



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 005 311**

⑫ Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 491/052 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2015 E 22198821 (5)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 4212552**

⑭ Título: **Conjugado anticuerpo-fármaco ANTI-HER2**

⑬ Prioridad:

**31.01.2014 JP 2014017777
22.08.2014 JP 2014168944
10.11.2014 JP 2014227886**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2025

⑬ Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.00%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP**

⑬ Inventor/es:

**NAITO, HIROYUKI;
OGITANI, YUSUKE;
MASUDA, TAKESHI;
NAKADA, TAKASHI;
YOSHIDA, MASAO;
ASHIDA, SHINJI;
MORITA, KOJI;
MIYAZAKI, HIDEKI;
KASUYA, YUJI;
HAYAKAWA, ICHIRO y
ABE, YUKI**

⑬ Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 005 311 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

Conjugado anticuerpo-fármaco ANTI-HER2

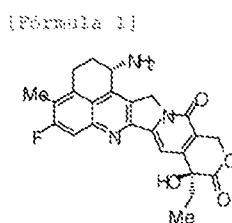
Campo técnico

La presente invención se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene un fármaco antitumoral conjugado 5 con un anticuerpo anti-HER2 a través de una fracción de estructura enlazadora, siendo útil el conjugado como fármaco antitumoral.

Técnica antecedente

Un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que tiene un fármaco con citotoxicidad conjugado con un anticuerpo, 10 cuyo antígeno se expresa en la superficie de las células cancerosas y que también se une a un antígeno capaz de internalización celular, y por lo tanto puede administrar el fármaco selectivamente a las células cancerosas, se espera así que cause acumulación del fármaco dentro de las células cancerosas y que mate las células cancerosas (véase, Literaturas de no patente 1 a 3). Como ADC, Milotarg (marca registrada; Gemtuzumab ozogamicin), en el que la calicheamicina se conjuga con un anticuerpo anti-CD33, está aprobado como agente terapéutico para la leucemia mieloide aguda. Además, Adcetris (marca registrada; Brentuximab vedotin), en el que la auristatina E se 15 conjuga con un anticuerpo anti-CD30, se ha aprobado recientemente como agente terapéutico para el linfoma de Hodgkin y el linfoma anaplásico de células grandes (véase, Literatura no patente 4). Los fármacos contenidos en las ADC aprobadas hasta ahora se dirigen al ADN o a la tubulina.

Con respecto a un agente antitumoral, se conocen derivados de camptotecina, compuestos de bajo peso molecular 20 que inhiben la topoisomerasa I para exhibir un efecto antitumoral. Entre ellos, un compuesto antitumoral representado por la fórmula siguiente



(exatecán, nombre químico: (1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-diona) es un derivado hidrosoluble de la camptotecina (Literaturas de Patente 1 y 2). A diferencia del irinotecán utilizado actualmente en clínica, este 25 compuesto no requiere la activación de una enzima para mostrar su efecto antitumoral. Además, se observó que su actividad inhibidora sobre la topoisomerasa I era superior a la del SN-38, que es la principal sustancia farmacéuticamente activa del irinotecán y el topotecán también utilizados en entornos clínicos, y se confirmó una mayor actividad citotóxica in vitro contra diversas células cancerosas. En particular, se confirmó su efecto contra las células cancerosas que presentan resistencia al SN-38 o similares debido a la expresión de la glicoproteína P. 30 Además, en un modelo de ratón con trasplante subcutáneo de tumor humano, se confirmó que tenía un potente efecto antitumoral, por lo que se ha sometido a estudios clínicos, pero aún no se ha comercializado (véanse las literaturas de no patente 5 a 10). Aún no está claro si el exatecán actúa eficazmente como ADC.

DE-310 es un complejo en el que el exatecán se conjuga con un polímero de polialcohol carboximetilhexano biodegradable a través de un espaciador de péptido GGFG (Literatura de Patentes 3). Al convertir el exatecán en 35 un profármaco polimérico, se puede mantener una elevada propiedad de retención sanguínea y también se incrementa pasivamente una elevada propiedad de focalización en las zonas tumorales utilizando la mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos recién formados dentro de los tumores y la propiedad de retención en los tejidos tumorales. Con DE-310, a través de la escisión del espaciador peptídico por la enzima, el exatecán y el exatecán con glicina conectada a un grupo amino se liberan continuamente como sustancia activa principal y, como 40 resultado, se mejora la farmacocinética. Se comprobó que DE-310 tiene una eficacia superior a la del exatecán administrado solo, a pesar de que la dosis total de exatecán contenida en D310 es inferior a la de la administración de exatecán solo, de acuerdo con diversos modelos de evaluación tumoral en estudios no clínicos. Se realizó un estudio clínico sobre el DE-310 y también se confirmaron casos eficaces, incluido un informe que sugería que la 45 principal sustancia activa se acumula en los tumores más que en los tejidos normales. Sin embargo, también hay un informe que indica que la acumulación de DE-310 y la principal sustancia activa en los tumores no es muy diferente de la acumulación en tejidos normales en humanos y, por lo tanto, no se observa ninguna dirección pasiva en humanos (ver Literatura de no patente 11 a 14). Como resultado, el DE-310 no se comercializó también, y sigue sin estar claro si el exatecan actúa o no eficazmente como fármaco dirigido a dicho objetivo.

Como compuesto relativo a DE-310, también se conoce un complejo en el que una fracción estructural representada por -NH-(CH₂)₄-C(=O)- se inserta entre el espaciador -GGFG- y el exatecán para formar -GGFG-NH-(CH₂)₄-C(=O)- utilizado como estructura espaciadora (Literatura de Patentes 4). Sin embargo, no se conoce en absoluto el efecto antitumoral de dicho complejo.

5 HER2 es uno de los productos de un oncogén de tipo receptor del factor de crecimiento típico identificado como oncogén relacionado con el receptor 2 del factor de crecimiento celular epidérmico humano, y es una proteína receptora transmembrana que tiene un peso molecular de 185 kDa y que tiene un dominio tirosina quinasa (Literatura de no patente 15). La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de HER2 se divultan en una base de datos pública, y pueden consultarse, por ejemplo, bajo el número de acceso M11730 (GenBank),
10 NP_004439.2 (NCBI), o similares.

15 HER2 (neu, ErbB-2) es uno de los miembros de la familia EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) y se activa por autofosforilación en residuos de tirosina intracelulares mediante su formación de homodímero o formación de heterodímero con otro receptor EGFR HER1 (EGFR, ErbB-1), HER3 (ErbB-3), o HER4 (ErbB-4) (Literaturas de no patente 16 a 18), desempeñando así un papel importante en el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia en células normales y células cancerosas (Literaturas de no patente 19 y 20). HER2 se sobreexpresa en diversos tipos de cáncer, tal como el de mama, el gástrico y el de ovario (literaturas de no patente 21 a 26) y se ha informado de que es un factor de pronóstico negativo para el cáncer de mama (literaturas de no patente 27 y 28).

20 El trastuzumab es un anticuerpo humanizado de un anticuerpo 4D5 anti-HER2 de ratón (literatura de no patente 29 y literatura de patente 5), denominado anticuerpo monoclonal recombinante humanizado anti-HER2 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Herceptin(R)) (literatura de patente 6). El trastuzumab se une específicamente al dominio extracelular IV de HER2 e induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o ejerce un efecto anticancerígeno a través de la inhibición de la transducción de señales de HER2 (Literaturas de no patente 30 y 31). El trastuzumab es muy eficaz para los tumores que sobreexpresan HER2 (literatura de no patente 32) y, 25 como tal, se lanzó en 1999 en EE. UU. y en 2001 en Japón como agente terapéutico para pacientes con cáncer de mama metastásico que sobreexpresan HER2.

30 Aunque el efecto terapéutico del trastuzumab en el cáncer de mama se ha demostrado adecuadamente (Literatura de no patente 33), supuestamente aproximadamente 15% de las pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan HER2 y que han recibido una amplia gama de terapias anticancerosas convencionales son respondedoras al trastuzumab. Aproximadamente 85% de las pacientes de esta población no responden al tratamiento con trastuzumab o lo hacen de forma muy débil.

35 Así, se ha reconocido la necesidad de un agente terapéutico dirigido a enfermedades relacionadas con la expresión de HER2 para pacientes afectados por tumores que sobreexpresan HER2 con respuesta nula o débil a trastuzumab o trastornos relacionados con HER2. Se han desarrollado T-DM1 (trastuzumab emtansina, Kadcila (R); literatura de no patentes 34) que tiene un fármaco antitumoral conjugado con trastuzumab mediante una estructura de enlace, y pertuzumab (Perjeta(R); literatura de no patente 35 y literatura de patentes 7) diseñado para dirigirse al dominio extracelular II de HER2 e inhibir la formación de heterodímeros. Sin embargo, su capacidad de respuesta, la intensidad de su actividad y las indicaciones aceptadas siguen siendo insuficientes, y existen necesidades insatisfechas para la diana HER2.

40 [Lista de citas]

[Literaturas de patente]

[Literatura de patente1] Patente japonesa abierta al público No. 5-59061

[Literatura de patente2] Patente japonesa abierta al público No. 8-337584

[Literatura de patentes 3] Publicación internacional No. WO 1997/46260.

45 [Literatura de patentes 4] Publicación internacional No. WO 2000/25825.

[Literatura de patentes 5] Patente de EE. UU. No. 5677171

[Literatura de patentes 6] Patente de EE. UU. No. 5821337

[Literatura de patentes 7] Publicación internacional No. WO 01/00244.

[Literaturas de no patente]

50 [Literatura de no patente 1] Ducry, L., et al., Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.

[Literatura de no patente 2] Alley, S. C., et al., Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.

- [Literatura de no patente 3] Damle N.K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.
- [Literatura de no patente 4] Senter P. D., et al., Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.
- [Literatura de no patente 5] Kumazawa, E., Tohgo, A., Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632.
- [Literatura de no patente 6] Mitsui, I., et al., Jpn J. Cancer Res.. (1995) 86, 776-782.
- 5 [Literatura de no patente 7] Takiguchi, S., et al., Jpn J. Cancer Res.. (1997) 88, 760-769.
- [Literatura de no patente 8] Joto, N. et al. Int J Cancer (1997) 72, 680-686.
- [Literatura de no patente 9] Kumazawa, E. et al., Cancer Chemother.. Pharmacol. (1998) 42, 210-220.
- [Literatura de no patente 10] De Jager, R., et al., Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260-273.
- 10 [Literatura de no patente 11] Inoue, K. et al., Polymer Drugs in the Clinical Stage, Editado por Maeda et al.. (2003) 145-153.
- [Literatura de no patente 12] Kumazawa, E. et al., Cancer Sci (2004) 95, 168-175.
- [Literatura de no patente 13] Soopenberg, O. et al., Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703-711.
- [Literatura de no patente 14] Wente M. N. et al., Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347.
- [Literatura de no patente 15] Coussens L, et al., Science. 1985;230 (4730) :1132-1139.
- 15 [Literatura de no patente 16] Graus-Porta G, et al., EMBO J. 1997;16:1647-1655.
- [Literatura de no patente 17] Karnagaran D, et al., EMBO J. 1996;15:254-264.
- [Literatura de no patente 18] Sliwkowski MX, et al., J. Biol.. Chem. 1994;269:14661-14665.
- [Literatura de no patente 19] Di Fore PP, et al., Science.. 1987;237:178-182.
- [Literatura de no patente 20] Hudziak RM, et al., Proc Natl Acad Sci EE. UU... 1987;84:7159-7163.
- 20 [Literatura de no patente 21] Hardwick R, et al., Eur.. J Surg Oncol. 1997 (23):30-35.
- [Literatura de no patente 22] Korkaya H, et al., Oncogene.. 2008;27(47):6120-6130.
- [Literatura de no patente 23] Yano T, et al., Oncol Rep.. 2006;15(1):65-71.
- [Literatura de no patente 24] Slamon DJ, et al., Science.. 1987;235:177-182.
- [Literatura de no patente 25] Gravalos C, et al., Ann Oncol 19.. 1523-1529, 2008.
- 25 [Literatura de no patente 26] Fukushige S et al., Mol Cell Biol 6.. 955-958, 1986.
- [Literatura de no patente 27] Slamon DJ, et al.. Science. 1989;244:707-712.
- [Literatura de no patente 28] Kaptain S et al., Diagn Mol Pathol 10:139-152, 2001.
- [Literatura de no patente 29] Fendly. et al., Cancer Research 1990(50):1550-1558.
- [Literatura de no patente 30] Sliwkowski MX, et al., Semin Oncol.. 1999;26(4,Suppl 12):60-70.
- 30 [Literatura de no patente 31] Hudis CA, et al., N Engl J Med.. 357: 39-51, 2007.
- [Literatura de no patente 32] Vogel CL, et al., J Clin Oncol.. 2002;20(3):719-726.
- [Literatura de no patente 33] Baselga et al., J. Clin.. Oncol. 14:737-744 (1996).
- [Literatura no patente 34] Howard A. et al., J Clin Oncol 2011;29:398-405.
- [Literatura de no patente 35] Adams CW, et al., Cancer Immunol Immunother.. 2006;6:717-727.
- 35 [Resumen de la invención]
- [Problema técnico]

Con respecto al tratamiento de tumores mediante anticuerpos, puede observarse un efecto antitumoral insuficiente incluso cuando el anticuerpo reconoce un antígeno para unirse a células tumorales, y hay casos en los que se necesita un anticuerpo antitumoral más eficaz. Además, muchos compuestos antitumorales de bajo peso molecular presentan problemas de seguridad, como efectos secundarios y toxicidad, aunque tengan un excelente efecto antitumoral. Sigue siendo un objetivo lograr un efecto terapéutico superior mejorando aún más la seguridad. Así, un objeto de la presente invención es proporcionar un fármaco antitumoral que tenga un excelente efecto terapéutico, que sea excelente en términos de efecto antitumoral y seguridad.

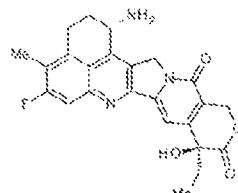
[Solución al problema]

- Los inventores consideraron que un anticuerpo anti-HER2 es un anticuerpo que es capaz de dirigirse a células tumorales, es decir, que tiene una propiedad de reconocer células tumorales, una propiedad de unirse a células tumorales, una propiedad de internalizarse dentro de células tumorales, una actividad citotóxica contra células tumorales, una actividad citotóxica contra células tumorales, o similares; de este modo, cuando el compuesto antitumoral exatecan se convierte en un conjugado anticuerpo-fármaco, a través de una fracción de estructura de enlace, mediante conjugación con este anticuerpo, el compuesto antitumoral puede administrarse con mayor seguridad a las células tumorales para exhibir específicamente el efecto antitumoral del compuesto en las células tumorales, y de este modo, el efecto antitumoral se puede exhibir con seguridad y también se puede esperar un efecto citocídico mejorado del anticuerpo anti-HER2, y la dosis del compuesto antitumoral se puede reducir en comparación con el caso de administrar el compuesto solo, y así se pueden aliviar las influencias del compuesto antitumoral en las células normales, de modo que se puede lograr una mayor seguridad.
- A este respecto, los inventores crearon un enlazador con una estructura específica y consiguieron obtener un conjugado anticuerpo-fármaco en el que el anticuerpo anti-HER2 y el exatecán se conjugan entre sí a través del enlazador, y confirmaron un excelente efecto antitumoral exhibido por el conjugado para completar así la presente invención.

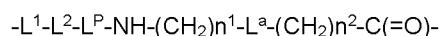
Especificamente, la presente invención se refiere a lo siguiente.

- [1] Un conjugado anticuerpo-fármaco en el que un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 2]



se conjuga con un anticuerpo anti-HER2 mediante un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



- a través de un enlace tioéter que se forma en una fracción de enlace disulfuro presente en la parte de bisagra del anticuerpo anti-HER2.

Aquí, el anticuerpo anti-HER2 está conectado al terminal L^1 ,

el compuesto antitumoral se conecta al grupo carbonilo de la fracción $-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$ con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como posición de conexión,

- en donde

n^1 representa un número entero de 0 a 6,

n^2 representa un número entero de 0 a 5,

L^1 representa $-(Succinimid-3-il-N) - (CH_2)^{n^3}-C(=O)-$,

en donde n^3 representa un número entero de 2 a 8,

- L^2 representa $-NH-(CH_2CH_2-O)^{n^4}-CH_2CH_2-C(=O)-$ o un enlace sencillo,

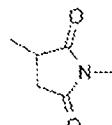
en donde n^4 representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa un residuo peptídico que consiste en 2 a 7 aminoácidos,

L^a representa -O- o un enlace simple, y

-(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 3]



5

que está conectado al anticuerpo anti-HER2 en la posición 3 del mismo y está conectado al grupo metileno en la estructura enlazadora que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1.

La presente invención se refiere además a cada uno de los siguientes.

10 [2] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con [1], en el que el residuo peptídico L^P es un residuo peptídico que comprende un aminoácido seleccionado de fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico.

[3] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con [1] o [2], en el que L^P es un residuo peptídico seleccionado del siguiente grupo:

-GGF-,

15 -DGGF-,

-(D-)D-GGF-,

-EGGF-,

-GGFG-,

-SGGF-,

20 -KGGF-,

-DGGFG-,

-GGFGG-,

-DDGGFG-,

-KDGGFG-, y

25 -GGFGGGF-;

en donde "(D-)D" representa el ácido D-aspártico.

[4] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con [1] o [2], en el que L^P es un residuo peptídico que consiste en 4 aminoácidos.

30 [5] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], en el que L^P es el residuo tetrapéptido -GGFG-.

[6] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en el que n_3 es un número entero de 2 a 5, y L^2 es un enlace simple.

[7] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en el que n_3 es un número entero de 2 a 5, L^2 es -NH-(CH₂CH₂-O)n₄-CH₂CH₂-C(=O)-, y n_4 es 2 o 4.

35 [8] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7], en el que -NH-(CH₂)n₁-La-(CH₂)n₂-C(=O)- es una estructura parcial que tiene una longitud de cadena de 4 a 7 átomos.

[9] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7], en el que -NH-(CH₂)_{n1}-La-(CH₂)_{n2}-C(=O)- es una estructura parcial que tiene una longitud de cadena de 5 o 6 átomos.

[10] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9], en el que -NH-(CH₂)_{n1}-La-(CH₂)_{n2}-C(=O)- es

5 -NH-CH₂CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

10 -NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

o

-NH-CH₂CH₂-O-C(=O)-.

[11] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9], en el que -NH-(CH₂)_{n1}-La-(CH₂)_{n2}-C(=O)- es

15 -NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

o

-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-.

[12] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9], en el que la molécula de la estructura del fármaco-enlazador que tiene el fármaco conectado a -L₁-L₂-LP-NH-(CH₂)_{n1}-La-(CH₂)_{n2}-C(=O)- es una estructura fármaco-enlazador seleccionada del grupo siguiente:

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

25 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-C(=O)-(NH-DX),

30 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

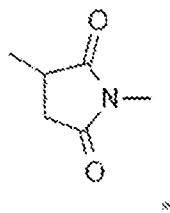
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

35 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

en la que -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula

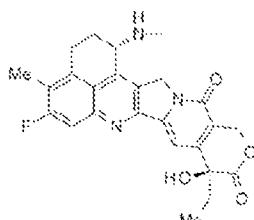
[Fórmula 4]



que está conectado al anticuerpo anti-HER2 en la posición 3 del mismo y está conectado al grupo metileno en la estructura enlazadora que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

-(NH-DX) representa un grupo representado por la fórmula siguiente:

[Fórmula 5]



5

en el que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición de conexión, y
-GGFG- representa el residuo tetrapéptido -Gly-Gly-Phe-Gly-.

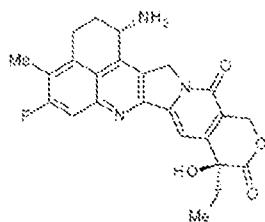
[13] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9], en el que la molécula de la estructura del fármaco-enlazador que tiene el fármaco conectado a -L¹-L²-LP-NH-(CH₂)ⁿ¹-La-(CH₂)ⁿ²-C(=O)- es una estructura fármaco-enlazador seleccionada del grupo siguiente:

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

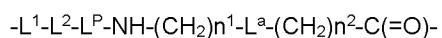
15 Aquí, -(Succinimid-3-il-N)-, -(NH-DX), y -GGFG- son como se definió anteriormente.

[14] Un conjugado anticuerpo-fármaco en el que un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 6]



20 se conjuga con un anticuerpo anti-HER2 mediante un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



a través de un enlace tioéter que se forma en una fracción de enlace disulfuro presente en la parte de bisagra del anticuerpo anti-HER2,

en el que

5 el anticuerpo anti-HER2 está conectado a la L1terminal, el compuesto antitumoral está conectado al grupo carbonilo de la fracción -(CH₂)_{n2}-C(=O)-,

en donde

n1 representa un número entero de 0 a 6,

n2 representa un número entero de 0 a 5,

L1 representa -(Succinimid-3-il-N)-(CH₂)_{n3}-C(=O)-,

10 en donde n3 representa un número entero de 2 a 8,

L2 representa -NH-(CH₂CH₂-O)n4-CH₂CH₂-C(=O)- o un enlace sencillo,

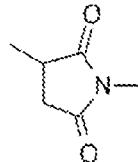
en donde n4 representa un número entero de 1 a 6,

LP representa el residuo tetrapéptido -GGFG-,

La representa -O- o un enlace simple, y

15 -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 7]



que está conectado al anticuerpo anti-HER2 en la posición 3 del mismo y está conectado al grupo metileno en la estructura enlazadora que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1.

[15] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con [14], en el que

20 n1 es 3, n2 es 0, n3 es 2, L2 es -NH-(CH₂CH₂-O)n4-CH₂CH₂-C(=O)-, n4 es 2, y La es un enlace sencillo,

n1 es 1, n2 es 1, n3 es 5, L2 es un enlace sencillo, y La es -O-, o

n1 es 2, n2 es 1, n3 es 5, L2 es un enlace sencillo, y La es -O-.

[16] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con [14] o [15], en el que n3 es 2 o 5, y L2 es un enlace sencillo.

25 [17] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con [14] o [15], en el que n3 es 2 o 5, L2 es -NH-(CH₂CH₂-O)n4-CH₂CH₂-C(=O)-, y n4 es 2 o 4.

[18] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera

de [14] a [17], en el que -NH-(CH₂)_{n1}-La-(CH₂)_{n2}-C(=O)-es

30 -NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

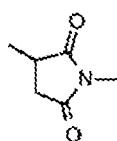
o

-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-.

[19] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [14] a [18], en el que la molécula de la estructura del fármaco-enlazador que tiene el fármaco conectado a $-L_1-L_2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ es una estructura de enlazador de fármaco seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- 5 – (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- 10 – (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- 15 – (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- 20 – (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- donde, -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

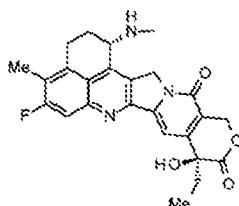
[Fórmula 8]



que está conectado al anticuerpo anti-HER2 en la posición 3 del mismo y está conectado al grupo metileno en la estructura enlazadora que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

- (NH-DX) representa un grupo representado por la fórmula siguiente:

[Fórmula 9]



25

en el que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición de conexión, y

- GGFG- representa el residuo tetrapéptido -Gly-Gly-Phe-Gly-.

[20] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [14] a [18], en el que la molécula de la estructura del fármaco-enlazador que tiene el fármaco conectado a $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ es una estructura de enlazador de fármaco seleccionada del grupo siguiente:

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), y
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

- 5 Aquí, -(Succinimid-3-il-N)-, -(NH-DX), y -GGFG-son como se definió anteriormente.
- [21] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [20], en el que el número medio de unidades de la estructura seleccionada de un enlazador de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 1 a 10.
- 10 [22] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [20], en el que el número medio de unidades de la estructura seleccionada de un enlazador de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 2 a 8.
- [23] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [20], en el que el número medio de unidades de la estructura seleccionada de un fármaco-enlazador conjugado por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 3 a 8.
- 15 [24] Un fármaco que contiene el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [23], una sal del mismo o un hidrato del mismo.
- [25] Un fármaco antitumoral y/o anticanceroso que contiene el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [23], una sal del mismo o un hidrato del mismo.
- 20 [26] El fármaco antitumoral y/o anticanceroso de acuerdo con [25], que es para uso contra cáncer de pulmón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de cuello uterino, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas, cáncer peritoneal, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de útero, cáncer de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, cáncer de pene, leucemia, linfoma maligno, plasmocitoma, mieloma o sarcoma.
- 25 [27] Una composición farmacéutica que contiene el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [23], una sal del mismo o un hidrato del mismo como componente activo, y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.
- 30 [28] La composición farmacéutica de acuerdo con [27], que es para uso contra cáncer de pulmón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de cuello uterino, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas, cáncer peritoneal, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de útero, cáncer de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, cáncer de pene, leucemia, linfoma maligno, plasmocitoma, mieloma o sarcoma.
- 35 [29] Un método para tratar tumor y/o cáncer que comprende administrar el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [23], una sal del mismo o un hidrato del mismo.
- [30] Un método para producir un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende hacer reaccionar un compuesto representado por la siguiente fórmula:

40 (maleimid-N-il)-(CH₂)ⁿ³-C(=O)-L²-L²-NH-(CH₂)ⁿ¹-L^a-(CH₂)ⁿ²-C(=O)-(NH-DX)

con un anticuerpo anti-HER2 o un derivado reactivo del mismo y la conjugación de una fracción de fármaco enlazador con el anticuerpo mediante un método para formar un enlace tioéter en un sitio de enlace disulfuro presente en la parte de bisagra del anticuerpo.

45 En la fórmula, n3 representa un número entero de 2 a 8, L2 representa -NH-(CH₂CH₂-O)ⁿ⁴-CH₂CH₂-C(=O)- o un enlace sencillo, en el que n4 representa un número entero 1 a 6,

LP representa un residuo peptídico formado por 2 a 7 aminoácidos seleccionados de fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico,

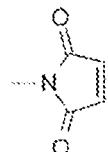
n1 representa un número entero de 0 a 6,

n2 representa un número entero de 0 a 5,

La representa -O- o un enlace simple,

(maleimida-N-il) - es un grupo representado por la fórmula siguiente:

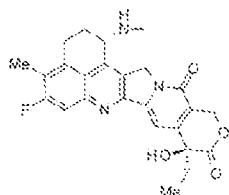
(Fórmula 10)



en el que el átomo de nitrógeno es la posición de conexión, y

5 -(NH-DX) es un grupo representado por la siguiente fórmula:

(Fórmula 11)



en el que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición de conexión.

10 [31] El método de producción de acuerdo con [30], en el que el método para conjugar una fracción de enlazador de fármaco con un anticuerpo anti-HER2 es un método de reducción del anticuerpo para convertir el anticuerpo en un derivado reactivo.

[32] El método de producción de acuerdo con [30] o [31], en el que el número medio de unidades de la estructura farmacológica seleccionada conjugada por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 1 a 10.

15 [33] El método de producción de acuerdo con [30] o [31], en el que el número medio de unidades de la estructura farmacológica seleccionada conjugada por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 2 a 8.

[34] El método de producción de acuerdo con [30] o [31], en el que el número medio de unidades de la estructura farmacológica seleccionada conjugada por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 3 a 8.

[35] Un conjugado anticuerpo-fármaco obtenido por el método de producción de acuerdo con cualquiera de [30] a [34].

20 [36] Un conjugado anticuerpo-fármaco obtenido mediante la formación de un enlace tioéter en un sitio de enlace sulfuro en la parte bisagra del anticuerpo, en el que el anticuerpo anti-HER2 se trata en una condición reductora y posteriormente se hace reaccionar con un compuesto seleccionado del grupo mostrado a continuación:

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

25 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

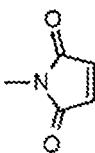
30 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 5 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 10 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
 15 (NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 20 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 25 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 30 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), and
 35 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

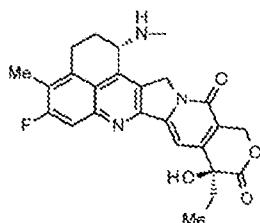
En lo anterior, (maleimid-N-il)- es un grupo representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 12]



en el que el átomo de nitrógeno es la posición de conexión, y -(NH-DX) es un grupo representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 13]



5 en el que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición de conexión, y -GGFG- representa el residuo tetrapéptido -Gly-Gly-Phe-Gly-.

[37] Un conjugado anticuerpo-fármaco obtenido mediante la formación de un enlace tioéter en un sitio de enlace sulfuro presente en la parte bisagra del anticuerpo, en el que el anticuerpo anti-HER2 se trata en una condición reductora y posteriormente se hace reaccionar con un compuesto seleccionado del grupo mostrado a continuación:

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), y

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

15 Aquí, (maleimid-N-il) -, - (NH-DX), y -GGFG- son como se definieron anteriormente.

[38] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con [36] o [37], en el que el número medio de unidades de la estructura fármaco-enlazador seleccionada conjugadas por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 1 a 10.

20 [39] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con [36] o [37], en el que el número medio de unidades de la estructura fármaco-enlazador seleccionada conjugada por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 2 a 8.

[40] El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con [36] o [37], en el que el número medio de unidades de la estructura fármaco-enlazador seleccionada conjugada por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 3 a 8.

Efectos ventajosos de la invención

25 Con un conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 que tiene el compuesto antitumoral exatecán conjugado a través de un enlazador con una estructura específica, se puede conseguir un excelente efecto antitumoral y seguridad.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2 (SEQ ID NO: 1).

30 [Figura 2] La Figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de un anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2 (SEQ ID NO: 2).

[Figura 3] La Figura 3 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (27) o trastuzumab en un ratón desnudo con células de la línea KPL-4 de cáncer de mama humano trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

5 [Figura 4] La Figura 4 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (8), (28) o trastuzumab emtansina en un ratón desnudo con células de la línea de cáncer gástrico humano NCI-N87 trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

10 [Figura 5] La figura 5 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (8), (29), (30), trastuzumab o trastuzumab emtansina en un ratón desnudo con células de la línea JIMT-1 de cáncer de mama humano trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

15 [Figura 6] La Figura 6 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (31), trastuzumab o trastuzumab emtansina en un ratón desnudo con células de la línea Capan-1 de cáncer de páncreas humano trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

20 [Figura 7] La Figura 7 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (50) en un ratón desnudo con células de la línea de cáncer gástrico humano NCI-N87 trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

25 [Figura 8] La figura 8 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (50), trastuzumab o trastuzumab emtansina en un ratón desnudo con células ST225 de cáncer de mama humano trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

30 [Figura 9] La figura 9 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (50), trastuzumab o trastuzumab emtansina en un ratón desnudo con células ST910 de cáncer de mama humano trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

35 [Figura 10] La figura 10 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (50), trastuzumab o trastuzumab emtansina en un ratón desnudo con células de la línea de cáncer colorrectal humano CTG-0401 trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

40 [Figura 11] La figura 11 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (50), trastuzumab o trastuzumab emtansina en un ratón desnudo con células CTG-0860 de cáncer de pulmón humano de células no pequeñas trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

45 [Figura 12] La figura 12 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (50), trastuzumab o trastuzumab emtansina en un ratón desnudo con células CTG-0927 de la línea de cáncer de vías biliares humanas trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

[Figura 13] La figura 13 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (50), trastuzumab o trastuzumab emtansina en un ratón desnudo con células de la línea de cáncer de esófago humano CTG-0137 trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

50 [Figura 14] La figura 14 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado anticuerpo-fármaco (50), trastuzumab o trastuzumab emtansina en un ratón desnudo con células de la línea SK-OV-3 de cáncer de ovario humano trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral.

Descripción de las realizaciones

50 A continuación, se describen modos preferidos para llevar a cabo la presente invención con referencia a los dibujos. Las realizaciones descritas a continuación se dan meramente para ilustrar un ejemplo de una realización típica de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

El conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención es un fármaco antitumoral en el que un anticuerpo anti-HER2 se conjuga con un compuesto antitumoral a través de una fracción de estructura enlazadora y se explica en detalle a continuación.

[Anticuerpo]

- 5 El anticuerpo anti-HER2 utilizado en el conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención puede derivarse de cualquier especie, y ejemplos preferidos de las especies pueden incluir seres humanos, ratas, ratones y conejos. En caso de que el anticuerpo proceda de una especie distinta de la humana, es preferible quimerizarlo o humanizarlo mediante una técnica bien conocida. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal y es preferentemente un anticuerpo monoclonal.
- 10 El anticuerpo anti-HER2 es el anticuerpo, que es capaz de dirigirse a células tumorales, es decir, posee una propiedad de reconocer una célula tumoral, una propiedad de unirse a una célula tumoral, una propiedad de internalizarse en una célula tumoral, actividad citotóxica contra células tumorales, o similares, y puede conjugarse con un fármaco que tiene actividad antitumoral a través de un enlazador para formar un conjugado anticuerpo-fármaco.
- 15 La actividad de unión del anticuerpo frente a células tumorales puede confirmarse mediante citometría de flujo. La internalización del anticuerpo en células tumorales se puede confirmar usando (1) un ensayo de visualización de un anticuerpo incorporado en las células bajo un microscopio de fluorescencia usando un anticuerpo secundario (marcado fluorescentemente) que se une al anticuerpo terapéutico (*Cell Death and Differentiation* (2008) 15, 751-761), (2) un ensayo para medir la intensidad de la fluorescencia incorporada en las células usando un anticuerpo secundario (marcado con fluorescencia) que se une al anticuerpo terapéutico (*Molecular Biology of the Cell*, Vol. 15, 5268-5282, diciembre de 2004), o (3) un ensayo Mab-ZAP que utiliza una inmunotoxina que se une al anticuerpo terapéutico en el que la toxina se libera tras su incorporación en las células para inhibir el crecimiento celular (*Bio Techniques* 28: 162-165, enero de 2000). Como inmunotoxina, puede utilizarse una proteína compleja recombinante de un dominio catalítico de toxina diftérica y proteína G.
- 20
- 25 La actividad antitumoral del anticuerpo puede confirmarse *in vitro* determinando la actividad inhibitoria frente al crecimiento celular. Por ejemplo, se cultiva una línea celular cancerosa que sobreexpresa una proteína objetivo para el anticuerpo, y se añade el anticuerpo a concentraciones variables en el sistema de cultivo para determinar una actividad inhibitoria contra la formación de focos, la formación de colonias y el crecimiento de esferoides. La actividad antitumoral puede confirmarse *in vivo*, por ejemplo, administrando el anticuerpo a un ratón desnudo con una línea celular tumoral transplantada que exprese altamente la proteína objetivo, y determinando el cambio en la célula cancerosa.
- 30

Puesto que el compuesto conjugado en el conjugado anticuerpo-fármaco ejerce un efecto antitumoral, se prefiere, pero no es esencial que el propio anticuerpo tenga un efecto antitumoral. Con el fin de ejercer específica y selectivamente la actividad citotóxica del compuesto antitumoral contra las células tumorales, es importante y también preferible que el anticuerpo tenga la propiedad de internalizarse para migrar al interior de las células tumorales.

35 El anticuerpo anti-HER2 puede obtenerse mediante un procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo de la presente invención puede obtenerse usando un método llevado a cabo habitualmente en la técnica, que comprende inmunizar animales con un polipéptido antigenóico y recoger y purificar anticuerpos producidos *in vivo*. El origen del antígeno no se limita a los seres humanos, y los animales pueden inmunizarse con un antígeno derivado de un animal no humano, tal como un ratón, una rata y similares. En este caso, la reactividad cruzada de los anticuerpos que se unen al antígeno heterólogo obtenido con antígenos humanos puede probarse para buscar un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

40 Alternativamente, las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos contra el antígeno se fusionan con células de mieloma de acuerdo con un método conocido en la técnica (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* (1975) 256, p. 495-497; y Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, p. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)) para establecer hibridomas, a partir de los cuales pueden obtenerse a su vez anticuerpos monoclonales.

45 El antígeno puede obtenerse mediante ingeniería genética de células huésped para producir un gen que codifique la proteína antigenóica. Concretamente, se preparan vectores que permiten la expresión del gen del antígeno y se transfieren a células huésped para que se exprese el gen. El antígeno así expresado puede purificarse. El anticuerpo también puede obtenerse mediante un método de inmunización de animales con las células genéticamente modificadas que expresan el antígeno descritas anteriormente o con una línea celular que exprese el antígeno.

50 Los anticuerpos anti-HER2 que pueden usarse en la presente invención no están particularmente limitados y son preferentemente, por ejemplo, los que tienen propiedades como las descritas a continuación.

55 (1) Un anticuerpo anti-HER2 con las siguientes propiedades:

- (a) se une específicamente a HER2, y
- (b) que tengan una actividad de internalización en las células que expresan HER2 mediante la unión a HER2.
- (2) El anticuerpo de acuerdo con (1) anterior, en el que el anticuerpo se une al dominio extracelular de HER2.
- 5 (3) El anticuerpo de acuerdo con (1) o (2) anterior, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- (4) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores, en el que el anticuerpo tiene una actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).
- 10 (5) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de ratón, un anticuerpo monoclonal químérico o un anticuerpo monoclonal humanizado.
- (6) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (5) anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera consistente en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2.
- 15 (7) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (6) anteriores, en el que el anticuerpo carece de un residuo de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada.
- (8) El anticuerpo de acuerdo con (7) anterior, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada consistente en una secuencia de aminoácidos consistente en los residuos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera constituida por una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2.
- 20 (9) Un anticuerpo obtenido por un método para producir el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (8) anteriores, comprendiendo el método los pasos de: cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el anticuerpo; y recolectar el anticuerpo de interés a partir de los cultivos obtenidos en el paso anterior.
- 25 A continuación, se describe el anticuerpo anti-HER2 utilizado en la invención.
- Los términos "cáncer" y "tumor" utilizados en el presente documento se emplean con el mismo significado.
- El término "gen", tal como se utiliza en el presente documento, incluye no sólo ADN, sino también ARNm del mismo, ADNc del mismo y ARNc del mismo.
- 30 El término "polinucleótido" tal como se utiliza en el presente documento se utiliza con el mismo significado que un ácido nucleico y también incluye ADN, ARN, sondas, oligonucleótidos y cebadores.
- Los términos "polipéptido", "proteína" y "proteína" utilizados en el presente documento se emplean indistintamente.
- El término "célula" tal como se utiliza en el presente documento también incluye células en un individuo animal y células cultivadas.
- 35 El término "HER2" tal como se utiliza en el presente documento se utiliza con el mismo significado que proteína HER2.
- Ejemplos del anticuerpo anti-HER2 como se utiliza en el presente documento pueden incluir, pero sin limitación particular, pertuzumab (Publicación de Patente Internacional No. WO 01/00245) y trastuzumab (Patente de EE. UU. No. 5821337). Se prefiere el trastuzumab. Sin embargo, el anticuerpo anti-HER2 de la presente invención no está limitado a ello siempre que sea un anticuerpo anti-HER2 que se une específicamente a HER2, y más preferentemente que tenga una actividad de internalización en células que expresan HER2 uniéndose a HER2.
- 40 El término "trastuzumab" tal como se utiliza en el presente documento también se denomina HERCEPTIN(R), huMAb4D5-8, o rhuMAb4D5-8 y es un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 (Figura 1) y una cadena ligera consistente en una secuencia de aminoácidos formada por los residuos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2 (Figura 2).
- 45 El término "unión específica", tal como se utiliza en el presente documento, significa unión que no es adsorción inespecífica. Entre los ejemplos del criterio para determinar si la unión es específica o no se puede incluir la constante de disociación (en lo sucesivo, "KD"). El valor KD del anticuerpo para la proteína HER2 es preferentemente 1×10^{-5} M o menor, 5×10^{-6} M o menor, 2×10^{-6} M o menor, o 1×10^{-6} M o menor, más preferentemente 5×10^{-7} M o menor, 2×10^{-7} M o menor, o 1×10^{-7} M o menor, más preferentemente 5×10^{-8} M o

menor, 2×10^{-8} M o menor, o 1×10^{-8} M o menor, y más preferentemente 5×10^{-9} M o menor, 2×10^{-9} M o menor, o 1×10^{-9} M o menor. La unión entre la proteína HER2 y el anticuerpo puede medirse mediante un método conocido en la técnica, como la resonancia de plasmón superficial, ELISA o RIA.

- 5 El término "CDR" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una región determinante de la complementariedad (CDR). Se sabe que cada cadena pesada y ligera de una molécula de anticuerpo tiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La CDR también se denomina dominio hipervariable, y está presente en una región variable de cada cadena pesada y ligera de un anticuerpo. Es un sitio que presenta una variabilidad inusualmente alta en su estructura primaria, y hay tres CDR separadas en la estructura primaria de cada cadena polipeptídica pesada y ligera. En esta especificación, en cuanto a las CDR de un anticuerpo, las CDR de la cadena pesada están representadas por CDRH1, CDRH2 y CDRH3 del lado aminoterminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, y las CDR de la cadena ligera están representadas por CDRL1, CDRL2 y CDRL3 del lado aminoterminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera. Estos sitios están próximos entre sí en la estructura terciaria y determinan la especificidad para un antígeno al que se une el anticuerpo.
- 10 15 La frase "la hibridación se realiza en condiciones estrictas", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un proceso en el que la hibridación se realiza en condiciones en las que puede lograrse la identificación realizando la hibridación a 68°C en una solución de hibridación disponible comercialmente ExpressHyb Hybridization Solution (fabricada por Clontech, Inc.) o realizando la hibridación a 68°C en presencia de NaCl 0,7 a 1,0 M utilizando un filtro con ADN inmovilizado en el mismo, seguido de un lavado a 68°C utilizando una solución de 0,1 a $2 \times$ SSC (la solución $1 \times$ SSC se compone de NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM) o en condiciones equivalentes.
- 20 25 30 35 40 45 50 55

1. HER2

HER2 es uno de los productos oncogénicos de un oncogén receptor del factor de crecimiento típico identificado como oncogén relacionado con el receptor 2 del factor de crecimiento celular epidérmico humano, y es una proteína receptora transmembrana que tiene un peso molecular de 185 kDa y que tiene un dominio tirosina quinasa. HER2 es un miembro de la familia EGFR que consiste en HER1 (EGFR, ErbB-1), HER2 (neu, ErbB-2), HER3 (ErbB-3) y HER4 (ErbB-4) y se sabe que se autofosforila en residuos de tirosina intracelulares mediante su formación de homodímero o heterodímero con otro receptor EGFR HER1, HER3 o HER4 y se activa a sí mismo de esa manera, desempeñando así un papel importante en el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia en células normales y tumorales.

En cuanto a la proteína HER2 a utilizar en la presente invención, la proteína HER2 puede purificarse directamente a partir de células que expresan HER2 de un mamífero humano o no humano (tal como una rata o un ratón) y utilizarse, o puede prepararse y utilizarse una fracción de membrana celular de las células anteriormente descritas. Además, el HER2 puede obtenerse mediante su síntesis *in vitro* o su producción en una célula huésped mediante ingeniería genética. En la ingeniería genética, concretamente, después de integrar el ADNc HER2 en un vector capaz de expresar el ADNc HER2, la proteína HER2 puede obtenerse sintetizándola en una solución que contenga una enzima, un sustrato y una sustancia energética necesaria para la transcripción y la traducción, o expresando HER2 en otra célula huésped procariota o eucariota transformada. Como alternativa, se pueden utilizar las células que expresan HER2 mediante ingeniería genética descritas anteriormente, o una línea celular que exprese HER2 como proteína HER2.

La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de HER2 se divultan en una base de datos pública, y se puede hacer referencia a ellas, por ejemplo, bajo el número de acceso M11730 (GenBank), NP_004439.2 (NCBI), o similares.

Además, una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos se sustituyen, suprimen y/o añaden en cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente de HER2 y también tiene una actividad biológica equivalente a la de la proteína también se incluye en HER2.

La proteína HER2 humana se compone de una secuencia señal que consiste en 22 residuos de aminoácidos N-terminales, un dominio extracelular que consiste en 630 residuos de aminoácidos, un dominio transmembrana que consiste en 23 residuos de aminoácidos y un dominio intracelular que consiste en 580 residuos de aminoácidos.

2. Producción del anticuerpo anti-HER2

El anticuerpo contra HER2 de la presente invención puede obtenerse de acuerdo con, por ejemplo, un método llevado a cabo habitualmente en la técnica, que comprende inmunizar animales con HER2 o un polipéptido arbitrario seleccionado a partir de la secuencia de aminoácidos de HER2 y recoger y purificar anticuerpos producidos *in vivo*. La especie biológica de HER2 que se utilizará como antígeno no se limita a ser humana, y un animal puede inmunizarse con HER2 derivado de un animal que no sea humano, como un ratón o una rata, o con p185neu de rata. En este caso, examinando la reactividad cruzada entre un anticuerpo que se une al HER2 heterólogo obtenido y al HER2 humano, se puede seleccionar un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

Además, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal a partir de un hibridoma establecido fusionando células productoras de anticuerpos que producen un anticuerpo contra HER2 con células de mieloma de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y.. (1980)).

5 El HER2 a utilizar como antígeno puede obtenerse expresando el gen HER2 en una célula huésped mediante ingeniería genética.

Específicamente, se produce un vector capaz de expresar el gen HER2, y el vector resultante se transfecta en una célula huésped para expresar el gen, y después, se purifica el HER2 expresado.

10 Alternativamente, las células que expresan HER2 genéticamente descritas anteriormente, o una línea celular que expresa HER2 puede usarse como la proteína HER2. El anticuerpo anti-HER2 puede obtenerse por un procedimiento conocido en la técnica. A continuación, se describe específicamente un método de obtención de un anticuerpo contra HER2.

(1) Preparación del antígeno

15 Ejemplos del antígeno que se utilizará para producir el anticuerpo anti-HER2 incluyen HER2, o un polipéptido que consiste en una secuencia parcial de aminoácidos que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de HER2, o un derivado obtenido mediante la adición de una secuencia de aminoácidos dada o portador a la misma.

HER2 puede purificarse directamente a partir de tejidos tumorales humanos o células tumorales y utilizarse. Además, HER2 puede obtenerse sintetizándose *in vitro* o produciéndose en una célula huésped mediante modificación genética.

20 Con respecto a la ingeniería genética, específicamente, después de que el ADNc HER2 se integre en un vector capaz de expresar ADNc HER2, HER2 puede obtenerse sintetizándolo en una solución que contenga una enzima, un sustrato y una sustancia energética necesaria para la transcripción y traducción, o expresando HER2 en otra célula huésped procariota o eucariota transformada.

25 Además, el antígeno también puede obtenerse como una proteína secretora expresando una proteína de fusión obtenida ligando el dominio extracelular de HER2, que es una proteína de membrana, a la región constante de un anticuerpo en un sistema huésped-vector apropiado.

30 El ADNc HER2 puede obtenerse mediante, por ejemplo, un método denominado PCR en el que se realiza una reacción en cadena de la polimerasa utilizando una biblioteca de ADNc que expresa ADNc HER2 como molde y cebadores que amplifican específicamente el ADNc HER2 (PCR; Saiki, R. K., et al., *Science*, (1988) 239, pp. 487-489).

Como síntesis *in vitro* del polipéptido, por ejemplo, puede ejemplificarse Rapid Translation System (RTS) fabricado por Roche Diagnostics, Inc. pero no se limita a ello.

35 Ejemplos de las células huésped procariotas incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Para transformar las células huésped con un gen objetivo, las células huésped se transforman mediante un vector plasmídico que comprende un replicón, es decir, un origen de replicación derivado de una especie compatible con el huésped, y una secuencia reguladora. Además, el vector tiene preferentemente una secuencia capaz de imponer selectividad fenotípica en la célula transformada.

40 Ejemplos de las células huésped eucariotas incluyen células de vertebrados, células de insectos y células de levadura. Como las células de vertebrados, por ejemplo, las células COS de simio (Gluzman, Y., *Cell*, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650; ATCC: American Type Culture Collection), fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC n.º CRL-1658) y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., *Proc.. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77, pp. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61); y similares; sin embargo, las células no se limitan a ellas.

45 El transformante así obtenido puede cultivarse de acuerdo con un método habitualmente llevado a cabo en la técnica, y mediante el cultivo del transformante se produce intracelular o extracelularmente un polipéptido objetivo.

Un medio adecuado a utilizar para el cultivo puede seleccionarse de entre varios medios de cultivo comúnmente utilizados dependiendo de las células huésped empleadas. Si se emplea *Escherichia coli*, por ejemplo, puede utilizarse un medio LB suplementado con un antibiótico como ampicilina o IPMG según sea necesario.

50 Una proteína recombinante producida intracelularmente o extracelularmente por el transformante mediante dicho cultivo puede separarse y purificarse mediante cualquiera de los diversos métodos de separación conocidos que utilizan la propiedad física o química de la proteína.

Ejemplos específicos de los métodos incluyen tratamiento con un precipitante proteico común, ultrafiltración, diversos tipos de cromatografía líquida tales como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel),

cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de afinidad, diálisis, y una combinación de los mismos.

5 Además, uniendo una etiqueta de seis residuos de histidina a una proteína recombinante que se va a expresar, la proteína se puede purificar eficientemente con una columna de afinidad de níquel. Alternativamente, uniendo la región Fc de la IgG a una proteína recombinante a expresar, la proteína puede purificarse eficazmente con una columna de proteína A.

Mediante la combinación de los métodos descritos anteriormente, se puede producir fácilmente una gran cantidad de un polipéptido objetivo en alto rendimiento y alta pureza.

10 El propio transformante descrito anteriormente puede usarse como antígeno. También puede utilizarse como antígeno una línea celular que exprese HER2. Ejemplos de dicha línea celular pueden ser las líneas de cáncer de mama humano SK-BR-3, BT-474, KPL-4 y JIMT-1, una línea de cáncer gástrico humano NCI-N87 y una línea de cáncer de ovario humano SK-OV-3. La línea celular de la presente invención no se limita a estas líneas celulares siempre que exprese HER2.

(2) Producción de anticuerpo monoclonal anti-HER2

15 Ejemplos del anticuerpo que se une específicamente a HER2 incluyen un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a HER2, y un método de obtención de dicho anticuerpo es como se describe a continuación.

La producción de un anticuerpo monoclonal generalmente requiere los siguientes pasos operativos de:

- (a) purificar un biopolímero para utilizarlo como antígeno, o preparar células que expresen antígeno;
- 20 (b) preparar células productoras de anticuerpos inmunizando a un animal mediante la inyección del antígeno, recogiendo la sangre, analizando su título de anticuerpos para determinar cuándo se extirpa el bazo;
- (c) preparar células de mieloma (en lo sucesivo, "mieloma");
- (d) fusionar las células productoras de anticuerpos con el mieloma;
- (e) cribado de un grupo de hibridomas que produzcan un anticuerpo deseado;
- (f) dividir los hibridomas en clones unicelulares (clonación);
- 25 (g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar un animal implantado con el hibridoma para producir una gran cantidad de anticuerpo monoclonal;
- (h) examinar el anticuerpo monoclonal así producido para determinar su actividad biológica y especificidad de unión, o ensayar el mismo para determinar sus propiedades como reactivo marcado; y similares.

30 En lo sucesivo, el método de producción de un anticuerpo monoclonal se describirá en detalle siguiendo los pasos anteriores, sin embargo, el método no está limitado al mismo y, por ejemplo, pueden usarse células productoras de anticuerpos distintas de células de bazo y mieloma.

(a) Purificación del antígeno

Como antígeno, puede usarse HER2 preparado por el método descrito anteriormente o un péptido parcial del mismo.

35 Además, también puede usarse como antígeno una fracción de membrana preparada a partir de células recombinantes que expresan HER2 o las propias células recombinantes que expresan HER2, y también un péptido parcial de la proteína de la invención sintetizado químicamente mediante un método conocido por los expertos en la técnica.

Además, también puede usarse como antígeno una línea celular que exprese HER2.

40 (b) Preparación de células productoras de anticuerpos

El antígeno obtenido en el paso (a) se mezcla con un adyuvante tal como adyuvante completo o incompleto de Freund o agente auxiliar tal como sulfato de aluminio y potasio y la mezcla resultante se usa como inmunógeno para inmunizar un animal de experimentación. Otro método consiste en inmunizar a un animal de experimentación con células que expresan el antígeno como inmunógeno. Como animal de experimentación, puede utilizarse sin impedimentos cualquier animal empleado en un método conocido de producción de hibridomas. Específicamente, por ejemplo, se puede utilizar un ratón, una rata, una cabra, ovejas, ganado vacuno, un caballo, o similares. Sin embargo, desde el punto de vista de la facilidad de disponibilidad de las células de mieloma que se van a fusionar con las células productoras de anticuerpos extraídas, se utiliza preferentemente un ratón o una rata como animal a inmunizar.

Además, la cepa de un ratón o una rata a utilizar no está particularmente limitada, y en el caso de un ratón, por ejemplo, pueden utilizarse diversas cepas tales como A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, y 129 y similares, y en el caso de una rata, por ejemplo, pueden utilizarse Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer y similares.

5 Estos ratones y ratas están disponibles comercialmente de criadores/distribuidores de animales de experimentación, por ejemplo, CLEA Japan, Inc. y Charles River Laboratories Japan, Inc.

Como animal a inmunizar, en consideración de la compatibilidad de fusión con células de mieloma descrita a continuación, en el caso de un ratón, se prefieren particularmente las cepas BALB/c, y en el caso de una rata, las cepas Wistar y Low.

10 Además, en consideración de la homología antigenética entre humanos y ratones, también se prefiere usar un ratón que tenga una función biológica disminuida para eliminar autoanticuerpos, es decir, un ratón con una enfermedad autoinmune.

La edad de dicho ratón o rata en el momento de la inmunización es preferentemente de 5 a 12 semanas de edad, más preferentemente de 6 a 8 semanas de edad.

15 Para inmunizar a un animal con HER2 o un recombinante del mismo, por ejemplo, un método conocido descrito en detalle en, por ejemplo, Weir, D. M., *Handbook of Experimental Immunology* Vol. I. II.. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. y Mayer, M. M., *Experimental Immunochemistry*, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) o similares.

20 Entre estos métodos de inmunización, un método específico preferido en la presente invención es, por ejemplo, el siguiente.

Es decir, en primer lugar, una fracción de proteína de membrana que sirve como el antígeno o células causadas para expresar el antígeno es/son administradas intradérmica o intraperitonealmente a un animal. Sin embargo, se prefiere la combinación de ambas vías de administración para aumentar la eficacia de la inmunización, y cuando la administración intradérmica se realiza en la primera mitad y la intraperitoneal en la última mitad o sólo en la última dosis, la eficacia de la inmunización puede aumentar especialmente.

25 El esquema de administración del antígeno varía dependiendo del tipo de animal a inmunizar, diferencia individual o similar. Sin embargo, en general, se prefiere un esquema de administración en el que la frecuencia de administración del antígeno es de 3 a 6 veces y el intervalo de dosificación es de 2 a 6 semanas, y se prefiere más un esquema de administración en el que la frecuencia de administración del antígeno es de 3 a 4 veces y el intervalo de dosificación es de 2 a 4 semanas.

30 Además, la dosis del antígeno varía dependiendo del tipo de animal, diferencias individuales o similares, sin embargo, la dosis se establece generalmente de 0,05 a 5 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a 0,5 mg.

35 Se realiza una inmunización de refuerzo de 1 a 6 semanas, preferentemente de 1 a 4 semanas, más preferentemente de 1 a 3 semanas después de la administración del antígeno como se ha descrito anteriormente. Cuando el inmunógeno son células, se utilizan de 1×10^6 a 1×10^7 células.

40 La dosis del antígeno en el momento de realizar la inmunización de refuerzo varía dependiendo del tipo o tamaño del animal o similar, sin embargo, en el caso de, por ejemplo, un ratón, la dosis se establece generalmente de 0,05 a 5 mg, preferentemente de 0,1 a 0,5 mg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg. Cuando el inmunógeno son células, se utilizan de 1×10^6 a 1×10^7 células.

45 Las células del bazo o los linfocitos que incluyen células productoras de anticuerpos se extraen asépticamente del animal inmunizado después de 1 a 10 días, preferentemente de 2 a 5 días, más preferentemente de 2 a 3 días desde la inmunización de refuerzo. En este momento, se mide el título de anticuerpos, y si se utiliza un animal que tenga un título de anticuerpos suficientemente elevado como fuente de suministro de las células productoras de anticuerpos, el procedimiento posterior puede llevarse a cabo con mayor eficacia.

50 Ejemplos del método de medición del título de anticuerpos a utilizar aquí incluyen un método RIA y un método ELISA, pero el método no se limita a los mismos. Por ejemplo, si se emplea un método ELISA, la medición del título de anticuerpos en la invención puede llevarse a cabo de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación.

55 En primer lugar, un antígeno purificado o parcialmente purificado se adsorbe a la superficie de una fase sólida tal como una placa de 96 pocillos para ELISA, y la superficie de la fase sólida que no tiene antígeno adsorbido a la misma se cubre con una proteína no relacionada con el antígeno tal como albúmina de suero bovino (BSA). Tras lavar la superficie, ésta se pone en contacto con una muestra diluida en serie (por ejemplo, suero de ratón) como anticuerpo primario para permitir que el anticuerpo de la muestra se una al antígeno.

Además, como anticuerpo secundario, se añade un anticuerpo marcado con una enzima contra un anticuerpo de ratón y se deja que se una al anticuerpo de ratón. Tras el lavado, se añade un sustrato para la enzima y se mide el cambio de absorbancia que se produce debido al desarrollo del color inducido por la degradación del sustrato o similar, y se calcula el título del anticuerpo basándose en la medición.

- 5 La separación de las células productoras de anticuerpos de las células del bazo o de los linfocitos del animal inmunizado puede llevarse a cabo de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, Kohler et al., *Nature* (1975), 256, p. 495; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* (1977), 6, p. 511; Milstein et al., *Nature* (1977), 266, p. 550; Walsh, *Nature* (1977), 266, p. 495). Por ejemplo, en el caso de las células del bazo, puede emplearse un método general en el que las células productoras de anticuerpos se separan homogeneizando el bazo para obtener las células mediante filtración con una malla de acero inoxidable y suspendiendo las células en medio esencial mínimo de Eagle (MEM).

(c) Preparación de células de mieloma (en lo sucesivo, "mieloma")

- 15 Las células de mieloma a utilizar para la fusión celular no están particularmente limitadas y las células adecuadas pueden seleccionarse de líneas celulares conocidas. Sin embargo, en consideración a la conveniencia cuando se selecciona un hibridoma a partir de células fusionadas, se prefiere utilizar una cepa deficiente en HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa) cuyo procedimiento de selección se haya establecido.

- 20 Más específicamente, ejemplos de la cepa deficiente en HGPRT incluyen X63-Ag8(X63), NS1-ANS11(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO, y BU.1 derivadas de ratones; 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) derivadas de ratas; y U266AR(SKO-007), GM1500-GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) y 8226AR/NIP4-1(NP41) derivadas de humanos. Estas cepas deficientes en HGPRT están disponibles, por ejemplo, en ATCC o similares.

- 25 Estas cepas celulares se subcultan en un medio apropiado tal como un medio de 8-azaguanina [un medio obtenido añadiendo 8-azaguanina a un medio RPMI 1640 suplementado con glutamina, 2-mercaptopropionato, gentamicina y suero fetal de ternera (en lo sucesivo, "FCS")], medio de Dulbecco modificado por Iscove (en lo sucesivo, "IMDM") o medio de Eagle modificado por Dulbecco (en lo sucesivo, "DMEM"). En este caso, de 3 a 4 días antes de realizar la fusión celular, las células se subcultan en un medio normal (por ejemplo, un medio ASF104 (fabricado por Ajinomoto Co., Ltd.) que contenga un 10% de FCS) para garantizar no menos de 2×10^7 células el día de la fusión celular.

(d) Fusión celular

- 30 La fusión entre las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma puede realizarse adecuadamente de acuerdo con un método conocido (Weir, D. M. *Handbook of Experimental Immunology* Vol. I. II., III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. y Mayer, M. M., *Experimental Immunochemistry*, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), etc.), en condiciones tales que la tasa de supervivencia de las células no se reduzca excesivamente.

- 35 Como tal método, por ejemplo, puede utilizarse un método químico en el que las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se mezclan en una solución que contiene un polímero tal como polietilenglicol a una concentración elevada, un método físico que utiliza estimulación eléctrica, o similares. Entre estos métodos, un ejemplo específico del método químico es el que se describe a continuación.

- 40 Es decir, en el caso en el que se utiliza polietilenglicol en la solución que contiene un polímero a una concentración elevada, las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se mezclan en una solución de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 1500 a 6000, más preferentemente de 2000 a 4000 a una temperatura de 30 a 40°C, preferentemente de 35 a 38°C durante 1 a 10 minutos, preferentemente de 5 a 8 minutos.

(e) Selección de un grupo de hibridomas

- 45 El método de selección de hibridomas obtenidos por la fusión celular descrita anteriormente no está particularmente limitado. Normalmente, se utiliza un método de selección HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) (Kohler et al., *Nature* (1975), 256, p. 495; Milstein et al., *Nature* (1977), 266, p. 550).

- 50 Este método es eficaz cuando los hibridomas se obtienen usando las células de mieloma de una cepa deficiente en HGPRT que no puede sobrevivir en presencia de aminopterina. Es decir, al cultivar células no fusionadas e hibridomas en un medio HAT, sólo se permite selectivamente que sobrevivan y proliferen los hibridomas resistentes a la aminopterina.

(f) División en clon unicelular (clonación)

Como método de clonación para hibridomas, puede utilizarse un método conocido como el método de metilcelulosa, el método de agarosa blanda o el método de dilución limitante (véase, por ejemplo, Barbara, B. M. y Stanley, M. S.: *Selected Methods in Cellular Immunology*, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Entre estos

métodos, en particular, se prefiere un método de cultivo tridimensional como el método de metilcelulosa. Por ejemplo, el grupo de hibridomas producidos por fusión celular se suspende en un medio metilcelulósico como ClonaCell-HY Selection Medium D (fabricado por StemCell Technologies, Inc., #03804) y se cultiva. A continuación, se recogen las colonias de hibridoma formadas, con lo que pueden obtenerse hibridomas monoclonales. Se cultivan las respectivas colonias de hibridoma recogidas, y se selecciona como cepa de hibridoma productora de anticuerpos monoclonales HER2 un hibridoma que se haya confirmado que tiene un título estable de anticuerpos en un sobrenadante de cultivo de hibridoma obtenido.

(g) Preparación de anticuerpo monoclonal mediante cultivo de hibridoma

Cultivando el hibridoma así seleccionado, puede obtenerse eficientemente un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, antes del cultivo, es preferible realizar el cribado de un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal objetivo.

En dicho cribado, puede emplearse un método conocido.

La medición del título de anticuerpos en la invención puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, un método ELISA explicado en el punto (b) descrito anteriormente.

El hibridoma obtenido por el método descrito anteriormente puede almacenarse en estado congelado en nitrógeno líquido o en un congelador a -80°C o menos.

Después de completar la clonación, se cambia el medio de un medio HT a un medio normal, y se cultiva el hibridoma.

El cultivo a gran escala se realiza mediante cultivo por rotación utilizando una botella de cultivo grande o mediante cultivo por centrifugación. A partir del sobrenadante obtenido por el cultivo a gran escala, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína de la invención mediante purificación utilizando un método conocido por los expertos en la materia, como la filtración en gel.

Además, el hibridoma se inyecta en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que el hibridoma (por ejemplo, el BALB/c descrito anteriormente) o un ratón Nu/Nu para proliferar el hibridoma, por lo que puede obtenerse la ascitis que contiene una gran cantidad del anticuerpo monoclonal de la invención.

En el caso en el que el hibridoma se administra en la cavidad abdominal, si se administra un aceite mineral tal como 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (pristano) de 3 a 7 días antes del mismo, se puede obtener una mayor cantidad de ascitis.

Por ejemplo, se inyecta previamente un inmunosupresor en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que el hibridoma para inactivar las células T. 20 días después, se suspenden de 10^6 a 10^7 células clonales de hibridoma en un medio libre de suero (0,5 ml), y se administra la suspensión en la cavidad abdominal del ratón. En general, cuando el abdomen se expande y se llena de ascitis, ésta se recoge del ratón. Mediante este método, el anticuerpo monoclonal puede obtenerse a una concentración que es unas 100 veces o mucho mayor que la de la solución de cultivo.

El anticuerpo monoclonal obtenido por el método anteriormente descrito puede purificarse por un método descrito en, por ejemplo, Weir, D. M.: *Handbook of Experimental Immunology* Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

El anticuerpo monoclonal así obtenido tiene alta especificidad de antígeno para HER2. Ejemplos del anticuerpo monoclonal de la presente invención pueden incluir, pero no están particularmente limitados a, un anticuerpo monoclonal de ratón 4D5 (ATCC CRL 10463).

(h) Ensayo del anticuerpo monoclonal

El isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal así obtenido pueden determinarse como sigue.

En primer lugar, los ejemplos del método de identificación incluyen un método Ouchterlony, un método ELISA y un método RIA.

Un método de Ouchterlony es sencillo, pero cuando la concentración del anticuerpo monoclonal es baja, se requiere una operación de condensación.

Por otro lado, cuando se utiliza un método ELISA o un método RIA, haciendo reaccionar directamente el sobrenadante de cultivo con una fase sólida adsorbida con antígeno y utilizando anticuerpos correspondientes a diversos tipos de isotipos y subclases de inmunoglobulina como anticuerpos secundarios, se puede identificar el isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal.

Además, como método más sencillo, también puede usarse un kit de identificación disponible comercialmente (por ejemplo, Mouse Typer Kit fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) o similar.

Además, la determinación cuantitativa de una proteína puede realizarse por el método de Folin Lowry y un método de cálculo basado en la absorbancia a 280 nm (1,4 (OD 280) = Inmunoglobulina 1 mg/ml).

Además, incluso cuando el anticuerpo monoclonal se obtiene separada e independientemente realizando de nuevo los pasos de (a) a (h) en (2), es posible obtener un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo HER2 obtenido en el paso de (g). Como un ejemplo de tal anticuerpo, se puede exemplificar un anticuerpo que se une al mismo epítopo que el anticuerpo HER2 obtenido en el paso de (g).

Si un anticuerpo monoclonal recién producido se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la que se une el anticuerpo anti-HER2, puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítopo que el anticuerpo anti-HER2. Además, al confirmar que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo anti-HER2 por la unión a HER2 (es decir, el anticuerpo monoclonal inhibe la unión entre el anticuerpo anti-HER2 y HER2), se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítopo que el anticuerpo anti-HER2 aunque no se haya determinado la secuencia o estructura específica del epítopo. Cuando se confirma que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítopo que el anticuerpo anti-HER2, se espera que el anticuerpo monoclonal tenga una afinidad de unión al antígeno o una actividad biológica equivalente a la del anticuerpo anti-HER2.

15 (3) Otros anticuerpos

El anticuerpo de la invención incluye no sólo el anticuerpo monoclonal contra HER2 descrito anteriormente sino también un anticuerpo recombinante obtenido por modificación artificial con el fin de disminuir la antigenicidad heteróloga para humanos tal como un anticuerpo químérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos pueden producirse mediante un método conocido.

20 Como anticuerpo químérico, puede exemplificarse un anticuerpo en el que las regiones variable y constante del anticuerpo derivan de especies diferentes, por ejemplo, un anticuerpo químérico en el que una región variable de anticuerpo derivada de ratón o rata está conectada a una región constante de anticuerpo derivada de ser humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 81, 6851-6855, (1984)). Ejemplos del anticuerpo químérico de la presente invención pueden incluir, pero no se limitan particularmente a, un anticuerpo químérico 4D5 que comprende una 25 región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG2 humana.

Como anticuerpo humanizado, un anticuerpo obtenido integrando solamente una región determinante de la complementariedad (CDR) en un anticuerpo derivado humano (véase Nature (1986) 321, pp. 522-525), y un anticuerpo obtenido injertando una parte de los residuos de aminoácidos de la estructura así como la secuencia CDR a un anticuerpo humano mediante un método de injerto CDR (WO 90/07861), y un anticuerpo humanizado usando estrategia de mutagénesis de conversión génica (Patente de EE.UU. No. 5821337) pueden exemplificarse.

30 El término "varios" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, o 1 o 2.

Como sustitución de aminoácidos en esta memoria descriptiva, se prefiere una sustitución de aminoácidos conservadora. La sustitución conservadora de aminoácidos se refiere a una sustitución que se produce dentro de 35 un grupo de aminoácidos relacionados con las cadenas laterales de aminoácidos. Los grupos de aminoácidos preferidos son los siguientes: un grupo ácido (ácido aspártico y ácido glutámico); un grupo básico (lisina, arginina e histidina); un grupo no polar (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano); y una familia polar no cargada (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina). Los grupos de aminoácidos más preferidos son los siguientes: un grupo hidroxi alifático (serina y treonina); un grupo que contiene 40 amida (asparagina y glutamina); un grupo alifático (alanina, valina, leucina e isoleucina); y un grupo aromático (fenilalanina, triptófano y tirosina). Dicha sustitución de aminoácidos se realiza preferentemente dentro de un rango que no perjudique las propiedades de una sustancia que tenga la secuencia original de aminoácidos.

45 Combinando una secuencia que tiene una alta homología con la secuencia de aminoácidos de cadena pesada descrita anteriormente con una secuencia que tiene una alta homología con la secuencia de aminoácidos de cadena ligera descrita anteriormente, es posible seleccionar un anticuerpo que tiene una actividad biológica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. Dicha homología es generalmente una homología del 80% o más, preferentemente una homología del 90% o más, más preferentemente una homología del 95% o más, más preferentemente una homología del 99% o más. Además, combinando una secuencia de aminoácidos en la que se sustituyen, suprimen o añaden de uno a varios residuos de aminoácidos en la secuencia 50 de aminoácidos de la cadena pesada o de la cadena ligera, también es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad biológica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. El término "homología" utilizado en el presente documento tiene el mismo significado que "identidad".

55 La homología entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando los parámetros por defecto del algoritmo Blast versión 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res.. 25: 3389-3402). El algoritmo Blast puede utilizarse también a través de Internet accediendo al sitio www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.

- Además, el anticuerpo de la invención incluye un anticuerpo humano que se une a HER2. Un anticuerpo humano anti-HER2 se refiere a un anticuerpo humano que sólo tiene una secuencia de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano. El anticuerpo humano anti-HER2 puede obtenerse por un método que utiliza un ratón productor de anticuerpos humanos que tiene un fragmento de cromosoma humano que comprende genes de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano (véase Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics* (1997) 16, pp. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, pp. 3447-3448; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. y Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, pp. 722-727, etc.).
- 5 Tal ratón productor de anticuerpos humanos puede crearse específicamente como sigue. Se crea un animal modificado genéticamente en el que se han interrumpido los loci génicos de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina endógenas y, en su lugar, se han introducido los loci génicos de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina humanas mediante un vector de cromosoma artificial de levadura (YAC) o similar, produciendo un animal desactivado y un animal transgénico y apareándolos.
- 10 Además, de acuerdo con una técnica de ADN recombinante, utilizando ADNc que codifica cada una de dicha cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo humano, y preferentemente un vector que comprende dichos ADNc, se transforman células eucariotas, y se cultiva una célula transformante que produce un anticuerpo monoclonal humano recombinante, por lo que el anticuerpo también puede obtenerse a partir del sobrenadante del cultivo.
- 15 Aquí, como huésped, por ejemplo, pueden usarse células eucariotas, preferentemente células de mamífero tales como células CHO, linfocitos o células de mieloma.
- 20 Además, un método de obtención de un anticuerpo humano derivado de visualización de fagos seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos (véase Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*.. (2002) 43 (7), pp. 2301-2308; Carmen, S. et al., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), pp. 189-203; Siriwardena, D. et al., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), pp. 427-431, etc.).
- 25 Por ejemplo, puede usarse un método de visualización de fagos en el que una región variable de un anticuerpo humano se expresa en la superficie de un fago como un anticuerpo de cadena única (scFv), y se selecciona un fago que se une a un antígeno (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), pp. 1105-1116).
- Analizando el gen del fago seleccionado basándose en la unión a un antígeno, puede determinarse una secuencia de ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humano que se une a un antígeno.
- 30 Si se determina la secuencia de ADN de scFv que se une a un antígeno, puede obtenerse un anticuerpo humano preparando un vector de expresión que comprenda la secuencia e introduciendo el vector en un hospedador apropiado para expresarlo (WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388; Annu. Rev. Immunol. (1994) 12, pp. 433-455, *Nature Biotechnology* (2005) 23 (9), pp. 1105-1116).
- 35 Como ejemplo de otro índice para uso en la comparación de las propiedades de anticuerpos, puede ejemplificarse la estabilidad de anticuerpos. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es un dispositivo capaz de medir con rapidez y precisión una temperatura media de desnaturización térmica (Tm) para utilizarla como índice favorable de la estabilidad conformacional relativa de las proteínas. Midiendo los valores de Tm mediante DSC y comparando los valores, se puede comparar una diferencia en la estabilidad térmica. Se sabe que la estabilidad de 40 almacenamiento de los anticuerpos muestra cierta correlación con la estabilidad térmica de los anticuerpos (Lori Burton, et. al., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, pp. 265-273), y puede seleccionarse un anticuerpo preferido utilizando la estabilidad térmica como índice. Ejemplos de otros índices para seleccionar anticuerpos incluyen las siguientes características: el rendimiento en una célula huésped apropiada es alto; y la agregabilidad en una solución acuosa es baja. Por ejemplo, un anticuerpo que muestra el mayor rendimiento no 45 siempre muestra la mayor estabilidad térmica, y por lo tanto, es necesario seleccionar un anticuerpo más adecuado para la administración a humanos haciendo una evaluación exhaustiva basada en los índices descritos anteriormente.
- En la presente invención, también se incluye una variante modificada del anticuerpo. La variante modificada se 50 refiere a una variante obtenida sometiendo el anticuerpo de la presente invención a una modificación química o biológica. Los ejemplos de variante modificada químicamente incluyen variantes modificadas químicamente mediante la unión de una fracción química a un esqueleto de aminoácido, variantes modificadas químicamente con una cadena de carbohidratos ligada a N u O, etc. Los ejemplos de variante biológicamente modificada incluyen variantes obtenidas por modificación postraduccional (tal como glucosilación ligada a N u O, procesamiento N- o C-terminal, desamidación, isomerización del ácido aspártico u oxidación de la metionina) y variantes en las que se 55 ha añadido un residuo de metionina al extremo N al expresarse en una célula huésped procariota. Además, un anticuerpo marcado para permitir la detección o el aislamiento del anticuerpo o de un antígeno de la invención, por ejemplo, un anticuerpo marcado con enzimas, un anticuerpo marcado con fluorescencia y un anticuerpo marcado con afinidad también se incluyen en el significado de la variante modificada. Dicha variante modificada del

anticuerpo de la invención es útil para mejorar la estabilidad y la retención en sangre del anticuerpo, reducir la antigenicidad del mismo, detectar o aislar un anticuerpo o un antígeno, etc.

Además, regulando la modificación de un glicano que está unido al anticuerpo de la invención (glicosilación, defucosilación, etc.), es posible potenciar una actividad citotóxica celular dependiente del anticuerpo. Como técnica para regular la modificación de un glicano de anticuerpos, se conocen los documentos WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, etc. Sin embargo, la técnica no se limita a ello. En el anticuerpo de la presente invención, también se incluye un anticuerpo en el que se regula la modificación de un glicano.

En el caso en el que un anticuerpo se produce aislando primero un gen de anticuerpo y luego introduciendo el gen en un huésped apropiado, puede usarse una combinación de un huésped apropiado y un vector de expresión apropiado. Ejemplos específicos del gen del anticuerpo incluyen una combinación de un gen que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo descrito en esta memoria descriptiva y un gen que codifica una secuencia de cadena ligera del mismo. Cuando se transforma una célula huésped, es posible insertar el gen de la secuencia de cadena pesada y el gen de la secuencia de cadena ligera en el mismo vector de expresión, y también

en diferentes vectores de expresión por separado.

En el caso en el que se utilizan células eucariotas como huésped, pueden utilizarse células animales, células vegetales y microorganismos eucariotas. Como células animales, células de mamíferos, por ejemplo, células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC n.º CRL-1658) y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61).

En el caso en el que se utilizan células procariotas, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* pueden ejemplificarse.

Introduciendo un gen de anticuerpo deseado en estas células mediante transformación, y cultivando las células así transformadas *in vitro*, puede obtenerse el anticuerpo. En el método de cultivo descrito anteriormente, el rendimiento puede variar a veces basándose en la secuencia del anticuerpo y, por lo tanto, es posible seleccionar un anticuerpo que se produzca fácilmente como producto farmacéutico utilizando el rendimiento como índice entre los anticuerpos que tienen una actividad de unión equivalente. Por lo tanto, en el anticuerpo de la presente invención, también se incluye un anticuerpo obtenido por un método de producción de un anticuerpo, caracterizado por incluir un paso de cultivo de la célula huésped transformada y un paso de recogida de un anticuerpo deseado a partir de un producto cultivado obtenido en el paso de cultivo.

Se sabe que se elimina un residuo de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), y también se sabe que se suprime dos residuos de aminoácidos (glicina y lisina) en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada y se amida un residuo de prolina recién situado en el extremo carboxilo (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, dicha supresión y modificación de la secuencia de la cadena pesada no afectan a la afinidad de unión al antígeno ni a la función efectora (la activación de un complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, etc.) del anticuerpo. Por lo tanto, en el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, también se incluye un anticuerpo sometido a dicha modificación y un fragmento funcional del anticuerpo, y también se incluye una variante de delección en la que se han suprimido uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada, una variante obtenida por amidación de la variante de delección (por ejemplo, una cadena pesada en la que se ha amido el residuo carboxilo terminal de prolina), y similares. El tipo de variante de delección que tiene una delección en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la invención no se limita a las variantes anteriores siempre que se conserven la afinidad de unión al antígeno y la función efectora. Las dos cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de acuerdo con la invención pueden ser de un tipo seleccionado del grupo que consiste en una cadena pesada de longitud completa y la variante de delección descrita anteriormente, o pueden ser de dos tipos combinados seleccionados de entre ellos. La proporción de la cantidad de cada variante de delección puede verse afectada por el tipo de células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la invención y las condiciones de cultivo, sin embargo, puede ejemplificarse un caso en el que se ha delecionado un residuo de aminoácido en el extremo carboxilo en ambas de las dos cadenas pesadas contenidas como componentes principales en el anticuerpo de acuerdo con la invención.

Como isotipo del anticuerpo de la invención, por ejemplo, puede ejemplificarse IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), y puede ejemplificarse preferentemente IgG1 o IgG2.

Como actividad biológica del anticuerpo, generalmente una actividad de unión a antígeno, una actividad de internalización en células que expresan un antígeno por unión al antígeno, una actividad de neutralización de la actividad de un antígeno, una actividad de potenciación de la actividad de un antígeno, una actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y una fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP). La actividad biológica del anticuerpo de la presente invención es una actividad de unión a HER2, y preferentemente una actividad de internalización en células que expresan HER2 mediante la unión a HER2. Además, el anticuerpo de

la presente invención puede tener una actividad ADCC, una actividad CDC, y/o una actividad ADCP además de una actividad de internalización en células.

El anticuerpo obtenido puede purificarse hasta homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo puede realizarse empleando un método convencional de separación y purificación de proteínas. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse y purificarse seleccionando y combinando adecuadamente cromatografía en columna, filtración por filtro, ultrafiltración, precipitación salina, diálisis, electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, electroforesis con enfoque isoelectrónico, y similares (Estrategias para la purificación y caracterización de proteínas: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Anticuerpos: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero el método no se limita a ello.

Ejemplos de dicha cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción.

Dicha cromatografía puede realizarse empleando cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC.

Como columna a utilizar en cromatografía de afinidad, pueden exemplificarse una columna de proteína A y una columna de proteína G. Por ejemplo, como columna puede utilizarse una columna de proteína A, Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia Corporation) y similares.

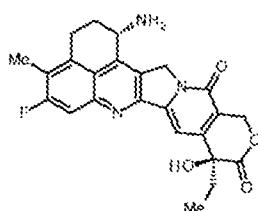
Además, utilizando un soporte que tenga un antígeno inmovilizado sobre el mismo, el anticuerpo también puede purificarse utilizando la propiedad de unión del anticuerpo al antígeno.

20 [Compuesto antitumoral]

Se explica el compuesto antitumoral a conjugar con el conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención. El compuesto antitumoral utilizado en la presente invención no está particularmente limitado siempre que sea un compuesto que tenga un efecto antitumoral y un grupo sustituyente o una estructura parcial que permita la conexión con una estructura enlazadora. Cuando una parte o la totalidad del enlazador se escinde en las células tumorales, la fracción del compuesto antitumoral se libera para mostrar el efecto antitumoral del compuesto antitumoral. Al escindirse el enlazador en una posición de conexión con el fármaco, el compuesto antitumoral se libera en una estructura no modificada para exhibir su efecto antitumoral intrínseco.

Como compuesto antitumoral utilizado en la presente invención, el exatecán (((1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-10,13(9H,15H)-diona; mostrado en la siguiente fórmula), uno de los derivados de camptotecina, puede usarse preferentemente.

(Fórmula 14)



Aunque tiene un excelente efecto antitumoral, el exatecán no se ha comercializado como fármaco antitumoral. El compuesto puede obtenerse fácilmente por un método conocido y el grupo amino en la posición 1 puede utilizarse preferentemente como posición de unión a la estructura enlazadora. Además, aunque el exatecán también puede liberarse en las células tumorales mientras parte del enlazador sigue unido a ellas, es un compuesto excelente que exhibe un excelente efecto antitumoral incluso en dicha estructura.

Debido a que el exatecán tiene una estructura de camptotecina, se sabe que el equilibrio se desplaza a una estructura con un anillo de lactona cerrado (anillo cerrado) en un medio acuoso ácido (por ejemplo, pH 3 aproximadamente) pero se desplaza a una estructura con un anillo de lactona abierto (anillo abierto) en un medio acuoso básico (por ejemplo, pH 10 aproximadamente). También se espera que un conjugado de fármaco introducido con un residuo de exatecán correspondiente a la estructura de anillo cerrado y a la estructura de anillo abierto tenga el mismo efecto antitumoral y no hace falta decir que cualquiera de estas estructuras está dentro del alcance de la presente invención.

Otros ejemplos del compuesto antitumoral pueden incluir doxorubicina, daunorubicina, mitomicina C, bleomicina, ciclocitidina, vincristina, vinblastina, metotrexato, agente antitumoral a base de platino (cisplatino o sus derivados), taxol o sus derivados, y otras camptotecinas o sus derivados (agente antitumoral descrito en Patente japonesa abierta al público No. 6-87746).

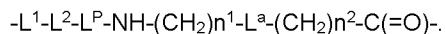
Con respecto al conjugado anticuerpo-fármaco, el número de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo es un factor clave que influye en la eficacia y la seguridad. La producción del conjugado anticuerpo-fármaco se lleva a cabo definiendo las condiciones de reacción, incluyendo las cantidades de materias primas y reactivos utilizados para la reacción, con el fin de tener un número constante de moléculas de fármaco conjugado.

- 5 Generalmente se obtiene una mezcla que contiene diferentes números de moléculas de fármacos conjugados a diferencia de la reacción química de un compuesto de bajo peso molecular. El número de fármacos conjugados en una molécula de anticuerpo se expresa o especifica mediante el valor medio, es decir, el número medio de moléculas de fármaco conjugadas. A menos que se describa específicamente de otro modo como principio, el número de moléculas de fármaco conjugado significa el valor medio, excepto en el caso en que represente un conjugado anticuerpo-fármaco que tenga un número específico de moléculas de fármaco conjugado que esté incluido en una mezcla de conjugado anticuerpo-fármaco que tenga diferentes números de moléculas de fármaco conjugado.
- 10

El número de moléculas de exatecán conjugadas a una molécula de anticuerpo es controlable, y como número medio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo, pueden conectarse aproximadamente de 1 a 10 exatecán. Preferentemente, es de 2 a 8, y más preferentemente de 3 a 8. Mientras tanto, un experto en la técnica puede diseñar una reacción para conjugar un número requerido de moléculas de fármaco con una molécula de anticuerpo basándose en la descripción de los Ejemplos de la presente solicitud y puede obtener un conjugado anticuerpo-fármaco conjugado con un número controlado de moléculas de exatecán.

[Estructura del enlazador]

- 20 Con respecto al conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención, se explica la estructura del enlazador para conjugar un compuesto antitumoral con el anticuerpo anti-HER2. El enlazador tiene una estructura de la siguiente fórmula:



- 25 El anticuerpo está conectado al terminal L^1 (terminal opuesto a la conexión con L^2), y el compuesto antitumoral está conectado al grupo carbonilo de la fracción $-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$.

n^1 representa un número entero de 0 a 6 y es preferentemente un número entero de 1 a 5, y más preferentemente de 1 a 3.

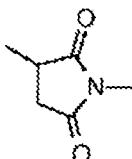
1. L^1

L^1 está representada por la siguiente estructura:

- 30 $-(Succinimid-3-il-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-$.

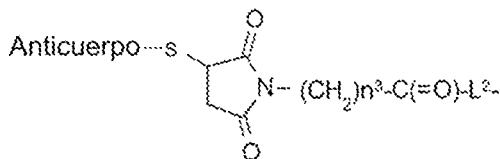
En lo anterior, n^3 es un número entero de 2 a 8, $"-(Succinimida-3-il-N)"$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 15]



- 35 La posición 3 de la estructura parcial anterior es la posición de conexión con el anticuerpo anti-HER2. La unión al anticuerpo en la posición 3 se caracteriza por la unión con formación de tioéter. El átomo de nitrógeno en la posición 1 de la fracción estructural está conectado al átomo de carbono del metíleno presente en el enlazador que incluye la estructura. En concreto, $-(Succinimid-3-il-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-L^2-$ es una estructura representada por la siguiente fórmula (en el presente documento, "anticuerpo-S-" procede de un anticuerpo).

(Fórmula 3.6)



En la fórmula, n^3 es un número entero de 2 a 8, y preferentemente de 2 a 5.

Ejemplos específicos de L^1 pueden incluir.

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-,
- 5 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-, y
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

2. L^2

L^2 está representada por la siguiente estructura:

- 10 -NH-(CH₂CH₂-O)n⁴-CH₂CH₂-C(=O)-,

L^2 puede no estar presente, y en tal caso, L^2 es un enlace sencillo. n^4 es un número entero de 1 a 6, y preferentemente de 2 a 4. L^2 está conectada a L^1 en su grupo amino terminal y está conectada a L^P en su grupo carbonilo en el otro terminal.

Ejemplos específicos de L^2 pueden incluir.

- 15 -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,
- NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,
- NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,
- NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,
- NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,
- 20 -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-.

3. L^P

L^P es un residuo peptídico que consiste en 2 a 7 aminoácidos. Concretamente, consiste en un residuo oligopéptido en el que de 2 a 7 aminoácidos están unidos por enlace peptídico. L^P está conectada a L^2 en su extremo N y está conectada al grupo amino del - NH-(CH₂)n¹-L^a-(CH₂)n²-C(=O)- del enlazador en su extremo C. Aquí, el término "residuo peptídico" o "residuo oligopéptido" es un grupo derivado de un péptido formado por dos o más residuos de aminoácidos y se refiere a un grupo divalente cuyas terminaciones N y C son posiciones de conexión.

El aminoácido que constituye L^P en el enlazador no está particularmente limitado, sin embargo, ejemplos del mismo incluyen un L- o un D-aminoácido, preferentemente un L-aminoácido. Y, puede ser un aminoácido que tenga una estructura como β -alanina, ácido ϵ -aminocaproico, o ácido γ -aminobutírico además de un α -aminoácido, además, puede ser un aminoácido de tipo no natural tal como el aminoácido N-metilado.

La secuencia de aminoácidos de L^P no está particularmente limitada, pero ejemplos de los aminoácidos constituyentes incluyen fenilalanina (Phe; F), tirosina (Tyr; Y), leucina (Leu; L), glicina (Gly; G), alanina (Ala; A), valina (Val; V), lisina (Lys; K), citrulina (Cit), serina (Ser; S), ácido glutámico (Glu; E) y ácido aspártico (Asp; D). Entre ellos, los ejemplos preferidos incluyen fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico. A partir de estos aminoácidos, puede construirse L^P con una secuencia de aminoácidos opcionalmente seleccionados con o sin solapamientos. Dependiendo del tipo de aminoácidos, se puede controlar el patrón de liberación del fármaco. El número de aminoácidos puede oscilar entre 2 y 7.

Ejemplos específicos de L^P pueden incluir.

- GGF-,

- DGGF-,
- (D-)D-GGF-,
- EGGF-,
- GGFG-,
- 5 -SGGF-,
- KGGF-,
- DGGFG-,
- GGFGG-,
- DDGGFG-,
- 10 -KDGFG-, y
- GGFGGGF-.

En lo anterior, "(D-)D" representa un ácido D-aspártico. Ejemplos particularmente preferidos de L^P para el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención pueden incluir el residuo tetrapéptido -GGFG-.

4. $L^a-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$

- 15 L^a en $L^a-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$ es una estructura de -O- o un enlace simple. n^2 es un número entero de 0 a 5, preferentemente de 0 a 3, y más preferentemente 0 o 1.

Ejemplos de $L^a-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$ pueden incluir las siguientes estructuras:

- O-CH₂-C(=O)-,
- O-CH₂CH₂-C(=O)-,
- 20 -O-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- O-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- O-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- CH₂-C(=O)-,
- CH₂CH₂-C(=O)-,
- 25 -CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- O-C(=O)-.

Entre ellos,

- 30 -O-CH₂-C(=O)-,
- O-CH₂CH₂-C(=O)-,
- O-C(=O)-,

o se prefiere un caso en el que L^a es un enlace sencillo, y n^2 es 0.

Ejemplos específicos de la estructura representada por.

- 35 -NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)- del enlazador puede incluir.
- NH-CH₂-C(=O)-,
- NH-CH₂CH₂-C(=O)-,

- NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
 - NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
 - NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
 - NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- 5 -NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- NH-CH₂-O-C(=O)-,
 - NH-CH₂CH₂-O-C(=O)-,
 - NH-CH₂CH₂CH₂-O-C(=O)-,
 - NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-O-C(=O)-.

- 10 Entre ellos,
- NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
 - NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
 - NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
- son más preferibles.

- 15 En el enlazador, la longitud de cadena de -NH-(CH₂)ⁿ-L^a-(CH₂)ⁿ-C(=O)- es preferentemente una longitud de cadena de 4 a 7 átomos, y más preferentemente una longitud de cadena de 5 o 6 átomos.

Con respecto al conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención, cuando se transfiere al interior de células tumorales, se ha sugerido que la fracción enlazadora se escinde y el derivado de fármaco que tiene una estructura representada por NH₂-(CH₂)ⁿ-L^a-(CH₂)ⁿ-C(=O)-(NH-DX) se libera para expresar una acción antitumoral. Los ejemplos del derivado antitumoral que exhibe un efecto antitumoral liberándose del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención incluyen un derivado antitumoral que tiene una fracción de estructura en la que un terminal de la estructura representada por -NH-(CH₂)ⁿ-L^a-(CH₂)ⁿ-C(=O)- del enlazador tiene un grupo amino, y los particularmente preferidos incluyen los siguientes.

- NH₂-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- 25 NH₂-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- NH₂-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - NH₂-CHCH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

30 Mientras tanto, en el caso del NH₂-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), se confirmó que, como la estructura aminal de la molécula es inestable, vuelve a sufrir una autodegradación para liberar el siguiente HO-CH₂-C(=O)-(NH-DX). Estos compuestos también pueden utilizarse preferentemente como intermedios de producción del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención.

35 el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención en el que se usa exatecán como fármaco, es preferible que la molécula de estructura fármaco-enlazador [-L¹-L²-L^P-NH-(CH₂)ⁿ-L^a-(CH₂)ⁿ-C(=O)-(NH-DX)] con la siguiente estructura se conecta a un anticuerpo. El número medio conjugado de dichas moléculas de estructura fármaco-enlazador por molécula de anticuerpo puede ser de 1 a 10. Preferentemente, es de 2 a 8, y más preferentemente de 3 a 8.

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- 40 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 5 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).
- 10 Entre estos, más preferidos son los siguientes.
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 15 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).
- 20 Particularmente preferidos son los siguientes.
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).
- 25 Con respecto a la estructura del enlazador para conjugar el anticuerpo anti-HER2 y el fármaco en el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención, el enlazador preferido puede construirse conectando estructuras preferidas mostradas para cada parte del enlazador explicado anteriormente. En cuanto a la estructura del enlazador, pueden utilizarse preferentemente los que tienen la siguiente estructura. Mientras tanto, el terminal izquierdo de estas estructuras es la posición de conexión con el anticuerpo y el terminal derecho es la posición de conexión con el fármaco.
 30 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-,
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-,
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
 35 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-C(=O)-,
 40 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-,

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-.

Entre estos, más preferidos son los siguientes.

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- 5 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-C(=O)-,
- 10 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-.

Particularmente preferidos incluyen los siguientes.

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- 15 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

[Método de producción]

20 A continuación, se dan explicaciones para el método representativo para producir el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención o un intermedio de producción del mismo. Mientras tanto, los compuestos se describen a continuación con el número de compuesto indicado en cada fórmula de reacción. En concreto, se denominan "compuesto de fórmula (1)", "compuesto (1)" o similares. Los compuestos con números distintos a éstos también se describen de forma similar.

1. Método de producción 1

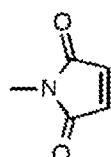
25 El conjugado anticuerpo-fármaco representado por la fórmula (1) en la que el anticuerpo está conectado a la estructura de fármaco-enlazador mediante tioéter puede producirse mediante el siguiente método, por ejemplo.

[Fórmula 17]



[En la fórmula, AB representa un anticuerpo que tiene un grupo sulfhidrilo, y L' representa L¹ estructura de enlace en la que el terminal de enlace es un grupo maleimidilo (fórmula mostrada a continuación).

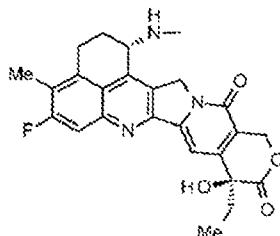
[Fórmula 18]



30

(en la fórmula, el átomo de nitrógeno es la posición de unión), y representa específicamente un grupo en el que la fracción -(Succinimid-3-il-N)- en -(Succinimid-3-il-N)-(CH₂)ⁿ-C(=O)- de L¹ es un grupo maleimidilo. Además, el -(NH-DX) representa una estructura representada por la siguiente fórmula:

(Fórmula 19)



y representa un grupo que se deriva eliminando un átomo de hidrógeno del grupo amino en la posición 1 del exatecán].

Además, el compuesto de la fórmula (1) en la fórmula de reacción anterior puede interpretarse como una estructura en la que una fracción de estructura correspondiente del fármaco al terminal enlazador se conecta a un anticuerpo. Sin embargo, es sólo una descripción dada por conveniencia, y en realidad hay muchos casos en los que una pluralidad de los motivos de estructura está conectados a una molécula de anticuerpo. Lo mismo cabe decir de la explicación del método de producción que se describe a continuación.

El conjugado anticuerpo-fármaco (1) puede producirse haciendo reaccionar el compuesto (2), que puede obtenerse por el método descrito a continuación, con el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo.

El anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo puede obtenerse por un método bien conocido en la técnica [Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)]. Algunos ejemplos son: el reactivo de Traut se hace reaccionar con el grupo amino del anticuerpo; los N-succinimidil S-acetiltioalcanoatos se hacen reaccionar con el grupo amino del anticuerpo seguido de una reacción con hidroxilamina; después de reaccionar con N-succinimidil 3-(piridilditio)propionato, el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor; el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor tal como ditiotreitol, 2-mercaptopetanol, y clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para reducir el enlace disulfuro en la parte bisagra en el anticuerpo para formar un grupo sulfhidrilo, pero no se limita a ello.

Específicamente, usando de 0,3 a 3 equivalentes molares de TCEP como agente reductor por disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo y reaccionando con el anticuerpo en una solución tampón que contiene un agente quelante, puede obtenerse el anticuerpo con disulfuro parcial o completamente reducido en la parte de bisagra en el anticuerpo. Algunos ejemplos de agentes quelantes son el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Puede utilizarse en concentraciones de 1 mM a 20 mM. Ejemplos de la solución tampón que puede utilizarse incluyen una solución de fosfato sódico, borato sódico o acetato sódico.

Específicamente, haciendo reaccionar el anticuerpo con TCEP a 4°C a 37°C durante 1 a 4 horas, puede obtenerse el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo parcial o completamente reducido.

Mientras tanto, mediante la realización de la reacción para añadir un grupo sulfhidrilo a una fracción de fármaco-enlazadora, la fracción de fármaco-enlazadora puede conjugarse mediante un enlace tioéter.

Usando de 2 a 20 equivalentes molares del compuesto (2) por el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo, se puede producir el conjugado anticuerpo-fármaco (1) en el que se conjugan de 2 a 8 moléculas de fármaco por molécula de anticuerpo. Específicamente, es suficiente que la solución que contiene el compuesto (2) disuelto en ella se añada a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo para la reacción. En este caso, algunos ejemplos de solución tampón que pueden utilizarse son la solución de acetato sódico, el fosfato sódico y el borato sódico. El pH para la reacción es de 5 a 9, y más preferentemente la reacción se realiza cerca del pH 7. Ejemplos del disolvente para disolver el compuesto (2) incluyen un disolvente orgánico tal como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA) y N-metil-2-piridona (NMP).

Es suficiente que la solución de disolvente orgánico que contiene el compuesto (2) disuelto en el mismo se añada al 1 a 20% v/v a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo para la reacción. La temperatura de reacción es de 0 a 37°C, más preferentemente de 10 a 25°C, y el tiempo de reacción es de 0,5 a 2 horas. La reacción puede terminarse desactivando la reactividad del compuesto (2) sin reaccionar con un reactivo que contenga tiol. Algunos ejemplos de reactivos que contienen tioles son la cisteína y la N-acetil-L-cisteína (NAC). Más concretamente, se añaden de 1 a 2 equivalentes molares de NAC al compuesto (2) utilizado y, incubando a temperatura ambiente de 10 a 30 minutos, se puede terminar la reacción.

El conjugado anticuerpo-fármaco (1) producido puede, después de la concentración, el intercambio de tampón, la purificación y la medición de la concentración de anticuerpo y el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo de acuerdo con los procedimientos comunes descritos a continuación, someterse a la identificación del conjugado anticuerpo-fármaco (1).

Procedimiento común A: Concentración de la solución acuosa del anticuerpo o del conjugado anticuerpo-fármaco

A un recipiente Amicon Ultra (50.000 MWCO, Millipore Co.), se añadió una solución de anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco y la solución de anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco se concentró por centrifugación (centrifugación durante 5 a 20 minutos a 2000 G a 3800 G) usando una centrifugadora (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.).

5 Procedimiento común B: Medición de la concentración de anticuerpos

Utilizando un detector UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), se realizó la medición de la concentración de anticuerpos de acuerdo con el método definido por el fabricante. En ese momento se utilizó un coeficiente de absorción de 280 nm diferente para cada anticuerpo ($1,3 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $1,8 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Procedimiento común C-1: Intercambio de tampón para anticuerpos

10 Columna NAP-25 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) utilizando el soporte Sephadex G-25 se equilibró con tampón fosfato (10 mM, pH 6,0; en la especificación se denomina PBS6,0/EDTA) que contiene cloruro sódico (137 mM) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 5 mM) de acuerdo con el método definido por el fabricante. La solución acuosa del anticuerpo se aplicó en una cantidad de 2,5 mL a la columna única NAP-25, y después se recogió la fracción (3,5 mL) eludida con 3,5 mL de PBS6,0/EDTA. La fracción resultante se concentró mediante el procedimiento común A. Tras medir la concentración del anticuerpo mediante el procedimiento común B, la concentración del anticuerpo se ajustó a 10 mg/mL utilizando PBS6,0/EDTA.

Procedimiento común C-2: Intercambio de tampón para anticuerpos

20 Columna NAP-25 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) utilizando el soporte Sephadex G-25 se equilibró con tampón fosfato (50 mM, pH 6,5; en la especificación se denomina PBS6,5/EDTA) que contiene cloruro sódico (50 mM) y EDTA (2 mM) de acuerdo con el método definido por el fabricante. La solución acuosa del anticuerpo se aplicó en una cantidad de 2,5 mL a la columna única NAP-25, y después se recogió la fracción (3,5 mL) eludida con 3,5 mL de PBS6,5/EDTA. La fracción resultante se concentró mediante el procedimiento común A. Tras medir la concentración del anticuerpo mediante el procedimiento común B, la concentración del anticuerpo se ajustó a 20 mg/mL utilizando PBS6,5/EDTA.

25 Procedimiento común D: Purificación del conjugado anticuerpo-fármaco

30 La columna NAP-25 se equilibró con cualquier tampón seleccionado entre el tampón fosfato disponible comercialmente (PBS7,4, Cat. No. 10010-023, Invitrogen), tampón fosfato sódico (10 mM, pH 6,0; se denomina PBS6,0) que contiene cloruro sódico (137 mM), y tampón acetato que contiene sorbitol (5%) (10 mM, pH 5,5; se denomina ABS en la memoria descriptiva). La solución acuosa de la reacción anticuerpo-fármaco conjugado se aplicó en una cantidad de aproximadamente 1,5 mL a la columna NAP-25, y después se eludió con el tampón en una cantidad definida por el fabricante para recoger la fracción de anticuerpos. La fracción recogida se aplicó de nuevo a la columna NAP-25 y, repitiendo de 2 a 3 veces en total el proceso de purificación por filtración en gel para eludir con tampón, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco que excluía el enlazador del fármaco no conjugado y un compuesto de bajo peso molecular (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), N-acetil-L-cisteína (NAC) y dimetilsulfóxido).

35 Procedimiento común E: Medición de la concentración de anticuerpos en el conjugado anticuerpo-fármaco y número medio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (1).

40 La concentración de fármaco conjugado en el conjugado anticuerpo-fármaco puede calcularse midiendo la absorbancia UV de una solución acuosa del conjugado anticuerpo-fármaco a dos longitudes de onda de 280 nm y 45 370 nm, seguido de la realización del cálculo que se muestra a continuación.

Dado que la absorbancia total a cualquier longitud de onda es igual a la suma de la absorbancia de cada especie química absorbente de luz que está presente en el sistema (aditividad de la absorbancia), cuando los coeficientes de absorción molar del anticuerpo y del fármaco permanecen iguales antes y después de la conjugación entre el anticuerpo y el fármaco, la concentración de anticuerpo y la concentración de fármaco en el conjugado anticuerpo-fármaco se expresan mediante las siguientes ecuaciones.

$$A_{280} = A_{A,280} + A_{D,280} = \epsilon_{A,280}C_A + \epsilon_{D,280}C_D \quad \text{Ecuación (I)}$$

$$A_{370} = A_{A,370} + A_{D,370} = \epsilon_{A,370}C_A + \epsilon_{D,370}C_D \quad \text{Ecuación (II)}$$

50 En lo anterior, A_{280} representa la absorbancia de una solución acuosa del conjugado anticuerpo-fármaco a 280 nm, A_{370} representa la absorbancia de una solución acuosa del conjugado anticuerpo-fármaco a 370 nm, $A_{A,280}$ representa la absorbancia de un anticuerpo a 280 nm, $A_{A,370}$ representa la absorbancia de un anticuerpo a 370 nm, $A_{D,280}$ representa la absorbancia de un precursor de conjugado a 280 nm, $A_{D,370}$ representa la absorbancia de un precursor de conjugado a 370 nm, $\epsilon_{A,280}$ representa el coeficiente de absorción molar de un anticuerpo a 280 nm, $\epsilon_{A,370}$ representa el coeficiente de absorción molar de un anticuerpo a 370 nm, $\epsilon_{D,280}$ representa el coeficiente de

absorción molar de un precursor de conjugado a 280 nm, $\epsilon_{D,370}$ representa el coeficiente de absorción molar de un precursor de conjugado a 370 nm, C_A representa la concentración de anticuerpo en un conjugado anticuerpo-fármaco, y C_D representa la concentración de fármaco en un conjugado anticuerpo-fármaco.

- 5 En cuanto a $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,370}$, $\epsilon_{D,280}$, y $\epsilon_{D,370}$ en lo anterior, se utilizan valores preparados previamente (valores estimados basados en el cálculo o valores de medición obtenidos por medición UV de los compuestos). Por ejemplo, $\epsilon_{A,280}$ puede estimarse a partir de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo utilizando un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). $\epsilon_{A,370}$ es generalmente cero. En los Ejemplos, en cuanto al coeficiente de absorción molar del trastuzumab, se utilizaron $\epsilon_{A,280} = 215400$ (valor estimado basado en el cálculo) y $\epsilon_{A,370} = 0$. $\epsilon_{D,280}$ y $\epsilon_{D,370}$ pueden obtenerse basándose en la ley de Lambert-Beer (Absorbancia = concentración molar \times coeficiente de absorción molar \times longitud del camino celular) midiendo la absorbancia de una solución en la que el precursor conjugado que se va a utilizar está disuelto a una determinada concentración molar. En cuanto al coeficiente de absorción molar de un enlazador de fármaco en los Ejemplos, se utilizaron $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor medio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor medio medido), a menos que se especifique lo contrario. Midiendo A_{280} y A_{370} de una solución acuosa del conjugado anticuerpo-fármaco y resolviendo las ecuaciones simultáneas (I) y (II) utilizando los valores, pueden obtenerse C_A y C_D . Además, dividiendo C_D por C_A , se puede obtener el número medio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo.

Procedimiento común F: Medición (2) del número medio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado anticuerpo-fármaco.

- 20 El número medio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado anticuerpo-fármaco también puede determinarse mediante análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando el siguiente método además del procedimiento común E antes mencionado.

[F-1. Preparación de la muestra para el análisis por HPLC (reducción del conjugado anticuerpo-fármaco)]

- 25 Se mezcla una solución de conjugado anticuerpo-fármaco (aproximadamente 1 mg/mL, 60 μ L) con una solución acuosa de ditioreitol (DTT) (100 mM, 15 μ L). En el análisis por HPLC se utiliza una muestra en la que el enlace disulfuro entre la cadena L y la cadena H del conjugado anticuerpo-fármaco se ha escindido incubando la mezcla durante 30 minutos a 37°C.

[F-2. Análisis HPLC]

El análisis por HPLC se realiza en las siguientes condiciones de medición:

- 30 Sistema HPLC: Sistema HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Inc.)
- Detector: espectrómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 280 nm)
- Columna: PLRP-S (2,1 \times 50 mm, 8 μ m, 1000 angstroms; Agilent Technologies, Inc., PiN PL1912-1802)
- Temperatura de la columna: 80°C
- Fase móvil A: solución acuosa que contiene 0,04% de ácido trifluoroacético (TFA)
- Fase móvil B: solución de acetonitrilo con 0,04% de TFA
- 35 Programa de gradiente: 29%-36% (0-12,5 min), 36%-42% (12,5-15 min), 42%-29% (15-15,1 min), y 29%-29% (15,1-25 min)
- Volumen de inyección de la muestra: 15 μ L

[F-3. Análisis de datos]

- 40 [F-3-1] En comparación con las cadenas L (L_0) y H (H_0) de anticuerpos no conjugados, la cadena L (L conectada a una molécula de fármaco: L_1) y H (cadena H conectada a una molécula de fármaco: H_1 , cadena H conectada a dos moléculas de fármaco: H_2 , cadena H conectada a tres moléculas de fármaco: H_3) presentan una mayor hidrofobicidad en proporción al número de moléculas de fármaco conjugadas y, por tanto, tienen un mayor tiempo de retención. Por tanto, estas cadenas se eluden en el orden de L_0 y L_1 o H_0 , H_1 , H_2 y H_3 . Los picos de detección pueden asignarse a cualquiera de L_0 , L_1 , H_0 , H_1 , H_2 , y H_3 mediante la comparación de los tiempos de retención con L_0 y H_0 .
- 45 [F-3-2] Dado que el enlazador del fármaco tiene absorción UV, los valores del área de pico se corrigen en respuesta al número de moléculas de enlazador del fármaco conjugadas de acuerdo con la siguiente expresión utilizando los coeficientes de absorción molar de la cadena L o H y del enlazador del fármaco.

[Expresión 1]

Valor corregido del área pico de la cadena L (L_i) \approx Área pico

Coeficiente de absorción molar de la cadena L

 \times -----

Coeficiente de absorción molar de la cadena L + El número de moléculas de fármaco conjugado + Coeficiente de absorción molar del enlaceador del fármaco

[Expresión 2]

Valor corregido del área pico de la cadena H (H_i) \approx Área pico

Coeficiente de absorción molar de la cadena H

 \times -----

Coeficiente de absorción molar de la cadena H + El número de moléculas de fármaco conjugado + Coeficiente de absorción molar del enlaceador del fármaco

Aquí, en cuanto al coeficiente de absorción molar (280 nm) de la cadena L o H de cada anticuerpo, puede utilizarse un valor estimado a partir de la secuencia de aminoácidos de la cadena L o H de cada anticuerpo mediante un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). En el caso del trastuzumab, se utilizaron un coeficiente de absorción molar de 26150 y un coeficiente de absorción molar de 81290 como valores estimados para las cadenas L y H, respectivamente, de acuerdo con su secuencia de aminoácidos. En cuanto al coeficiente de absorción molar (280 nm) del fármaco enlazador, se utilizó el coeficiente de absorción molar medido (280 nm) de un compuesto en el que el grupo maleimida se convertía en succinimida tioéter mediante la reacción de cada fármaco enlazador con mercaptoetanol o N-acetilcisteína.

- 5 10 [F-3-3] La relación de áreas de pico (%) de cada cadena se calcula para el total de los valores corregidos de las áreas de pico de acuerdo con la siguiente expresión.

[Expresión 3]

$$\text{Relación del área pico de la cadena L} = \frac{A_{L_i}}{A_{L_0} + A_{L_1}} \times 100$$

$$\text{Relación del área pico de la cadena H} = \frac{A_{H_i}}{A_{H_0} + A_{H_1} + A_{H_2} + A_{H_3}} \times 100$$

Valores corregidos de las áreas de pico respectivas de A_{L_i} , A_{H_i} , L_i , H_i

[F-3-4] El número medio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado anticuerpo-fármaco se calcula de acuerdo con la siguiente expresión.

- 15 A continuación se describe el compuesto intermedio de producción utilizado en el método de producción 1. El compuesto representado por la fórmula (2) en el método de producción 1 es un compuesto representado por la fórmula siguiente:



En la fórmula,

- 20 n^3 representa un número entero de 2 a 8,

 L^2 representa $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ o un enlace sencillo,en donde n^4 representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa un residuo peptídico formado por 2 a 7 aminoácidos seleccionados de fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico,

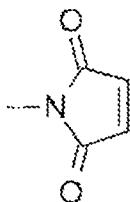
n^1 representa un número entero de 0 a 6,

n^2 representa un número entero de 0 a 5,

5 L^3 representa -O- o un enlace simple,

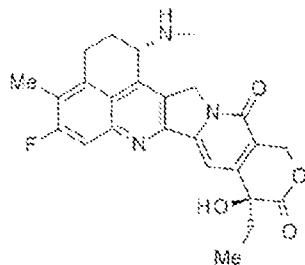
(maleimid-N-il)- es un grupo maleimidilo (grupo 2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il) representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 20]



10 en el que el átomo de nitrógeno es la posición de conexión, y -(NH-DX) es un grupo representado por la fórmula siguiente:

[Fórmula 21]



en el que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición de conexión.

Cuando L^2 es un enlace sencillo o $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$, se prefiere como intermedio de producción que n^4 deba ser un número entero de 2 a 4.

15 En cuanto al residuo peptídico de L^P , se prefiere como intermedio de producción un compuesto que tenga un residuo peptídico consistente en un aminoácido seleccionado de fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico. Entre esos residuos peptídicos, se prefiere como intermedio de producción un compuesto en el que L^P es un residuo peptídico formado por 4 aminoácidos. Más específicamente, se prefiere como intermedio de producción un compuesto en el que L^P es el residuo tetrapéptido -GGFG-.

20 Además, en cuanto a $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$, un compuesto que tiene $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, o $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ se prefiere como intermedio de producción. Un compuesto que tiene $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, o $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ es más preferido.

25 Un compuesto representado por la fórmula (2) en la que n^3 es un número entero de 2 a 5, L^2 es un enlace sencillo, y $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ es $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, o $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ se prefiere como intermedio de producción. Un compuesto en el que $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ es $NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, o $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ es más preferido. Se prefiere además un compuesto en el que n^3 es un número entero de 2 o 5.

30 Un compuesto representado por la fórmula (2) en la que n^3 es un número entero de 2 a 5, L^2 es $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$, n^4 es un número entero de 2 a 4, y $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ es $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, o $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ se prefiere como intermedio de producción. Es más preferido un compuesto en el que n^4 es un número entero de 2 o

4. Un compuesto en el que $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-$ es $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2-$, o $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2-$ es más preferido.

Ejemplos preferidos de un intermedio útil para producir dicho compuesto de la presente invención pueden incluir lo siguiente.

- 5 (maleimid-N-il) $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il) $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 10 (maleimid-N-il) $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 15 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il) $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 20 (maleimid-N-il) $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 25 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 30 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ (NH-DX),
 35 El conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención puede producirse haciendo reaccionar un compuesto enlazador de fármaco seleccionado del grupo de compuestos intermedios de producción mencionado anteriormente con un anticuerpo anti-HER2 o un derivado reactivo del mismo para formar de este modo un enlace tioéter en un sitio de enlace disulfuro presente en la parte de bisagra del anticuerpo anti-HER2. En este caso, se utiliza preferentemente el derivado reactivo del anticuerpo anti-HER2, y se prefiere particularmente un derivado reactivo obtenido por reducción del anticuerpo anti-HER2.
 40 Los siguientes son compuestos más preferidos como intermedio de producción.

- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 5 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂-CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 10 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Entre el grupo de compuestos intermedios arriba mencionado, un compuesto representado por la fórmula siguiente:

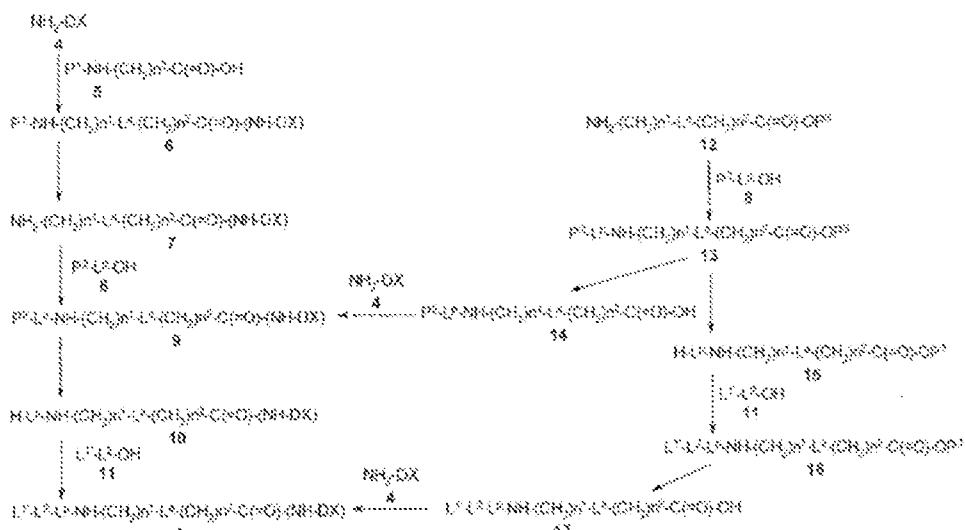
- 15 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), o
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 es otro compuesto preferido.

- 20 Para asegurar la cantidad del conjugado, puede mezclarse una pluralidad de conjugados obtenidos en condiciones de producción similares para tener un número equivalente de fármacos (por ejemplo, aproximadamente ± 1) para preparar nuevos lotes. En este caso, el número medio de fármacos se sitúa entre los números medios de fármacos en los conjugados antes de la mezcla.

2. Método de producción 2

- 25 El compuesto representado por la fórmula (2) como intermedio utilizado en el método de producción anterior y una sal farmacológicamente aceptable del mismo pueden producirse mediante el método siguiente, por ejemplo.

(Fórmula 22)



En la fórmula, L¹ representa un grupo maleimidilo terminal, y P¹, P², y P³ representan cada uno un grupo protector.

El compuesto (6) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico (5) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido o similar y haciéndolo reaccionar con NH₂-DX(4) o una sal farmacológicamente aceptable del mismo. NH₂-DX (4) indica exatecan (nombre químico: (1S,9S)-1-amino-9-etyl-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6, 7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-diona).

- 5 Para la reacción pueden emplearse reactivos y condiciones que se utilizan comúnmente para la síntesis de péptidos. Existen diversos tipos de ésteres activos. Por ejemplo, puede producirse haciendo reaccionar fenoles tales como p-nitrofenol, N-hidroxi benzotriazol, N-hidroxi succinimida, o similares, con el ácido carboxílico (5) utilizando un agente condensador tal como N,N'-diclohexilcarbodiimida o clorhidrato de 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Además, el éster activo también puede producirse mediante una reacción del ácido carboxílico (5) con trifluoroacetato de pentafluorofenilo o similar; una reacción del ácido carboxílico (5) con hexafluorofosfato de 1-benzotriazolil oxitripirrolidinofosfonio; una reacción del ácido carboxílico (5) con cianofosfonato de dietilo (método de salazón); una reacción del ácido carboxílico (5) con trifenilfosfina y disulfuro de 2,2'-dipiridilo (método de Mukaiyama); una reacción del ácido carboxílico (5) con un derivado de triazina tal como el cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM); o similares. Además, la reacción 10 puede realizarse también, por ejemplo, mediante un método de haluro ácido por el que el ácido carboxílico (5) se trata con un haluro ácido tal como el cloruro de tionilo y el cloruro de oxalilo en presencia de una base.

Haciendo reaccionar el éster activo, el anhídrido de ácido mixto o el haluro de ácido del ácido carboxílico (5) obtenido como anteriormente con el compuesto (4) en presencia de una base adecuada en un disolvente inerte a -78°C a 150°C, puede producirse el compuesto (6). (Mientras tanto, "disolvente inerte" indica un disolvente que no 20 inhibe una reacción para la que se utiliza el disolvente).

Ejemplos específicos de la base utilizada para cada paso descrito anteriormente incluyen un carbonato, alcóxido, hidróxido o hidruro de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo tal como carbonato de sodio, carbonato de potasio, etóxido de sodio, butóxido de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidruro de sodio e hidruro de potasio; una base organometálica representada por un alquil-litio tal como el n-butil-litio, o dialquilamino-litio tal como la 25 diisopropilamida de litio; una base organometálica de bisililamina tal como la bis(trimetilsilil)amida de litio; y una base orgánica que incluya una amina terciaria o un compuesto heterocíclico que contenga nitrógeno, tal como piridina, 2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, N-metil morfolina, diisopropiletilamina y diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU).

Ejemplos del disolvente inerte que se usa para la reacción de la presente invención incluyen un disolvente de 30 hidrocarburo halogenado tal como diclorometano, cloroformo y tetracloruro de carbono; un disolvente éter tal como tetrahidrofurano, 1,2-dimetoxietano y dioxano; un disolvente hidrocarburo aromático tal como benceno y tolueno; y un disolvente amida tal como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida y N-metilpirrolidin-2-ona. Además de éstos, en algunos casos puede utilizarse un disolvente sulfóxido tal como el dimetilsulfóxido y el sulfolano; y un disolvente cetónico tal como la acetona y la metiletilcetona y un disolvente alcohólico tal como el metanol y el 35 etanol. Además, también puede utilizarse una mezcla de disolventes.

En cuanto al grupo protector P¹ para el grupo amino terminal del compuesto (6), puede usarse un grupo protector para un grupo amino que se usa generalmente para la síntesis peptídica, por ejemplo, un grupo tert-butiloxi carbonilo, un grupo 9-fluorenilmetoxi carbonilo, o un grupo bentiloxi carbonilo. Ejemplos de otros grupos protectores para un grupo amino incluyen un grupo alcanoilo tal como un grupo acetilo; un grupo alcoxycarbonilo 40 tal como un grupo metoxicarbonilo y un grupo etoxicarbonilo; un grupo arilmethoxycarbonilo tal como un grupo parametoxibenciloxycarbonilo, y un grupo para (u orto)nitrobenciloxycarbonilo; un grupo arilmethyl, tal como un grupo bencilo y un grupo trifenilmetilo; un grupo ariolo, tal como un grupo benzoilo; y un grupo aril sulfonilo, tal como un grupo 2,4-dinitrobenceno sulfonilo y un grupo 4-ortonitrobenceno sulfonilo. El grupo protector P¹ puede seleccionarse dependiendo, por ejemplo, de las propiedades del compuesto que tiene el grupo amino que debe protegerse.

45 Desprotegiendo el grupo protector P¹ para el grupo amino terminal del compuesto (6) obtenido, puede producirse el compuesto (7). En la desprotección, los reactivos y las condiciones pueden seleccionarse en función del grupo protector.

El compuesto (9) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico peptídico (8) que tiene el terminal N protegido con P² en un éster activo, anhídrido ácido mixto o similar y haciéndolo reaccionar con el compuesto (7) obtenido. 50 Las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el disolvente inerte utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (8) y el compuesto (7) pueden seleccionarse adecuadamente entre los descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P² puede seleccionarse convenientemente de entre los descritos para el grupo protector del compuesto (6), y la selección puede hacerse basándose, por ejemplo, en las propiedades del compuesto que tiene el grupo amino a proteger. Como se utiliza generalmente para la síntesis peptídica, repitiendo secuencialmente la reacción y la desprotección del aminoácido o del péptido que constituye el ácido carboxílico peptídico (8) para la elongación, también se puede producir el compuesto (9).

55 Desprotegiendo el grupo protector P² para el grupo amino del compuesto (9) obtenido, puede producirse el compuesto (10). En la desprotección, los reactivos y las condiciones pueden seleccionarse en función del grupo protector.

Es posible producir el compuesto (2) derivatizando el ácido carboxílico (11) en un éster activo, anhídrido ácido mixto, haluro de ácido o similar y haciéndolo reaccionar con el compuesto (10) obtenido. Las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el disolvente inerte utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico (11) y el compuesto (10) pueden seleccionarse adecuadamente entre los descritos para la síntesis del compuesto (6).

5 El compuesto (9) puede producirse también por el método siguiente, por ejemplo.

El compuesto (13) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico peptídico (8) que tiene el terminal N protegido con P² en un éster activo, anhídrido de ácido mixto o similar y haciéndolo reaccionar en presencia de una base con el compuesto de amina (12) que tiene el grupo carboxilo protegido con P³. Las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el disolvente inerte utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (8) y el compuesto (12) pueden seleccionarse adecuadamente entre los descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P² para el grupo amino del compuesto (13) no está particularmente limitado siempre que se trate de un grupo protector de uso general.

10 Específicamente, ejemplos del grupo protector para un grupo hidroxilo pueden incluir un grupo alcoximetilo tal como un grupo metoximetilo; un grupo arilmethyl tal como un grupo bencilo, un grupo 4-metoxibencilo, y un grupo trifenilmetilo; un grupo alcanoilo tal como un grupo acetilo; un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo; y un grupo sililo tal como un grupo difenilsililo tert-butilo. El grupo carboxi puede protegerse, por ejemplo, como un éster con un grupo alquilo, tal como un grupo metilo, un grupo etilo y un grupo tert-butilo, un grupo alilo o un grupo arilmethyl, tal como un grupo bencilo. Ejemplos del grupo protector para un grupo amino pueden incluir: un grupo alquilocarbonilo, tal como un grupo tert-butilocarbonilo, un grupo metoxicarbonilo y un grupo etoxicarbonilo; un grupo aliloxicarbonilo, o un grupo arilmethoxicarbonilo, tal como un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo, un grupo parametoxibenciloxicarbonilo y un grupo para (u orto)nitrobenciloxicarbonilo; un grupo alquenilo, tal como un grupo acetilo; un grupo arilmethyl, tal como un grupo bencilo y un grupo trifenilmetilo; un grupo aroilo, tal como un grupo benzoilo; y un grupo aril sulfonilo, tal como un grupo 2,4-dinitrobenceno sulfonilo o 25 un grupo ortonitrobenceno sulfonilo.

15 En cuanto al grupo protector P³ para un grupo carboxilo, puede usarse un grupo protector usado comúnmente como grupo protector para un grupo carboxilo en química sintética orgánica, en particular, síntesis peptídica. En concreto, puede seleccionarse adecuadamente entre los grupos protectores descritos anteriormente, por ejemplo, ésteres con un grupo alquilo tal como un grupo metilo, un grupo etilo o un tert-butilo, ésteres de alilo y ésteres de bencilo.

20 En tales casos, el grupo protector para un grupo amino y el grupo protector para un grupo carboxi pueden ser aquellos preferentemente eliminados por un método diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P² es un grupo tert-butiloxi carbonilo y P³ es un grupo bencilo. Los grupos protectores pueden seleccionarse de entre los mencionados anteriormente en función, por ejemplo, de las propiedades de los compuestos que tienen el grupo amino y el grupo carboxi que hay que proteger. Para la eliminación de los grupos protectores, los reactivos y las condiciones pueden seleccionarse en función del grupo protector.

25 Desprotegiendo el grupo protector P³ para el grupo carboxilo del compuesto (13) obtenido, puede producirse el compuesto (14). En la desprotección, los reactivos y las condiciones se seleccionan en función del grupo protector.

30 El compuesto (9) puede producirse derivatizando el compuesto (14) obtenido en un éster activo, un anhídrido ácido mixto, un haluro de ácido o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, también pueden utilizarse los reactivos y las condiciones de reacción que se emplean generalmente para la síntesis de péptidos, y las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el disolvente inerte utilizados para la reacción pueden seleccionarse adecuadamente entre los descritos para la síntesis del compuesto (6).

35 El compuesto (2) puede producirse también por el método siguiente, por ejemplo.

40 Desprotegiendo el grupo protector P² para el grupo amino del compuesto (13), puede producirse el compuesto (15). En la desprotección, los reactivos y las condiciones pueden seleccionarse en función del grupo protector.

45 El compuesto (16) puede producirse derivatizando el derivado de ácido carboxílico (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido o similar y haciéndolo reaccionar en presencia de una base con el compuesto (15) obtenido. Las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el disolvente inerte utilizados para formar un enlace amida entre el ácido carboxílico peptídico (11) y el compuesto (15) pueden seleccionarse adecuadamente entre los descritos para la síntesis del compuesto (6).

50 Desprotegiendo el grupo protector del grupo carboxilo del compuesto (16) obtenido, puede producirse el compuesto (17). La desprotección puede llevarse a cabo de forma similar a la desprotección en el grupo carboxilo para producir el compuesto (14).

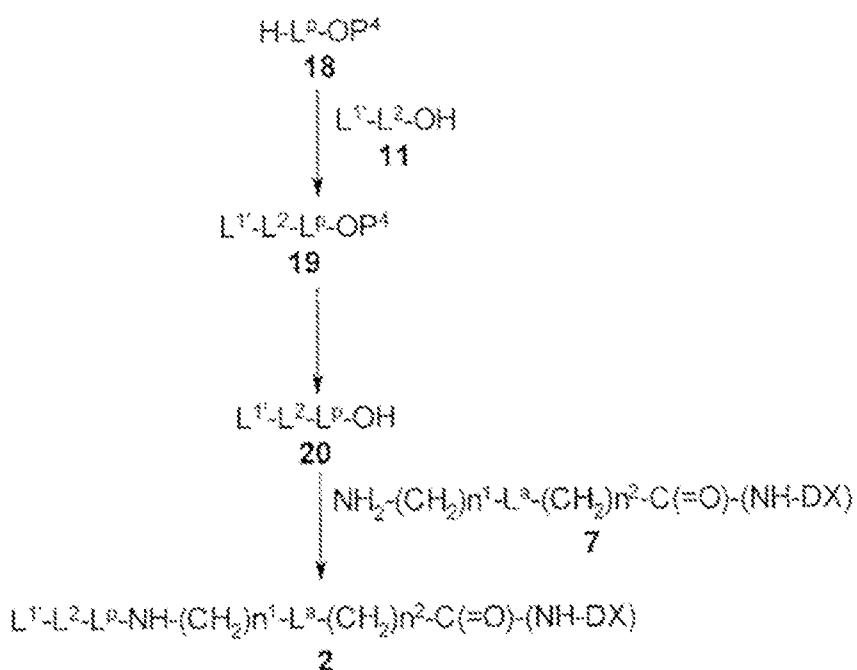
El compuesto (2) puede producirse derivatizando el compuesto (17) en un éster activo, anhídrido ácido mixto, haluro de ácido o similar y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, también pueden utilizarse los reactivos y las condiciones de reacción que se emplean generalmente para la síntesis de péptidos, y las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el disolvente inerte utilizados para la reacción pueden seleccionarse adecuadamente entre los descritos para la síntesis del compuesto (6).

5

3. Método de producción 3

El compuesto representado por la fórmula (2) de un intermedio puede producirse también por el método siguiente.

(Fórmula 23)



10 En la fórmula, L^1 corresponde a L^1 que tiene una estructura en la que el terminal se convierte en un grupo maleimidilo, y P^4 representa un grupo protector.

15 El compuesto (19) puede producirse derivatizando el compuesto (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto o similar y haciéndolo reaccionar en presencia de una base con el ácido carboxílico peptídico (18) que tiene el terminal C protegido con P^4 . Las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el disolvente inerte utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (18) y el compuesto (11) pueden seleccionarse adecuadamente entre los descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^4 para el grupo carboxilo del compuesto (18) puede seleccionarse adecuadamente de entre los grupos protectores descritos anteriormente.

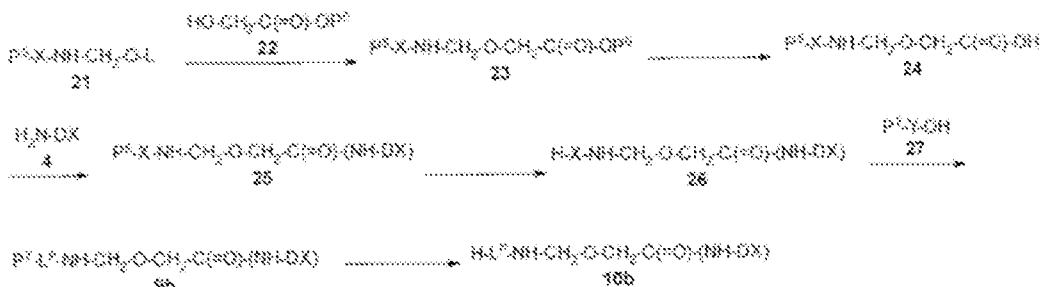
Desprotegiendo el grupo protector del grupo carboxilo del compuesto (19) obtenido, puede producirse el compuesto (20). La desprotección puede realizarse de forma similar a la desprotección del grupo carboxilo para producir el compuesto (14).

20 El compuesto (2) puede producirse derivatizando el compuesto (20) obtenido en un éster activo, anhídrido ácido mixto o similar y haciéndolo reaccionar con el compuesto (7). Para la reacción, también pueden utilizarse los reactivos y las condiciones de reacción que se emplean generalmente para la síntesis de péptidos, y las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el disolvente inerte utilizados para la reacción pueden seleccionarse adecuadamente de entre los descritos para la síntesis del compuesto (6).

4. Método de producción 4

A continuación, se describe en detalle el método para producir el compuesto (10b) que tiene $n^1 = 1$, $\text{L}^a = \text{O}$ en el intermedio de producción (10) descrito en el Método de producción 2. El compuesto representado por la fórmula (10b), una sal o un solvato del mismo puede producirse de acuerdo con el siguiente método, por ejemplo.

(Fórmula 24)



En la fórmula, L^P es como se ha definido anteriormente, L representa un grupo acilo que es un grupo alcanoilo tal como un grupo acetilo o un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo, o un átomo de hidrógeno, X e Y representan cada uno un oligopéptido formado por 1 a 3 aminoácidos, P^5 y P^7 representan cada uno un grupo protector para un grupo amino, y P^6 representa un grupo protector para un grupo carboxilo.

5 Un compuesto representado por la fórmula (21) puede producirse usando o aplicando el método descrito en la

Patente japonesa abierta al público 2002-60351 o la bibliografía (J. Org. Chem., Vol. 51, página 3196, 1986), y llevando a cabo la eliminación de los grupos protectores o la modificación de los grupos funcionales, si es necesario. Además, también puede obtenerse tratando un aminoácido con un grupo amino terminal protegido o una amida ácida de un oligopéptido con grupo amino protegido con un aldehído o una cetona.

10 Haciendo reaccionar el compuesto (21) con el compuesto (22) que tiene un grupo hidroxilo a una temperatura que oscila entre en condiciones de temperatura de enfriamiento a temperatura ambiente en un disolvente inerte en presencia de un ácido o una base, puede producirse el compuesto (23).

15 Aquí, ejemplos del ácido que puede usarse incluyen un ácido inorgánico tal como ácido fluorhídrico, ácido

clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y ácido bórico; un ácido orgánico como ácido acético, ácido cítrico, ácido paratolueno sulfónico y ácido metanosulfónico; y un ácido de Lewis tal como tetrafluoroborato, cloruro de zinc, cloruro de estaño, cloruro de aluminio y cloruro de hierro. Entre ellos, es preferible un ácido sulfónico, en particular, el ácido paratolueno sulfónico. En cuanto a la base, puede seleccionarse y utilizarse adecuadamente cualquiera de las bases ya mencionadas. Entre los ejemplos preferidos de los mismos se incluyen un alcóxido de metal alcalino, tal como el tert-butóxido potásico, un hidróxido de metal alcalino, tal como el hidróxido sódico y el hidróxido potásico; un hidruro de metal alcalino o alcalinotérreo, tal como el hidruro sódico y el hidruro potásico; una base organometálica representada por dialquilamino de litio, tal como la diisopropilamida de litio; y una base organometálica de bisililamina, como la bis(trimetilsilil)amida de litio.

20 Ejemplos del disolvente a utilizar para la reacción incluyen un disolvente éter tal como tetrahidrofurano y 1,4-dioxano; y un disolvente hidrocarburo aromático tal como benceno y tolueno. Estos disolventes pueden prepararse como una mezcla con agua.

25 Además, el grupo protector para un grupo amino como se ejemplifica por P^5 no está particularmente limitado siempre que sea un grupo usado comúnmente para la protección de un grupo amino. Ejemplos representativos incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describen en el método de producción 2. Sin embargo, en la presente reacción, puede haber casos en los que el grupo protector para un grupo amino como el ejemplificado por P^5 se escinde. En tales casos, puede introducirse de nuevo un grupo protector realizando adecuadamente una reacción con un reactivo adecuado para proteger un grupo amino, según sea necesario.

30 El compuesto (24) puede producirse eliminando el grupo protector P^6 del compuesto (23). En el método de producción 2 se describen ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxilo, ejemplificado por P^6 , y puede seleccionarse adecuadamente de entre ellos. En el compuesto (23), es deseable en este caso que el grupo protector P^5 para un grupo amino y el grupo protector P^6 para un grupo carboxilo sean los grupos protectores que puedan eliminarse mediante un método o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P^5 es un grupo 9-fluorenilmetiloxy carbonilo y P^6 es un grupo bencilo. Los grupos protectores pueden seleccionarse en función, por ejemplo, de las propiedades de un compuesto que tenga el grupo amino y el grupo carboxilo que se desea proteger. Para la eliminación de los grupos protectores, los reactivos y las condiciones se seleccionan en función del grupo protector.

35 El compuesto (26) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico (24) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido o similar y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) o una sal farmacológicamente aceptable del mismo para producir el compuesto (25) seguido de la eliminación del grupo protector P^5 del compuesto (25) obtenido. Para la reacción entre el compuesto (4) y el ácido carboxílico (24) y la reacción para

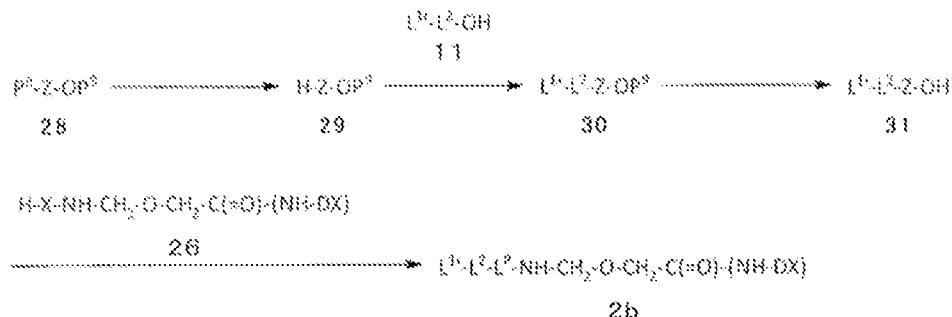
eliminar el grupo protector P⁶, pueden emplearse los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el método de producción 2.

5 El compuesto (10b) puede producirse haciendo reaccionar el compuesto (26) con un aminoácido con un grupo amino terminal protegido o el oligopéptido (27) con un grupo amino protegido para producir el compuesto (9b) y eliminando el grupo protector P⁷ del compuesto (9b) obtenido. El grupo protector para un grupo amino representado por P⁷ no está particularmente limitado siempre que se utilice generalmente para la protección de un grupo amino. Ejemplos representativos de los mismos incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describen en el método de producción 2. Para eliminar el grupo protector, los reactivos y las condiciones se seleccionan basándose en el grupo protector. Para la reacción entre el compuesto (26) y el compuesto (27), pueden emplearse reactivos y condiciones de reacción que se utilizan habitualmente para la síntesis de péptidos. El compuesto (10b) producido por el método mencionado puede derivatizarse en el compuesto (1) de la presente invención de acuerdo con el método descrito anteriormente.

5. Método de producción 5

10 A continuación, se describe en detalle el método para producir el compuesto (2) que tiene n¹ = 1, n² = 1, L^a = O en el intermedio de producción (2) descrito en Método de producción 2. El compuesto representado por la fórmula (2), una sal o un solvato del mismo puede producirse de acuerdo con el siguiente método, por ejemplo.

[Fórmula 25]



20 En la fórmula, L¹, L², L^P son como se han definido anteriormente, Z representa un oligopéptido que consta de 1 a 3 aminoácidos, P⁸ representa un grupo protector para un grupo amino, y P⁹ representa un grupo protector para un grupo carboxi.

25 El compuesto (30) puede producirse eliminando el grupo protector P⁸ del aminoácido u oligopéptido (28) con el grupo amino terminal protegido y el grupo carboxi para producir el compuesto (29) y haciendo reaccionar la forma amina obtenida (29) con el compuesto (11). El grupo protector de un grupo amino representado por P⁸ no está particularmente limitado siempre que sea un grupo utilizado habitualmente para la protección de un grupo amino.

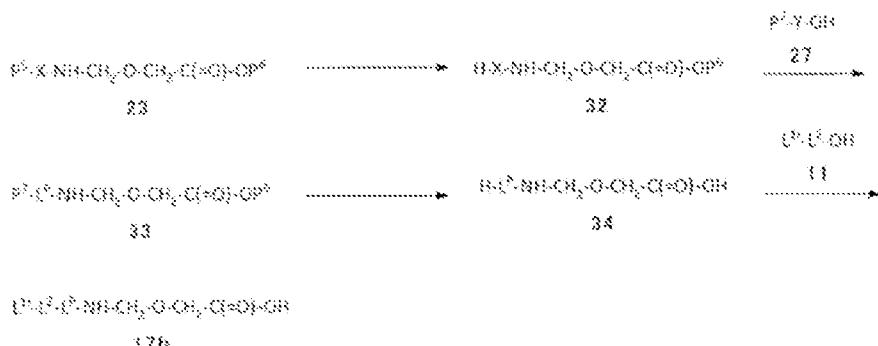
30 Ejemplos representativos incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describen en el método de producción 2. Además, para eliminar el grupo protector P⁸, pueden seleccionarse reactivos y condiciones en función del grupo protector. Para la reacción entre el compuesto (29) y el ácido carboxílico (11), pueden utilizarse los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el método de producción 2.

35 El intermedio de producción (2b) puede producirse eliminando el grupo protector P⁹ del compuesto (30) para producir el compuesto (31) y haciendo reaccionar el ácido carboxílico (31) obtenido con el compuesto (26). Los ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxilo representado por P⁸ se describen en el método de producción 2. Para la reacción de desprotección de la misma, pueden utilizarse los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el método de producción 2. Para la reacción entre el compuesto (26) y el ácido carboxílico (31), pueden utilizarse también los reactivos y condiciones de reacción que se emplean generalmente para la síntesis de péptidos. El compuesto (2b) producido por el método mencionado puede derivatizarse en el compuesto (1) de la presente invención de acuerdo con el método descrito anteriormente.

6. Método de producción 6

40 A continuación, se describe en detalle un método para producir el compuesto (17b) que tiene n¹ = 1, n² = 1, L^a = O en el intermedio de producción (17) descrito en el método de producción 2. El compuesto representado por la fórmula (17b), una sal o un solvato del mismo puede producirse también de acuerdo con el método siguiente, por ejemplo.

[Fórmula 26]



En la fórmula, L¹, L², L^P, X, Y, P⁵, P⁶, y P⁷ son como se han definido anteriormente.

El compuesto (33) puede producirse desprotegiendo el grupo protector P⁵ para el grupo amino del compuesto (23) que tiene el grupo amino terminal protegido y el grupo carboxi para producir el compuesto (32) y haciendo

5 reaccionar el derivado de amina obtenido (32) con el oligopéptido (27) que tiene un grupo amino terminal protegido o un grupo amino protegido. El grupo protector de un grupo amino representado por P⁵ no está particularmente limitado siempre que sea un grupo utilizado habitualmente para la protección de un grupo amino. Ejemplos 10 representativos incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describen en el método de producción 2. Además, para eliminar el grupo protector P⁵, pueden seleccionarse reactivos y condiciones en función del grupo 15 protector. En el presente documento, aunque ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxilo como se representa por P⁶ y el grupo protector para un grupo amino como se representa por P⁷ incluyen los grupos protectores para un grupo carboxilo y un grupo amino que se describen en el método de producción 2. Es deseable que en el compuesto (33), el grupo protector P⁶ para un grupo carboxi y el grupo protector P⁷ para un grupo amino sean grupos protectores que puedan eliminarse por el mismo método o en las mismas condiciones. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P⁶ es un grupo éster bencílico y P⁷ es un grupo benciloxicarbonilo.

El compuesto (34) puede producirse eliminando el grupo protector P⁶ para el grupo carboxilo del compuesto (33) y el grupo protector P⁷ para el grupo amino del compuesto (33). El compuesto (37) también puede producirse 20 eliminando secuencialmente el grupo protector P⁶ para el grupo carboxi y el grupo protector P⁷ para el grupo amino, y además, el compuesto (34) puede producirse simplemente eliminando a la vez ambos grupos protectores P⁶ y P⁷ que pueden eliminarse por el mismo método o en las mismas condiciones.

El compuesto (17b) puede producirse haciendo reaccionar el compuesto obtenido (34) con el compuesto (11). Para la reacción entre el compuesto (34) y el compuesto (11), pueden utilizarse los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el método de producción 2.

25 El conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención, cuando se deja al aire o se recristaliza o purifica, puede absorber humedad o tener agua de adsorción o convertirse en un hidrato, y tales compuestos o sales que contienen agua también se incluyen en la presente invención.

También se incluyen en la presente invención compuestos marcados con diversos isótopos radiactivos o no 30 radiactivos. Uno o más átomos que constituyen el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención pueden contener un isótopo atómico en una proporción no natural. Algunos ejemplos de isótopos atómicos son el deuterio (2H), el tritio (3H), el yodo-125 (125I) y el carbono-14 (14C). Además, el compuesto de la presente invención puede 35 estar marcado radiactivamente con un isótopo radiactivo tal como tritio (3H), yodo-125 (125I), carbono-14 (14C), cobre-64 (64Cu), circonio-89 (89Zr), yodo-124 (124I), flúor-18 (18F), indio-111 (111I), carbono-11 (11C) y yodo-131 (131I). El compuesto marcado con un isótopo radiactivo es útil como agente terapéutico o profiláctico, como reactivo de 40 investigación, tal como reactivo de ensayo, y tal como agente de diagnóstico, como agente de diagnóstico por imagen in vivo. Sin estar relacionado con la radiactividad, cualquier tipo de variante isotópica del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención está dentro del alcance de la presente invención.

[Fármacos]

El conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención exhibe actividad citotóxica contra células 45 cancerosas, y por lo tanto, puede usarse como fármaco, particularmente como agente terapéutico y/o agente profiláctico para el cáncer.

Es decir, el conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención puede usarse selectivamente como un fármaco para quimioterapia, que es un método principal para tratar el cáncer, y como resultado, puede retrasar el desarrollo de células cancerosas, inhibir el crecimiento de las mismas, y matar más células cancerosas. Esto

5 puede permitir a los pacientes de cáncer liberarse de los síntomas causados por el cáncer o lograr una mejora de la QOL de los pacientes de cáncer y consigue un efecto terapéutico al mantener la vida de los pacientes de cáncer. Aunque el conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención no consiga matar las células cancerosas, puede lograr una mayor QOL de los pacientes con cáncer y una supervivencia a más largo plazo, al inhibir o controlar el crecimiento de las células cancerosas.

En dicha terapia farmacológica, puede usarse como fármaco solo y además, puede usarse como fármaco en combinación con una terapia adicional en terapia adyuvante y puede combinarse con operación quirúrgica, radioterapia, terapia hormonal o similares. Además, también puede utilizarse como fármaco para la terapia neoadyuvante.

10 Además del uso terapéutico como se ha descrito anteriormente, también puede esperarse un efecto de supresión del crecimiento de pequeñas células cancerosas metastásicas y de eliminación adicional de las mismas. En particular, cuando se confirma la expresión de HER2 en células cancerosas primarias, puede esperarse la inhibición de la metástasis del cáncer o un efecto profiláctico mediante la administración del conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención. Por ejemplo, se puede esperar un efecto de inhibición y eliminación 15 de células cancerosas en un fluido corporal en el curso de la metástasis o un efecto de, por ejemplo, inhibición y eliminación de pequeñas células cancerosas inmediatamente después de su implantación en cualquier tejido. En consecuencia, cabe esperar una inhibición de la metástasis del cáncer o un efecto profiláctico, en particular, tras la extirpación quirúrgica del cáncer.

20 Puede esperarse que el conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención ejerza un efecto terapéutico por administración como terapia sistémica a pacientes, y adicionalmente, por administración local a tejidos cancerosos.

25 Ejemplos del tipo de cáncer al que se aplica el conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención pueden incluir cáncer de pulmón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de cuello uterino, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas, cáncer peritoneal, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de útero, cáncer de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de vulva, cáncer de tiroides o cáncer de pene. El sujeto de tratamiento del conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención es una célula cancerosa que expresa, en una célula cancerosa como sujeto de tratamiento, la proteína HER2 que el anticuerpo dentro del conjugado anticuerpo-fármaco puede reconocer. El término "cáncer que expresa la proteína HER2", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, es un cáncer que contiene células que tienen la proteína HER2 en su superficie celular. La proteína HER2 se sobreexpresa en diversos tumores humanos y puede evaluarse mediante un método generalmente utilizado en la técnica, como el método de tinción inmunohistoquímica (IHC) para evaluar la sobreexpresión de la proteína HER2, o el método de hibridación fluorescente in situ (FISH) para evaluar la 30 amplificación del gen HER2.

35 Además, el conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención exhibe un efecto antitumoral al reconocer, a través de su anticuerpo anti-HER2, la proteína HER2 expresada en la superficie de las células cancerosas e internalizarse en las células cancerosas. Así, el objeto de tratamiento del conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención no se limita al "cáncer que expresa la proteína HER2" y también puede 40 ser, por ejemplo, leucemia, linfoma maligno, plasmocitoma, mieloma o sarcoma.

45 El conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención puede administrarse preferentemente a un mamífero, pero se administra más preferentemente a un humano.

50 Las sustancias utilizadas en una composición farmacéutica que contiene conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención pueden seleccionarse y aplicarse adecuadamente a partir de aditivos de formulación o similares que se utilizan generalmente en la técnica, en vista de la dosificación o concentración de administración.

55 El conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención puede administrarse como una composición farmacéutica que contiene al menos un ingrediente farmacéuticamente adecuado. Por ejemplo, la composición farmacéutica anterior contiene típicamente al menos un portador farmacéutico (por ejemplo, líquido esterilizado). En este caso, el líquido incluye, por ejemplo, agua y aceite (aceite de petróleo y aceite de origen animal, vegetal o sintético). El aceite puede ser, por ejemplo, aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral o aceite de sésamo. El agua es un portador más típico cuando la composición farmacéutica anterior se administra por vía intravenosa. También se pueden utilizar como vehículo líquido, en particular, para una solución inyectable, una solución salina, una solución acuosa de dextrosa y una solución acuosa de glicerol. Un vehículo farmacéutico adecuado puede seleccionarse de los conocidos en la técnica. Si se desea, la composición anterior también puede contener una pequeña cantidad de un agente hidratante, un agente emulsionante o un agente amortiguador del pH. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin se dan ejemplos de soportes farmacéuticos adecuados. Las formulaciones corresponden a un modo de administración.

Se conocen diversos sistemas de administración que pueden usarse para administrar el conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención. Ejemplos de la vía de administración pueden incluir las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea, pero sin limitarse a ellas. La administración puede realizarse mediante inyección o inyección en bolo, por ejemplo. De acuerdo con una realización preferida específica, la administración del conjugado anticuerpo-fármaco se realiza mediante inyección. La vía de administración preferida es la parenteral.

De acuerdo con una realización representativa, la composición farmacéutica se prescribe, como composición farmacéutica adecuada para administración intravenosa a humanos, de acuerdo con los procedimientos convencionales. La composición para administración intravenosa suele ser una solución en una solución tampón acuosa estéril e isotónica. Si es necesario, el fármaco puede contener un agente solubilizante y anestésicos locales para aliviar el dolor en el lugar de la inyección (por ejemplo, lignocaína). Generalmente, el ingrediente anterior se suministra individualmente como uno cualquiera de los polvos liofilizados o un concentrado anhídrido contenido en un envase que se obtiene sellando una ampolla o una bolsita que contiene una cantidad del agente activo o como una mezcla en una forma de dosificación unitaria. Cuando el fármaco deba administrarse por inyección, podrá administrarse a partir de un frasco inyector que contenga agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando el fármaco se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril o solución salina inyectable para que los ingredientes mencionados se mezclen entre sí antes de la administración.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que contiene solamente el conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención o una composición farmacéutica que contiene el conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 y al menos un agente tratante del cáncer distinto del conjugado. El conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 de la presente invención puede administrarse con otros agentes para el tratamiento del cáncer. El efecto anticancerígeno puede potenciarse en consecuencia. Otros agentes anticancerígenos utilizados para tal fin pueden administrarse a un individuo simultáneamente, por separado o posteriormente al conjugado anticuerpo-fármaco, y pueden administrarse variando el intervalo de administración de cada uno. Algunos ejemplos de agentes para el tratamiento del cáncer son 5-FU, pertuzumab, paclitaxel, carboplatino, cisplatino, gemcitabina, capecitabina, irinotecán (CPT-11), paclitaxel, docetaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastina, vinorelbina, everolims, tanespimicina, bevacizumab, oxaliplatino, lapatinib, ado-trastuzumab emtansina(T-DM1), o medicamentos descritos en la Publicación Internacional No. WO 2003/038043, análogos de LH-RH (leuprorelina, goserelina o similares), fosfato de estramustina, antagonistas de estrógenos (tamoxifeno, raloxifeno o similares) e inhibidores de aromatasa (anastrozol, letrozol, exemestano o similares), pero no están limitados siempre que sean fármacos con actividad antitumoral.

La composición farmacéutica puede formularse en una formulación de liofilización o una formulación líquida como una formulación que tiene la composición deseada y la pureza requerida. Cuando se formula como una formulación de liofilización, puede ser una formulación que contenga aditivos de formulación adecuados que se utilizan en la técnica. También para una formulación líquida, puede formularse como una formulación líquida que contiene varios aditivos de formulación que se utilizan en el arte.

La composición y concentración de la composición farmacéutica pueden variar dependiendo del método de administración. Sin embargo, el conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER2 contenido en la composición farmacéutica de la presente invención puede exhibir un efecto farmacéutico incluso a una dosificación pequeña cuando el conjugado anticuerpo-fármaco tiene una mayor afinidad por un antígeno, es decir, una mayor afinidad (= menor valor K_d) en términos de la constante de disociación (es decir, valor K_d) para el antígeno. Así, para determinar la dosificación del conjugado anticuerpo-fármaco, la dosificación puede determinarse teniendo en cuenta la situación relativa a la afinidad entre el conjugado anticuerpo-fármaco y el antígeno. Cuando el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención se administra a un ser humano, por ejemplo, pueden administrarse aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg una vez o varias veces con un intervalo de durante 1 a 180 días.

en una sola vez con un intervalo de 1 a 180 días

Ejemplos

La presente invención se describe específicamente a la vista de los ejemplos que se muestran a continuación. Sin embargo, la presente invención no se limita a éstos. Además, no se interpreta de forma limitada. Además, a menos que se describa específicamente lo contrario, el reactivo, el disolvente y el material de partida descritos en la especificación pueden obtenerse fácilmente de un proveedor comercial.

Ejemplo de referencia 1 Preparación de trastuzumab

Se disolvieron 14 viales de 440 mg/vial de Herceptin (Genentech, Inc.) en 2 L de tampón A de cromatografía de intercambio catiónico (tampón citrato 25 mM, NaCl 30 mM, pH 5,0) y se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm (Millipore Corp.: Stericup 0,22 µm, Membrana GVPVDF). Las muestras se aplicaron a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose HP 240 ml, columna XK50), seguida de elución bajo un gradiente lineal de concentración de NaCl de 30 mM a 500 mM utilizando el tampón B de cromatografía de intercambio catiónico (tampón citrato 25 mM, NaCl 500 mM, pH 5,0) para separar las fracciones de monómeros de

IgG. Las muestras de monómero con una pureza superior al 98% mediante análisis de cromatografía de exclusión por tamaño se combinaron y concentraron con UF30K (Millipore Corp.: PELLICON XL Filter, BIOMAX 30K, PXB030A50), y el tampón se sustituyó por el tampón CBS (10 mM citrato/140 mM NaCl, pH 6,0). Las muestras sustituidas por tampón CBS se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm (Sartorius AG: Minisart-Plus 0,2 µm, 17823K).

5 **Ejemplo de referencia 2 Producción de trastuzumab emtansina T-DM1**

Derivatización SMCC del anticuerpo: Usando el procedimiento común C-2 (se usó PBS6,5/EDTA como solución tampón), el procedimiento común A, y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,37 mLmg⁻¹cm⁻¹) descritos en el Método de producción 1, la sustitución del tampón por PBS6,5/EDTA en el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 para preparar una solución que contenía trastuzumab (160,0 mg) disuelto en PBS6,5/EDTA (7,60 mL) en un tubo de polipropileno de 15 mL. Posteriormente, se añadió SMCC (1,84 mg) solución DMSO (0,40 mL; lo que corresponde a aproximadamente 5,1 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se ajustó para tener una concentración de anticuerpo de 20mg/mL, y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) durante 2 horas. Esta solución de reacción se sometió a purificación de acuerdo 10 con el procedimiento común D-2 (se utilizó PBS6,5/EDTA como solución tampón) para obtener 12 mL de una solución que contenía 154,9 mg del anticuerpo derivatizado con SMCC. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador del fármaco: Adición de PBS6,5/EDTA (2,56 mL) y N²-deacetil-N²-(3-mercaptopropano-1-oxopropil)-maytansina (4,67 mg; DM1, Journal of Medicinal Chemistry, 2006, Vol. 49, No. 14, p. 4392) DMA (dimetilacetamida) (0,93 mL; lo que corresponde a aproximadamente 5,8 equivalentes por molécula de anticuerpo derivatizado SMCC) a la 15 solución obtenida anteriormente en el tubo de polipropileno de 50 mL a temperatura ambiente, la solución de reacción se ajustó a una concentración de anticuerpo de 10 mg/mL, y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando un rotador de tubo durante 16,5 horas.

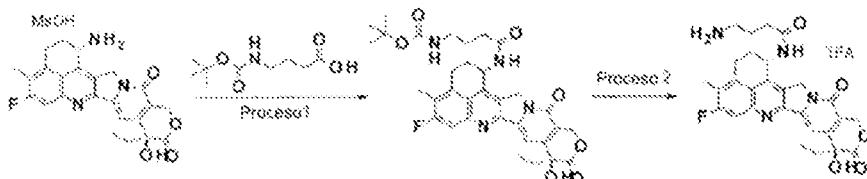
20 Procedimiento de purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D-1 utilizando una solución amortiguadora de fosfato sódico (10 mM, pH 6,5) que contenía cloruro sódico (137 mM) para obtener 35 mL de una solución que contenía el compuesto objetivo del Ejemplo de Referencia.

25 Caracterización fisicoquímica: Mediante el procedimiento común E utilizando la absorbancia UV a dos longitudes de onda de 252 nm y 280 nm, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo 4,14 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 144,9 mg (91%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 3,0.

30 **Ejemplo 1 Intermedio (1)**

(Fórmula 27)



Proceso 1: tert-butil [(4-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino)-4-oxobutil]carbamato

35 Se disolvió ácido 4-(tert-Butoxicarbonilamino)butanoico (0,237 g, 1,13 mmol) en diclorometano (10 mL), se añadieron N-hidroxisuccinimida (0,130 g, 1,13 mmol) y clorhidrato de 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,216 g, 1,13 mmol) y se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (10 mL) cargada con sal de ácido metanosulfónico de exatecán (0,500 g, 0,94 mmol) y trietilamina (0,157 mL, 1,13 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para producir el compuesto titulado (0,595 g, cuantitativo).

40 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,31 (9H, s), 1,58 (1H, t, J=7,2 Hz), 1,66 (2H, t, J=7,2 Hz), 1,82-1,89 (2H, m), 2,12-2,21 (3H, m), 2,39 (3H, s), 2,92 (2H, t, J=6,5 Hz), 3,17 (2H, s), 5,16 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,59-5,55 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,78 (1H, t, J=6,3 Hz), 7,30 (1H, s), 7,79 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,40 (1H, d, J=8,6 Hz).

45 MS (APCI) m/z: 621 (M+H)⁺

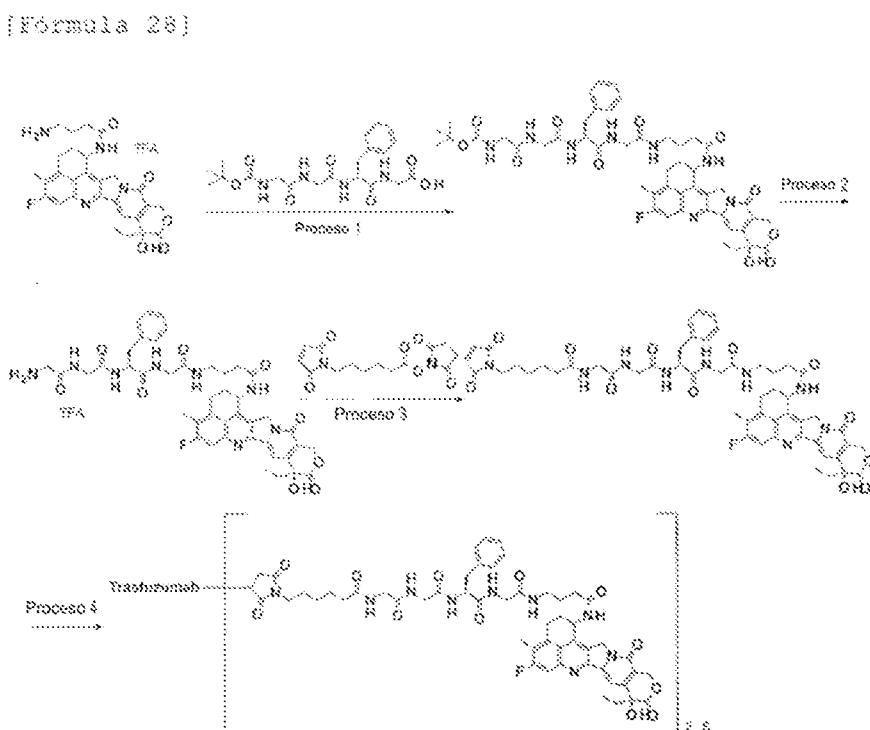
Proceso 2: 4-Amino-N-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]butanamida

El compuesto (0,388 g, 0,61 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se disolvió en diclorometano (9 mL). Se añadió ácido trifluoroacético (9 mL) y se agitó durante 4 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica particionada de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir trifluoroacetato del compuesto titulado (0,343 g, cuantitativo).

10 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,87 (3H, t, $J=7,2$ Hz), 1,79-1,92 (4H, m), 2,10-2,17 (2H, m), 2,27 (2H, t, $J=7,0$ Hz), 2,40 (3H, s), 2,80-2,86 (2H, m), 3,15-3,20 (2H, m), 5,15 (1H, d, $J=18,8$ Hz), 5,26 (1H, d, $J=18,8$ Hz), 5,42 (2H, s), 5,54-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,72 (3H, brs), 7,82 (1H, d, $J=11,0$ Hz), 8,54 (1H, d, $J=8,6$ Hz).

MS (APCI) m/z: 521 (M+H) $^+$

Ejemplo 2 Conjugado anticuerpo-fármaco (2)



15 Proceso 1: N-(tert-Butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-4-oxobutil)glicinamida

20 Se disolvió N-(tert-Butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanilglicina (0,081 g, 0,19 mmol) en diclorometano (3 mL), se añadió N-hidroxisuccinimida (0,021 g, 0,19 mmol) y clorhidrato de 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,036 g, 0,19 mmol) y se agitó durante 3,5 horas. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (1,5 mL) cargada con el compuesto (0,080 g, 0,15 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 1, y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para obtener el compuesto del título (0,106 g, 73%).

25 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,87 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,36 (9H, s), 1,71 (2H, m), 1,86 (2H, t, $J=7,8$ Hz), 2,15-2,19 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,77 (1H, dd, $J=12,7, 8,8$ Hz), 3,02 (1H, dd, $J=14,1, 4,7$ Hz), 3,08-3,11 (2H, m), 3,16-3,19 (2H, m), 3,54 (2H, d, $J=5,9$ Hz), 3,57-3,77 (4H, m), 4,46-4,48 (1H, m), 5,16 (1H, d, $J=19,2$ Hz), 5,25 (1H, d, $J=18,8$ Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,00 (1H, t, $J=6,3$ Hz), 7,17-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,71 (1H, t, $J=5,7$ Hz), 7,80 (1H, d, $J=11,0$ Hz), 7,92 (1H, t, $J=5,7$ Hz), 8,15 (1H, d, $J=8,2$ Hz), 8,27 (1H, t, $J=5,5$ Hz), 8,46 (1H, d, $J=8,2$ Hz).

30 MS (APCI) m/z: 939 (M+H) $^+$

Proceso 2: Glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-4-oxobutil)glicinamida

El compuesto (1,97 g, 2,10 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se disolvió en diclorometano (7 mL). Tras añadir ácido trifluoroacético (7 mL), se agitó durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos se cargaron con tolueno para la destilación azeotrópica. Los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica particionada de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir trifluoroacetato del compuesto titulado (1,97 g, 99%).

10 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,71-1,73 (2H, m), 1,82-1,90 (2H, m), 2,12-2,20 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,75 (1H, dd, J=13,7, 9,4 Hz), 3,03-3,09 (3H, m), 3,18-3,19 (2H, m), 3,58-3,60 (2H, m), 3,64 (1H, d, J=5,9 Hz), 3,69 (1H, d, J=5,9 Hz), 3,72 (1H, d, J=5,5 Hz), 3,87 (1H, dd, J=16,8, 5,9 Hz), 4,50-4,56 (1H, m), 5,16 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 7,17-7,27 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,78-7,81 (2H, m), 7,95-7,97 (3H, m), 8,33-8,35 (2H, m), 8,48-8,51 (2H, m).

MS (APCI) m/z: 839 (M+H)⁺

15 Proceso 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-[(1S,9S)-9-ethyl -5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolina -1-il]amino)-4-oxobutil)glicinamida

20 A una solución de N,N-dimetilformamida (1,2 mL) del compuesto (337 mg, 0,353 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior, se añadieron trietilamina (44,3 mL, 0,318 mmol) y hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida (119,7 mg, 0,388 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 5 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (278,0 mg, 76%).

25 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,66-1,76 (2H, m), 1,80-1,91 (2H, m), 2,05-2,21 (6H, m), 2,39 (3H, s), 2,79 (1H, dd, J=1,0, 9,8 Hz), 2,98-3,21 (5H, m), 3,55-3,77 (8H, m), 4,41-4,48 (1H, m), 5,15 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,40 (1H, d, J=17,1 Hz), 5,44 (1H, d, J=17,1 Hz), 5,54-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,20-7,27 (5H, m), 7,30 (1H, s), 7,70 (1H, t, J=5,5 Hz), 7,80 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,8 Hz), 8,08 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,14 (1H, d, J=7,9 Hz), 8,25 (1H, t, J=6,1 Hz), 8,46 (1H, d, J=8,5 Hz).

MS (APCI) m/z: 1032 (M+H)⁺

Proceso 4: Conjugado anticuerpo-fármaco (2)

30 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/mL con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,37 mlmg⁻¹cm⁻¹) descritos en el Método de producción 1. La solución (3,0 mL) se colocó en un tubo de polipropileno de 15 mL y se cargó con una solución acuosa de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina 10 mM (TCEP, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0934 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,150 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora.

40 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras incubar la solución anterior a 22°C durante 10 minutos, se añadió a la misma una solución de DMSO (0,187 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 3 y se incubó para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a 22°C durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,0374 mL; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de N-acetilcisteína (NAC, Sigma-Aldrich Co. LLC) y se incubó a 22°C para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos.

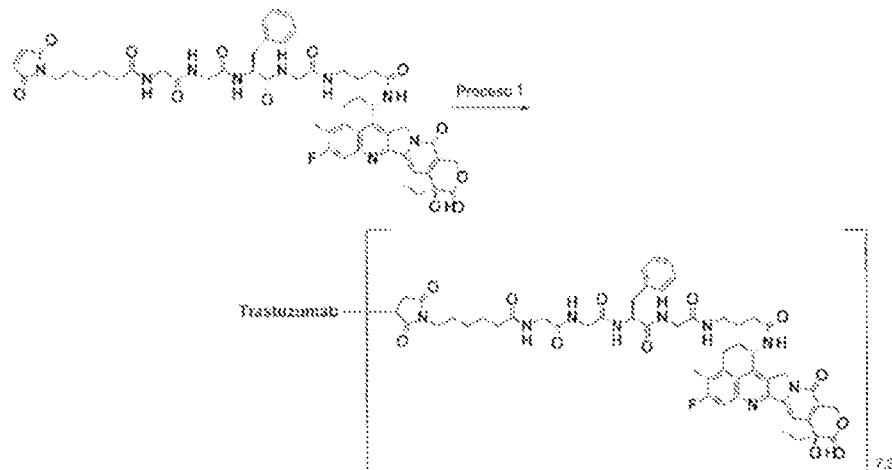
45 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación utilizando el procedimiento común D-1 (se utilizó PBS6,0 como solución tampón) descrito en el método de producción 1 para obtener 6 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado. Después, la solución se concentró por el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E descrito en el método de producción 1, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

50 Concentración de anticuerpos: 3,21 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 22,5 mg (75%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 2,6.

Ejemplo 3 Conjugado anticuerpo-fármaco (3)

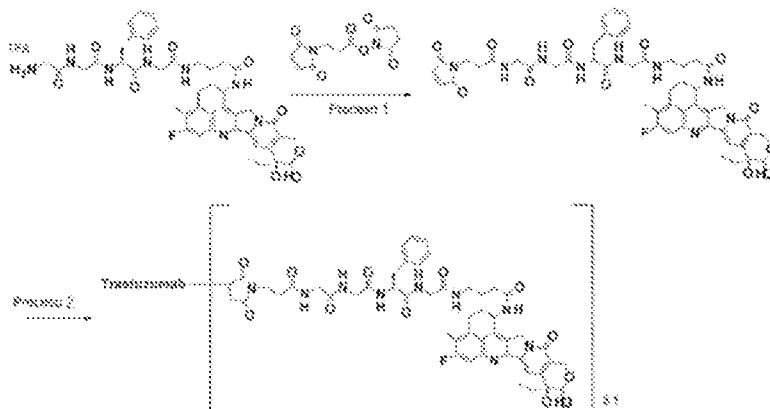
[Fórmula 29]

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (3)

- Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó $1.487 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (1,25 mL) se colocó en un tubo de polipropileno de 1,5 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,039 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,0625 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador del fármaco: Despues de añadir DMSO (0,072 mL) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 3 del Ejemplo 2 (0,078 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó utilizando un rotador de tubos para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,0155 mL; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación utilizando el procedimiento común D (se utilizó ABS como solución tampón) descrito en el método de producción 1 para obtener 6 mL de una solución que contenía el compuesto de interés. La solución se concentró aún más por el procedimiento común A. Despues, utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.
- Concentración de anticuerpos: 9,85 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 6,9 mg (55%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 7,3.

Ejemplo 4 Conjugado anticuerpo-fármaco (4)

[Fórmula 30]



Proceso 1: N-[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino]-4-oxobutil)glicinamida

5 El compuesto (80 mg, 0,084 mmol) del Ejemplo 1 se hizo reaccionar de la misma manera que el Proceso 3 del Ejemplo 2 usando N-succinimidil 3-maleimida propioato (24,6 mg, 0,0924 mmol) en lugar de N-succinimidil 6-maleimida hexanoato para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (60,0 mg, 73%).

10 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,89 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,70-1,78 (2H, m), 1,81-1,94 (2H, m), 2,12-2,23 (4H, m), 2,42 (3H, s), 2,81 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 3,01-3,15 (3H, m), 3,16-3,23 (2H, m), 3,30-3,35 (1H, m), 3,58-3,71 (6H, m), 3,71-3,79 (1H, m), 4,44-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,0 Hz), 5,27 (1H, d, J=19,0 Hz), 5,43 (1H, d, J=17,6 Hz), 5,47 (1H, d, J=17,6 Hz), 5,57-5,63 (1H, m), 6,56 (1H, s), 7,02 (2H, s), 7,17-7,22 (1H, m), 7,22-7,30 (5H, m), 7,34 (1H, s), 7,73 (1H, t, J=5,6 Hz), 7,83 (1H, d, J=10,7 Hz), 8,08 (1H, t, J=5,6 Hz), 8,15 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,30 (2H, dt, J=18,7, 5,7 Hz), 8,49 (1H, d, J=8,8 Hz).

MS (APCI) m/z: 990 (M+H)⁺

Proceso 2: Conjugado anticuerpo-fármaco (4)

15 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó 1,48 ml mg⁻¹ cm⁻¹). La solución (1 mL) se colocó en un tubo de polipropileno de 1,5 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,0155 mL; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,050 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador del fármaco: Despues de añadir DMSO (0,072 mL) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 3 del Ejemplo 2 (0,031 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó utilizando un rotador de tubos para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,0078 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D (se utilizó ABS como solución tampón) para obtener 6 mL de una solución que contenía el compuesto de interés. Utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

20

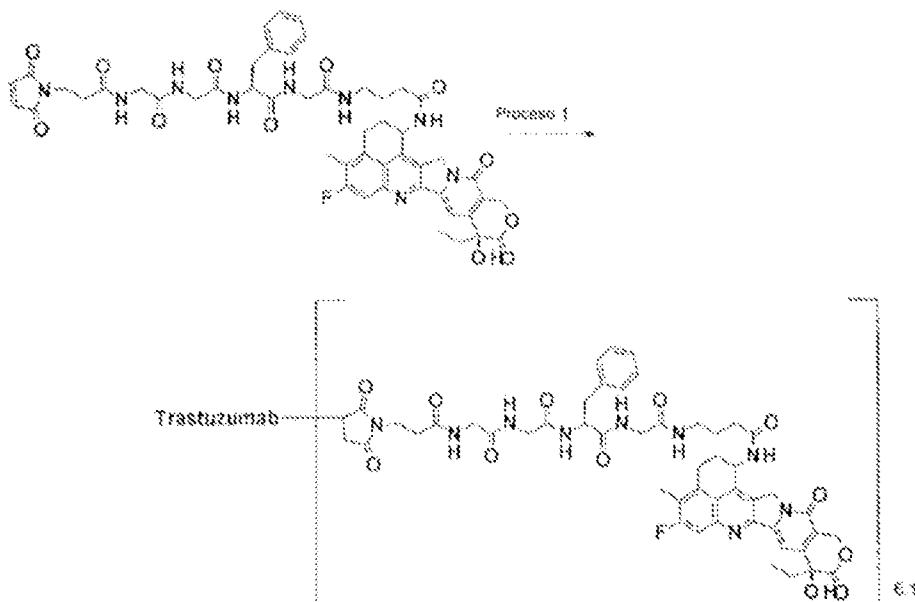
25

30

Concentración de anticuerpos: 1,32 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,9 mg (79%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 3,1.

Ejemplo 5 Conjugado anticuerpo-fármaco (5)

{Fórmula 31}



Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (5)

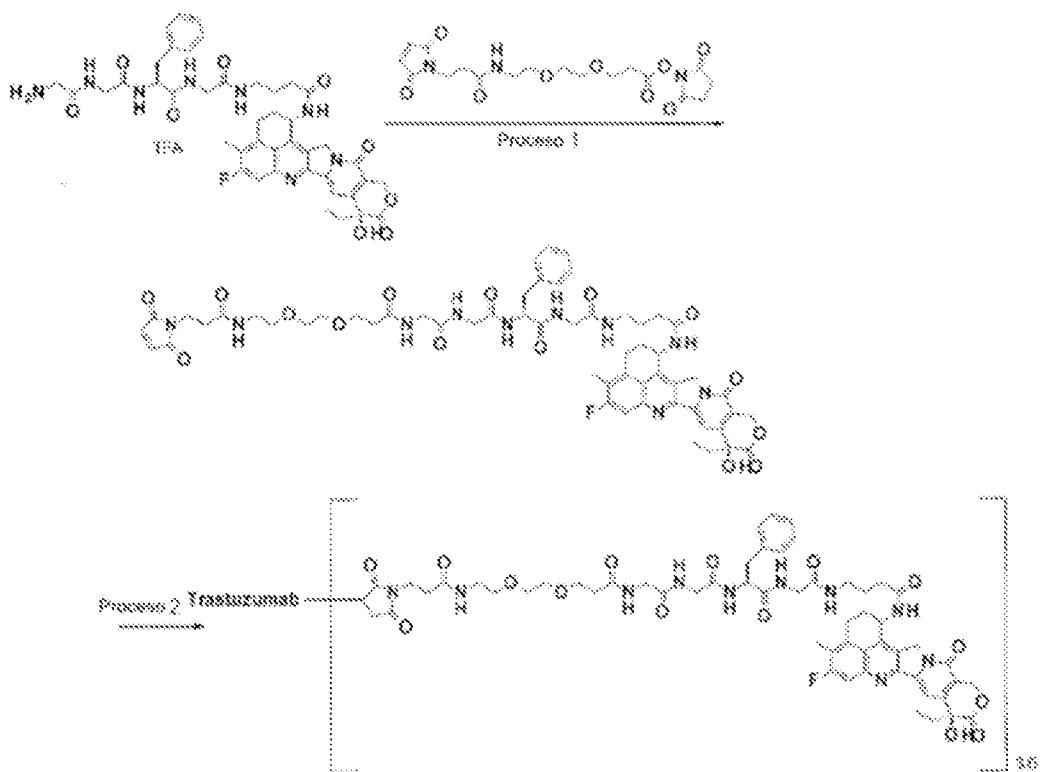
La cantidad de la solución acuosa de TCEP 10 mM se ajustó de tal manera que la relación molar de TCEP con el anticuerpo en la reducción de anticuerpo fuera 4,6. Y la cantidad de la solución 10 mM de enlazador de fármaco añadida se ajustó de forma que la relación molar del compuesto del Proceso 1 del Ejemplo 4 con el anticuerpo en

5 la conjugación del enlazador de fármaco fuera de 9,2. A continuación, se ajustó la cantidad de la solución acuosa de 100 mM de NAC añadida de forma que la relación molar de NAC con respecto al anticuerpo al finalizar la reacción fuera de 18,4. Por los mismos procedimientos que en el Proceso 2 del Ejemplo 4, se obtuvieron 6 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado, y se obtuvieron los siguientes valores

10 Concentración de anticuerpos: 1,23 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,4 mg (74%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 6,1.

Ejemplo 6: Conjugado anticuerpo-fármaco (6)

(Fórmula 32)



Proceso 1: N-[3-[2-(2-[[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil]amino]etoxi]etoxi]propanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-4-oxobutil)glicinamida

El compuesto (100 mg, 0,119 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 2 se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 usando diisopropiletilamina (20,8 μ L, 0,119 mmol) en lugar de trietilamina y 3-(2-(2-(3-maleinimidopropanamida)etoxi)etoxi)propanoato de N-succinimidilo (50,7 mg, 0,119 mmol) en lugar de hexanoato de N-succinimidilo 6-maleimida para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (66,5 mg, 48%).

20 1 H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 0,85 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,65-1,74 (2H, m), 1,77-1,90 (2H, m), 2,07-2,19 (4H, m), 2,30 (2H, t, J=7,2 Hz), 2,33-2,36 (2H, m), 2,38 (3H, s), 2,76 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 2,96-3,18 (9H, m), 3,42-3,44 (4H, m), 3,53-3,76 (10H, m), 4,43 (1H, td, J=8,6, 4,7 Hz), 5,14 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,38 (1H, d, J=17,2 Hz), 5,42 (1H, d, J=17,2 Hz), 5,52-5,58 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,98 (2H, s), 7,12-7,17 (1H, m), 7,18-7,25 (4H, m), 7,29 (1H, s), 7,69 (1H, t, J=5,5 Hz), 7,78 (1H, d, J=11,3 Hz), 7,98-8,03 (2H, m), 8,11 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,16 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,23 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,44 (1H, d, J=9,0 Hz).

MS (APCI) m/z: 1149 (M+H)⁺

Proceso 2: Conjugado anticuerpo-fármaco (6)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó 1,48 ml mg⁻¹ cm⁻¹). La solución (1,25 mL) se colocó en un tubo de polipropileno de 1,5 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,019 mL; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,0625 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador del fármaco: Tras añadir DMSO (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,109 mL) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 1 (0,039 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó utilizando un rotador de tubos para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,008 mL) de NAC 100 mM y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos.

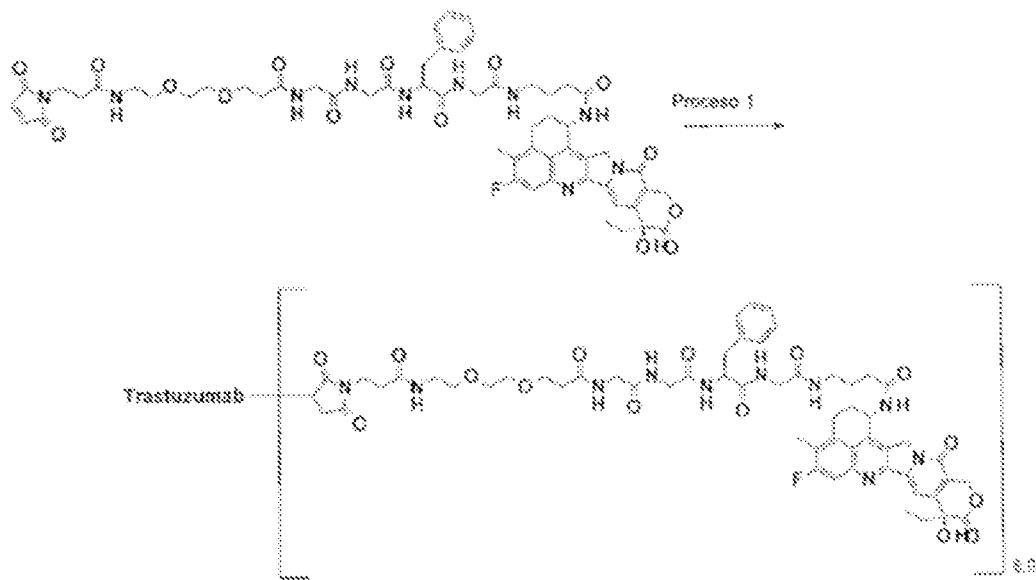
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación utilizando el procedimiento común D (se utilizó ABS como solución tampón) descrito en el método de producción 1 para obtener 6 mL de una solución que contenía el compuesto de interés.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 1,76 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 10,6 mg (85%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 3,6.

Ejemplo 7 Conjugado anticuerpo-fármaco (7)

[Fórmula 33]



Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (7)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó 1,48 ml mg⁻¹ cm⁻¹). La solución (1,25 mL) se colocó en un tubo de polipropileno de 1,5 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,039 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,0625 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador del fármaco: Despues de añadir DMSO (0,072 mL) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del

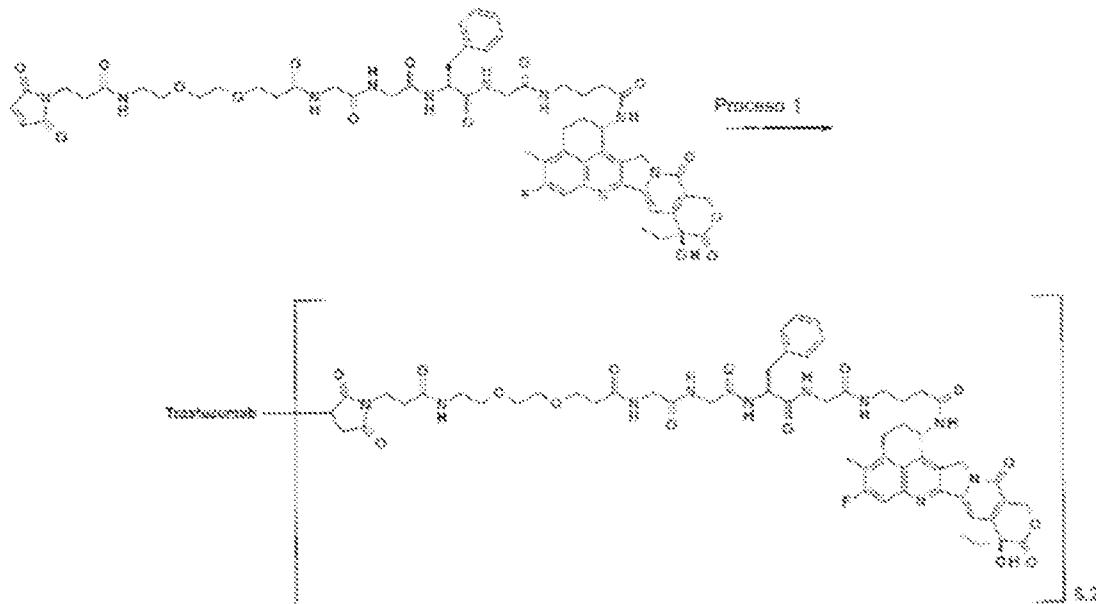
5 compuesto del Proceso 1 del Ejemplo 6 (0,078 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó utilizando un rotador de tubos para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,0155 mL) de NAC 100 mM y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D (se utilizó ABS como solución tampón) para obtener 6 mL de una solución que contenía el compuesto de interés.

10 Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

15 Concentración de anticuerpos: 1,93 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 11,6 mg (93%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 6,9.

Ejemplo 8 Conjugado anticuerpo-fármaco (8)

(Fórmula 34)



Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (8)

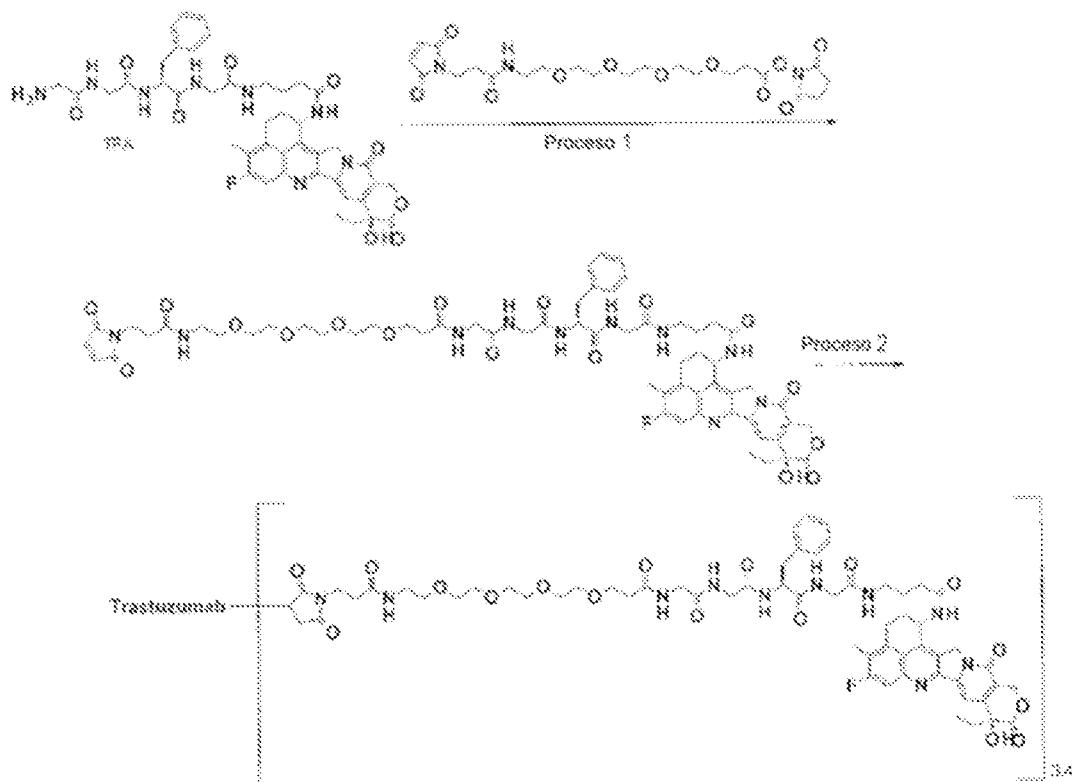
15 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó 1,48 $\text{ml mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$). La solución (1,25 mL) se colocó en un tubo de polipropileno de 1,5 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,039 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,0625 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador del fármaco: Despues de añadir DMSO (0,072 mL) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 1 del Ejemplo 6 (0,078 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó utilizando un rotador de tubos para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,0155 mL) de NAC 100 mM y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación utilizando el procedimiento común D-1 (se utilizó ABS como solución tampón) para obtener 5,7 mL de una solución que contenía el compuesto de interés.

20 Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

25 Concentración de anticuerpos: 1,50 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,55 mg (86%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 6,2.

Ejemplo 9 Conjugado anticuerpo-fármaco (9)

(Fórmula 35)



Proceso 1: N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxo-16-azanonadecan-1-oil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-4-oxobutil)glicinamida

El compuesto (90 mg, 0,107 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 2 se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 usando diisopropiletilamina (18,7 μ L, 0,107 mmol) en lugar de trietilamina y N-succinimidil 1-maleimidimid-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecan-19-oato (55,1 mg, 0,107 mmol) en lugar de N-succinimidil 6-maleimida hexanoato para producir el compuesto titulado como un sólido amarillo pálido (50 mg, 37%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 0,85 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,64-1,74 (2H, m), 1,77-1,90 (2H, m), 2,06-2,19 (4H, m), 2,27-2,32 (2H, m), 2,33-2,37 (2H, m), 2,38 (3H, s), 2,72-2,80 (3H, m), 2,96-3,19 (6H, m), 3,39-3,48 (10H, m), 3,52-3,75 (10H, m), 4,39-4,48 (1H, m), 5,14 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,38 (1H, d, J=17,0 Hz), 5,42 (1H, d, J=17,0 Hz), 5,52-5,58 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,98 (1H, s), 7,13-7,24 (5H, m), 7,29 (1H, s), 7,69 (1H, t, J=5,5 Hz), 7,78 (1H, d, J=10,9 Hz), 7,98-8,03 (2H, m), 8,10 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,16 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,23 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,44 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (APCI) m/z: 1237 (M+H)⁺

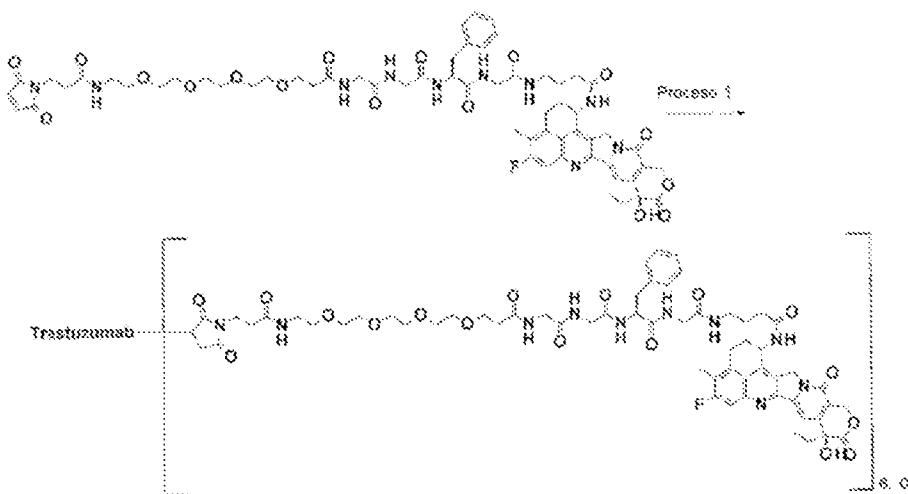
Proceso 2: Conjugado anticuerpo-fármaco (9)

Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 6.

Concentración de anticuerpos: 1,75 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 10,5 mg (84%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 3,4.

Ejemplo 10 Conjugado anticuerpo-fármaco (10)

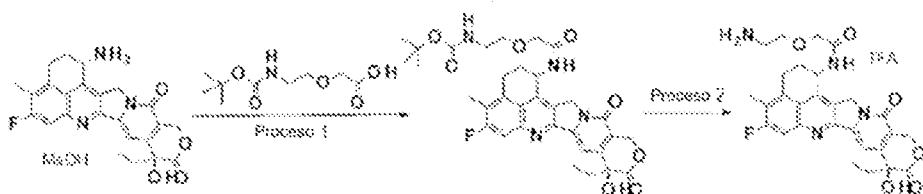
(Fórmula 36)

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (10)

- 5 Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 9, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpos: 1,79 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 10,7 mg (86%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 6,0.

Ejemplo 11 Intermedio (11)

(Fórmula 37)



- 10 Proceso 1: tert-butil [2-(2-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)etyl]carbamato

15 La sal de ácido metanosulfónico de exatecán (3,10 g, 5,47 mol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 1 usando ácido {2-[(tert-butoxicarbonil)amino]etoxi}acético (J. Med. Chem., 1992, vol. 35, pp. 292; 1,55 g, 6,01 mmol) en lugar de ácido 4-(tert-butoxicarbonilamino)butanoico para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (2,56 g, 73%).

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,26 (9H, s), 1,81-1,91 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 3,08-3,26 (4H, m), 3,43-3,53 (2H, m), 4,00 (1H, d, J=15,1 Hz), 4,05 (1H, d, J=15,1 Hz), 5,14 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,22 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,40 (1H, d, J=16,6 Hz), 5,44 (1H, d, J=16,6 Hz), 5,59-5,66 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,86 (1H, t, J=5,4 Hz), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,49 (1H, d, J=9,1 Hz).

- 20 MS (APCI) m/z: 637 (M+H)⁺

Proceso 2: 2-(2-Aminoetoxi)-N-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]acetamida

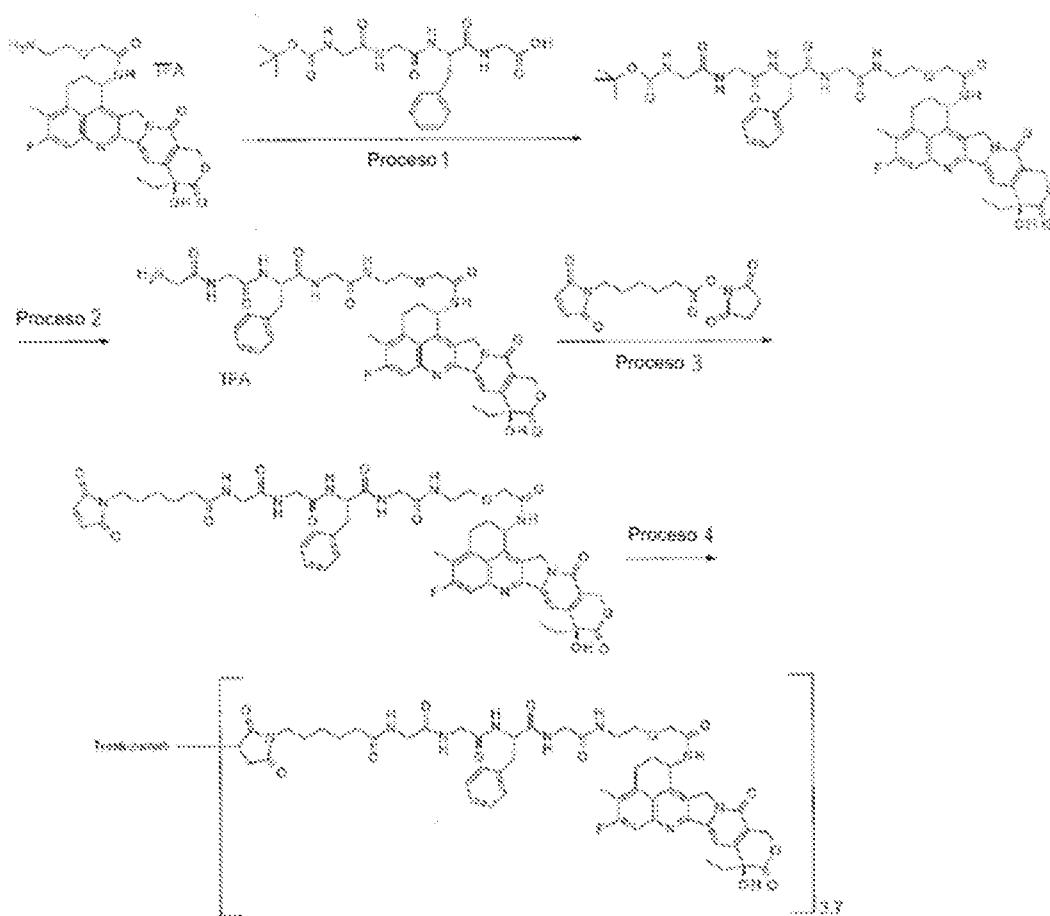
25 El compuesto (1,50 g, 2,36 mol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 1 para producir sal de ácido trifluoroacético del compuesto del título como un sólido de color amarillo pálido (1,50 g, cuantitativo).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,5 Hz), 1,81-1,92 (2H, m), 2,15-2,23 (2H, m), 2,41 (3H, s), 3,05 (2H, t, J=5,1 Hz), 3,15-3,23 (2H, m), 3,71 (2H, t, J=5,1 Hz), 4,10 (2H, s), 5,19 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,43 (2H, s), 5,58-5,66 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,33 (1H, s), 7,73-7,84 (4H, m), 8,55 (1H, d, J=9,1 Hz).

5 MS (APCI) m/z: 537 (M+H)⁺

Ejemplo 12 Conjugado anticuerpo-fármaco (12)

(Fórmula 39)



Proceso 1: N-(tert-Butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-(2-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-2-oxoetoxi)etyl]glicinamida

10 El compuesto (554 mg, 0,85 mmol) del Proceso 2 del Ejemplo 11 se hizo reaccionar de la misma manera que el Proceso 1 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título (775 mg, 95%). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,85 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,36 (9H, s), 1,78-1,89 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd, J=13,4, 9,8 Hz), 2,95 (1H, dd, J=13,4, 4,3 Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,23-3,32 (2H, m), 3,40-3,62 (8H, m), 3,73 (1H, dd, J=16,5, 5,5 Hz), 4,03 (2H, s), 4,39-4,47 (1H, m), 5,17 (1H, dd, J=18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,41 (1H, d, J=16,8 Hz), 5,45 (1H, d, J=16,8 Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,54 (1H, s), 6,99 (1H, t, J=5,8 Hz), 7,13-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,76-7,82 (2H, m), 7,90 (1H, t, J=5,2 Hz), 8,13 (1H, d, J=7,9 Hz), 8,27 (1H, t, J=5,8 Hz), 8,49 (1H, d, J=8,5 Hz).

15 MS (APCI) m/z: 955 (M+H)⁺

20 Proceso 2: Glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-(2-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-2-oxoetoxi)etyl]glicinamida

El compuesto (630 mg, 0,659 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 2 para producir sal de ácido trifluoroacético del compuesto del título (588 mg, 92%).

5 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 0,86 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,79-1,90 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd, J=13,4, 10,1 Hz), 2,99 (1H, dd, J=13,4, 4,3 Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,24-3,32 (3H, m), 3,41-3,71 (7H, m), 3,86 (1H, dd, J=16,8, 5,8 Hz), 4,04 (2H, s), 4,52 (1H, td, J=9,0, 4,1 Hz), 5,17 (1H, dd, J=18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,41 (1H, d, J=16,5 Hz), 5,45 (1H, d, J=16,5 Hz), 5,56-5,65 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,13-7,26 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,80 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,87-8,01 (4H, m), 8,29-8,36 (2H, m), 8,46-8,55 (2H, m).

MS (APCI) m/z: 855 (M+H)⁺

10 Proceso 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi]etil]glicinamida

El compuesto (240 mg, 0,247 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título (162 mg, 62%).

15 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 0,86 (3H, t, J=7,6 Hz), 1,13-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,78-1,90 (2H, m), 2,09 (2H, t, J=7,6 Hz), 2,14-2,21 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,74 (1H, dd, J=13,6, 9,7 Hz), 2,96 (1H, dd, J=13,6, 4,5 Hz), 3,08-3,24 (1H, m), 3,24-3,30 (1H, m), 3,33-3,40 (4H, m), 3,47-3,68 (7H, m), 3,72 (1H, dd, J=16,6, 5,7 Hz), 4,03 (2H, s), 4,42 (1H, td, J=8,6, 4,2 Hz), 5,17 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,40 (1H, d, J=17,2 Hz), 5,44 (1H, d, J=17,2 Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,25 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,81 (2H, m), 7,99 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,03-8,11 (2H, m), 8,22 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,47 (1H, d, J=9,1 Hz).

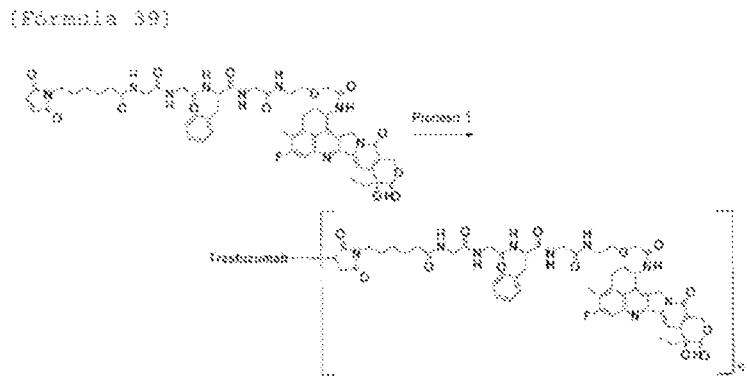
20 MS (APCI) m/z: 1048 (M+H)⁺

Proceso 4: Conjugado anticuerpo-fármaco (12)

Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 3, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 6. La solución se concentró aún más por el procedimiento común A. Después, utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron 25 los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 10,77 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,5 mg (60%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 3,7.

Ejemplo 13 Conjugado anticuerpo-fármaco (13)

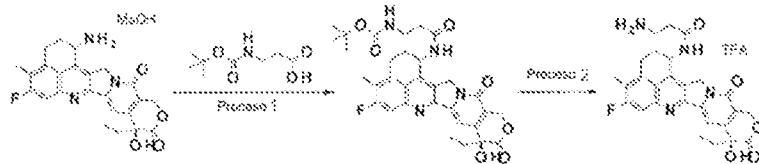


Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (13)

Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 3 del Ejemplo 12, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. La solución se concentró aún más por el procedimiento común A. Después, utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpos: 10,69 mg/mL, 35 rendimiento de anticuerpos: 7,5 mg (60%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 6,9.

Ejemplo 14 Intermedio (14)

(Fórmula 40)



Proceso 1: tert-butil (3-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-3-oxopropil)carbamato

La sal de ácido metanosulfónico de exatecán (500 mg, 0,941 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 1 usando N-(tert-butoxicarbonil)-β-alanina en lugar de ácido 4-(tert-butoxicarbonilamino)butanoico para producir el compuesto del título como un sólido amarillo-marrón (616 mg, cuantitativo).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,29 (9H, s), 1,86 (2H, dt, J=15,1, 7,3 Hz), 2,04-2,22 (2H, m), 2,31 (2H, t, J=6,8 Hz), 2,40 (3H, s), 3,10-3,26 (4H, m), 5,15 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,26 (1H, dd, J=19,2 Hz), 5,42 (2H, dd, J=18,8, 16,4 Hz), 5,57 (1H, dt, J=8,5, 4,2 Hz), 6,53 (1H, s), 6,78 (1H, t, J=5,5 Hz), 7,30 (1H, s), 7,80 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,46 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 607 (M+H)⁺

Proceso 2: N-[(1S,9S)-9-Etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-β-alaninamida

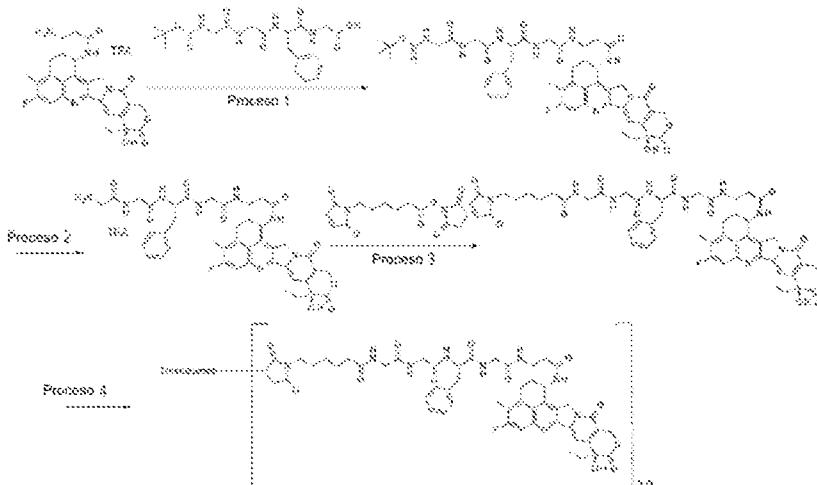
El compuesto obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que el Proceso 2 del Ejemplo 1 para producir la sal de ácido trifluoroacético del compuesto del título como un sólido amarillo (499 mg, 86%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,86 (2H, dquin, J=14,6, 7,2, 7,2, 7,2, 7,2 Hz), 2,06-2,27 (1H, m), 2,41 (3H, s), 2,46-2,57 (2H, m), 3,08 (2H, t, J=6,8 Hz), 3,14-3,24 (2H, m), 5,22 (1H, dt, J=18,8 Hz), 5,29 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,43 (2H, s), 5,58 (1H, dt, J=8,5, 4,5 Hz), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,74 (3H, brs), 7,82 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,67 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 507 (M+H)⁺

Ejemplo 15 Conjugado anticuerpo-fármaco (15)

(Fórmula 41)



Proceso 1: N-(tert-butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanilglicil-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-β-alaninamida

El compuesto (484 mg, 0,780 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 14 se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (626 mg, 87%).

5 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,27-1,42 (9H, m), 1,77-1,93 (2H, m), 2,06-2,22 (2H, m), 2,36 (2H, t, J=7,2 Hz), 2,40 (3H, d, J=1,6 Hz), 2,44-2,54 (2H, m), 2,76 (1H, dd, J=14,5, 10,2 Hz), 3,02 (1H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 3,12-3,22 (2H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 7,6 (1H, dd, J=14,5, 10,2 Hz), 3,02 (1H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 3,12-3,22 (2H, m), 3,52 (6H, d, J=6,3 Hz), 4,42-4,54 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1H, dd, J=18,4 Hz), 5,42 (1H, dd, J=18,4, 16,4 Hz), 5,57 (1H, dt, J=8,7, 4,4 Hz), 6,53 (1H, s), 6,98 (1H, t, J=5,9 Hz), 7,14-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,77-7,84 (1H, m), 7,91 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,16 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,27 (1H, t, J=5,1 Hz), 8,52 (1H, d, J=9,0 Hz).

10 Proceso 2: Glicilglicil-L-fenilalanilglicil-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-β-alaninamida trifluoroacetato

15 El compuesto (624 mg, 0,675 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 2 para dar el compuesto del título como un sólido amarillo (626 mg, 92%).

20 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,86 (2H, tt, J=14,5, 7,2 Hz), 2,07-2,22 (2H, m), 2,36 (2H, t, J=7,2 Hz), 2,40 (3H, s), 2,44-2,54 (2H, m), 2,75 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 3,04 (1H, dd, J=13,7, 4,3 Hz), 3,12-3,22 (2H, m), 3,58 (2H, d, J=4,7 Hz), 3,69 (3H, td, J=11,2, 5,7 Hz), 3,87 (1H, dd, J=17,0, 5,7 Hz), 4,54 (1H, m, J=17,8, 4,5 Hz), 5,19 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,43 (2H, s), 5,51-5,60 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,14-7,29 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,81 (1H, d, J=10,9 Hz), 7,88 (1H, t, J=5,7 Hz), 7,97 (3H, brs), 8,29-8,38 (2H, m), 8,50 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,55 (1H, d, J=8,6 Hz).

25 MS (ESI) m/z: 825 (M+H)⁺

25 Proceso 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanilglicil-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-β-alaninamida

30 El compuesto (60,0 mg, 0,0646 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título como un sólido (14,0 mg, 21%).

35 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,39-1,51 (4H, m), 1,79-1,91 (2H, m), 2,02-2,20 (2H, m), 2,07 (2H, t, J=7,4 Hz), 2,30-2,42 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,78 (1H, dd, J=14,1, 9,4 Hz), 3,02 (1H, dd, J=14,7, 4,9 Hz), 3,12-3,21 (2H, m), 3,26-3,42 (2H, m), 3,50-3,80 (6H, m), 4,40-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,6 Hz), 5,26 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,42 (2H, brs), 5,51-5,62 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,84 (2H, m), 8,01 (1H, t, J=5,3 Hz), 8,06 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,14 (1H, d, J=8,2 Hz), 8,25 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,53 (1H, d, J=8,6 Hz).

35 MS (ESI) m/z: 1018 (M+H)⁺

Proceso 4: Conjugado anticuerpo-fármaco (15)

40 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/mL con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,37 mLmg⁻¹cm⁻¹). La solución (1,0 mL) se recogió en un tubo de 2 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,0155 mL; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,050 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora.

45 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras incubar la solución a 22°C durante 10 minutos, se añadió a la misma una solución de DMSO (0,0311 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 3 y se incubó para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a 22°C durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,00622 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM y se incubó a 22°C para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos.

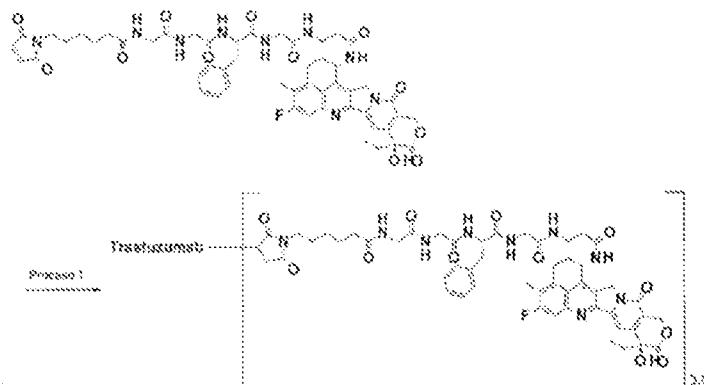
50 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D-1 (se utilizó PBS6,0 como solución tampón) para obtener 6 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 1,18 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,08 mg (71%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 2,0.

Ejemplo 16 Conjugado anticuerpo-fármaco (16)

(Fórmula 42)



5 **Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (16)**

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/mL con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,37 mLmg⁻¹cm⁻¹). La solución (1,0 mL) se recogió en un tubo de 2 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,0311 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,050 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora.

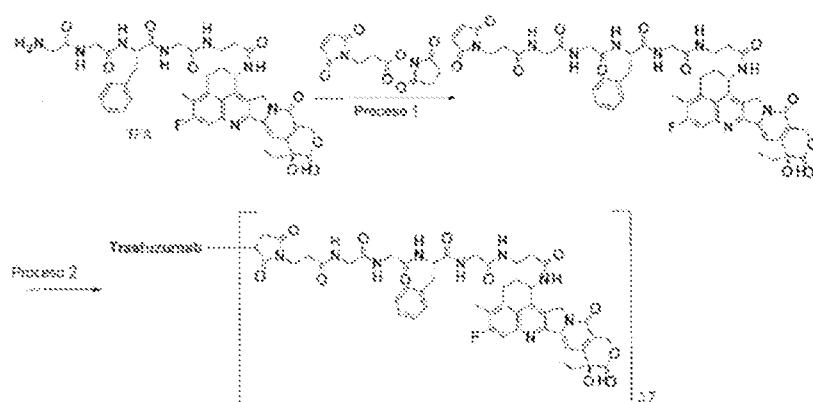
10 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Despues de incubar la solución a 22°C durante 10 minutos, se añadió a la misma una solución de DMSO (0,0622 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 3 del Ejemplo 15 y se incubó para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a 22°C durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,0124 mL; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM y se incubó a 22°C para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D-1 (se utilizó PBS6,0 como solución tampón) para obtener 6 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado. Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

15 Concentración de anticuerpos: 1,03 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 6,18 mg (62%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 3,8.

Ejemplo 17 Conjugado anticuerpo-fármaco (17)

(Fórmula 43)

25



Proceso 1: N-[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil]glicilglicil-L-fenilalanilglicil-N-[(S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-β-alaninamida

5 El compuesto (60,0 mg, 0,0646 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 15 se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 usando propionato de N-succinimidil 3-maleimida en lugar de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (36,0 mg, 57%).

10 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,85 (2H, dt, J=14,4, 7,5 Hz), 2,05-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,30-2,44 (5H, m), 2,73-2,84 (1H, m), 3,02 (1H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 3,17 (3H, d, J=5,1 Hz), 3,26-3,40 (2H, m), 3,26-3,40 (2H, m), 3,41-3,81 (6H, m), 4,40-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, brs), 5,52-5,61 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,80 (2H, d, J=10,2 Hz), 8,03 (1H, t, J= 5,5 Hz), 8,12 (1H, d, J=8,2 Hz), 8,20-8,31 (2H, m), 8,52 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 976 (M+H)⁺

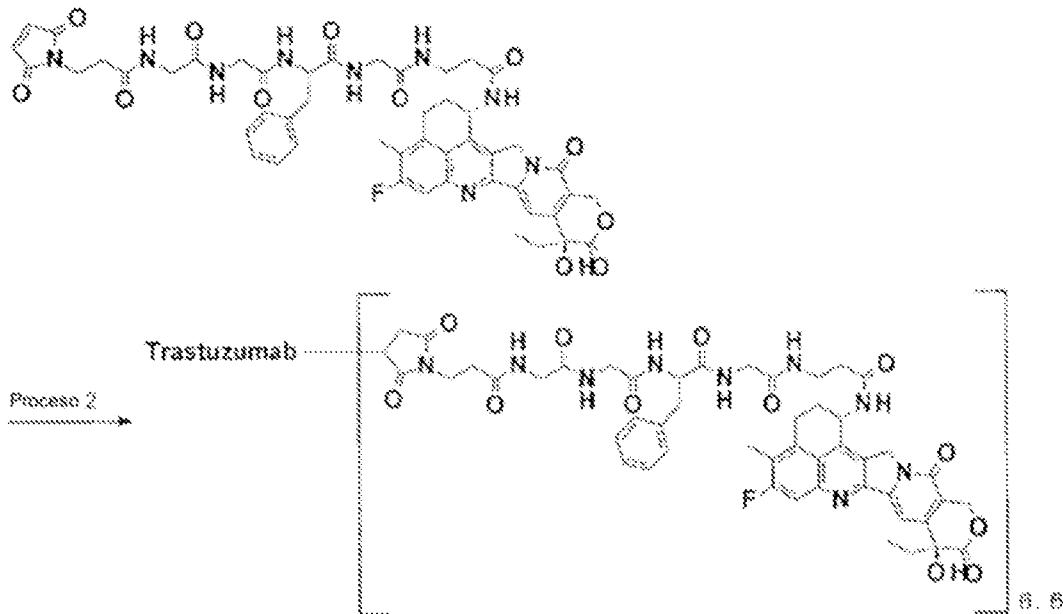
Proceso 2: Conjugado anticuerpo-fármaco (17)

15 Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 anterior, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 6.

Concentración de anticuerpos: 1,74 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 10,4 mg (83%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 3,7.

Ejemplo 18 Conjugado anticuerpo-fármaco (18)

(Fórmula 44)

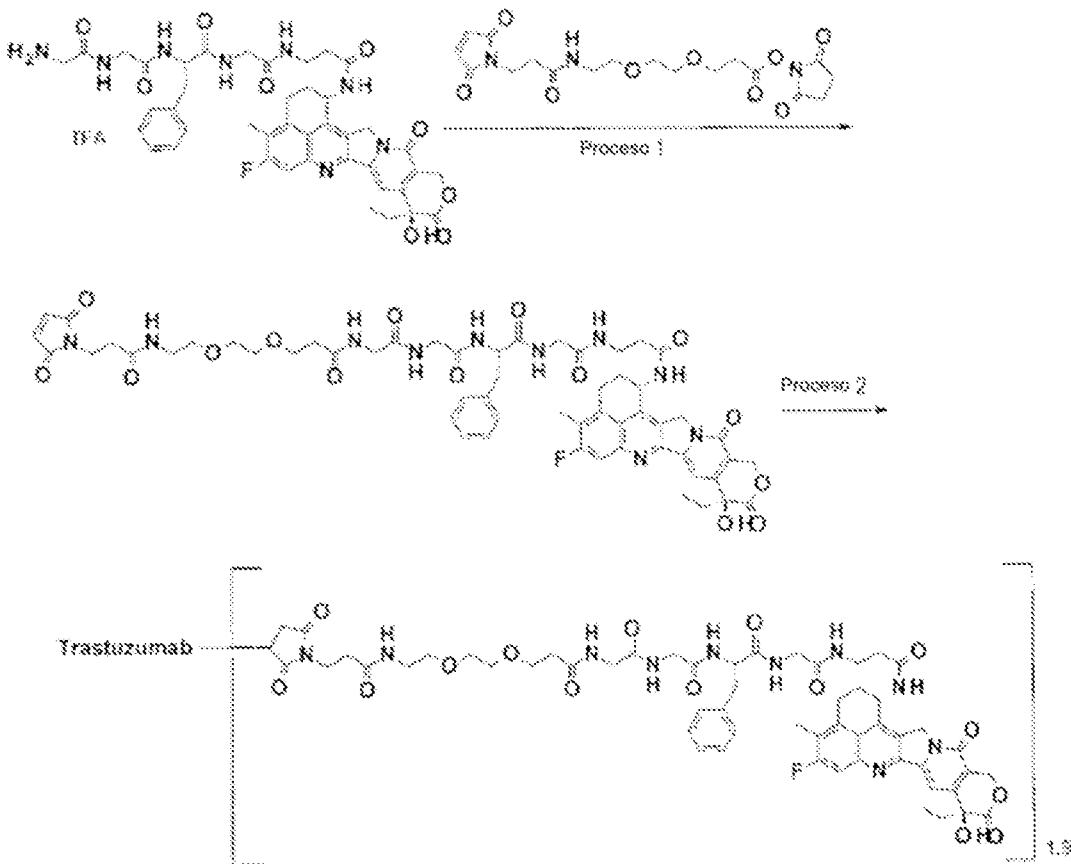


20 Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (18)

Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 17, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpos: 1,98 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 11,9 mg (95%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 6,6.

25 **Ejemplo 19 Conjugado anticuerpo-fármaco (19)**

(Fórmula 45)



Proceso 1: N-[3-[2-[2-[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil]amino}etoxi]propanoil]glicilglicil-L-fenilalanilglicil-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-β-alaninamida

5 El compuesto (60,0 mg, 0,0646 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 15 se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 usando 3-(2-(3-maleimidopropanamida)etoxi)etoxi)propanoato de N-succinimidilo en lugar de hexanoato de N-succinimidilo 6-maleimida para dar el compuesto del título como un sólido (23,0 mg, 31%).

10 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,77-1,92 (2H, m), 2,07-2,21 (2H, m), 2,27-2,42 (6H, m), 2,40 (3H, s), 2,74-2,84 (1H, m), 2,97-3,06 (1H, m), 3,09-3,21 (4H, m), 3,25-3,39 (6H, m), 3,45 (4H, s), 3,50-3,80 (8H, m), 4,41-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=18,4 Hz), 5,26 (1H, m, J=18,4 Hz), 5,42 (2H, brs), 5,51-5,61 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,13-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,87 (2H, m), 7,93-8,07 (2H, m), 8,09-8,21 (2H, m), 8,26 (1H, sr), 8,54 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 1135 (M+H)⁺

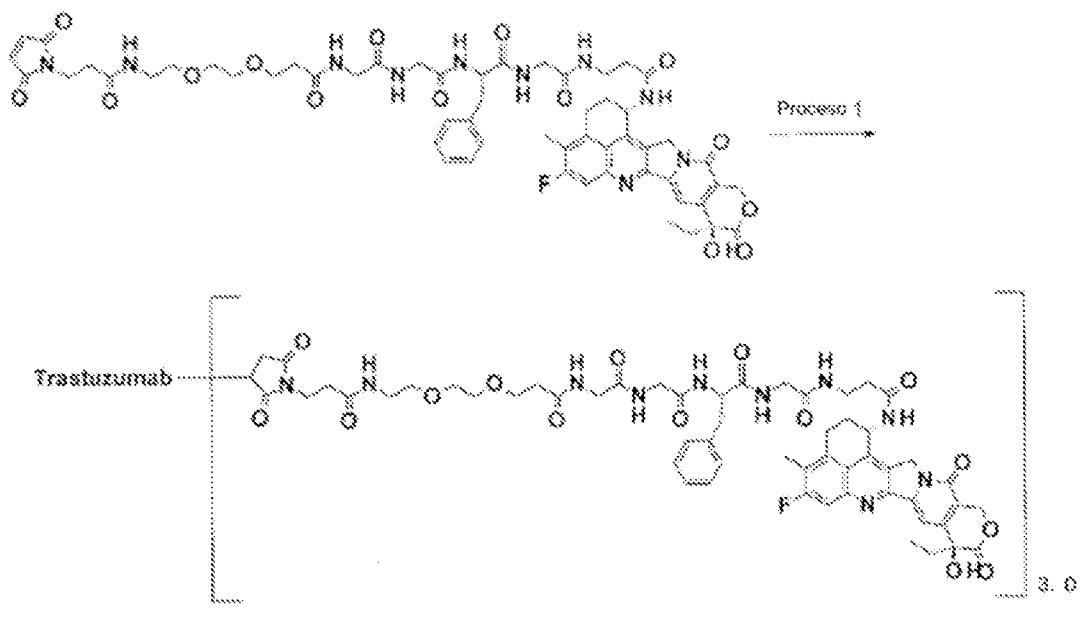
15 Proceso 2: Conjugado anticuerpo-fármaco (19)

Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 anterior, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 6.

Concentración de anticuerpos: 1,60 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 9,6 mg (77%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 1,9.

20 Ejemplo 20 Conjugado anticuerpo-fármaco (20)

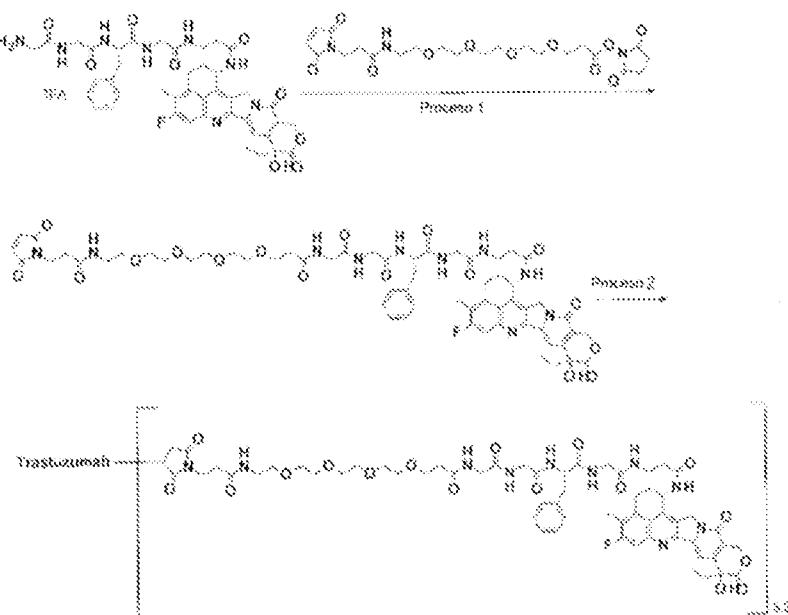
(Fórmula 46)

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (20)

Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 19, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpos: 1,69 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 10,1 mg (81%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 3,0.

Ejemplo 21 Conjugado anticuerpo-fármaco (21)

(Fórmula 47)



Proceso 1: N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]glicilglicil-L-fenilalanilglicil-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-β-alaninamida

5 El compuesto (60,0 mg, 0,0646 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 15 se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 usando 1-maleinimida-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecanoato de N-succinimidilo en lugar de hexanoato de N-succinimidilo 6-maleimida para producir el compuesto del título como un sólido (23,0 mg, 29%).

10 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J=7,0 Hz), 1,85 (2H, tt, J=14,6, 7,1 Hz), 2,06-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,28-2,43 (6H, m), 2,78 (1H, dd, J=13,7, 9,4 Hz), 3,02 (1H, dd, J=14,1, 3,9 Hz), 3,09-3,22 (4H, m), 3,27-3,41 (4H, m), 3,47 (12H, d, J=8,6 Hz), 3,53-3,81 (10H, m), 4,41-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, brs), 5,53-5,61 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,12-7,29 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,85 (2H, m), 8,03 (2H, d, J=6,6 Hz), 8,11-8,21 (2H, m), 8,27 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,54 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 1224 (M+H)⁺

Proceso 2: Conjugado anticuerpo-fármaco (21)

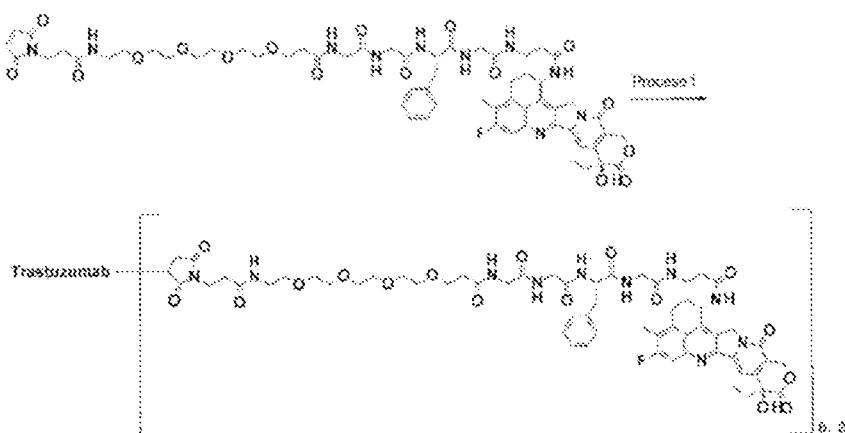
15 Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 6.

Concentración de anticuerpos: 1,77 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 10,6 mg (85%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 3,2.

Ejemplo 22 Conjugado anticuerpo-fármaco (22)

20

[Fórmula 48]

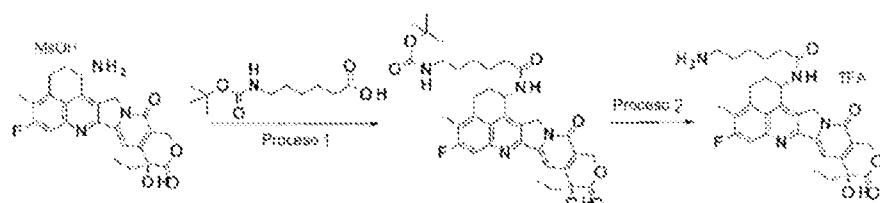


Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (22)

25 Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 21, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpos: 1,89 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 11,3 mg (90%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 6,2.

Ejemplo 23 Intermedio (23)

[Fórmula 49]



Proceso 1: *tert*-butil (6-[(1*S*,9*S*)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-6-oxohexil)carbamato

La sal de ácido metanosulfónico de exatecán (0,500 g, 0,882 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 1 usando ácido 6-(*tert*-butoxicarbonilamino) hexanoico en lugar de ácido 4-(*tert*-butoxicarbonilamino) butanoico para producir el compuesto del título (0,620 g, cuantitativo).

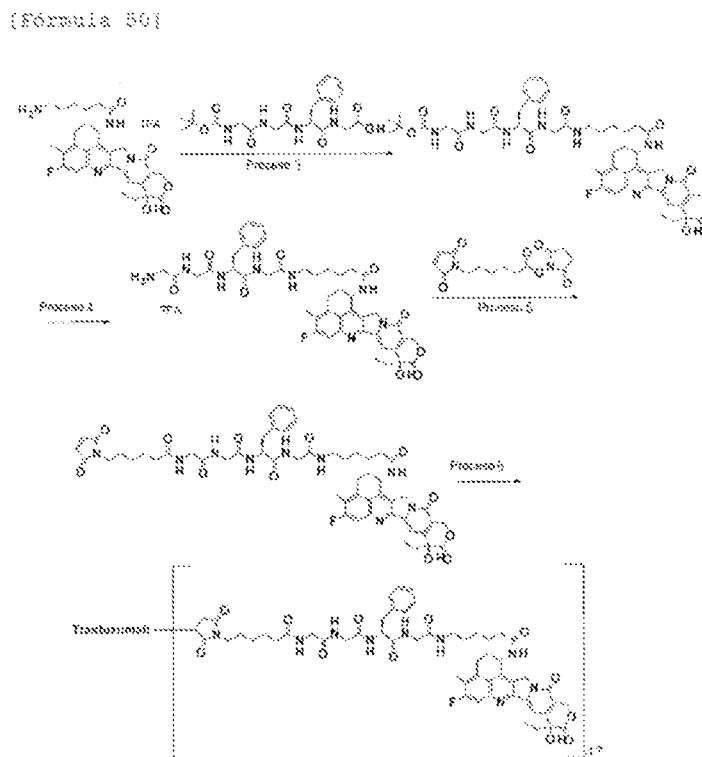
5 ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,83 (3H, t, J=7,8 Hz), 1,14-1,28 (2H, m), 1,31 (9H, s), 1,47-1,61 (2H, m), 1,75-1,89 (2H, m), 2,04-2,17 (4H, m), 2,35 (3H, s), 2,81-2,88 (2H, m), 3,09-3,16 (2H, m), 5,10 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,16 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,39 (2H, s), 5,48-5,55 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,73-6,78 (1H, m), 7,26 (1H, s), 7,74 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,39 (1H, d, J=9,0 Hz).

10 Proceso 2: 6-Amino-N-[(1*S*,9*S*)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]hexanamida

El compuesto (0,397 g, 0,611 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 1 para producir sal de ácido trifluoroacético del compuesto del título (0,342 g, 84%).

15 ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,88 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,31-1,41 (2H, m), 1,52-1,70 (4H, m), 1,80-1,94 (2H, m), 2,05-2,18 (2H, m), 2,21 (2H, t, J=7,4 Hz), 2,40 (3H, s), 2,81 (2H, t, J=7,4 Hz), 3,10-3,25 (2H, m), 3,33 (2H, brs), 5,18 (1H, d, J=19,8 Hz), 5,22 (1H, d, J=19,8 Hz), 5,41 (2H, d, J=16,6 Hz), 5,45 (2H, d, J=16,6 Hz), 5,53-5,60 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,80 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,49 (1H, d, J=9,2 Hz).

Ejemplo 24 Conjugado anticuerpo-fármaco (24)



20 Proceso 1: *N*-(*tert*-Butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-N-(6-[(1*S*,9*S*)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-6-oxohexil)glicinamida

El compuesto (0,170 g, 0,516 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 23 se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título (0,225 g, 91%).

25 ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,88 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,43-1,70 (6H, m), 1,87 (2H, td, J=15,0, 7,4 Hz), 2,10-2,22 (3H, m), 2,28-2,37 (1H, m), 2,42 (3H, s), 2,78-2,85 (1H, m), 3,01-3,10 (3H, m), 3,15-3,22 (2H, m), 3,54-3,61 (5H, m), 3,62-3,69 (1H, m), 4,44-4,53 (1H, m), 5,17 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,25 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,45 (2H, s), 5,54-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,02 (1H, t, J=6,1 Hz), 7,11-7,28 (5H, m), 7,33 (1H, s), 7,63-7,69 (1H, m), 7,82 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,90-7,96 (1H, m), 8,17 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,28 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,46 (1H, d, J=9,0 Hz).

Proceso 2: Glicilglicil-L-fenilalanil-N-(6-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-6-oxohexil)glicinamida

El compuesto (0,105 g, 0,108 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título (0,068 mg, 65%).

5 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 0,89 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,15-1,67 (6H, m), 1,79-1,97 (2H, m), 2,08-2,24 (4H, m), 2,42 (3H, s), 2,76-2,82 (1H, m), 3,00-3,10 (5H, m), 3,19 (1H, s), 3,50-3,63 (2H, m), 3,64-3,76 (3H, m), 3,84-3,92 (1H, m), 4,51-4,59 (1H, m), 5,17 (1H, d, $J=19,4$ Hz), 5,24 (1H, d, $J=19,4$ Hz), 5,44 (2H, s), 5,53 -5,61 (1H, m), 6,55 (1H, brs), 7,15-7,29 (5H, m), 7,33 (1H, s), 7,72-7,78 (1H, m), 7,82 (1H, d, $J=11,0$ Hz), 7,96-8,08 (2H, m), 8,30-8,38 (2H, m), 8,46-8,56 (2H, m).

10 Proceso 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(6-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-6-oxohexil)glicinamida

El compuesto (58 mg, 0,060 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título (39 mg, 62%).

15 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 0,99 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,27 (2H, td, $J=11,6, 6,1$ Hz), 1,38-1,44 (2H, m), 1,50-1,63 (6H, m), 1,65-1,80 (2H, m), 1,89-1,98 (2H, m), 2,17-2,25 (3H, m), 2,26-2,36 (3H, m), 2,40 (3H, s), 2,95 (1H, dd, $J=14,3, 9,2$ Hz), 3,12 (1H, dd, $J=13,7, 5,7$ Hz), 3,15-3,25 (4H, m), 3,44 (2H, t, $J=7,2$ Hz), 3,65 (1H, d, $J=17,2$ Hz), 3,76 (1H, d, $J=17,2$ Hz), 3,79-3,86 (4H, m), 4,43 (1H, dd, $J=8,9, 6,0$ Hz), 5,10 (1H, d, $J=18,9$ Hz), 5,25 (1H, d, $J=18,9$ Hz), 5,35 (1H, d, $J=16,6$ Hz), 5,56 (1H, d, $J=16,0$ Hz), 5,60-5,64 (1H, m), 6,76 (2H, s), 7,12-7,24 (6H, m), 7,58 (1H, s), 7,60 (1H, d, $J=10,9$ Hz), 7,68 (1H, t, $J=5,7$ Hz).

20 MS (ESI) m/z: 1060 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

Proceso 4: Conjugado anticuerpo-fármaco (24)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/mL con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,37 $\text{mL}\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La solución (9,0 mL) se recogió en un tubo de 50 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,140 mL; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,450 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora.

30 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras incubar la solución a 22°C durante 10 minutos, se añadió a la misma una solución de DMSO (0,280 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 3 y se incubó para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a 22°C durante 40 minutos.

35 A continuación, se añadió al mismo una solución acuosa (0,0559 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM y se incubó a 22°C para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante otros 20 minutos.

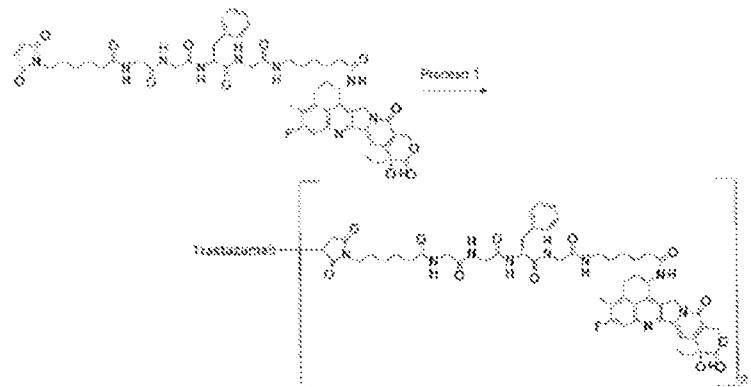
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D-1 (se utilizó PBS7,4 como solución tampón) para obtener una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

40 Concentración de anticuerpos: 3,30 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 53,5 mg (59%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 1,7.

Ejemplo 25 Conjugado anticuerpo-fármaco (25)

{Fórmula 8.1}

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (25)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/mL con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,37 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La solución (9,0 mL)

5 se recogió en un tubo de 50 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,280 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,450 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora.

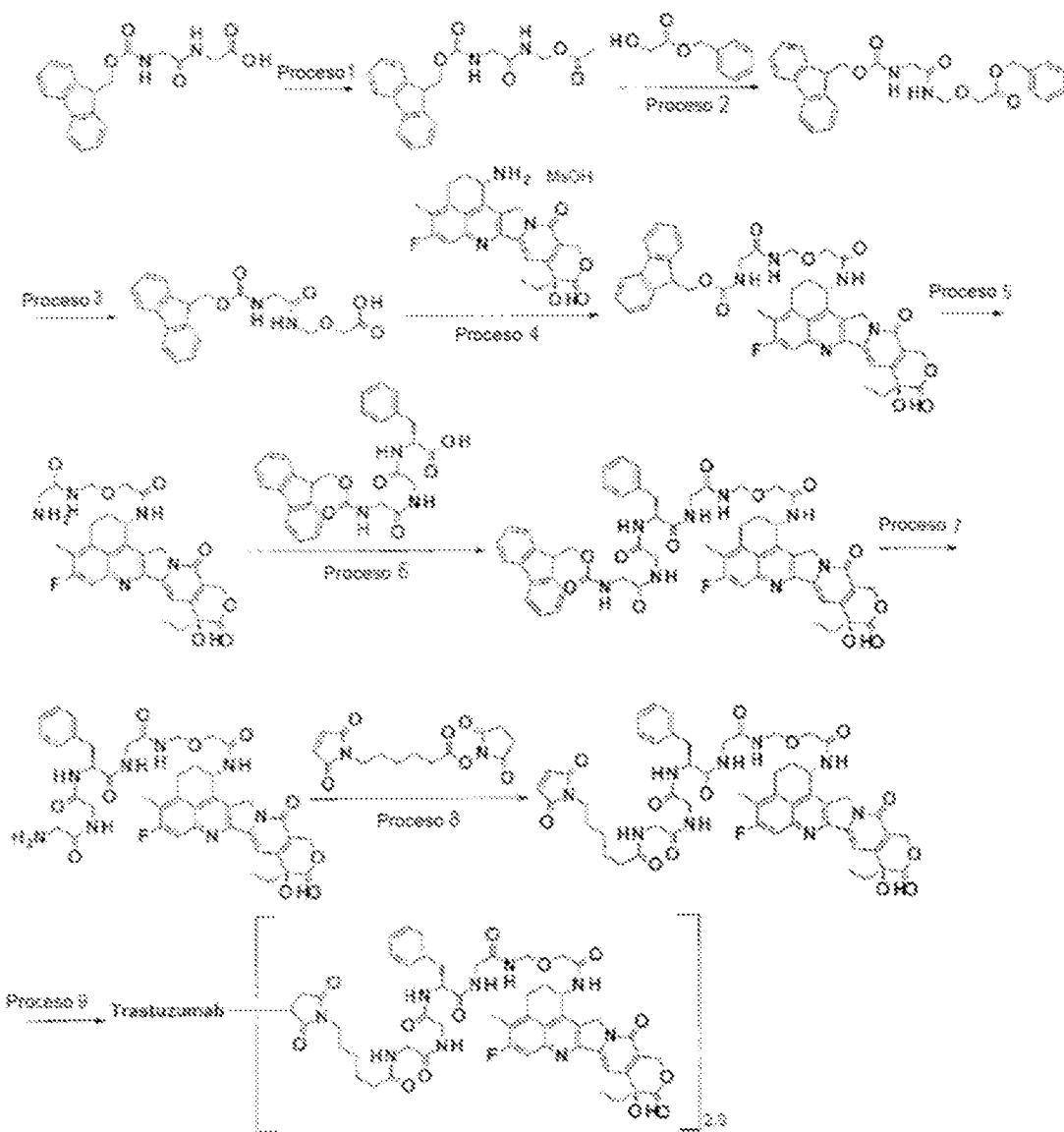
10 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Despues de incubar la solución a 22°C durante 10 minutos, se añadió a la misma una solución de DMSO (0,559 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 3 del Ejemplo 24 y se incubó para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a 22°C durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,112 mL; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM y se incubó a 22°C para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D-1 (se utilizó PBS6,0 como solución tampón) para obtener una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado.

15 Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

20 Concentración de anticuerpos: 10,65 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 55,1 mg (61%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 2,5.

Ejemplo 26 Conjugado anticuerpo-fármaco (26)

(Fórmula S2)

Proceso 1: ({{N-[{(9H-Fluoren-9-il)metoxi]carbonil}glicil}amino)acetato de metilo

A una mezcla que contenía N-9-fluorenilmetoxicarbonilglicilglicina (4,33 g, 12,2 mmol), tetrahidrofurano (THF; 120 ml) y tolueno (40,0 ml), se añadieron piridina (1,16 ml, 14,7 mmol) y tetraacetato de plomo (6,84 g, 14,7 mmol) y se calentó a reflujo durante 5 horas. Tras enfriar la solución de reacción a temperatura ambiente, se eliminaron los insolubles por filtración a través de Celite y se concentró a presión reducida. Los residuos obtenidos se disolvieron en acetato de etilo y se lavaron con agua y salmuera saturada; a continuación, la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhídrico. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, los residuos obtenidos se purificaron mediante chromatografía en columna de gel de sílice [hexano : acetato de etilo = 9 : 1 (v/v) - acetato de etilo] para producir el compuesto del título como un sólido incoloro (3,00 g, 67%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2,07 (3H, s), 3,90 (2H, d, J=5,1 Hz), 4,23 (1H, t, J=7,0 Hz), 4,46 (2H, d, J=6,6 Hz), 5,26 (2H, d, J=7,0 Hz), 5,32 (1H, brs), 6,96 (1H, brs), 7,32 (2H, t, J=7,3 Hz), 7,41 (2H, t, J=7,3 Hz), 7,59 (2H, d, J=7,3 Hz), 7,77 (2H, d, J=7,3 Hz).

Proceso 2: [{{N-[{(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil}glicil}amino)metoxi]acetato de bencilo

A una solución de THF (40,0 mL) del compuesto (3,68 g, 10,0 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior y glicolato de bencilo (4,99 g, 30,0 mmol), se añadió tert-butóxido de potasio (2,24 g, 20,0 mmol) a 0°C y se agitó a

temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución de reacción se cargó con acetato de etilo y agua a 0°C y se extrajo con acetato de etilo y cloroformo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida. Los residuos obtenidos se disolvieron en dioxano (40,0 mL) y agua (10,0 mL), se cargaron con hidrogenocarbonato sódico (1,01 g, 12,0 mmol) y cloroformato de 9-fluorenilmetilo (2,59 g, 10,0 mmol), y se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se cargó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano : acetato de etilo = 100 : 0 (v/v) - 0 : 100] para producir el compuesto del título como una sustancia aceitosa incolora (1,88 g, 40%).

10 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3,84 (2H, d, $J=5,5$ Hz), 4,24 (3H, t, $J=6,5$ Hz), 4,49 (2H, d, $J=6,7$ Hz), 4,88 (2H, d, $J=6,7$ Hz), 5,15-5,27 (1H, m), 5,19 (2H, s), 6,74 (1H, brs), 7,31-7,39 (7H, m), 7,43 (2H, t, $J=7,4$ Hz), 7,61 (2H, d, $J=7,4$ Hz), 7,79 (2H, d, $J=7,4$ Hz).

Proceso 3: ácido [(N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil]amino)metoxi]acético

15 El compuesto (1,88 g, 3,96 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior se disolvió en etanol (40,0 mL) y acetato de etilo (20,0 mL). Tras añadir el catalizador de carbono paladio (376 mg), se agitó bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 2 horas. Los insolubles se eliminaron por filtración a través de Celite, y el disolvente se eliminó a presión reducida para obtener el compuesto del título como un sólido incoloro (1,52 g, cuantitativo).

10 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 3,62 (2H, d, $J=6,3$ Hz), 3,97 (2H, s), 4,18-4,32 (3H, m), 4,60 (2H, d, $J=6,7$ Hz), 7,29-7,46 (4H, m), 7,58 (1H, t, $J=5,9$ Hz), 7,72 (2H, d, $J=7,4$ Hz), 7,90 (2H, d, $J=7,4$ Hz), 8,71 (1H, t, $J=6,5$ Hz).

20 Proceso 4: 9H-Fluoren-9-ilmetil(2-[(2-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)metil]amino}-2-oxoetil)carbamato

25 Bajo enfriamiento con hielo, a una solución de N,N-dimetilformamida (10,0 mL) de sal de ácido metanosulfónico de exatecán (0,283 g, 0,533 mmol), N-hidroxisuccinimida (61,4 mg, 0,533 mmol), y el compuesto (0,205 g, 0,533 mmol) obtenido en el Proceso 3 anterior, se añadieron N,N-diisopropiletilamina (92,9 μL , 0,533 mmol) y N,N'-diclohexilcarbodiimida (0,143 g, 0,693 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica particionada de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido marrón pálido (0,352 g, 82%).

30 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 0,81 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,73-1,87 (2H, m), 2,06-2,20 (2H, m), 2,34 (3H, s), 3,01-3,23 (2H, m), 3,58 (2H, d, $J=6,7$ Hz), 3,98 (2H, s), 4,13-4,25 (3H, m), 4,60 (2H, d, $J=6,7$ Hz), 5,09-5,22 (2H, m), 5,32-5,42 (2H, m), 5,50-5,59 (1H, m), 6,49 (1H, s), 7,24-7,30 (3H, m), 7,36 (2H, t, $J=7,4$ Hz), 7,53 (1H, t, $J=6,3$ Hz), 7,66 (2H, d, $J=7,4$ Hz), 7,75 (1H, d, $J=11,0$ Hz), 7,84 (2H, d, $J=7,4$ Hz), 8,47 (1H, d, $J=8,6$ Hz), 8,77 (1H, t, $J=6,7$ Hz).

35 MS (ESI) m/z: 802 (M+H)⁺

Proceso 5: N-[(2-[(1S,9S)-9-Etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

40 A una solución de N,N-dimetilformamida (11,0 mL) del compuesto (0,881 g, 1,10 mmol) obtenido en el Proceso 4 anterior, se añadió piperidina (1,1 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener una mezcla que contenía el compuesto del título. La mezcla se utilizó para la siguiente reacción sin más purificación.

45 Proceso 6: N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

50 Bajo enfriamiento con hielo, a una solución de N,N-dimetilformamida (50,0 mL) de la mezcla (0,439 mmol) obtenida en el Proceso 5 anterior, N-hidroxisuccinimida (0,101 g, 0,878 mmol), y N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina (el compuesto descrito en Patente japonesa abierta al público No- 2002-60351; 0,440 g, 0,878 mmol), se añadió N,N'-diclohexilcarbodiimida (0,181 g, 0,878 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 9 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido naranja pálido (0,269 g, 58%).

55 MS (ESI) m/z: 1063 (M+H)⁺

Proceso 7: Glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

A una disolución de N,N-dimetilformamida (4,00 mL) del compuesto (0,269 g, 0,253 mmol) obtenido en el Proceso 6 anterior, se añadió piperidina (0,251 mL, 2,53 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener una mezcla que contenía el compuesto del título. La mezcla se utilizó para la siguiente reacción sin más purificación.

- 5 Proceso 8: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{{(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il}amino}-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

A una solución de N,N-dimetilformamida (10,0 mL) del compuesto (0,253 mmol) obtenido en el Proceso 7 anterior, se añadió hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida (0,156 g, 0,506 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 9 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,100 g, 38%).

10 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,83 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,09-1,21 (2H, m), 1,33-1,47 (4H, m), 1,75-1,90 (2H, m), 2,00-2,23 (4H, m), 2,36 (3H, s), 2,69-2,81 (1H, m), 2,94-3,03 (1H, m), 3,06-3,22 (2H, m), 3,23-3,74 (6H, m), 3,98 (2H, s), 4,39-4,50 (1H, m), 4,60 (2H, d, J=6,7 Hz), 5,17 (2H, s), 5,39 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,96 (2H, s), 7,11-7,24 (5H, m), 7,28 (1H, s), 7,75 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,97 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,09 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,27 (1H, t, J=6,5 Hz), 8,48 (1H, d, J=9,0 Hz), 8,60 (1H, t, J=6,5 Hz).

15 MS (ESI) m/z: 1034 (M+H)⁺

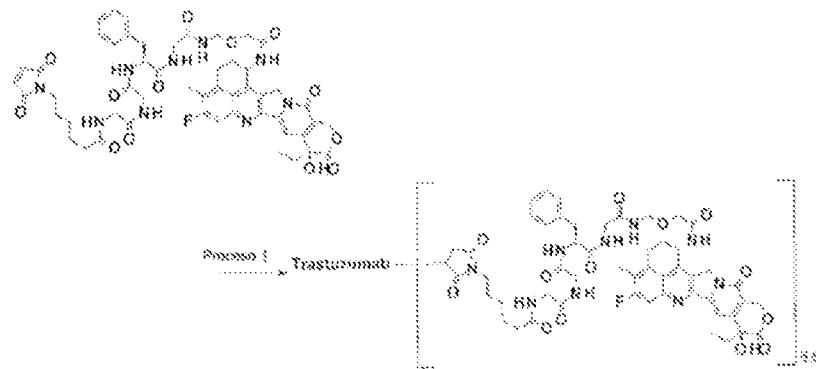
Proceso 9: Conjugado anticuerpo-fármaco (26)

20 Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 8 anterior, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 6.

Concentración de anticuerpos: 1,61 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 9,7 mg (77%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 2,9.

Ejemplo 27 Conjugado anticuerpo-fármaco (27)

{Fórmula 8-53}



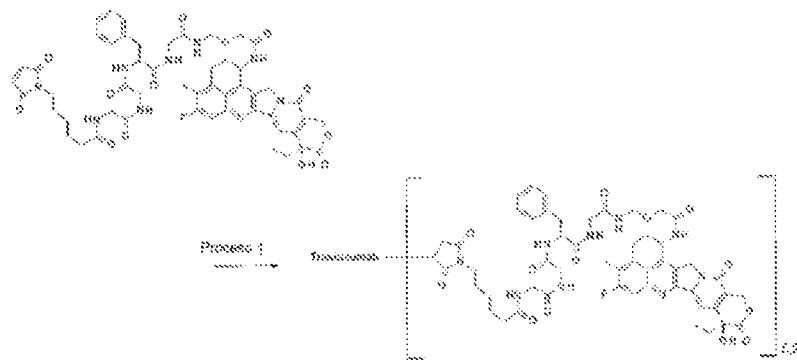
25

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (27)

Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 26, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpos: 1,58 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 9,5 mg (76%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 5,6.

Ejemplo 28 Conjugado anticuerpo-fármaco (28)

(Fórmula 34)

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (28)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento

5 común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó $1,48 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (1,25 mL) se colocó en dos tubos de polipropileno de 1,5 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,039 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,0625 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el

10 enlazador del fármaco: Despues de añadir DMSO (0,072 mL) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (0,078 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó utilizando un rotador de tubos para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa de NAC

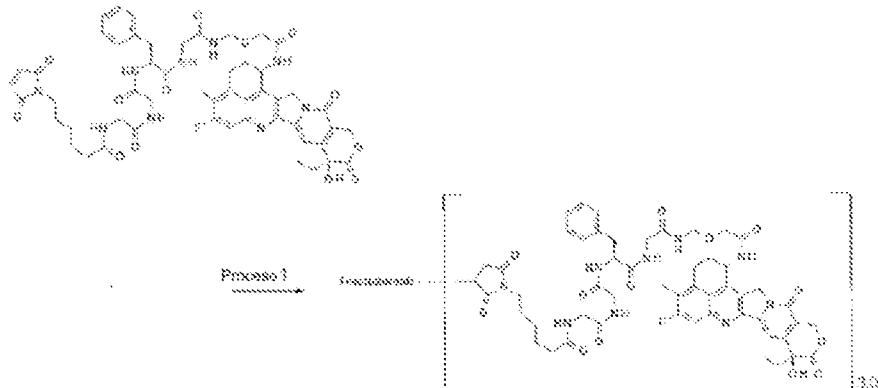
15 100 mM (0,0155 mL) y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación utilizando el procedimiento común D-1 (se utilizó ABS como solución tampón) para obtener 11,7 mL en total de una solución que contenía el compuesto de interés.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

20 Concentración de anticuerpos: 1,60 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 18,7 mg (94%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 5,2.

Ejemplo 29 Conjugado anticuerpo-fármaco (29)

(Fórmula 35)

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (29)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó $1,48 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (6 mL) se colocó en un tubo de polipropileno y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,108 mL; 2,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,091 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador del fármaco: Despues de añadir DMSO (0,146 mL) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (0,193 mL; 4,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se incubó para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a 15°C durante 1 hora. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,029 mL) de NAC 100 mM y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos.

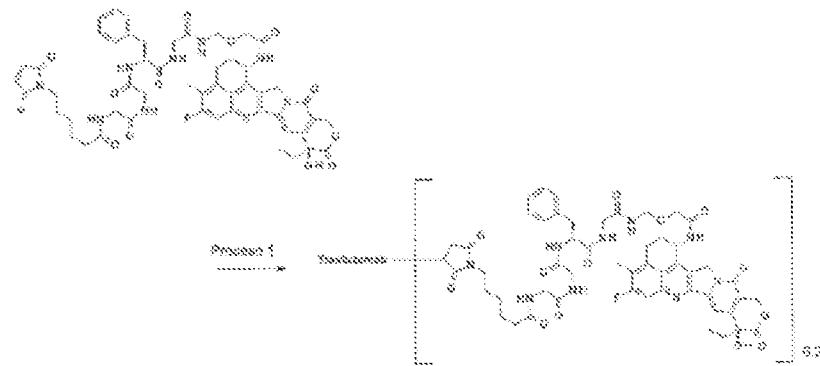
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D (se utilizó ABS como solución tampón) para obtener 24 mL de una solución que contenía el compuesto de interés.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando los procedimientos comunes E y F (se utilizaron $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido), y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 1,77 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 42 mg (85%), número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido por el procedimiento común E: 3,0, y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido por el procedimiento común F: 3,4.

20 Ejemplo 30 Conjugado anticuerpo-fármaco (30)

(Fórmula 56)



Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (30)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó $1,48 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (6 mL) se colocó en un tubo de polipropileno y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,215 mL; 5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,094 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora.

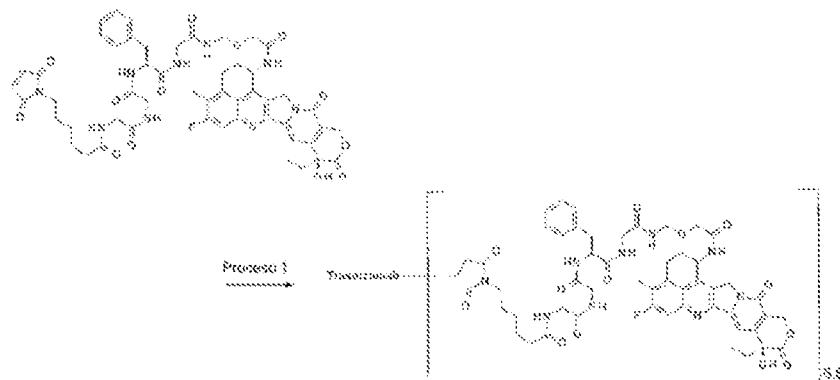
Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Despues de añadir una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (0,370 mL; 8,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se incubó para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a 15°C durante 1 hora. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,056 mL) de NAC 100 mM y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D (se utilizó ABS como solución tampón) para obtener 24 mL de una solución que contenía el compuesto de interés.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando los procedimientos comunes E y F (se utilizaron $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido), y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 1,92 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 46 mg (92%), número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido por el procedimiento común E: 6,2, y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido por el procedimiento común F: 7,1.

Ejemplo 31 Conjugado anticuerpo-fármaco (31)

(Fórmula 37)

**Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (31)**

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó 1,48 $\text{mL mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$). La solución (50,00 mL) se colocó en un recipiente de polipropileno y se cargó con una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,745 mL) a temperatura ambiente con agitación y después con una solución acuosa de TCEP 10 mM (1,868 mL; 5,4 equivalentes por molécula de anticuerpo). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, se terminó la agitación y se redujo el enlace disulfuro en la parte de bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora.

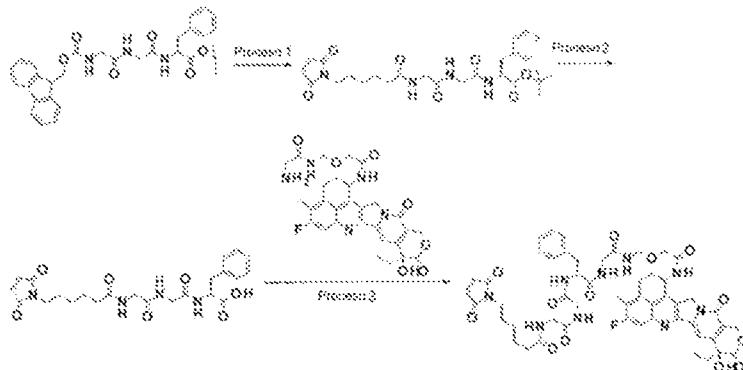
Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Despues de enfriar la solución anterior a 15°C, se añadió gradualmente gota a gota una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (2,958 mL; 8,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación. Mientras la temperatura se mantenía a 15°C, la solución de reacción se agitaba durante los primeros 30 minutos y se incubaba sin agitación para conjugar el enlazador del fármaco con el anticuerpo durante la siguiente 1 hora. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,444 mL) de NAC 100 mM con agitación y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos.

Purificación: Añadiendo gradualmente solución acuosa de ácido acético al 20% (aproximadamente 0,25 mL) y ABS (50 mL) a la solución anterior con agitación, el pH de la solución se ajustó a $5,5 \pm 0,1$. Esta solución se sometió a microfiltración (Millipore Corp., filtro Millex-HV, 0,45 μm , membrana de PVDF) para eliminar la materia blanquecina. Esta solución se sometió a purificación por ultrafiltración utilizando un aparato de ultrafiltración compuesto por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Biomax 50 KDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump modelo 77521-40, Pump Head modelo 7518-00) y un tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Específicamente, mientras que el ABS se añadía gota a gota (un total de 800 mL) como solución tampón para la purificación a la solución de reacción, se realizaba la purificación por ultrafiltración para eliminar los enlazadores de fármacos no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, sustituyendo también la solución tampón por ABS y concentrando aún más la solución. La solución purificada obtenida se sometió a microfiltración (0,22 μm (Millipore Corp., filtro Millex-GV, membrana de PVDF) y 0,10 μm (Millipore Corp., filtro Millex-VV, membrana de PVDF)) para obtener una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado. Caracterización fisicoquímica: Utilizando los procedimientos comunes E y F (se utilizaron $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido), y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 11,28 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 451 mg (90%), número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido por el procedimiento común E: 6,6, y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido por el procedimiento común F: 7,7.

Ejemplo 32 (Método alternativo para sintetizar el compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26)

(Fórmula 88)

Proceso 1: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenil alaninato de tert-butilo

Bajo refrigeración con hielo, a una solución de THF (12,0 ml) de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenil alaninato de tert-butilo (J. Pept. Res., 1999, vol. 53, pp. 393; 0,400 g, 0,717 mmol), se añadió 1,8-diazabiciclo[5.4.0]-7-undeceno (0,400 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 días, y después se añadió de nuevo hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida (0,221 g, 0,717 mmol) y se agitó durante 3 horas. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico y salmuera saturada; a continuación, la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 9 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,295 g, 78%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1,28-1,36 (2H, m), 1,41 (9H, s), 1,57-1,71 (4H, m), 2,23 (2H, t, J=7,6 Hz), 3,09 (2H, d, J=6,0 Hz), 3,51 (2H, t, J=7,6 Hz), 3,85-4,02 (4H, m), 4,69-4,78 (1H, m), 6,15 (1H, t, J=4,6 Hz), 6,33 (1H, d, J=7,3 Hz), 6,60 (1H, t, J=5,0 Hz), 6,68 (2H, s), 7,10-7,16 (2H, m), 7,22-7,31 (3H, m).

15 MS (ESI) m/z: 529 (M+H)⁺Proceso 2: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanina

A una solución de diclorometano (8,00 ml) del compuesto (0,295 g, 0,558 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior, se añadió ácido trifluoroacético (4,00 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,240 g, 91%).

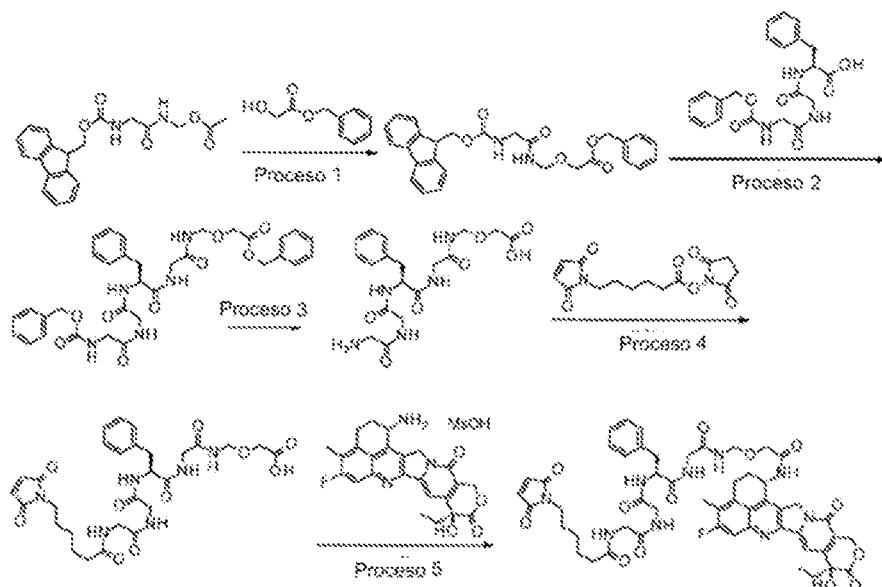
20 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1,15-1,23 (2H, m), 1,40-1,53 (4H, m), 2,10 (2H, t, J=7,6 Hz), 2,88 (1H, dd, J=13,7, 8,9 Hz), 3,04 (1H, dd, J=13,7, 5,0 Hz), 3,35-3,43 (2H, m), 3,58-3,77 (4H, m), 4,41 (1H, td, J=7,8, 5,0 Hz), 7,00 (2H, s), 7,16-7,31 (5H, m), 8,00 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,06 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,13 (1H, d, J=7,8 Hz).

Proceso 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-2-oxoetoxi]metil]glicinamida

El compuesto (0,572 g, 1,21 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior se disolvió en diclorometano (12,0 mL), se cargó con N-hidroxisuccinimida (0,152 g, 1,32 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etylcarbodiimida (0,253 g, 1,32 mmol), y se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se añadió a una solución de N,N-dimetilformamida (22,0 mL) de la mezcla (1,10 mmol) obtenida en el Proceso 5 del Ejemplo 26, y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de reacción se cargó con una solución acuosa de ácido cítrico al 10% y se extrajo con cloroformo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo-cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,351 g, 31%). Los datos instrumentales del compuesto fueron los mismos que los del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26.

Ejemplo 33 (Método alternativo para sintetizar el compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26)

(Fórmula 59)

Proceso 1: [(N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil]amino)metoxi]acetato de bencilo

A una solución de THF (200 mL) del compuesto (7,37 g, 20,0 mmol) obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 26, se añadieron glicolato de bencilo (6,65 g, 40,0 mmol) y ácido p-tolueno sulfónico monohidratado (0,381 g, 2,00 mmol) a 0°C y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y 30 minutos. La solución de reacción se cargó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano : acetato de etilo = 100 : 0 (v/v) - 0 : 100] para producir el compuesto del título como un sólido incoloro (6,75 g, 71%). Los datos instrumentales del compuesto fueron los mismos que los del compuesto del Proceso 2 del Ejemplo 26.

Proceso 2: N-[(benzoiloxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina-N-[(2-(benzoiloxi)-2-oxoetoxi)metyl]glicinamida

A una solución de N,N-dimetilformamida (140 mL) del compuesto (6,60 g, 13,9 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior, se añadió 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (2,22 g, 14,6 mmol) a 0°C y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución de reacción se cargó con una solución de N,N-dimetilformamida (140 mL) de N-[(benciloxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina (6,33 g, 15,3 mmol), N-hidroxisuccinimida (1,92 g, 16.7 mmol), y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etylcarbodiimida (3,20 g, 16,7 mmol) agitado previamente a temperatura ambiente durante 1 hora, y agitado a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución de reacción se cargó con ácido clorhídrico 0,1 N y se extrajo con cloroformo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para obtener el compuesto del título como sólido incoloro (7,10 g, 79%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 2,78 (1H, dd, J=13,9, 9,6 Hz), 3,05 (1H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 3,56-3,80 (6H, m), 4,15 (2H, s), 4,47-4,55 (1H, m), 4,63 (2H, d, J=6,6 Hz), 5,03 (2H, s), 5,15 (2H, s), 7,16-7,38 (15H, m), 7,52 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,17 (1H, d, J=8,2 Hz), 8,36 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,61 (1H, t, J=6,6 Hz).

Proceso 3: Glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(carboximetoxi)metyl]glicinamida

A una disolución de N,N-dimetilformamida (216 mL) del compuesto (7,00 g, 10,8 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior, se añadió catalizador de paladio carbono (7,00 g) y se agitó bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 24 horas. Los insolubles se eliminaron por filtración a través de Celite, y el disolvente se eliminó a presión reducida. Los residuos obtenidos se disolvieron en agua, el material insoluble se eliminó por filtración a través de Celite y el disolvente se eliminó a presión reducida. Este procedimiento se repitió dos veces para obtener el compuesto del título como sólido incoloro (3,77 g, 82%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 2,84 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 3,08 (1H, dd, J=13,7, 4,7 Hz), 3,50-3,72 (4H, m), 3,77-3,86 (2H, m), 3,87 (2H, s), 4,52-4,43 (1H, m), 4,61 (2H, d, J=6,6 Hz), 7,12-7,30 (5H, m), 8,43 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,54 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,70 (1H, t, J=6,3 Hz), 8,79 (1H, t, J=5,5 Hz).

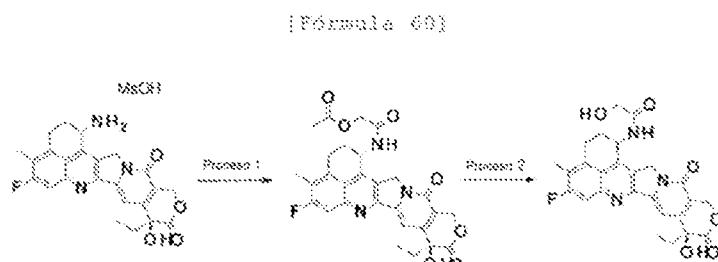
Proceso 4: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[carboximetoxi]metil]glicinamida

A una solución de N,N-dimetilformamida (85,0 mL) del compuesto (3,59 g, 8,48 mmol) obtenido en el Proceso 3 anterior, se añadieron hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida (2,88 g, 9,33 mmol) y trietilamina (0,858 g, 8,48 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de reacción se cargó con ácido clorhídrico 0,1 N y se extrajo con cloroformo y un disolvente mixto de cloroformo y metanol [cloroformo : metanol = 4 : 1 (v/v)]. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica particionada de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido incoloro (3,70 g, 71%). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,13-1,24 (2H, m), 1,42-1,53 (4H, m), 2,11 (2H, t, J=7,4 Hz), 2,80 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 3,06 (1H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 3,37 (2H, t, J=7,2 Hz), 3,56-3,78 (6H, m), 3,97 (2H, s), 4,46-4,53 (1H, m), 4,61 (2H, d, J=6,3 Hz), 7,00 (2H, s), 7,15-7,29 (5H, m), 8,03-8,20 (3H, m), 8,32 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,60 (1H, t, J=6,7 Hz).

Proceso 5: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi]metil]glicinamida

A una solución de N,N-dimetilformamida (40,0 mL) de sal de ácido metanosulfónico de exatecán (1,14 g, 2,00 mmol), trietilamina (0,202 g, 2,00 mmol), el compuesto (1,48 g, 2,40 mmol) obtenido en el Proceso 4 anterior, y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (0,993 g, 3,00 mmol) con 16,4% de agua se añadieron a 0°C y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (1,69 g, 82%). Los datos espectrales del compuesto fueron los mismos que los del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26.

Ejemplo 34 Intermedio (34)



Proceso 1: 2-[(1S,9S)-9-Etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetilacetato

Enfriada con hielo, a una suspensión de N,N-dimetilformamida (20,0 mL) de sal de ácido metanosulfónico de exatecán (0,500 g, 0,941 mmol), se añadieron N,N-diisopropiletilamina (0,492 mL, 2,82 mmol) y cloruro de acetoxiacetílico (0,121 ml, 1,13 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica particionada de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,505 g, cuantitativo).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,81-1,92 (2H, m), 2,08 (3H, s), 2,08-2,22 (2H, m), 2,41 (3H, s), 3,14-3,21 (2H, m), 4,51 (2H, dd, J=19,4, 14,7 Hz), 5,22 (2H, dd, J=40,1, 19,0 Hz), 5,43 (2H, s), 5,56-5,61 (1H, m), 6,53 (1H, dd, J=40,1, 19,0 Hz), 5,43 (2H, s), 5,56-5,61 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,31 (1H, s), 7,81 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,67 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 536 (M+H)⁺

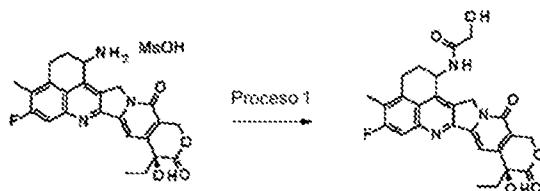
Proceso 2: N-[(1S,9S)-9-Etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-2-hidroxiacetamida

A una suspensión de metanol (50,0 mL) del compuesto (0,504 g, 0,941 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior, se añadieron un THF (20,0 ml) y una disolución acuosa de hidróxido sódico 1 N (4,00 ml, 4,00 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se terminó añadiendo ácido clorhídrico 1 N (5,00 ml, 5,00 mmol), y el disolvente se eliminó a presión reducida. Los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [capa orgánica particionada de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,412 g, 89%). Este compuesto se confirmó en el tumor de un ratón que recibió el conjugado anticuerpo-fármaco (45) o (46).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,78-1,95 (2H, m), 2,09-2,28 (2H, m), 2,39 (3H, s), 3,07-3,27 (2H, m), 3,96 (2H, d, J=6,0 Hz), 5,11-5,26 (2H, m), 5,42 (2H, s), 5,46-5,54 (1H, m), 5,55-5,63 (1H, m), 6,52 (1H, s), 7,30 (1H, s), 7,78 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,41 (1H, d, J=9,1 Hz). MS (ESI) m/z: 494 (M+H)⁺

Ejemplo 35 (Método alternativo para sintetizar el compuesto del Ejemplo 34)

{Fórmula 61}



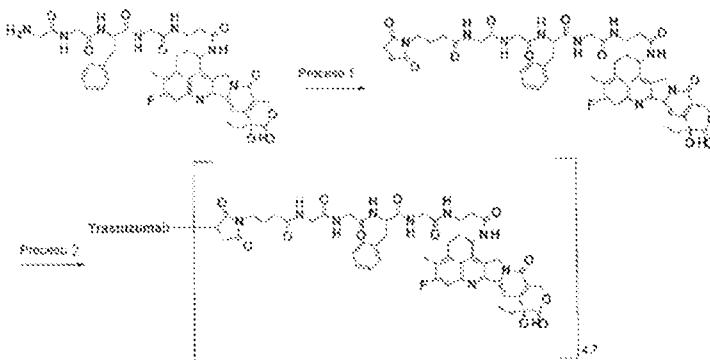
5

Proceso 1: N-[(1S,9S)-9-Etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-2-hidroxiacetamida

Se disolvió ácido glicólico (0,0201 g, 0,27 mmol) en N,N-dimetilformamida (1,0 mL), se cargó con N-hidroxisuccinimida (0,0302 g, 0,27 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etylcarbodiimida (0,0508 g, 0,27 mmol), y se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se añadió a una suspensión de N,N-dimetilformamida (1,0 mL) cargada con sal de ácido metanosulfónico de exatecán (0,1 g, 0,176 mmol) y trietilamina (0,025 mL, 0,18 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 10 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,080 g, 92%). Los datos espectrales del compuesto fueron los mismos que los del compuesto obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 34.

Ejemplo 36 Conjugado anticuerpo-fármaco (36)

{Fórmula 62}



20 Proceso 1: N-[4-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanoil]glicilglicil-L-fenilalanilglicil-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-β-alaninamida

El compuesto (60,0 mg, 0,0646 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 15 se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 usando butirato de N-succinimidil 4-maleimida en lugar de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para producir el compuesto del título como un sólido blanco pálido (24,0 mg, 38%).

25 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,68 (2H, quin, J = 7,4 Hz), 1,78-1,92 (2H, m), 2,06-2,22 (2H, m), 2,10 (2H, t, J = 7,8 Hz), 2,31-2,43 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,78 (1H, dd, J = 13,7, 9,4 Hz), 3,01 (1H, dd, J = 13,7, 4,7 Hz), 3,17 (4H, d, J = 5,1 Hz), 3,29-3,40 (2H, m), 3,52-3,80 (6H, m), 4,40-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J = 18,4 Hz), 5,26 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,52-5,61 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,12-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,84 (2H, m), 8,02 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,08-8,16 (2H, m), 8,25 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,52 (1H, d, J = 8,2 Hz).

30 MS (ESI) m/z: 990 (M+H)⁺

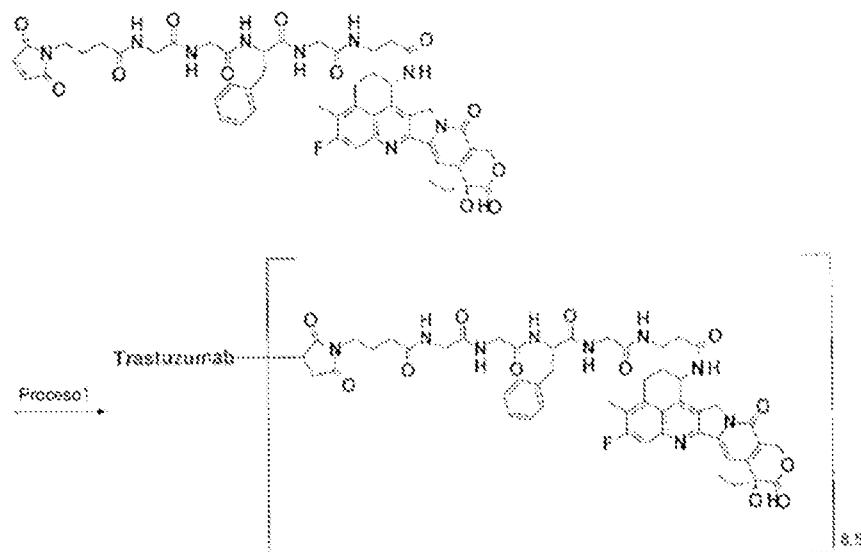
Proceso 2: Conjugado anticuerpo-fármaco (33)

Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 anterior, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 6.

Concentración de anticuerpos: 1,75 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 10,5 mg (84%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 4,7.

5 **Ejemplo 37 Conjugado anticuerpo-fármaco (37)**

[Fórmula 63]

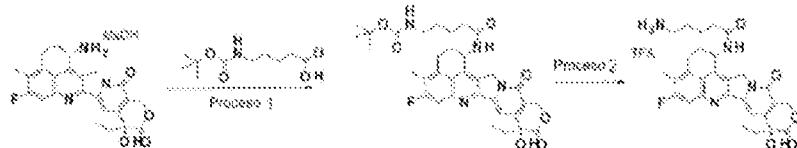


Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (37)

10 Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 36, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpos: 1,89 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 11,3 mg (90%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 8,5.

Ejemplo 38 Intermedio (38)

[Fórmula 64]



15 Proceso 1: tert-butyl (5-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-5-oxopentil)carbamato

La sal de ácido metanosulfónico de exatecán (500 mg, 0,941 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 1 usando ácido 5-(tert-butoxicarbonilamino)valérico en lugar de ácido 4-(tert-butoxicarbonilamino) butanoico para producir el compuesto del título como un sólido de color amarillo-marrón (571 mg, 96%). El compuesto se utilizó para la siguiente reacción sin realizar más purificaciones.

20 MS(ESI)m/z:635(M+H)⁺

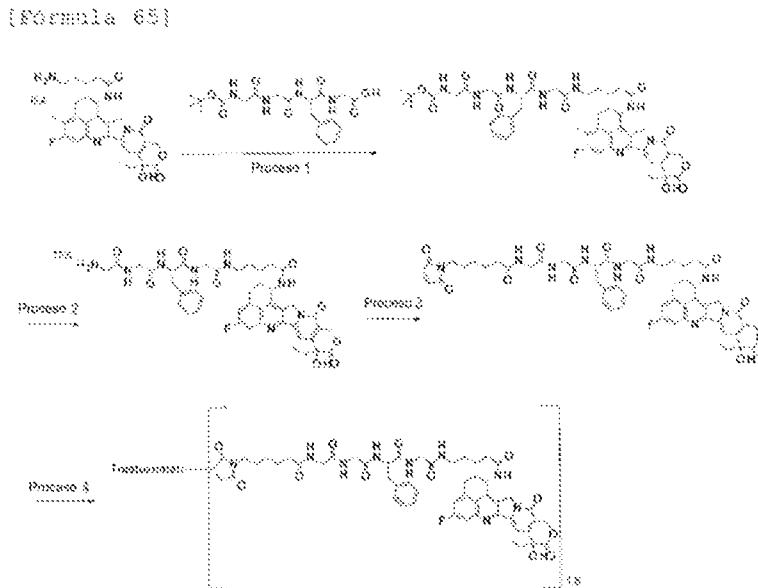
Proceso 2: 5-Amino-N-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]pentanamida

25 El compuesto (558 mg, 0,879 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 1 para producir trifluoroacetato del compuesto titulado como un sólido amarillo (363 mg, 64%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,88 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,52-1,71 (4H, m), 1,87 (2H, tt, J = 14,4, 6,9 Hz), 2,07-2,18 (2H, m), 2,22 (2H, t, J = 7,0 Hz), 2,40 (3H, s), 2,76-2,88 (2H, m), 3,13-3,22 (2H, m), 518 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,24 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,43 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,33 (1H, s), 7,65 (3H, br.s.), 7,81 (1H, d, J = 11,3 Hz), 8,49 (1H, d, J = 8,6 Hz).

5 MS (ESI) m/z: 535 (M+H)⁺

Ejemplo 39 Conjugado anticuerpo-fármaco (39)



10 Proceso 1: N-(tert-Butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-N-(5-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-5-oxopentil)glicinamida

El compuesto (348 mg, 0,537 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 38 se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (429 mg, 84%). El compuesto se utilizó para la siguiente reacción sin realizar más purificaciones.

15 Proceso 2: Glicilglicil-L-fenilalanil-N-(5-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-5-oxopentil)glicinamida

El compuesto (427 mg, 0,448 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 2 para producir trifluoroacetato del compuesto titulado como un sólido amarillo (430 mg, 99%).

20 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,38-1,49 (2H, m), 1,54-1,66 (2H, m), 1,86 (2H, tt, J = 14,5, 7,0 Hz), 2,08-2,16 (2H, m), 2,19 (2H, t, J = 7,2 Hz), 2,40 (3H, s), 2,76 (1H, dd, J = 13,9, 10,0 Hz), 3,00-3,12 (3H, m), 3,14-3,21 (2H, m), 3,57 (2H, dd, J = 4,7 Hz), 3,60-3,75 (3H, m), 3,87 (1H, dd, J = 16,8, 5,9 Hz), 4,55 (1H, td, J = 9,0, 4,7 Hz), 5,16 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J = 18,4 Hz), 5,44 (2H, s), 5,53-5,60 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,14-7,29 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,74 (1H, t, J = 5,5 Hz), 7,81 (1H, d, J = 10,9 Hz), 7,96 (3H, s.br.), 8,30-8,37 (1H, m), 8,44-8,53 (2H, m).

25 MS (ESI) m/z: 853 (M+H)⁺

Proceso 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(5-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-5-oxopentil)glicinamida

30 El compuesto (60,0 mg, 0,0621 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título como un sólido (16,0 mg, 25%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,13-1,21 (2H, m), 1,36-1,52 (6H, m), 1,53-1,65 (2H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,05-2,15 (4H, m), 2,19 (2H, s), 2,40 (3H, s), 2,79 (1H, dd, J = 13,7, 10,2 Hz), 2,98-3,10 (3H, m), 3,12-3,21 (2H, m), 3,29-3,37 (2H, m), 3,53-3,79 (6H, m), 4,41-4,50 (1H, m), 5,16 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,43 (2H, s), 5,52-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,12-7,28 (5H, m), 7,31

(1H, s), 7,63 (1H, t, J = 5,7 Hz), 7,80 (1H, d, J = 10,6 Hz), 8,02 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,08 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,12 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,24 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,45 (1H, d, J = 8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 1046 (M+H)⁺

Proceso 4: Conjugado anticuerpo-fármaco (39)

5 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/mL con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,37 mL $\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La solución (1,0 mL) se recogió en un tubo de 2 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,0155 mL; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,050 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora.

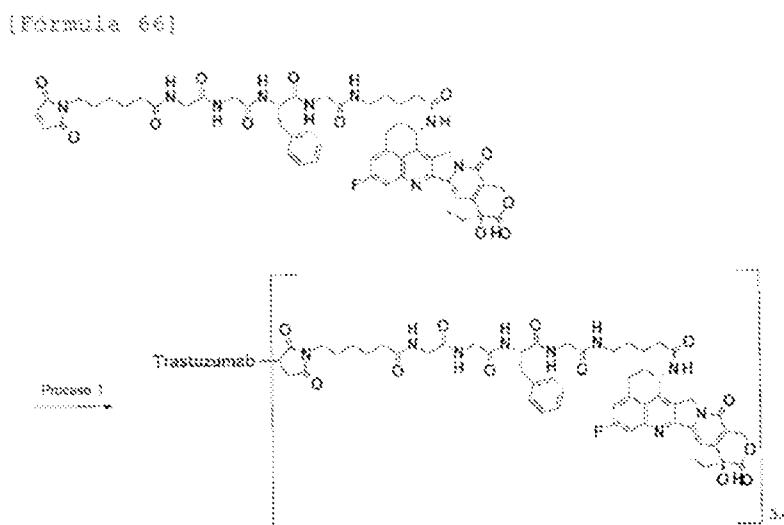
10 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras incubar la solución durante 10 minutos a 22°C, se añadió a la misma una solución de DMSO (0,0311 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 3 y se incubó para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a 22°C durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,00622 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM y se incubó a 22°C para terminar la reacción del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos.

15 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D-1 (se utilizó PBS6,0 como solución tampón) para obtener 6 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado.

20 Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 1,12 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 6,72 mg (67%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 1,8.

Ejemplo 40 Conjugado anticuerpo-fármaco (40)



25

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (40)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/mL con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,37 mL $\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La solución (1,0 mL) se recogió en un tubo de 2 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,0311 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,050 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora.

30 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Despues de incubar la solución a 22°C durante 10 minutos, se añadió a la misma una solución de DMSO (0,0622 mL; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 3 del Ejemplo 39 y se incubó para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a 22°C durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,0124 mL; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM y se incubó a 22°C para terminar la reacción

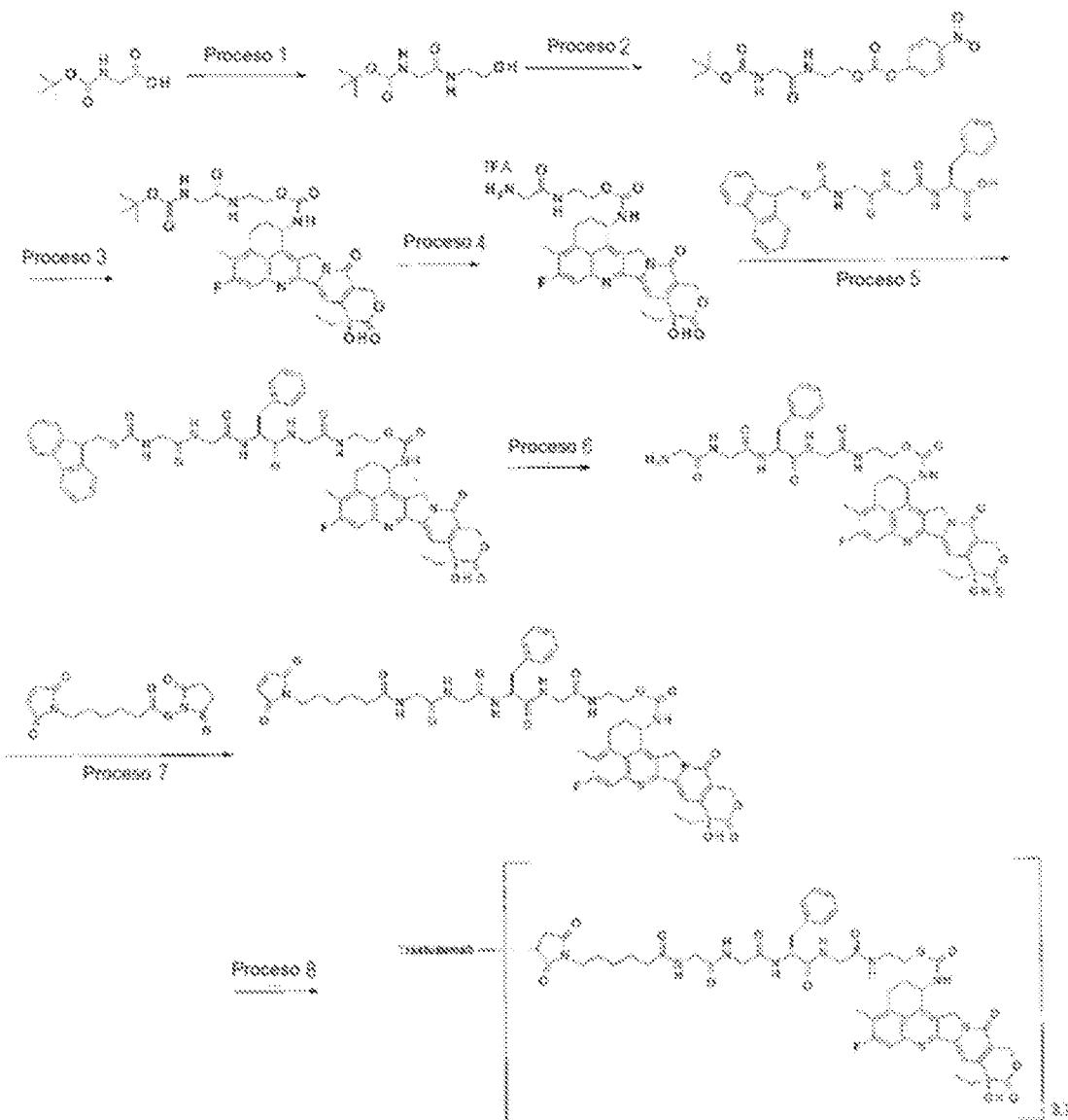
del enlazador del fármaco durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D-1 (se utilizó PBS6,0 como solución tampón) para obtener 6 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado.

5 Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 0,98 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 5,88 mg (59%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 3,4.

Ejemplo 41 Conjugado anticuerpo-fármaco (41)

(Fórmula 67)



Proceso 1: {2-[(2-hidroxietil)amino]-2-oxoetil}carbamato de tert-butilo

Se disolvió N-(tert-Butoxicarbonil)glicina (4,2 g, 24 mmol) en dimetilformamida (40 mL). Tras añadir aminoetanol (2,9 g, 48 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (3,7 g, 24 mmol) y añadir clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (6,9 g, 36 mmol), se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se cargó con tolueno para la destilación azeotrópica. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [acetato de etilo - acetato de etilo : metanol = 10 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como una sustancia aceitosa incolora (3,8 g, 72%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1,44 (9H, s), 1,69 (1H, brs), 3,43 (2H, td, J = 5,9, 5,1 Hz), 3,71 (2H, t, J = 5,1 Hz), 3,79 (2H, d, J = 5,9 Hz), 5,22 (1H, brs), 6,62 (1H, brs).

Proceso 2: 2-[{N-(tert-Butoxicarbonil)glicil}amino]4-nitrofenilcarbonato de etilo

A una disolución en THF (23 mL) del compuesto (1,0 g, 4,59 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior, se añadieron 5 diisopropiletilamina (0,80 mL, 4,59 mmol) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (1,32 g, 6,88 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano - hexano : acetato de etilo = 1 : 3 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (1,13 g, 64%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1,44 (1H, s), 3,66 (2H, td, J = 5,1, 5,9 Hz), 3,81 (2H, d, J = 5,9 Hz), 4,36 (2H, t, J = 5,1 Hz), 5,07 (1H, s), 6,48-6,53 (1H, m), 7,38 (2H, dt, J = 9,9, 2,7 Hz), 8,27 (2H, dt, J = 9,9, 2,7 Hz).

Proceso 3: 2-[{[(tert-Butoxicarbonil)amino]acetil}amino]ethyl[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]carbamato

A la sal de ácido metanosulfónico de exatecán (0,70 g, 1,2 mmol), el compuesto (0,57 g, 1,5 mmol) obtenido en el Proceso 2, y 1-hidroxibenzotriazol (3,7 g, 24 mmol), se añadió dimetilformamida (23 mL), y se añadió 15 diisopropiletilamina (0,43 mL, 2,5 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se cargó con tolueno para la destilación azeotrópica. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 10 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título (0,86 g, cuantitativo) como un sólido amarillo pálido.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,35 (9H, s), 1,78-1,94 (1H, m), 2,07-2,17 (1H, m), 2,17-2,27 (1H, m), 2,37 (3H, s), 3,05-3,16 (1H, m), 3,19-3,26 (1H, m), 3,34-3,39 (2H, m), 3,50-3,56 (2H, m), 4,00-4,07 (1H, m), 4,13-4,21 (1H, m), 5,15-5,34 (3H, m), 5,44 (2H, s), 6,54 (1H, s), 6,90-6,96 (1H, m), 7,32 (1H, s), 7,78 (1H, d, J = 11,0 Hz), 7,93-8,07 (2H, m).

Proceso 4: 2-(glicilamino)ethyl[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]carbamato

25 El compuesto (0,86 g, 2,1 mmol) obtenido en el Proceso 3 anterior se disolvió en diclorometano (15 mL). Tras añadir ácido trifluoroacético (15 mL), se agitó durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se cargó con tolueno para la destilación azeotrópica. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica particionada de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,86 g, 99%).

30 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,79-1,95 (2H, m), 2,06-2,18 (1H, m), 2,18-2,29 (1H, m), 2,38 (3H, s), 3,07-3,17 (1H, m), 3,20-3,29 (1H, m), 3,36-3,50 (2H, m), 3,51-3,62 (2H, m), 3,99-4,08 (1H, m), 4,22-4,31 (1H, m), 5,16-5,35 (3H, m), 5,42 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,46 (1H, d, J = 18,8 Hz), 6,56 (1H, s), 7,34 (1H, s), 7,65 (2H, brs), 7,79 (1H, d, J = 10,6 Hz), 7,99-8,06 (1H, m), 8,51 (1H, t, J = 5,5 Hz).

MS (APCI) m/z: 939 (M+H)⁺

35 Proceso 5: N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-{[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]carbamoyl}oxi)ethyl]glicinamida

40 Se disolvió N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina (Patente japonesa abierta al público No. 2002-60351; 0,21 g, 0,41 mmol) en N,N-dimetilformamida (3 mL). Tras añadir N-hidroxisuccinimida (0,052 g, 0,45 mmol) y clorhidrato de 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,086 g, 0,45 mmol), se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (2 mL) cargada con el compuesto (0,24 g, 0,35 mmol) obtenido en el Proceso 4 y trietilamina (0,078 mL, 0,45 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,24 g, 65%).

45 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,79-1,90 (2H, m), 2,05-2,27 (2H, m), 2,36 (3H, s), 2,73-2,81 (1H, m), 2,98-3,12 (2H, m), 3,17-3,26 (1H, m), 3,35-3,42 (2H, m), 3,55-3,79 (6H, m), 4,00-4,10 (1H, m), 4,12-4,23 (2H, m), 4,23-4,29 (2H, m), 4,45-4,55 (1H, m), 5,13-5,33 (3H, m), 5,40 (1H, d, J = 17,2 Hz), 5,44 (1H, d, J = 17,2 Hz), 6,53 (1H, s), 7,11-7,26 (5H, m), 7,26-7,33 (3H, m), 7,38 (2H, t, J = 7,6 Hz), 7,57 (1H, t, J = 5,9 Hz), 7,68 (2H, d, J = 7,4 Hz), 7,77 (1H, d, J = 11,0 Hz), 7,85 (2H, d, J = 9,0 Hz), 7,91-7,97 (1H, m), 7,98-8,05 (2H, m), 8,14 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,31-8,26 (1H, m).

50 MS (APCI) m/z: 1063 (M+H)⁺

Proceso 6: Glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-{[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]carbamoyl}oxy)ethyl]glicinamida

El compuesto (0,24 g, 0,35 mmol) obtenido en el Proceso 5 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 7 del Ejemplo 26 para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,12 g, 65%).

5 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,86 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,78-1,94 (2H, m), 2,06-2,27 (2H, m), 2,37 (3H, s), 2,72-2,81 (1H, m), 2,98-3,07 (1H, m), 3,12-3,17 (2H, m), 3,57-3,81 (6H, m), 4,00-4,21 (3H, m), 4,45-4,54 (1H, m), 5,15-5,35 (3H, m), 5,41 (1H, d, J = 17,2 Hz), 5,45 (1H, d, J = 17,2 Hz), 6,54 (1H, s), 7,11-7,26 (6H, m), 7,32 (1H, s), 7,78 (1H, d, J = 11,0 Hz), 7,93-8,00 (1H, m), 8,03 (1H, d, J = 9,4 Hz), 8,06-8,13 (1H, m), 8,21-8,27 (2H, m), 8,30-8,36 (1H, m).

MS (APCI) m/z: 841 (M+H) $^+$

10 Proceso 7: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-((1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]carbamoiil]oxi)etyl]glicinamida

El compuesto (42,0 mg, 0,0499 mmol) obtenido en el Proceso 6 se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 para dar el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (38,3 mg, 74%).

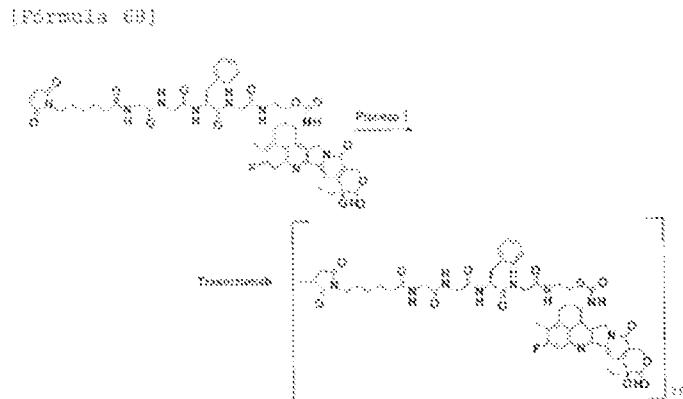
15 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,12-1,23 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,80-1,95 (2H, m), 2,05-2,27 (4H, m), 2,38 (3H, s), 3,43-2,40 (8H, m), 3,53-3,78 (6H, m), 4,00-4,21 (2H, m), 4,44-4,55 (1H, m), 5,17-5,36 (3H, m), 5,43 (2H, s), 6,54 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,19 (5H, d, J = 23,9 Hz), 7,33 (1H, s), 7,78 (1H, d, J = 10,6 Hz), 7,91-8,16 (5H, m), 8,24-8,31 (1H, m). MS (ESI) m/z: 1034 (M+H) $^+$

Proceso 8: Conjugado anticuerpo-fármaco (41)

20 Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 7 anterior, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 6.

Concentración de anticuerpos: 1,54 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 9,2 mg (74%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 3,7.

Ejemplo 42 Conjugado anticuerpo-fármaco (42)

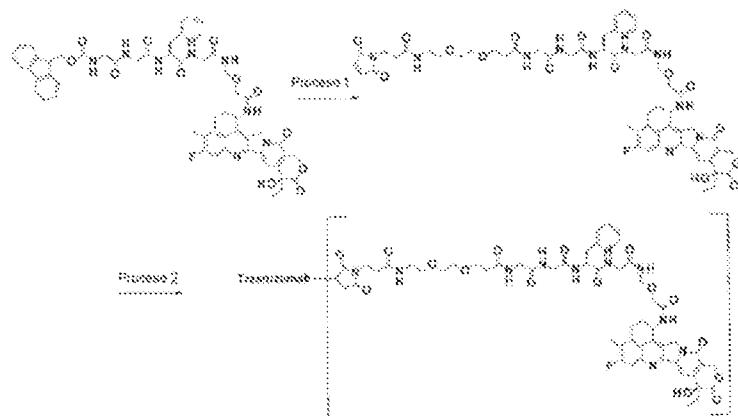


25 Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (42)

Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 7 del Ejemplo 41, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpos: 1,47 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,8 mg (71%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 7,0.

30 **Ejemplo 43 Conjugado anticuerpo-fármaco (43)**

(Formulación 69)



Proceso 1: N-[3-[2-(2-[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil]amino]etoxi]etoxi]propanoil]glicilglicil -L-fenilalanil-N-[(2-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

5 El compuesto (53,7 mg, 50,5 μ mol) obtenido en el Proceso 6 del Ejemplo 26 se disolvió en N,N-dimetilformamida (1,50 mL). Tras añadir 1,8-diazabiciclo(5.4.0)-7-undeceno (7,5 μ L, 50,5 μ mol), se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de reacción se cargó con p-toluenosulfonato de piridinio (14,0 mg, 5,56 μ mol), después se cargó con 3-(2-(2-(3-maleimidopropanamido)etoxi)etoxi)propanoato de N-succinimidilo (32,3 mg, 75,8 μ mol), y se agitó a temperatura ambiente durante 2,25 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [[capa orgánica particionada de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (27,1 mg, 47%).

15 1 H-NMR (DMSO-d₆) δ : 0,87 (3H, t, J = 7,0 Hz), 1,79-1,91 (2H, m), 2,18 (2H, t, J = 15,1 Hz), 2,29-2,33 (4H, m), 2,39 (3H, s), 2,76 (1H, dd, J = 13,9, 9,2 Hz), 3,02 (1H, dd, J = 13,7, 3,9 Hz), 3,13-3,15 (2H, m), 3,44-3,46 (6H, m), 3,57-3,59 (6H, m), 3,69-3,75 (6H, m), 4,01 (2H, s), 4,46-4,48 (1H, m), 4,63 (2H, d, J = 6,3 Hz), 5,21 (2H, s), 5,42 (2H, s), 5,60 (1H, dd, J = 13,5, 5,7 Hz), 6,54 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,17-7,24 (6H, m), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d, J = 11,0 Hz), 8,00-8,02 (2H, m), 8,13 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,17 (1H, t, J = 6,3 Hz), 8,52 (1H, d, J = 9,0 Hz), 8,65 (1H, t, J = 6,5 Hz).

MS (ESI) m/z = 1151 (M+H)⁺

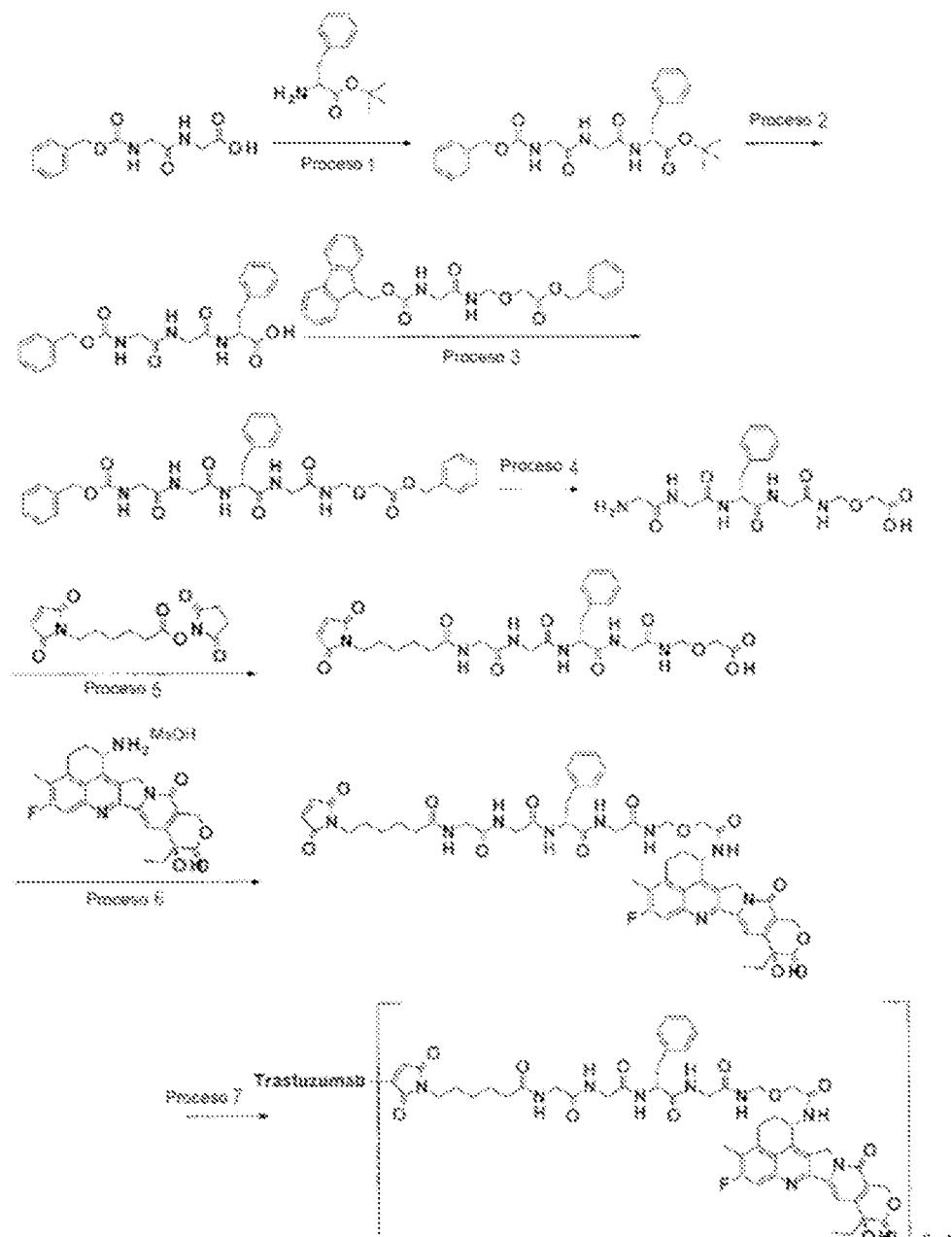
20 Proceso 2: Conjugado anticuerpo-fármaco (43)

Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7.

Concentración de anticuerpos: 1,96 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 17,6 mg (88%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 5,6.

25 **Ejemplo 44 Conjugado anticuerpo-fármaco (44)**

(Fórmula 70)



Proceso 1: N-[benzoxi]carbonil]glicilglicil-D-fenilalaninato de tert-butilo

Se disolvió N-[Bencíoxi]carbonil]glicilglicina (3,00 g, 11,3 mmol) en N,N-dimetilformamida (20,0 mL). Tras añadir N-hidroxisuccinimida (1,43 g, 12,4 mmol) y clorhidrato de 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (2,37 g, 12,4 mmol), se agitó durante 1 hora. Una solución de N,N-dimetilformamida (10 mL) cargada con D-fenilalanina tert-butilica (2,74 g, 12,38 mmol) y trietilamina (1,73 mL, 12,4 mmol) se añadió gota a gota a la solución de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se cargó con diclorometano y se lavó con agua, ácido clorhídrico 1 N y una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico; a continuación, la capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhídrico. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 9 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido incoloro (4,21 g, 80%).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,41 (9H, s), 3,03-3,14 (2H, m), 3,86-3,97 (4H, m), 4,70-4,77 (1H, m), 5,13 (2H, s), 5,43 (1H, brs), 6,42 (1H, d, J = 10,0 Hz), 6,64-6,71 (1H, m), 7,11-7,15 (2H, m), 7,20-7,31 (4H, m), 7,31-7,38 (4H, m).

MS (APCI) m/z: 470 (M+H)⁺

Proceso 2: N-[(Benzoiloxi)carbonil]glicilglicil-D-fenilalanina

El compuesto (4,21 g, 8,97 mmol) obtenido en el Proceso 1 se disolvió en acetato de etilo (20 mL). Después de añadir una solución de acetato de etilo (20,0 mL) de cloruro de hidrógeno 4 N, se dejó toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida, después se añadió tolueno y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica particionada de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido incoloro (1,66 g, 45%).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2,92-3,01 (1H, m), 3,10-3,18 (1H, m), 3,65-3,81 (3H, m), 3,88-3,98 (1H, m), 4,64-4,73 (1H, m), 5,06 (2H, s), 5,87 (1H, brs), 7,10-7,37 (13H, m).

MS (APCI) m/z: 412 (M+H)⁺

Proceso 3: N-[(benzoiloxi)carbonil]glicilglicil-D-fenilalanil-N-[2-(benzoiloxi)-2-oxoetoxi]metil]glicinamida

A una solución de dioxano (25,0 mL) del compuesto (1,25 g, 2,63 mmol) obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 32, se añadieron piperidina (5,00 mL) y N,N-dimetilformamida (5,00 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se disolvió en N,N-dimetilformamida (20,0 mL). Tras añadir el compuesto (1,20 g, 2,90 mmol) del Proceso 2 anterior y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (1,03 g, 3,16 mmol) con 16,4% de agua, se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se cargó con cloroformo y se lavó con agua; a continuación, la capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 9 : 1 (v/v)] para obtener el compuesto del título como sólido incoloro (270 mg, 16%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 2,78 (1H, dd, J = 13,6, 10,0 Hz), 3,05 (1H, dd, J = 13,9, 4,2 Hz), 3,56-3,79 (6H, m), 4,15 (2H, s), 4,47-4,54 (1H, m), 4,63 (2H, d, J = 6,7 Hz), 5,03 (2H, s), 5,15 (2H, s), 7,14-7,39 (15H, m), 7,50 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,02 (1H, t, J = 5,4 Hz), 8,16 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,34 (1H, t, J = 6,0 Hz), 8,60 (1H, t, J = 7,0 Hz).

MS (APCI) m/z: 648 (M+H)⁺

Proceso 4: Glicilglicil-D-fenilalanil-N-[(carboximetoxi)metil]glicinamida

El compuesto (200 mg, 0,31 mmol) obtenido en el Proceso 3 anterior se disolvió en N,N-dimetilformamida (5,0 mL). Tras añadir el catalizador de carbono paladio al 5% (0,12 g), se agitó en atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 9 horas. La solución de reacción se filtró a través de Celite, y el residuo se lavó con un disolvente mixto de agua y N,N-dimetilformamida. El filtrado y el lavado se combinaron y el disolvente se eliminó a presión reducida para obtener el compuesto del título como un sólido incoloro (0,15 g, cuantitativo).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 2,85 (1H, dd, J = 13,3, 9,7 Hz), 3,08 (1H, dd, J = 13,9, 5,4 Hz), 3,43-3,52 (4H, m), 3,62-3,89 (7H, m), 4,36-4,44 (1H, m), 4,58-4,67 (2H, m), 7,12-7,29 (5H, m), 8,44 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,67 (1H, d, J = 7,3 Hz), 8,78 (1H, t, J = 5,4 Hz), 8,91 (1H, brs).

MS (APCI) m/z: 424 (M+H)⁺

Proceso 5: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-D-fenilalanil-N-[(carboximetoxi)metil]glicinamida

El compuesto (0,15 g, 0,35 mmol) obtenido en el Proceso 4 anterior se disolvió en N,N-dimetilformamida (10 mL). Tras añadir hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida (0,11 g, 0,35 mmol), se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de reacción se cargó con cloroformo y se lavó con agua; a continuación, la capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [capa orgánica particionada de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido incoloro (41 mg, 26%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,13-1,24 (2H, m), 1,42-1,53 (4H, m), 2,12 (2H, t, J = 7,3 Hz), 2,82 (1H, dd, J = 13,9, 10,0 Hz), 3,09 (1H, dd, J = 13,9, 4,8 Hz), 3,17 (2H, d, J = 4,2 Hz), 3,47-3,89 (8H, m), 4,08-4,14 (1H, m), 4,41-4,49 (1H, m), 4,58-4,69 (2H, m), 7,00 (2H, s), 7,14-7,27 (5H, m), 8,31 (1H, t, J = 6,0 Hz), 8,39 (1H, brs), 8,55 (2H, brs), 8,93 (1H, brs).

MS (APCI) m/z: 615 (M-H)⁺

Proceso 6: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-D-fenilalanil-N-[(2-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi]metil]glicinamida

A una solución de N,N-dimetilformamida (10 mL) de sal de ácido metanosulfónico de exatecán (22 mg, 0,388 mmol), trietilamina (5,42 µL, 0,388 mmol), el compuesto (29 mg, 0,466 mmol) obtenido en el Proceso 5 anterior, y cloruro

de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (19 mg, 0,686 mmol) contenido un 16,4% de agua se añadieron a 0°C y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente de la solución de reacción se eliminó a presión reducida y, a continuación, el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica particionada de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (26 mg, 65%).

5 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 0,87 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,09 (2H, t, J = 7,6 Hz), 2,13-2,23 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,78 (1H, dd, J = 13,6, 9,4 Hz), 2,98-3,05 (1H, m), 3,13-3,23 (2H, m), 3,54-3,78 (8H, m), 4,02 (2H, s), 4,41-4,50 (1H, m), 4,61-4,66 (2H, m), 5,21 (2H, s), 5,42 (2H, s), 5,56-5,64 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,14-7,27 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d, J = 10,9 Hz), 8,01 (1H, t, J = 5,4 Hz), 8,07 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,14 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,31 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,53 (1H, d, J = 9,1 Hz), 8,63 (1H, t, J = 6,3 Hz).

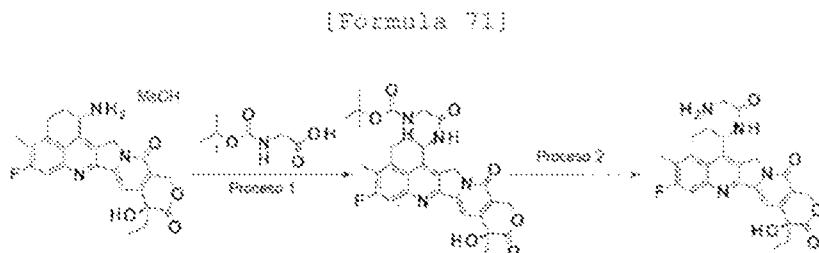
10 MS (APCI) m/z: 1034 (M+H)⁺

Proceso 7: Conjugado anticuerpo-fármaco (44)

15 Usando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 6 anterior, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco titulado de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7.

Concentración de anticuerpos: 1,87 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 16,8 mg (84%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 6,1.

Ejemplo 45 Intermedio (45)



20 Proceso 1: tert-butil (2-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetil)carbamato

25 A una solución de diclorometano (3,00 mL) de N-(tert-butoxicarbonil)-glicina (0,395 g, 2,26 mmol), N-hidroxisuccinimida (0,260 g, 2,26 mmol) y clorhidrato de 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,433 mg, 2,26 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Esta solución se añadió a una solución formada por sal de ácido metanosulfónico de exatecán (1,00 g, 1,88 mmol), trietilamina (0,315 mL, 2,26 mmol) y N,N-dimetilformamida (3,00 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 16,5 horas. La solución de reacción se diluyó con cloroformo y se lavó con solución de ácido cítrico al 10%; a continuación, la capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhídrico. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 9 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo (1,16 g, 99%).

30 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,86 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,30 (9H, s), 1,81-1,89 (2H, m), 2,09-2,21 (2H, m), 2,38 (3H, s), 3,15-3,17 (2H, m), 3,55-3,56 (2H, m), 5,15 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J = 19,2 Hz), 5,41 (2H, s), 5,55-5,56 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,95 (1H, t, J = 5,5 Hz), 7,28 (1H, s), 7,77 (1H, d, J = 11,0 Hz), 8,39 (1H, d, J = 8,6 Hz).

35 MS (APCI) m/z: 593 (M+H)⁺

Proceso 2: N-[(1S,9S)-9-Etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]glicinamida

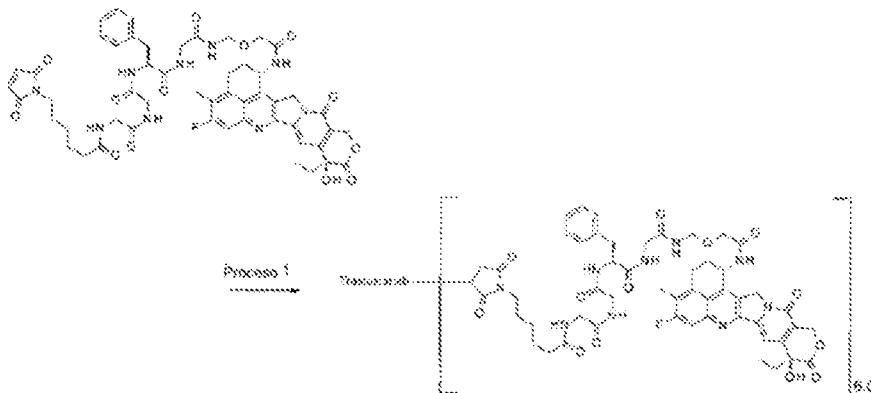
El compuesto (0,513 g, 1,01 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 1 para dar el compuesto del título como un sólido amarillo (0,463 g, 93%).

40 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD₃OD) δ : 0,96 (3H, t, J = 7,0 Hz), 1,89-1,91 (2H, m), 2,14-2,16 (1H, m), 2,30 (3H, s), 2,40-2,42 (1H, m), 3,15-3,21 (2H, m), 3,79-3,86 (2H, m), 4,63-4,67 (1H, m), 5,00-5,05 (1H, m), 5,23 (1H, d, J = 16,0 Hz), 5,48 (1H, d, J = 16,0 Hz), 5,62-5,64 (1H, m), 7,40-7,45 (2H, m).

MS (APCI) m/z: 493 (M+H)⁺

Ejemplo 46 Conjugado anticuerpo-fármaco (46)

(Fórmula 72)

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (46)

5 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó $1,48 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (50 mL) se colocó en un matraz Erlenmeyer de policarbonato de 125 mL, se cargó con una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M a temperatura ambiente (0,750 mL) con agitación utilizando un agitador magnético y, a continuación, se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (1,857 mL; 5,4 equivalentes por molécula de anticuerpo). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, se terminó la agitación y se redujo el enlace disulfuro en la parte de bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 1 hora.

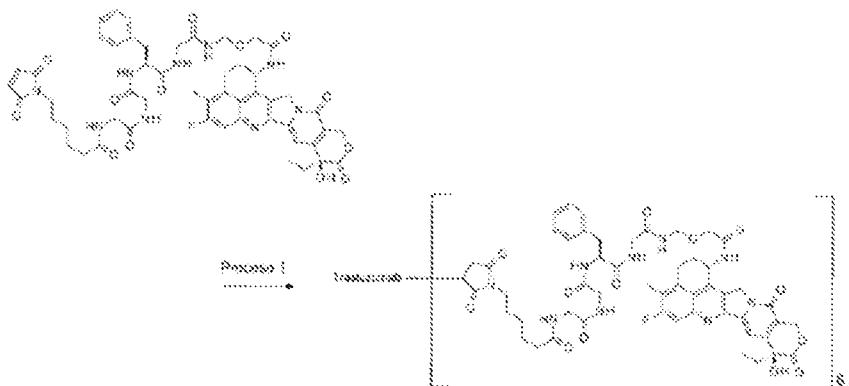
10 15 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de enfriar la solución anterior a 15°C , se añadió gradualmente gota a gota una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (2,958 mL; 8,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación. A 15°C , la solución de reacción se agitó durante los primeros 30 minutos y se incubó sin agitación para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo durante la siguiente 1 hora. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,444 mL; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de 100 mM de NAC con agitación y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reactividad de los enlazadores del fármaco sin reaccionar durante otros 20 minutos.

20 25 Purificación: Añadiendo gradualmente solución acuosa de ácido acético al 20% (aproximadamente 0,25 mL) y ABS (50 mL) a la solución anterior con agitación, el pH de la solución se ajustó a $5,5 \pm 0,1$. Esta solución se sometió a microfiltración (Millipore Corp., filtro Millex-HV, 0,45 μm , membrana de PVDF) para eliminar la materia blanquecina. Esta solución se sometió a purificación por ultrafiltración utilizando un aparato de ultrafiltración compuesto por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Biomax 50 KDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump modelo 77521-40, Pump Head modelo 7518-00) y un tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Específicamente, mientras que el ABS se añadía gota a gota (un total de 800 mL) como solución tampón para la purificación a la solución de reacción, se realizaba la purificación por ultrafiltración para eliminar los enlazadores de fármacos no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, sustituyendo también la solución tampón por ABS y concentrando aún más la solución. La solución purificada obtenida se sometió a microfiltración (0,22 μm (Millipore Corp., filtro Millex-GV, membrana de PVDF) y 0,10 μm (Millipore Corp., filtro Millex-VV, membrana de PVDF)) para obtener 42,5 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado. Caracterización fisicoquímica: Utilizando los procedimientos comunes E y F (se utilizaron $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido), y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

30 35 Concentración de anticuerpos: 10,4 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 442 mg (88,5%), número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido por el procedimiento común E: 6,0, y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido por el procedimiento común F: 7,5.

Ejemplo 47 Conjugado anticuerpo-fármaco (47)

(Fórmula 73)

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (47)

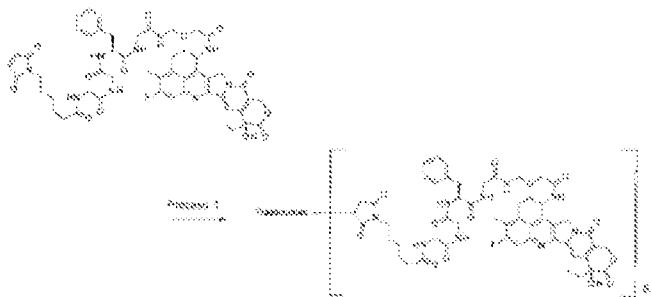
Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó $1,48 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (15 mL) se colocó en un tubo de polipropileno y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,567 mL; 5,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,225 mL). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, se redujo el enlace disulfuro en la parte bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 2 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador del fármaco: Despues de añadir DMSO (0,146 mL) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (0,928 mL; 9,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se incubó para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo a 15°C durante 30 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,133 mL; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM y se agitó a temperatura ambiente para poner fin a la reactividad de los enlazadores del fármaco sin reaccionar durante otros 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación mediante el procedimiento común D (se utilizó ABS como solución tampón) para obtener 49 mL de una solución que contenía el compuesto de interés.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E (se utilizaron $\epsilon_{D,280} = 5178$ y $\epsilon_{D,370} = 20217$), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpos: 2,91 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 143 mg (95%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 6,2.

Ejemplo 48 Conjugado anticuerpo-fármaco (48)

(Fórmula 74)

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (48)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó $1,48 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (280 mL) se colocó en un matraz Erlenmeyer de policarbonato de 1000 mL, se cargó con una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M a temperatura ambiente (4,200 mL) con agitación utilizando un agitador magnético y, a continuación, se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (10,594 mL; 5,5 equivalentes por molécula de anticuerpo). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, se terminó la agitación y se redujo el enlace disulfuro en la parte de bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 2 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Despues de enfriar la solución anterior a 15°C, se añadió gradualmente gota a gota una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (17,335 mL; 9,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación. La solución de reacción se agitó a 15°C para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo durante 30 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (2,485 mL; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de 100 mM de NAC con agitación y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reactividad de los enlazadores del fármaco sin reaccionar durante otros 20 minutos.

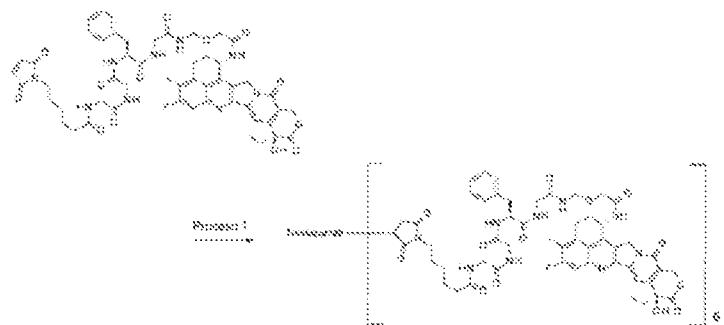
Purificación: Añadiendo gradualmente solución acuosa de ácido acético al 20% (aproximadamente 1,4 mL) y ABS (280 mL) a la solución anterior con agitación, el pH de la solución se ajustó a $5,5 \pm 0,1$. Esta solución se sometió a microfiltración (0,45 μ m, membrana de PVDF) para eliminar la materia blanquecina y se obtuvieron aproximadamente 600 mL de filtrado. Esta solución se sometió a purificación por ultrafiltración utilizando un aparato de ultrafiltración compuesto por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Biomax 50 KDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump modelo 77521-40, Pump Head modelo 7518-00) y un tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Específicamente, mientras que el ABS se añadía gota a gota (un total de 4800 mL) como solución tampón para la purificación a la solución de reacción, se realizaba la purificación por ultrafiltración para eliminar los enlazadores de fármacos no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, sustituyendo también la solución tampón por ABS y concentrando aún más la solución. La solución purificada obtenida se sometió a microfiltración (dos veces con 0,22 μ m y 0,10 μ m, membrana de PVDF) para obtener 70 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E (se utilizaron $\epsilon_{D,280} = 5178$ y $\epsilon_{D,370} = 20217$), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpos: 35,96 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 2517 mg (90%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 6,2.

Ejemplo 49 Conjugado anticuerpo-fármaco (49)

25

[Fórmula 75]



Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (49)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml reemplazando el medio con PBS6,0/EDTA utilizando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm se utilizó $1,48 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (280 mL) se colocó en un matraz Erlenmeyer de policarbonato de 1.000 mL, se cargó con una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M a temperatura ambiente (4.200 mL) con agitación utilizando un agitador magnético y, a continuación, se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (10.594 mL; 5,5 equivalentes por molécula de anticuerpo). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, se terminó la agitación y se redujo el enlace disulfuro en la parte de bisagra del anticuerpo incubándolo a 37°C durante 2 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Despues de enfriar la solución anterior a 15°C, se añadió gradualmente gota a gota una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (17,335 mL; 9,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación. La solución de reacción se agitó a 15°C para conjugar el fármaco enlazador con el anticuerpo durante 30 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (2,485 mL; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de 100 mM de NAC con agitación y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reactividad de los enlazadores del fármaco sin reaccionar durante otros 20 minutos.

Purificación: Añadiendo gradualmente solución acuosa de ácido acético al 20% (aproximadamente 1,4 mL) y ABS (280 mL) a la solución anterior con agitación, el pH de la solución se ajustó a $5,5 \pm 0,1$. Esta solución se sometió a microfiltración (0,45 μ m, membrana de PVDF) para eliminar la materia blanquecina y se obtuvieron aproximadamente 600 mL de filtrado. Esta solución se sometió a purificación por ultrafiltración utilizando un aparato de ultrafiltración compuesto por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Ultracell 30

5 KDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump modelo 77521-40, Pump Head modelo 7518-00) y un tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Específicamente, mientras que el ABS se añadía gota a gota (un total de 4800 mL) como solución tampón para la purificación a la solución de reacción, se realizaba la purificación por ultrafiltración para eliminar los enlazadores de fármacos no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, sustituyendo también la solución tampón por ABS y concentrando aún más la solución. La solución purificada obtenida se sometió a microfiltración (dos veces con 0,22 µm y 0,10 µm, membrana de PVDF) para obtener 130 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado.

10 Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento común E (se utilizaron $\epsilon_{D,280} = 5178$ y $\epsilon_{D,370} = 20217$), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

15 Concentración de anticuerpos: 21,00 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 2730 mg (97,5%), y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo: 6,3.

Ejemplo 50 Conjugado anticuerpo-fármaco (50)

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (50)

20 Los conjugados anticuerpo-fármaco (47), (48) y (49) producidos en los Ejemplos 47, 48 y 49 se mezclaron (243 mL) y se cargaron adicionalmente con ABS (39,75 mL) para obtener 283 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco titulado.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando los procedimientos comunes E y F (se utilizaron $\epsilon_{D,280} = 5178$, y $\epsilon_{D,370} = 20217$), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

25 Concentración de anticuerpos: 20,0 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 5655 mg, número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido por el procedimiento común E: 6,3, y número medio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido por el procedimiento común F: 7,8.

Evaluación Ejemplo 1 Efecto inhibidor del crecimiento celular (1) del conjugado anticuerpo-fármaco

30 Línea de cáncer de mama humano KPL-4 de células positivas al antígeno HER2 (Dr. Junichi Kurebayashi, Kawasaki Medical School, British Journal of Cancer, (1999) 79 (5/6).. 707-717) o la línea de cáncer de mama humano MCF7 de células antígeno-negativas (European Collection of Cell Cultures; ECACC) se cultivó en 25 RPMI1640 (GIBCO) que contenía un 10% de suero bovino fetal (MOREGATE) (en lo sucesivo, denominado medio). Las células KPL-4 o MCF7 se prepararon para tener una concentración de $2,5 \times 10^4$ células/mL utilizando medio, se añadieron a una concentración de 100 µL/pocillo a una microplaca de 96 pocillos para cultivo celular y se cultivaron durante toda la noche.

35 30 Al día siguiente, se añadió trastuzumab o el conjugado anticuerpo-fármaco diluido en 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM y 0,064 nM utilizando medio a una concentración de 10 µL/pocillo a la microplaca. Se añadió medio a una concentración de 10 µL/pocillo a los pocillos no suplementados con anticuerpos. Las células se cultivaron bajo un 5% de CO₂ a 37°C durante 5 a 7 días. Tras el cultivo, se sacó la microplaca de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad igual de CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) y se agitó. Tras dejar reposar la microplaca a temperatura ambiente durante 10 minutos, se midió la intensidad de luminiscencia de cada pocillo utilizando un lector de placas (PerkinElmer). El valor IC₅₀ se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

a: Concentración de la muestra a

b: Concentración de la muestra b

40 c: Viabilidad celular de la muestra a

d: Viabilidad celular de la muestra b

45 La viabilidad celular a cada concentración se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{a}{b} \times 100$$

a: Intensidad media de luminiscencia de los pocillos de muestra (n = 2)

45 b: Intensidad media de luminiscencia de los pocillos no suplementados con anticuerpos (n = 10)

Los conjugados anticuerpo-fármaco (2), (3), (5), (7), (10), (12), (13), (16), (18), (40) y (42) exhibieron un efecto inhibidor del crecimiento celular de IC₅₀ < 0,1 (nM) frente a las células KPL-4.

Los conjugados anticuerpo-fármaco (4), (6), (9), (15), (17), (21), (22), (25), (36), (37), (39), (41) y (43) mostraron un efecto inhibidor del crecimiento celular de $0,1 < IC_{50} < 1$ (nM) frente a las células.

5 Los conjugados anticuerpo-fármaco (20), (24) y (27) mostraron un efecto inhibidor del crecimiento celular de $1 < IC_{50} < 100$ (nM) frente a las células. Ninguno de los conjugados anticuerpo-fármaco (19) o (26) mostró un efecto inhibidor del crecimiento celular contra las células (> 100 (nM)).

Por otra parte, los conjugados anticuerpo-fármaco (5), (13) y (43) presentaron un efecto inhibidor del crecimiento celular de $1 < IC_{50} < 100$ (nM) frente a las células MCF7, mientras que ninguno de los conjugados anticuerpo-fármaco (2), (3), (4), (6), (7), (9), (10), (12), (15), (16), (17), (18), (25), (26), (27), (39), (40), (41), (42) y (44) mostró un efecto inhibidor del crecimiento celular frente a las células (> 100 (nM)).

10 El trastuzumab no mostró un efecto inhibidor del crecimiento celular contra las células KPL-4 ni contra las células MCF7 (> 100 (nM)).

Ejemplo de evaluación 2 Prueba antitumoral (1)

15 Ratón: Se aclimataron ratones desnudos hembra de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) durante 4 a 7 días en condiciones SPF antes de utilizarlos en el experimento. Los ratones se alimentaron con pienso sólido esterilizado (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd) y recibieron agua del grifo esterilizada (preparada mediante la adición de una solución de hipoclorito de sodio de 5 a 15 ppm).

Expresión de ensayo y cálculo: En todos los estudios, el eje mayor y el eje menor de un tumor se midieron dos veces por semana utilizando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitutoyo Corp.), y se calculó el volumen tumoral (mm^3). La expresión del cálculo es la que se muestra a continuación.

20 Todos los conjugados anticuerpo-fármaco y el anticuerpo se diluyeron con solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) y se utilizaron a un volumen de 10 mL/kg para la administración intravenosa en la vena de la cola de cada ratón.

25 Las células KPL-4 se suspendieron en solución salina fisiológica, y $1,5 \times 10^7$ células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón desnudo hembra (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente en el Día 15. El conjugado anticuerpo-fármaco (27) o el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab (Ejemplo de referencia 1) para un grupo de control se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en los Días 15 y 22. Se estableció un grupo no tratado como grupo de control.

30 Los resultados se muestran en la figura 3. La administración de trastuzumab inhibió el crecimiento tumoral, mientras que la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (27) produjo un efecto inhibidor del crecimiento tumoral más significativo. En el dibujo, la abscisa representa los días tras la inoculación del tumor y la ordenada el volumen tumoral. Además, los ratones que recibieron trastuzumab o el conjugado anticuerpo-fármaco (27) no presentaron signos notables como pérdida de peso, lo que sugiere que el conjugado anticuerpo-fármaco (27) es altamente seguro. En los Ejemplos de Evaluación a continuación relativos a la prueba antitumoral, la prueba se llevó a cabo mediante el procedimiento utilizado en este Ejemplo de Evaluación, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo de evaluación 3 Prueba antitumoral (2)

35 Las células de la línea de cáncer gástrico humano NCI-N87 adquiridas a ATCC (American Type Culture Collection) se suspendieron en solución salina fisiológica, y 1×10^7 células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón desnudo hembra (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente en el Día 7. El conjugado anticuerpo-fármaco (8) o (28), o trastuzumab emtansina (Ejemplo de referencia 2) se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón el Día 7. Se estableció un grupo no tratado como grupo de control.

40 Los resultados se muestran en la figura 4. Se confirmó que los conjugados anticuerpo-fármaco (8) y (28) tenían un fuerte efecto antitumoral con una regresión tumoral equivalente a la del trastuzumab emtansina. Además, se observó que la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (8) o (28), o de trastuzumab emtansina no provocaba pérdida de peso en los ratones.

Ejemplo de evaluación 4 Prueba antitumoral (3)

45 Las células de la línea de mama humana JIMT-1 adquiridas a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) se suspendieron en solución salina fisiológica, y 3×10^6 células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón desnudo hembra (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente en el Día 12. El conjugado anticuerpo-fármaco (8), (29) o (30), trastuzumab o trastuzumab emtansina se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón los días 12 y 19. Se estableció un grupo de administración de solución salina fisiológica como grupo de control.

Los resultados se muestran en la figura 5. La administración de trastuzumab o trastuzumab emtansina no inhibió el crecimiento del tumor JIMT-1. Por otro lado, la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (8), (29) o (30) inhibió el crecimiento del tumor. Además, se observó que la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (8), (29) o (30), trastuzumab o trastuzumab emtansina no producía pérdida de peso en los ratones.

5 **Evaluación Ejemplo 5 Efecto inhibidor del crecimiento celular (2) del conjugado anticuerpo-fármaco**

La línea de cáncer de pulmón humano de células no pequeñas Calu-3 (ATCC) se cultivó en medio esencial mínimo de Eagle (GIBCO) que contenía 10% de suero bovino fetal (MOREGATE) (en lo sucesivo, denominado medio MEM).

10 La línea de cáncer gástrico humano NCI-N87 (ATCC) o la línea de cáncer gástrico humano MKN-45 (Health Science Research Resources Bank) se cultivó en medio RPMI1640 (GIBCO) que contenía un 10% de suero bovino fetal (en lo sucesivo, medio RPMI).

La línea de cáncer de mama humano MDA-MB-453 (ATCC) o la línea de cáncer de mama humano MDA-MB-468 (ATCC) se cultivó en medio L-15 de Leibovitz (GIBCO) que contenía 10% de suero bovino fetal (en lo sucesivo, denominado medio de Leibovitz).

15 Entre estos 5 tipos de líneas celulares, Calu-3, NCI-N87 y MDA-MB-453 son células HER2-positivas, y MKN-45 y MDA-MB-468 son células HER2-negativas.

Calu-3, NCI-N87, o MKN-45 se preparó para tener una concentración de 4×10^4 células/mL utilizando medio MEM o medio RPMI, se añadió a una concentración de 25 μ L/pocillo a una microplaca de 96 pocillos para cultivo celular cargada con 65 μ L/pocillo de un medio, y se cultivó durante la noche bajo 5% de CO₂ a 37°C. Asimismo, se preparó MDA-MB-453 o MDA-MB-468 para tener una concentración de 4×10^4 células/mL utilizando medio de Leibovitz, se añadió a una concentración de 25 μ L/pocillo a una microplaca de 96 pocillos para cultivo celular cargada con 65 μ L/pocillo de medio, y se cultivó durante la noche a 37°C sin fijar la concentración de CO₂.

20 Al día siguiente, se añadió una sustancia de ensayo diluida en 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM y 0,064 nM utilizando medio RPMI o medio de Leibovitz, o medio RPMI o medio de Leibovitz a una concentración de 10 μ L/pocillo a la microplaca. Las células se cultivaron bajo una concentración del 5% de CO₂ a 37°C o a 37°C sin fijar la concentración de CO₂ durante 6 días.

25 Para Calu-3, NCI-N87 y MDA-MB-468, se añadió el conjugado anticuerpo-fármaco (46) como sustancia de ensayo. Para las demás células, se añadió el conjugado anticuerpo-fármaco (50) como sustancia de ensayo. Tras el cultivo, se sacó la microplaca de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad igual de CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) y se agitó con un mezclador de placas para lisar completamente las células. Tras dejar reposar la microplaca a temperatura ambiente durante 10 minutos, se midió la intensidad de la luminiscencia utilizando un lector de placas.

30 La viabilidad celular se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{a}{b} \times 100$$

35 a: Intensidad media de luminiscencia de los pocillos suplementados con la sustancia de ensayo

b: Intensidad media de luminiscencia de los pocillos suplementados con medio

El valor IC₅₀ se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

a: Concentración a de la sustancia de ensayo

b: Concentración b de la sustancia de ensayo

40 c: Viabilidad de las células suplementadas con la sustancia de ensayo con la concentración a

d: Viabilidad de las células suplementadas con la sustancia de ensayo con la concentración b

Las concentraciones a y b establecen la relación a > b cruzando el 50% de viabilidad celular.

45 El conjugado anticuerpo-fármaco (46) mostró un efecto inhibidor del crecimiento celular de IC₅₀ < 1 (nM) frente a las células HER2-positivas Calu-3 y NCI-N87. Por otro lado, el conjugado anticuerpo-fármaco (46) no mostró efecto inhibidor del crecimiento celular frente a las células HER2-negativas MDA-MB-468 (> 100 (nM)).

El conjugado anticuerpo-fármaco (50) mostró un efecto inhibidor del crecimiento celular de IC₅₀ < 1 (nM) frente a las células HER2-positivas MDA-MB-453. Por otro lado, el conjugado anticuerpo-fármaco (50) no mostró efecto inhibidor del crecimiento celular frente a las células HER2-negativas MKN-45 (> 100 (nM)).

Ejemplo de evaluación 6 Prueba antitumoral (4)

Las células de la línea de cáncer de páncreas humano Capan-1 (ATCC) que expresan débilmente HER2 se suspendieron en solución salina fisiológica, y 4×10^7 células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón desnudo hembra para generar el tumor sólido Capan-1. Posteriormente, este tumor sólido

5 se mantuvo en varios pasajes mediante trasplante a ratones desnudos hembra y se utilizó en este ensayo. Una sección del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón desnudo hembra (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente en el Día 20.

El conjugado anticuerpo-fármaco (31), trastuzumab, o trastuzumab emtansina se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón el Día 20. Se estableció un grupo de administración de

10 solución salina fisiológica como grupo de control.

Los resultados se muestran en la figura 6. La administración de trastuzumab o trastuzumab emtansina no inhibió el crecimiento del tumor Capan-1. Por el contrario, la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (31) inhibió el crecimiento del tumor, lo que demuestra que el conjugado anticuerpo-fármaco (31) es eficaz incluso para tumores con baja expresión de HER2. El conjugado anticuerpo-fármaco (31) no inhibió el crecimiento del tumor GCIY de la

15 línea de cáncer gástrico sin expresión de HER2.

En cuanto a la expresión de HER2 en el tumor, sobre la base de los resultados de medición de la tinción inmunohistoquímica descritos en la 3^a edición de las directrices para las pruebas de HER2 (desarrolladas por el Japanese Pathology Board for Optimal Use of Trastuzumab, The Japanese Society of Pathology), se realizó una

20 clasificación tal que la puntuación de 3+: expresión alta, 2+: expresión moderada, y 1+: expresión baja. Incluso si la puntuación era 0 en este método de medición, el tumor encontrado HER2-positivo por otros métodos de medición, tal como un método de medición utilizando un citómetro de flujo, se clasificó como tumor de baja expresión.

Ejemplo de evaluación 7 Prueba antitumoral (5)

Las células de la línea de cáncer gástrico humano NCI-N87 adquiridas a ATCC se suspendieron en solución salina fisiológica, y 1×10^7 células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón desnudo hembra (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente en el Día 6. El conjugado anticuerpo-fármaco (50) se

25 administró por vía intravenosa a cada dosis de 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón el Día 6. Se estableció un grupo de administración de solución tampón de acetato como grupo de control.

Los resultados se muestran en la figura 7. El conjugado anticuerpo-fármaco (50) mostró un efecto antitumoral dependiente de la dosis. Además, se observó que la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (50) no

30 provocaba pérdida de peso en los ratones.

Ejemplo de evaluación 8 Prueba antitumoral (6)

Esta prueba se llevó a cabo mediante el método siguiente.

Ratón: Se sometieron al experimento ratones desnudos hembra de 6 a 12 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.).

35 Expresión de ensayo y cálculo: El eje mayor y el eje menor del tumor se midieron dos veces por semana utilizando un calibrador digital electrónico, y se calculó el volumen tumoral (mm³). La expresión del cálculo es la que se muestra a continuación.

El conjugado anticuerpo-fármaco, trastuzumab y trastuzumab emtansina se diluyeron con una solución tampón de acetato y se utilizaron a un volumen de 10 mL/kg para la administración intravenosa en la vena de la cola de cada ratón.

40

En este ensayo se utilizó tumor (ST225; South Texas Accelerated Research Therapeutics (START)) extirpado de una paciente con cáncer de mama y mantenido en varios pasajes mediante trasplante a ratones desnudos hembra. Este tumor expresaba moderadamente HER2 (que recibió una puntuación de 2+ en la tinción inmunohistoquímica).

45 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lateral del cuerpo de cada ratón desnudo hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen tumoral alcanzó de 100 a 300 mm³. La fecha de agrupación se definió como Día 0. El conjugado anticuerpo-fármaco (50), el trastuzumab o el trastuzumab emtansina se administraron por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón el Día 0. Se estableció un grupo de administración de solución tampón de acetato como grupo de control.

50 Los resultados se muestran en la figura 8. La administración de trastuzumab no inhibió el crecimiento del tumor ST225 de cáncer de mama con expresión moderada de HER2. En cambio, la administración de trastuzumab emtansina o del conjugado anticuerpo-fármaco (50) inhibió notablemente el crecimiento del tumor.

Ejemplo de evaluación 9 Prueba antitumoral (7)

En este ensayo se utilizó tumor (ST910; START) extirpado de una paciente con cáncer de mama y mantenido en varios pasajes mediante trasplante a ratones desnudos hembra. Este tumor expresaba poco HER2 (que recibió una puntuación de 1+ en la tinción inmunohistoquímica).

5 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lateral del cuerpo de cada ratón desnudo hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen tumoral alcanzó de 100 a 300 mm³. La fecha de agrupación se definió como Día 0. El conjugado anticuerpo-fármaco (50), el trastuzumab o el trastuzumab emtansina se administraron por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón el Día 0. Se estableció un grupo de administración de solución tampón de acetato como grupo de control.

10 Los resultados se muestran en la figura 9. La administración de trastuzumab o trastuzumab emtansina no inhibió el crecimiento del tumor de cáncer de mama ST910 con baja expresión de HER2. Por el contrario, la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (50) inhibió notablemente el crecimiento del tumor, demostrando que el conjugado anticuerpo-fármaco (50) es eficaz para tumores de cáncer de mama poco expresivos de HER2. Este Ejemplo de Evaluación 9 se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que el Ejemplo de Evaluación 8.

Ejemplo de evaluación 10 Prueba antitumoral (8)

15 Esta prueba se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento. Los Ejemplos de Evaluación 11 a 13 también se realizaron por este procedimiento.

Ratón: Se utilizaron ratones desnudos hembra de 5 a 8 semanas de edad (Harlan Laboratories Ltd.).

20 Expresión de ensayo y cálculo: El eje mayor y el eje menor del tumor se midieron dos veces por semana utilizando un calibrador digital electrónico, y se calculó el volumen tumoral (mm³). La expresión del cálculo es la que se muestra a continuación.

$$\text{Volumen de tumor (mm}^3\text{)} = 0,52 \times \text{eje mayor (mm)} \times [\text{eje menor (mm)}]^2$$

El conjugado anticuerpo-fármaco, trastuzumab y trastuzumab emtansina se diluyeron con una solución tampón de acetato y se utilizaron a un volumen de 10 mL/kg para la administración intravenosa en la vena de la cola de cada ratón.

25 En este ensayo se utilizó tumor (CTG-0401; Champions Oncology Inc.) extirpado de un paciente con cáncer colorrectal y mantenido en varios pasajes mediante trasplante a ratones desnudos hembra. Este tumor expresaba baja o moderadamente HER2 (que recibió una puntuación de 1+ o 2+ en la tinción inmunohistoquímica).

30 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado izquierdo del cuerpo de cada ratón desnudo hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen tumoral alcanzó de 100 a 300 mm³. La fecha de agrupación se definió como Día 0. El conjugado anticuerpo-fármaco (50), el trastuzumab o el trastuzumab emtansina se administraron por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón el Día 0. Se estableció un grupo de administración de solución tampón de acetato como grupo de control.

35 Los resultados se muestran en la figura 10. La administración de trastuzumab o trastuzumab emtansina no inhibió el crecimiento del tumor de cáncer colorrectal CTG-0401 con baja o moderada expresión de HER2. Por el contrario, la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (50) inhibió notablemente el crecimiento del tumor.

Ejemplo de evaluación 11 Prueba antitumoral (9)

En este ensayo se utilizó tumor (CTG-0860; Champions Oncology Inc.) extirpado de un paciente con cáncer de pulmón de células no pequeñas y mantenido en varios pasajes mediante trasplante a ratones desnudos hembra. Este tumor expresaba moderadamente HER2 (que recibió una puntuación de 2+ en la tinción inmunohistoquímica).

40 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado izquierdo del cuerpo de cada ratón desnudo hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen tumoral alcanzó de 100 a 300 mm³. La fecha de agrupación se definió como Día 0. El conjugado anticuerpo-fármaco (50), el trastuzumab o el trastuzumab emtansina se administraron por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón el Día 0. Se estableció un grupo de administración de solución tampón de acetato como grupo de control.

45 Los resultados se muestran en la figura 11. La administración de trastuzumab o trastuzumab emtansina no inhibió el crecimiento del tumor CTG-0860 de cáncer de pulmón de células no pequeñas que expresaba moderadamente HER2. Por el contrario, la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (50) inhibió notablemente el crecimiento del tumor.

Ejemplo de evaluación 12 Prueba antitumoral (10)

50 En este ensayo se utilizó tumor (CTG-0927; Champions Oncology Inc.) extirpado de un paciente con cáncer de vías biliares y mantenido en varios pasajes mediante trasplante a ratones desnudos hembra. Este tumor expresaba altamente HER2 (que recibió una puntuación de 3+ en la tinción inmunohistoquímica).

Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado izquierdo del cuerpo de cada ratón desnudo hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen tumoral alcanzó de 100 a 300 mm³. La fecha de agrupación se definió como Día 0. El conjugado anticuerpo-fármaco (50), el trastuzumab o el trastuzumab emtansina se administraron por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón el Día 0. Se estableció un grupo de administración de solución tampón de acetato como grupo de control.

5 Los resultados se muestran en la figura 12. La administración de trastuzumab no inhibió el crecimiento del tumor CTG-0927 de cáncer de vías biliares con alta expresión de HER2. Por el contrario, la administración de trastuzumab emtansina inhibió el crecimiento del tumor. Además, la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (50) indujo la regresión del tumor.

10 **Ejemplo de evaluación 13 Prueba antitumoral (11)**

En este ensayo se utilizó tumor (CTG-0137; Champions Oncology Inc.) extirpado de un paciente con cáncer de esófago y mantenido en varios pasajes mediante trasplante a ratones desnudos hembra. Este tumor expresaba altamente HER2 (que recibió una puntuación de 3+ en la tinción inmunohistoquímica).

15 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado izquierdo del cuerpo de cada ratón desnudo hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen tumoral alcanzó de 100 a 300 mm³. La fecha de agrupación se definió como Día 0. El conjugado anticuerpo-fármaco (50), el trastuzumab o el trastuzumab emtansina se administraron por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón el Día 0. Se estableció un grupo de administración de solución tampón de acetato como grupo de control.

20 Los resultados se muestran en la figura 13. La administración de trastuzumab no inhibió el crecimiento del tumor de cáncer de esófago CTG-0137 con alta expresión de HER2. En cambio, la administración de trastuzumab emtansina o del conjugado anticuerpo-fármaco (50) inhibió notablemente el crecimiento del tumor.

25 **Ejemplo de evaluación 14 Prueba antitumoral (12)**

Las células de la línea de cáncer de ovario humano SK-OV-3 con alta expresión de HER2 compradas a ATCC se suspendieron en solución salina fisiológica, y 4×10^7 células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón desnudo hembra para preparar el tumor sólido SK-OV-3. Posteriormente, este tumor sólido se mantuvo en varios pasajes mediante trasplante a ratones desnudos hembra y se utilizó en este ensayo.

30 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón desnudo hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen tumoral alcanzó de 100 a 300 mm³. La fecha de agrupación se definió como Día 0. El conjugado anticuerpo-fármaco (50), el trastuzumab o el trastuzumab emtansina se administraron por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón el Día 0. Se estableció un grupo de administración de solución salina fisiológica como grupo de control.

35 Los resultados se muestran en la figura 14. La administración de trastuzumab no inhibió el crecimiento del tumor SK-OV-3. En cambio, la administración de trastuzumab emtansina o del conjugado anticuerpo-fármaco (50) inhibió notablemente el crecimiento del tumor.

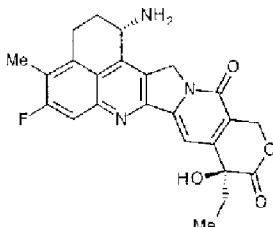
35 **Texto libre del listado de secuencias**

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada del anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2

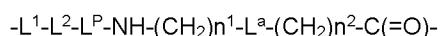
SEQ ID NO: 2 - Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera del anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que contiene un conjugado anticuerpo-fármaco o una sal del mismo como componente activo, y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable, en el que el conjugado anticuerpo-fármaco es un conjugado anticuerpo-fármaco en el que un compuesto antitumoral representado por la
- 5 siguiente fórmula:



se conjuga con un anticuerpo anti-HER2 mediante un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



- 10 a través de un enlace tioéter que se forma en una fracción de enlace disulfuro presente en la parte bisagra del anticuerpo anti-HER2,

en donde

- 15 el anticuerpo anti-HER2 se conecta a la fracción L^1 terminal, el compuesto antitumoral se conecta al grupo carbonilo de la fracción $-(CH_2)n^2-C(=O)-$ con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como posición de conexión,

en donde

n^1 representa un número entero de 0 a 6,

n^2 representa un número entero de 0 a 5,

L^1 representa $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)n^3-C(=O)-$,

- 20 en donde n^3 representa un número entero de 2 a 8,

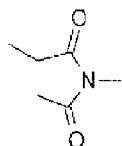
L^2 representa $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ o un enlace sencillo,

en donde n^4 representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa el residuo tetrapéptido $-GGFG-$,

L^a representa $-O-$ o un enlace simple, y

- 25 $-(\text{Succinimid-3-il-N})-$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



que está conectado al anticuerpo anti-HER2 en la posición 3 del mismo y está conectado al grupo metileno en la estructura enlazadora que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

para su uso en el tratamiento del cáncer con baja expresión de HER2.

- 30 2. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la fracción de la estructura del fármaco-enlazador que tiene el fármaco conectado a $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ es una estructura de enlazador de fármaco seleccionada del grupo siguiente:

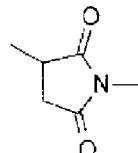
- $(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

- $(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

- 35 - $(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

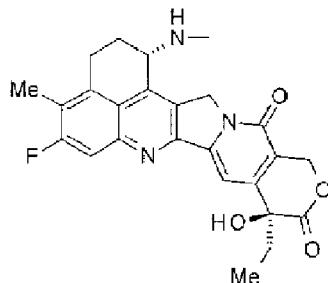
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- 5 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-C(=O)-(NH-DX)
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- 10 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

en donde -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



15

que está conectado al anticuerpo anti-HER2 en la posición 3 del mismo y está conectado al grupo metileno en la estructura enlazadora que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1, -(NH-DX) representa un grupo representado por la fórmula siguiente:



20

en el que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición de conexión, y

-GGFG- representa el residuo tetrapéptido -Gly-Gly-Phe-Gly-.

3. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la fracción de estructura de fármaco-enlazador es una estructura de fármaco-enlazador seleccionada del siguiente grupo:

-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

25

-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

4. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la fracción de la estructura del fármaco-enlazador es -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

30

5. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la fracción de la estructura del fármaco-enlazador es -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

6. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la fracción de la estructura del fármaco-enlazador es -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

5 7. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el anticuerpo anti-HER2 comprende una cadena pesada consistente en una secuencia de aminoácidos consistente en los residuos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera consistente en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2.

10 8. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el anticuerpo anti-HER2 comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera consistente en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2.

9. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el número medio de unidades de la estructura fármaco-enlazador seleccionada conjugada por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 2 a 8.

15 10. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el número medio de unidades de la estructura fármaco-enlazador seleccionada conjugadas por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 3 a 8.

20 11. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el cáncer con baja expresión de HER2 es cáncer de pulmón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de cuello uterino, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas, cáncer peritoneal, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de útero, cáncer de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de pene, leucemia, linfoma maligno, plasmocitoma, mieloma o sarcoma.

FIG.1

SEQ ID NO: 1 -Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2

EVOLVELSGGGILVQPGGGLRLSCAAGCFNISDTYTHWVVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAASV
KGRTTISADTCKNTAYLQMNSLRAEUTAVYYCSPNGQDGFYAMDYXQGQGTIVTVSSASTKGPSV
PPLAPESKSTSGGTRALGCLVKDYFPEPVTVSENNSGALTSCVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHEPSNTKVDEKVKVERPKSCDKTHTOPPCPAPELLGGPSVFLFPFPKDTIMI
SRTPEVTCVVVVDVSKEDPEVKPNNWYVQGVSVHAKTKPPEEQYNISTYEVVSVLTVLNQGWLNGK
RYKCKVSNKALPAPIEKTISRANGQPKEPVYVILPPSRHMMTKNQVSITCIVKQFYPSEIAVEM
ESNGQEPNNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSEWQQGKVYFQCSVNREALHNHYTQKSLSLSP
SK

FIG.2

SEQ ID NO: 2 -Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2

SIQMTQSPSSLASAVGDRVTITCRASQDVNTAVAVYQQEPKAPKLLIVGASFLYSGVPRDFSG
S86GTDFTLTISSIQPECFATYYCQGHTTPEPTYQQGTEVETKRTVRAAPSVTIIPPSDEQLKSG
TASVVCILLNNFYPREAKVQWKVUNALQSGNSQESVTEQD8KD8TYSL8STITL8KAPY5E8K8VY
ACEVTHQGL86PVTKSPNRGEC

FIG.3

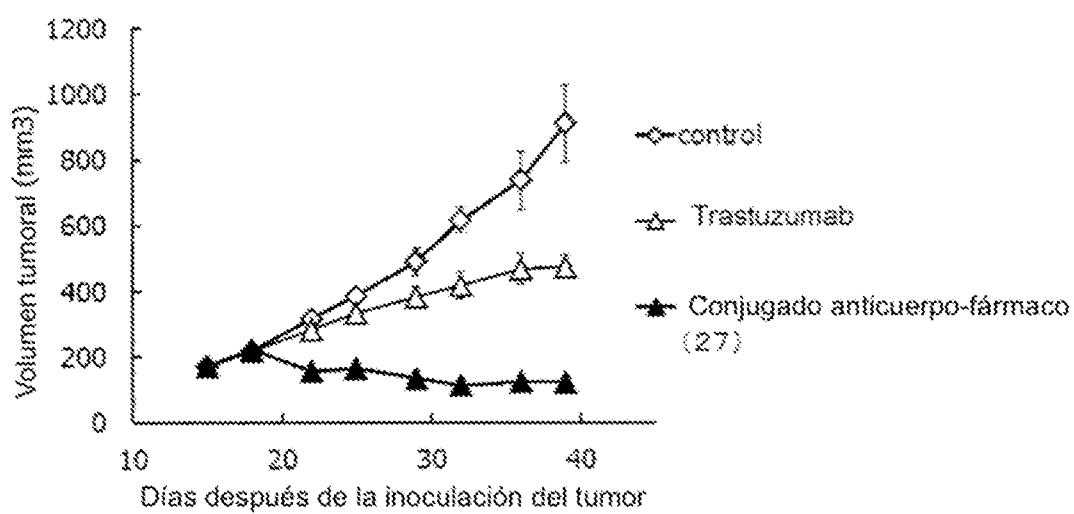


FIG.4

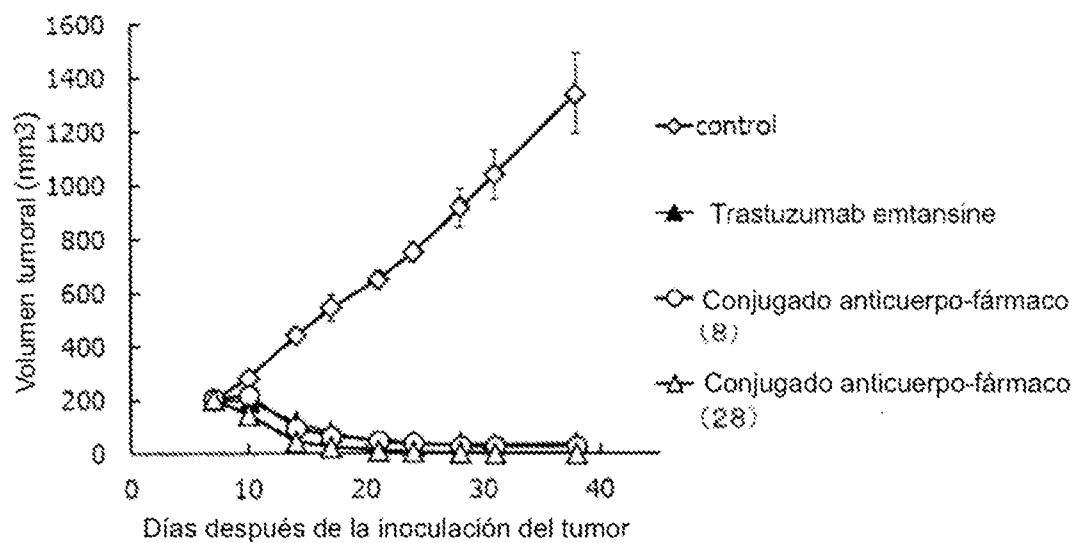


FIG.5

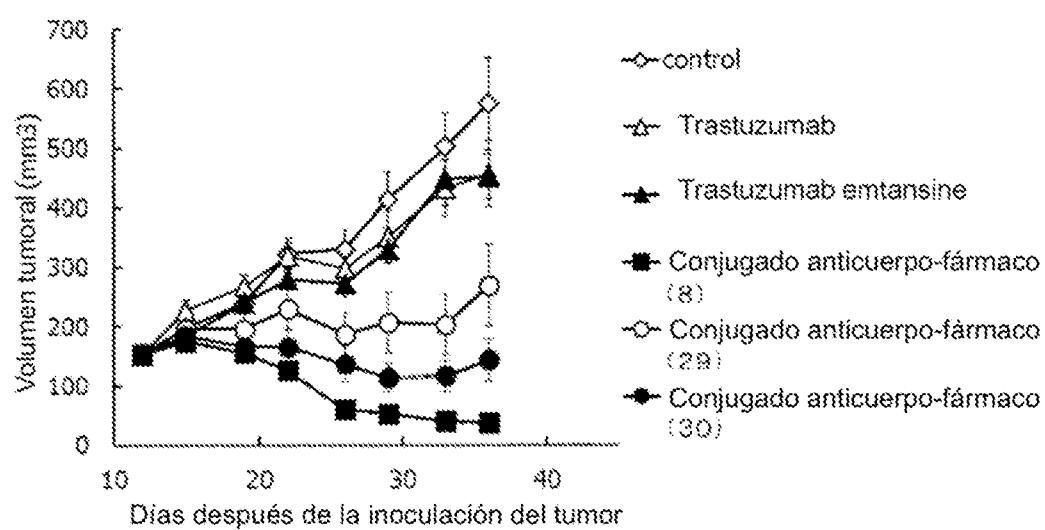


FIG.6

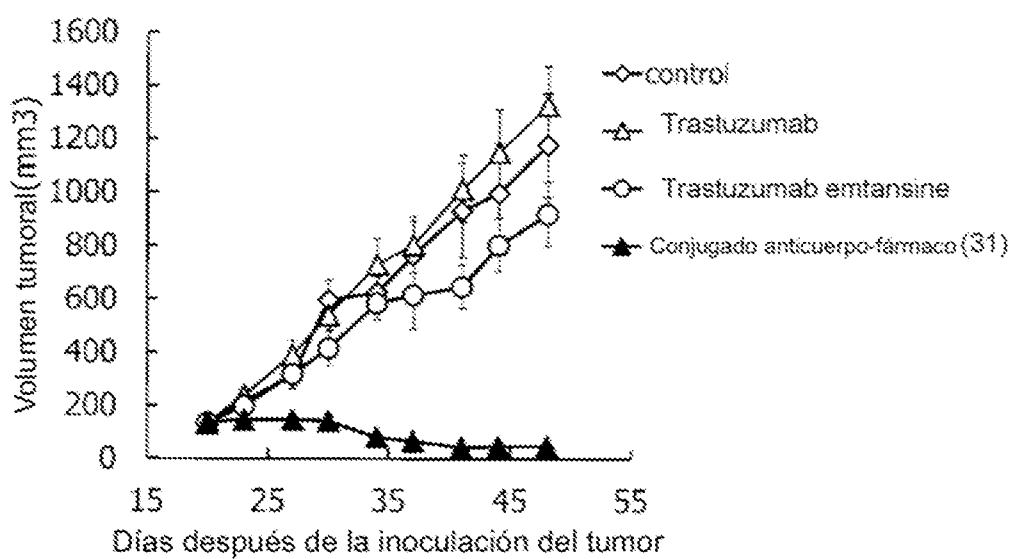


FIG.7

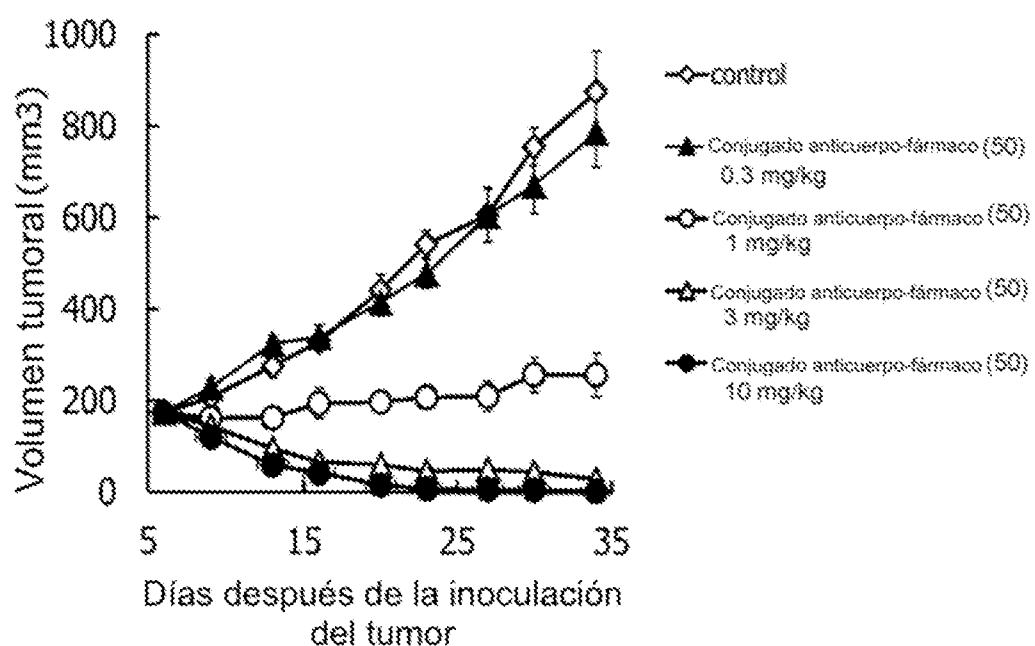


FIG.8

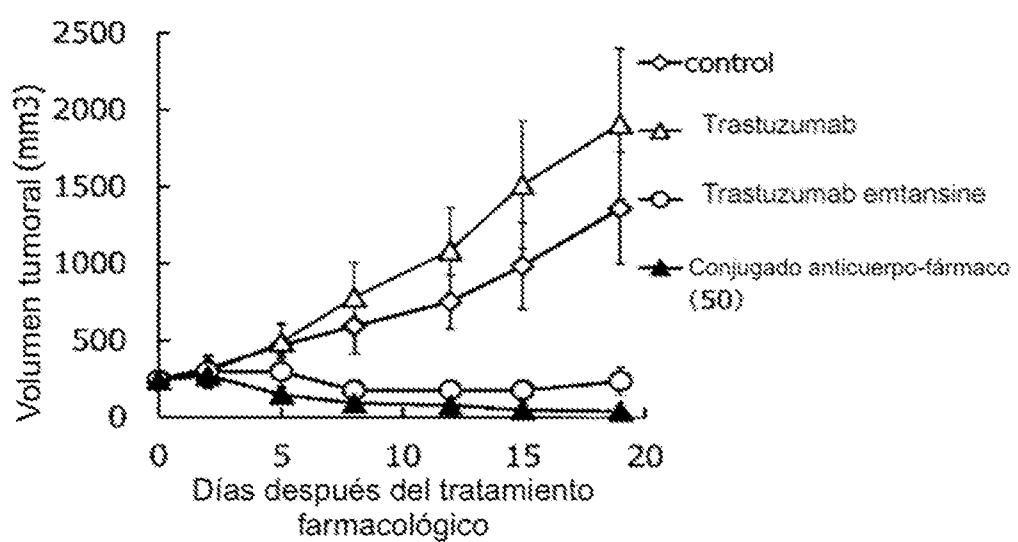


FIG.9

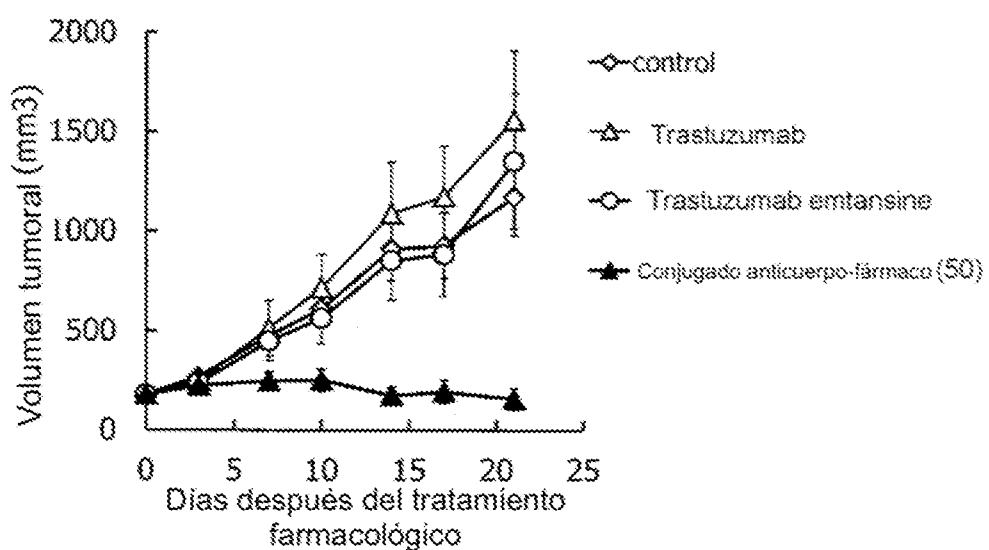


FIG.10

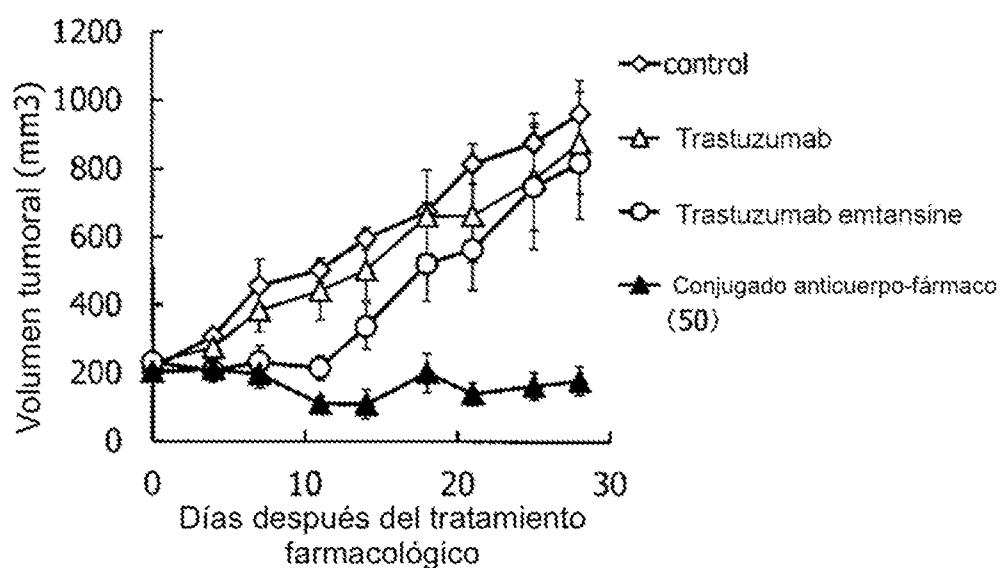


FIG.11

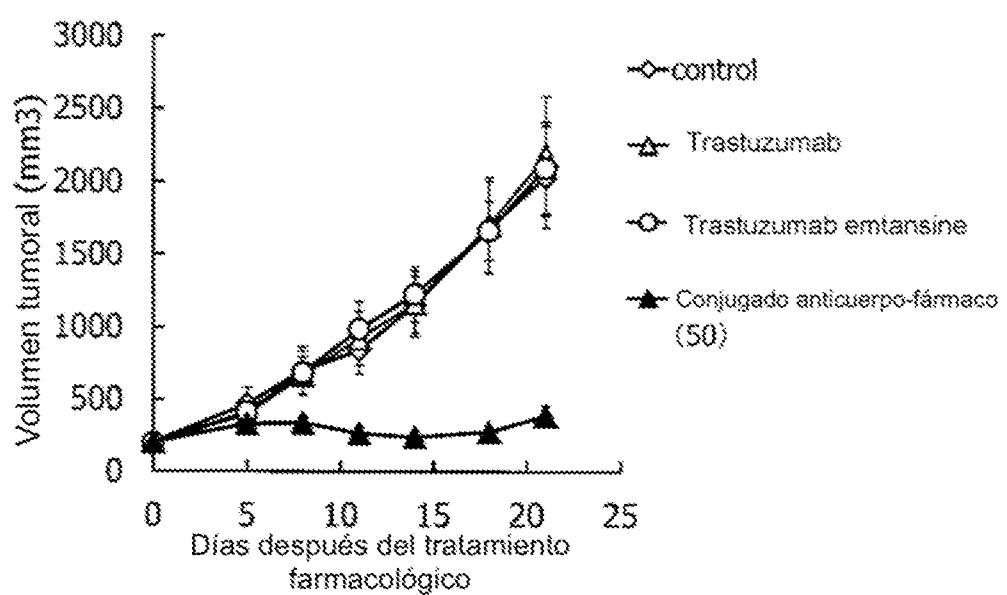


FIG. 12

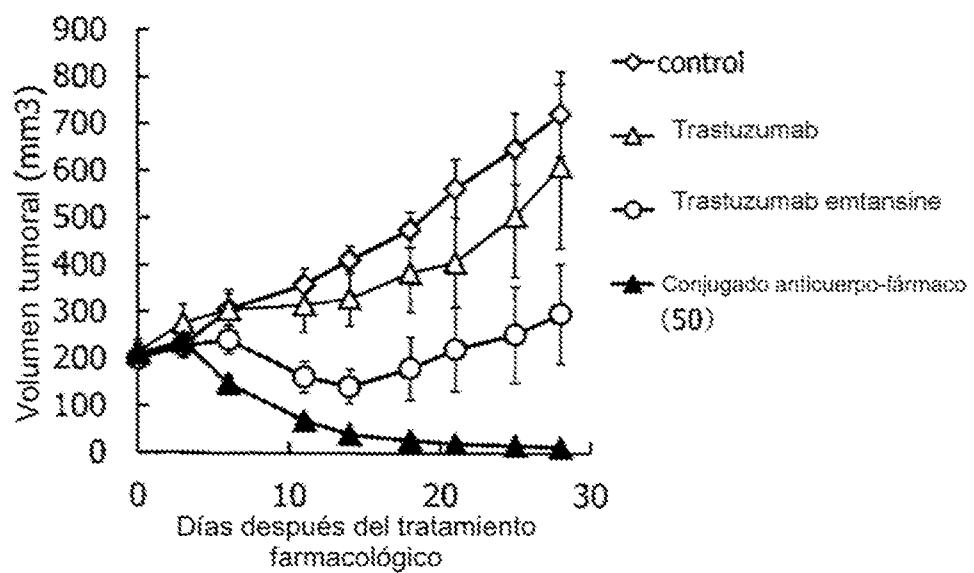


FIG. 13

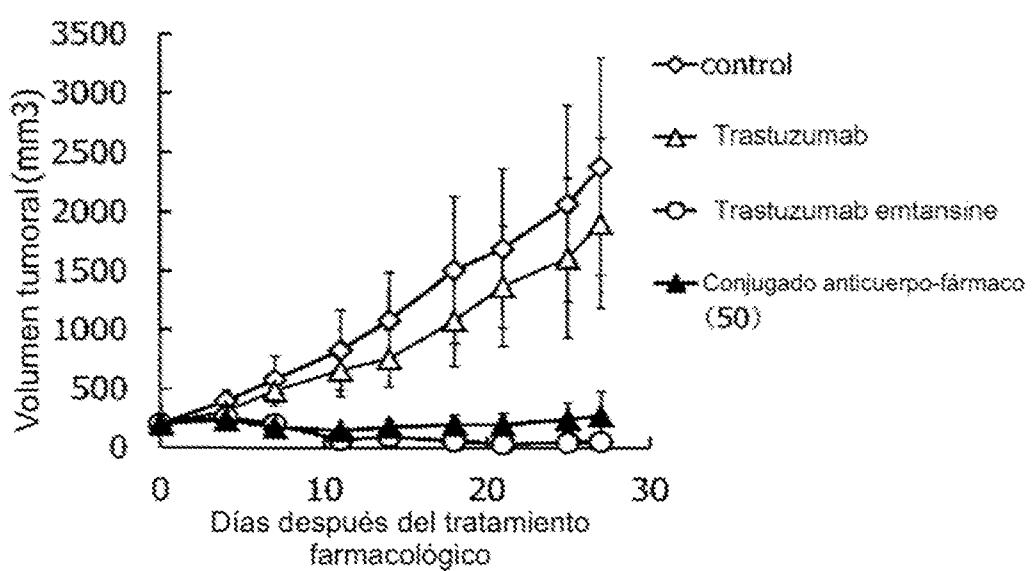


FIG.14

