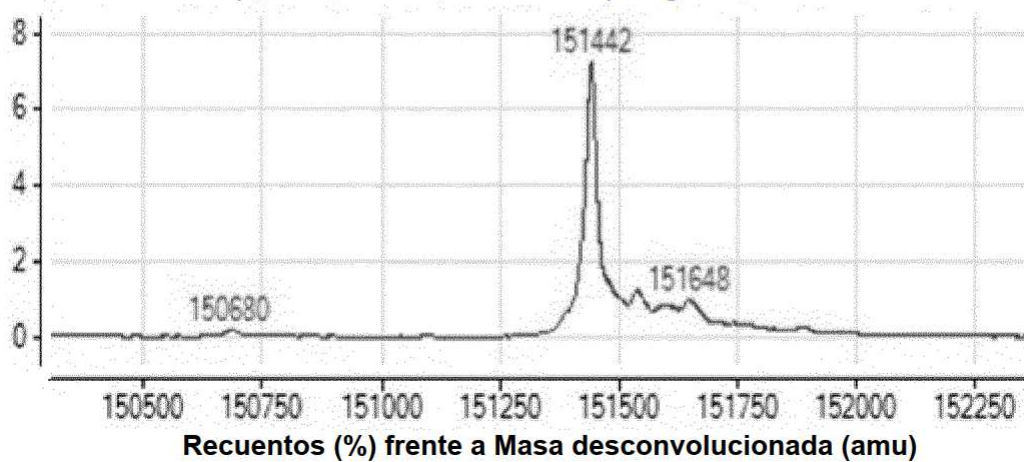
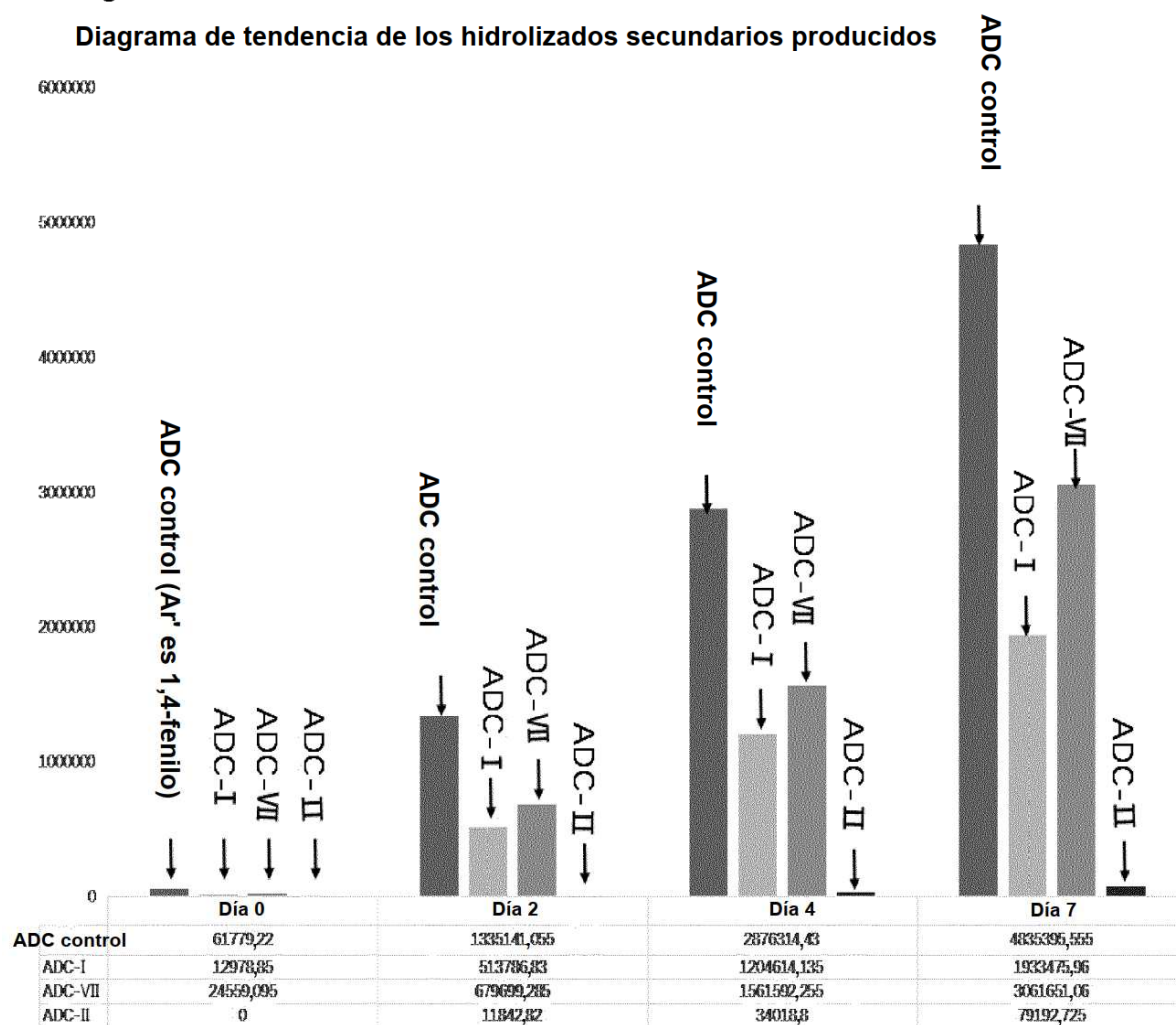


Fig. 15

Diagrama de tendencia de los hidrolizados secundarios producidos



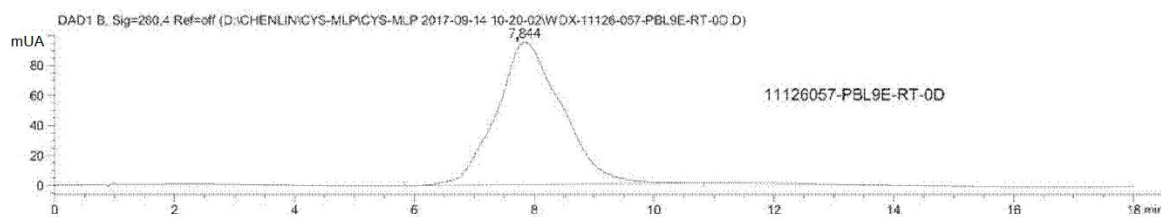


Fig. 16-1

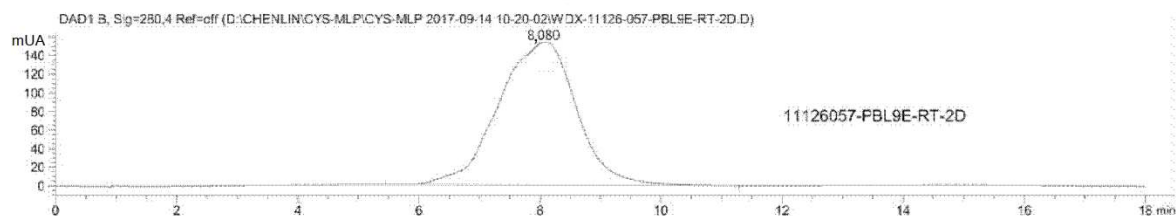


Fig. 16-2

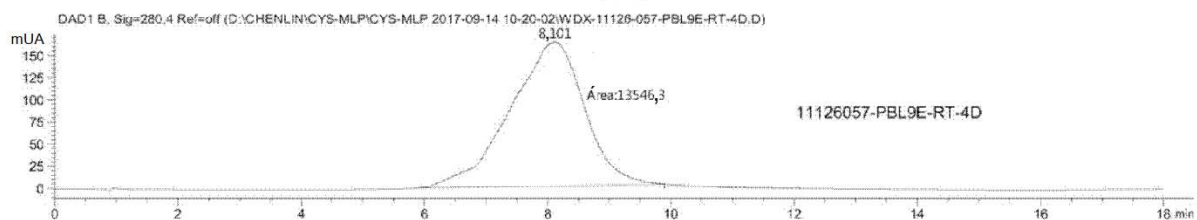


Fig. 16-3

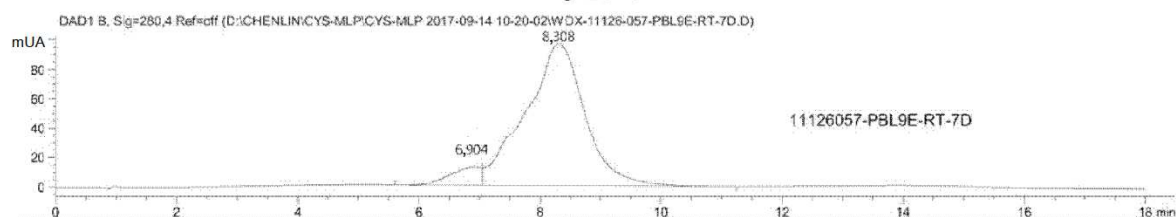


Fig. 16-4

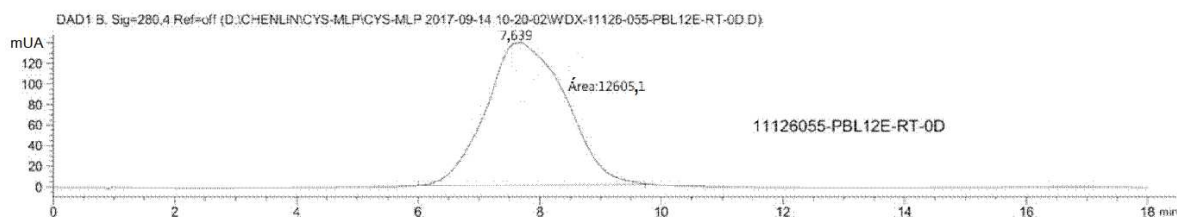


Fig. 17-1

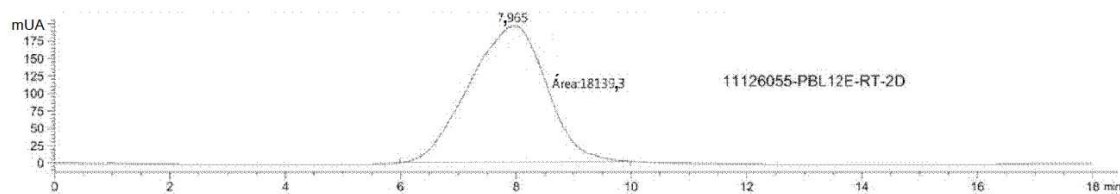


Fig. 17-2

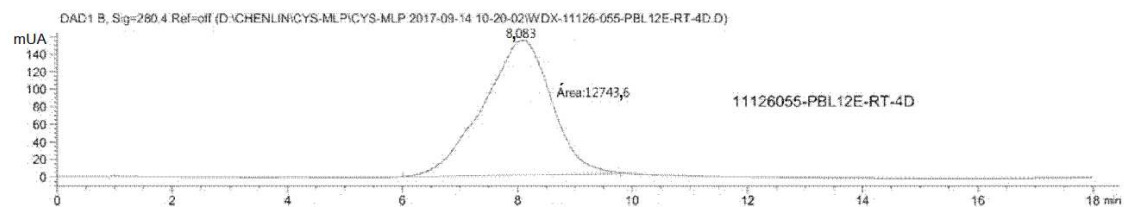


Fig. 17-3

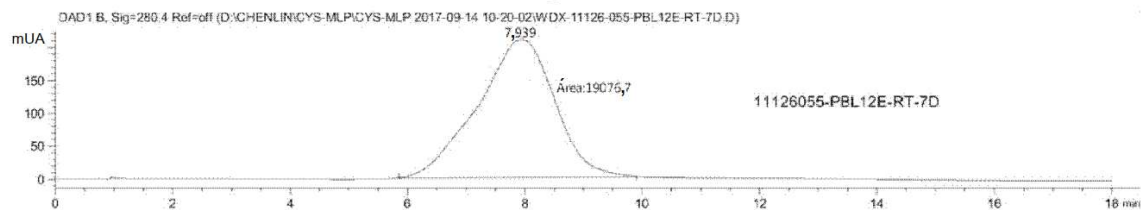


Fig. 17-4

Fig. 18-1

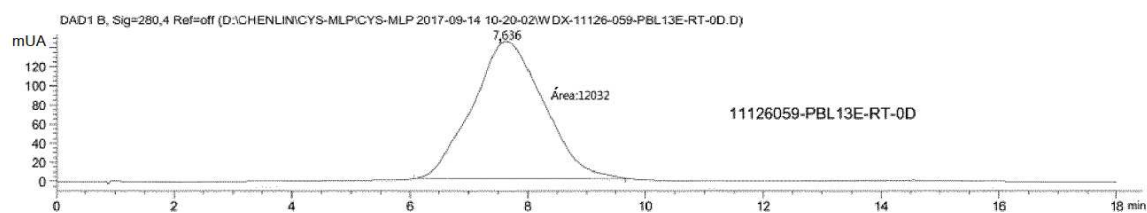


Fig. 18-2

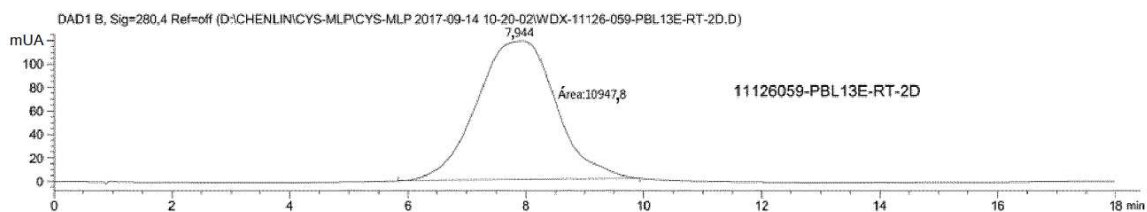


Fig. 18-3

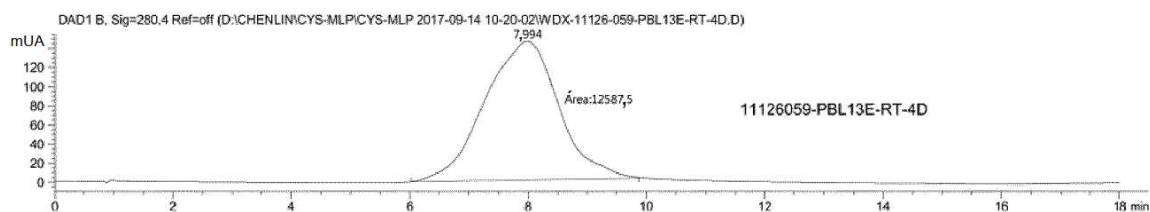


Fig. 18-4

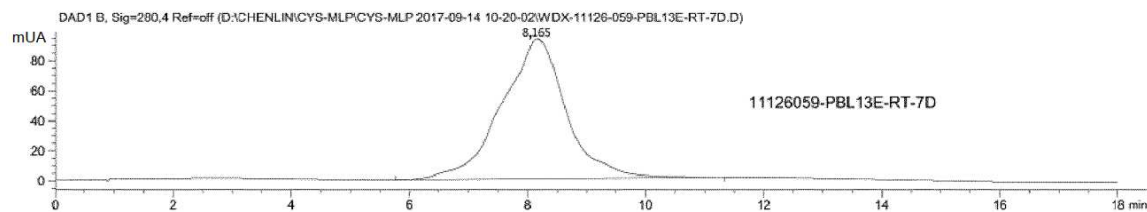


Fig. 19-1

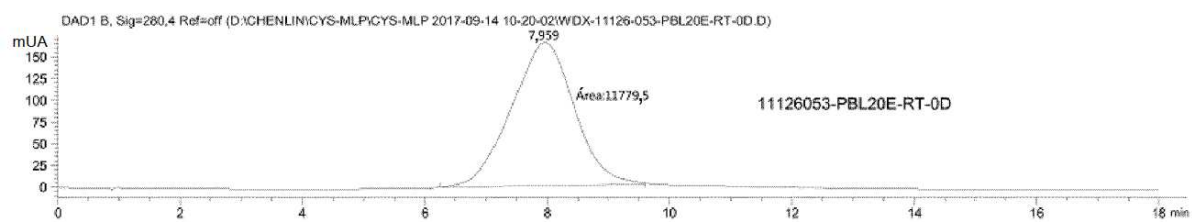


Fig. 19-2

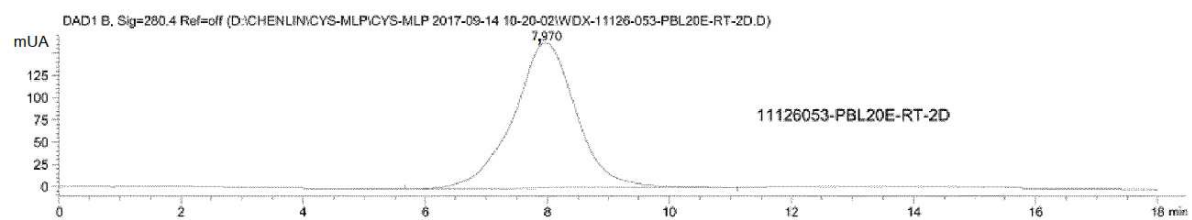


Fig. 19-3

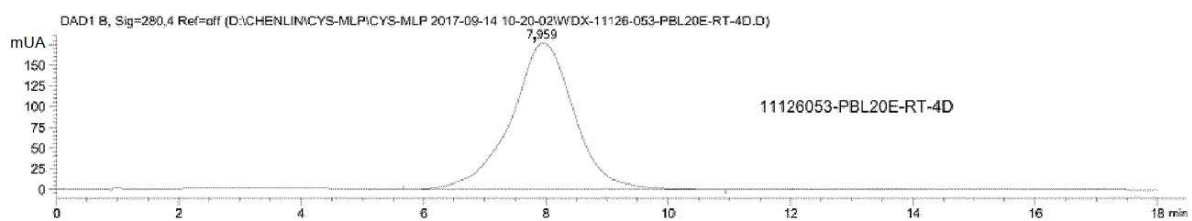


Fig. 19-4

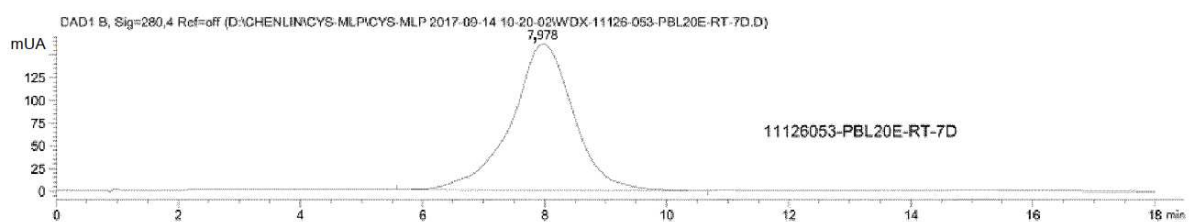


Fig. 20

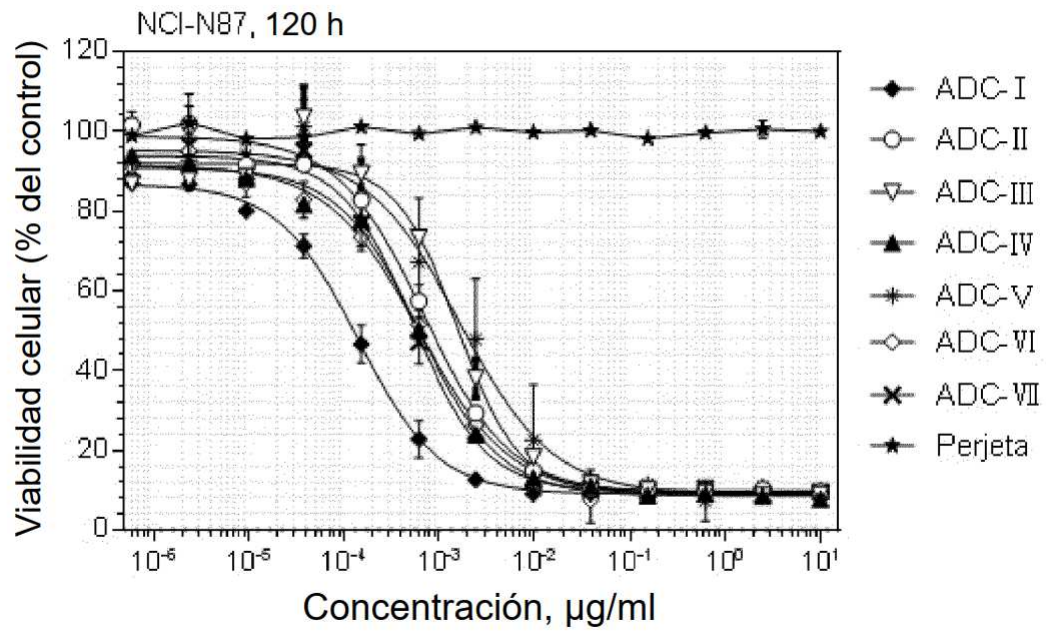


Fig. 21

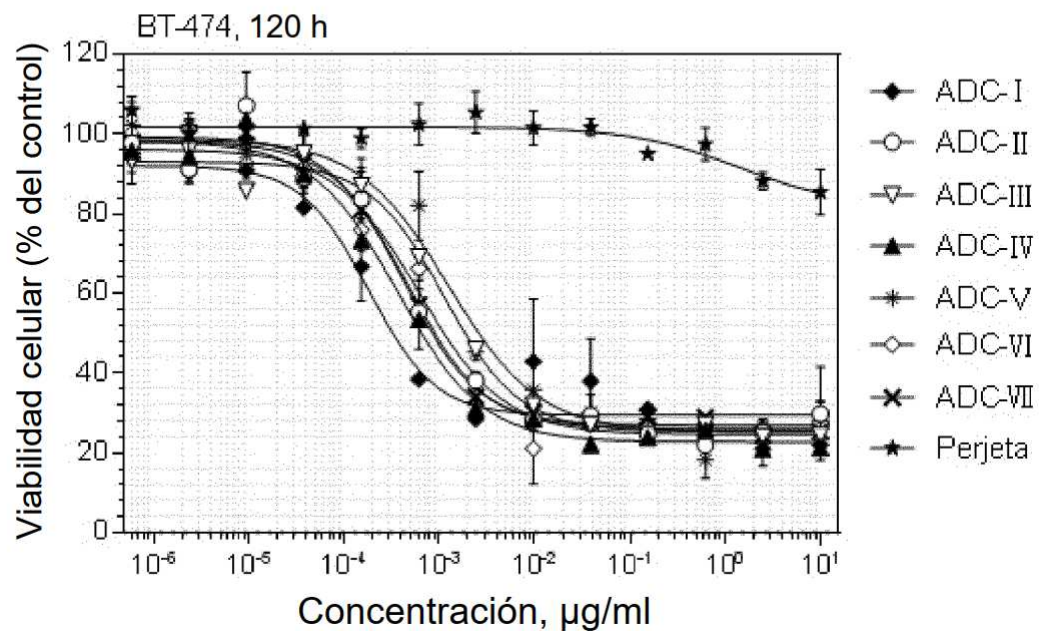


Fig. 22

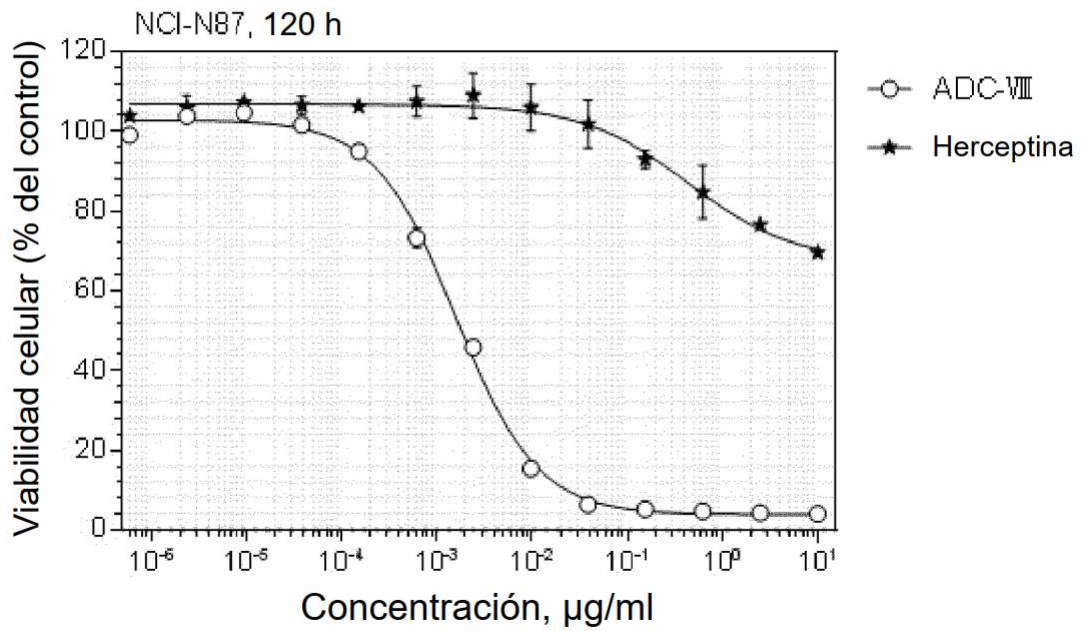


Fig. 23

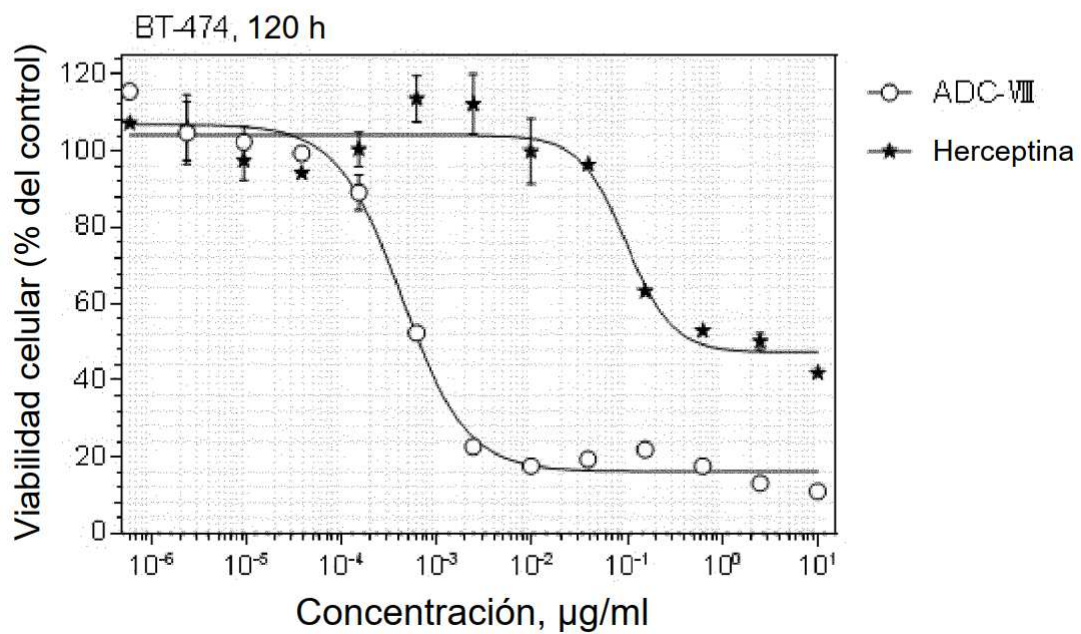


Fig. 24

