

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 996 334**

(51) Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2018 PCT/IB2018/054564**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2018 WO18235024**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2018 E 18746292 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024 EP 3641831**

(54) Título: **Conjugado de anticuerpo frente a CD38-fármaco**

(30) Prioridad:

**20.06.2017 US 201762522516 P
01.09.2017 US 201762553438 P**

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

12.02.2025

(73) Titular/es:

**VIVASOR, INC. (100.00%)
9380 Judicial Drive
San Diego, CA 92121, US**

(72) Inventor/es:

**ZHU, TONG;
KHASANOV, ALISHER;
CHEN, GANG;
FELLS, KATHERINE;
ZHOU, HEYUE y
GRAY, JOHN DIXON**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 996 334 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 de anticuerpo frente a CD38-fármaco

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

- 5 La presente solicitud de patente reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos 62/522.516 presentada el 20 de junio de 2017 y de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos 62/553.438 presentada el 01 de septiembre de 2017.

Campo técnico

- 10 La presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que tiene un anticuerpo IgG que se une a una diana de CD38 conjugada en un sitio Cys en la región bisagra de un anticuerpo IgG, como se define en la reivindicación 1. La presente divulgación proporciona además un ADC para su uso en un método para tratar un mieloma múltiple que comprende proporcionar una cantidad eficaz de un ADC de CD38, como se define en la reivindicación 10.

Antecedentes

- 15 CD38 es una glicoproteína transmembrana de tipo II de 45 kD con un dominio extracelular C-terminal largo y un dominio citoplasmático N-terminal corto. La proteína CD38 es una ectoenzima bifuncional que puede catalizar la conversión de NAD⁺ en ADP-ribosa cíclica (ADPRc) y también hidroliza ADPRc en ADP-ribosa. Durante la ontogenia, CD38 aparece en células madre comprometidas CD34⁺ y progenitores comprometidos por linaje de células linfoides, eritroides y mieloides. La expresión de CD38 persiste principalmente en el linaje linfoide con niveles de expresión variables en diferentes etapas del desarrollo de las células T y B.

- 20 CD38 está regulada al alza en muchas malignidades hematopoyéticas y en líneas celulares derivadas de diversas malignidades hematopoyéticas, incluyendo linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma de Burkitt (BL), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), leucemia linfocítica aguda B y T (ALL), linfoma de células T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia de células pilosas (HCL), linfoma de Hodgkin (HL) y leucemia mieloide crónica (CML). Por otro lado, la mayoría de las células madre pluripotentes primitivas del sistema hematopoyético son 25 CD38. La expresión de CD38 en malignidades hematopoyéticas y su correlación con la progresión de la enfermedad hacen que CD38 sea una diana atractiva para la terapia con anticuerpos anti-CD38.

- 30 Se ha informado que CD38 está implicada en la movilización del Ca²⁺ (Morra et al., 1998, *FASEB J.*, 12: 581-592; Zilber et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 2840-2845) y en la transducción de señales a través de la fosforilación de tirosina de numerosas moléculas de señalización, incluyendo fosfolipasa C-γ, ZAP-70, syk y c-cbl, en células o líneas celulares linfoideas y mieloides (Funaro et al., 1993, *Eur. J. Immunol.*, 23: 2407-2411; Morra et al., 1998, *FASEB J.*, 12: 581-592; Funaro et al., 1990, *J. Immunol.*, 145: 2390-2396; Zubiaur et al., 1997, *J. Immunol.*, 159: 193-205; Deaglio et al., 2003, *Blood* 102: 214-6-2155; Todisco et al., 2000, *Blood*, 95: 535-542; Konopleva et al., 1998, *J. Immunol.*, 161: 4702-4708; Zilber et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 2840-2845; Kitanaka et al., 1997, *J. Immunol.*, 159: 184-192; Kitanaka et al., 1999, *J. Immunol.*, 162: 1952-1958; Mallone et al., 2001, *Int. Immunol.*, 13: 35 397-409). Se propuso que CD38 era una importante molécula de señalización en la maduración y activación de células linfoideas y mieloides durante su desarrollo normal.

- 40 La evidencia de la función de CD38 procede de ratones con inactivación CD38^{-/-}, que tienen un defecto en su inmunidad innata y una respuesta humoral dependiente de células T reducida debido a un defecto en la migración de células dendríticas (Partida-Sánchez et al., 2004, *Immunity*, 20: 279-291; Partida-Sánchez et al., 2001, *Nat. Med.*, 7: 1209-1216). Sin embargo, no está claro si la función de CD38 en ratones es idéntica a la de los seres humanos, ya que el patrón de expresión de CD38 durante la hematopoyesis difiere enormemente entre el ser humano y el ratón: a) a diferencia de las células madre progenitoras inmaduras en los seres humanos, las células madre progenitoras similares en ratones expresan un alto nivel de CD38 (Randall et al., 1996, *Blood*, 87:4057-4067; Dagher et al., 1998, *Biol. Blood Marrow Transplant*, 4:69-74), mientras que, durante el desarrollo de las células B humanas, se encuentran niveles elevados de expresión de CD38 en las células B del centro germinal y en las células plasmáticas (Uckun, 1990, *Blood*, 76:1908-1923; Kumagai et al., 1995, *J. Exp. Med.*, 181: 1101-1110), en el ratón, los niveles de expresión de CD38 en las células correspondientes son bajos (Oliver et al., 1997, *J. Immunol.*, 158: 108-1115; Ridderstad y Tarlinton 1998, *J. Immunol.*, 160:4688-4695).

- 50 Se han descrito en la bibliografía varios anticuerpos anti-CD38 humana con diferentes propiedades proliferativas en diversas células tumorales y líneas celulares. Por ejemplo, un anticuerpo OKT10 químérico con Fab de ratón y Fc de IgG1 humana media la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) muy eficazmente contra células de linfoma en presencia de células efectoras mononucleares de sangre periférica de pacientes con MM o individuos normales (Stevenson et al., 1991, *Blood*, 77:1071-1079). Se ha mostrado que una versión humanizada injertada con CDR del anticuerpo anti-CD38 AT13/5 tiene actividad ADCC potente contra líneas celulares positivas para CD38. Se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD38 median la muerte *in vitro* de líneas celulares positivas para CD38 por ADCC y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y retrasan el crecimiento tumoral en ratones SCID que portan la línea celular de MM RPMI-8226 (WO2005/103083 A2). Por otro 55

lado, varios anticuerpos anti-CD38, IB4, SUN-4B7 y OKT10, pero no IB6, AT1 o AT2, indujeron la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de individuos normales (Ausiello et al. 2000, *Tissue Antigens*, 56:539-547).

Se ha mostrado que algunos de los anticuerpos de la técnica anterior son capaces de desencadenar la apoptosis en células B CD38⁺. Sin embargo, solo pueden hacerlo en presencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma. Se ha informado que un anticuerpo anti-CD38 agonista (IB4) previene la apoptosis de células B del centro germinal (GC) humano (Zupo et al. 1994, *Eur. J. Immunol.*, 24:1218-1222), e induce la proliferación de células de AML KG-1 y HL-60 (Konopleva et al. 1998, *J. Immunol.*, 161:4702-4708), pero induce la apoptosis en células linfoblásticas T Jurkat (Morra et al. 1998, *FASEB J.*, 12:581-592). Otro anticuerpo anti-CD38 T16 indujo la apoptosis de células linfoides inmaduras y células linfoblásticas leucémicas de un paciente con ALL (Kumagai et al. 1995, *J. Exp. Med.*, 181: 1101-1110) y de células mieloblasticas leucémicas de pacientes con AML (Todisco et al. 2000, *Blood*, 95:535-542), pero T16 indujo la apoptosis sólo en presencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma (IL-7, IL-3, factor de células madre).

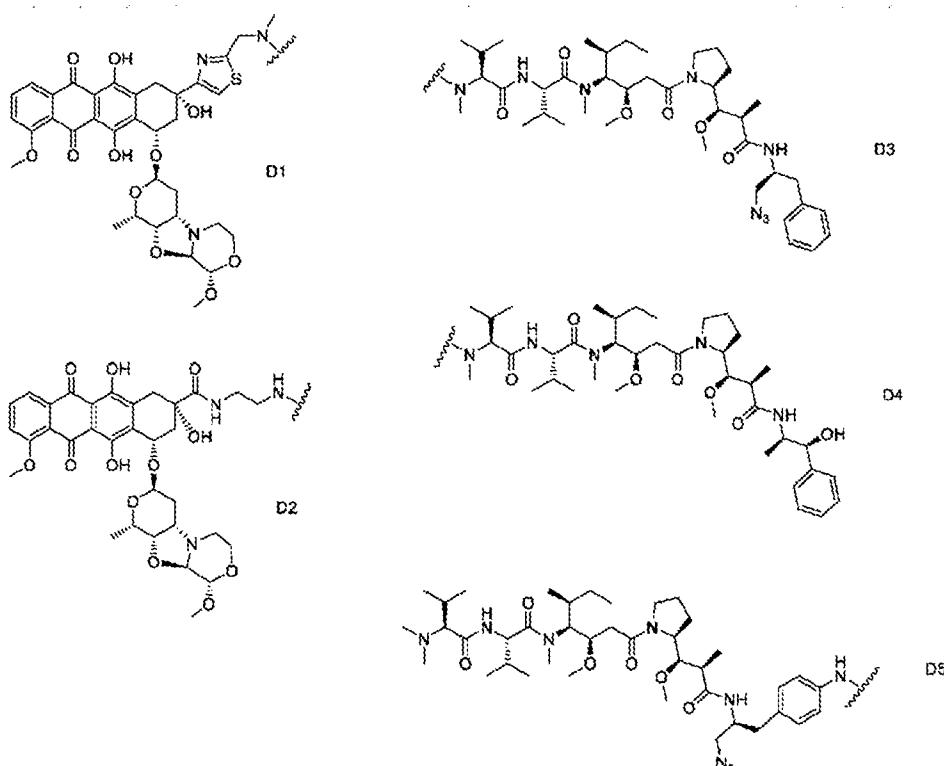
Los documentos US 2016/237161 A1 y EP1914242 A1 muestran conjugados anticuerpo-fármaco dirigidos con anticuerpos CD-18. Creemos que los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) mejorados, dirigidos con anticuerpos anti-CD38, ofrecen la promesa y potencial de suministrar una potente actividad antitumoral con la ventaja de efectos secundarios reducidos.

Sumario

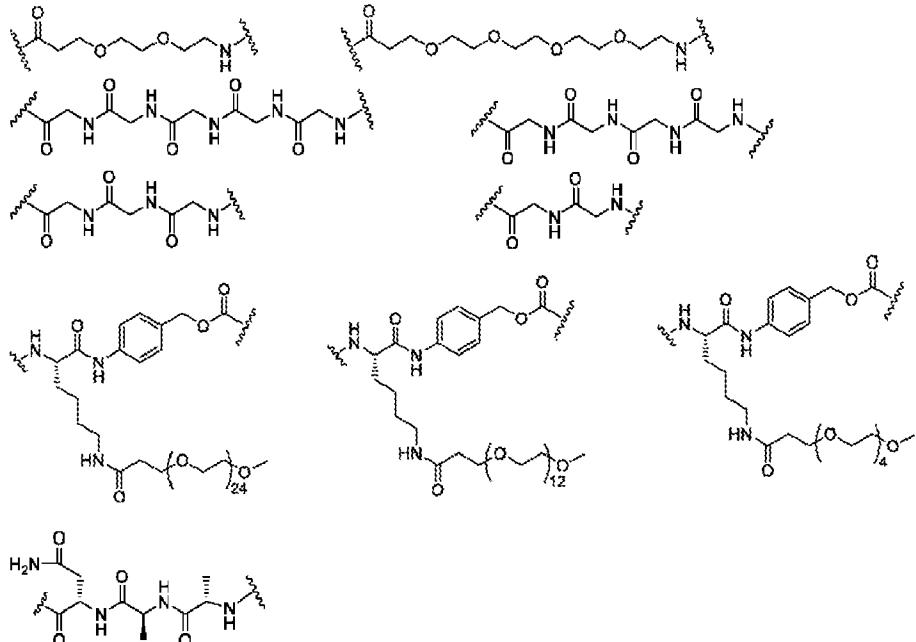
La presente divulgación proporciona una composición de ADC anti-CD38 que comprende:

- 20 (a) un anticuerpo IgG anti-CD38 C38A2-SV (SEQ ID NO. 1/3 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria) o C38A2 (SEQ ID NO. 1/2 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria);
- (b) un resto de fármaco o toxina que es un inhibidor de tubulina o un análogo de doxorubicina; y
- 25 (c) un resto enlazador de conjugación, en donde el enlazador de conjugación comprende un enlazador y un resto de conjugación que se une covalentemente a un único residuo de Cys en una región bisagra de un anticuerpo IgG, y en donde una región bisagra de cadena pesada de un anticuerpo IgG puede mutarse de manera que la región bisagra de cadena pesada contenga solo un residuo de Cys.

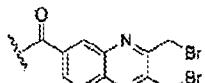
En algunas realizaciones, el resto de fármaco o toxina se selecciona del grupo que consiste en D1, D2, D3, D4, D5, y combinaciones de los mismos, en donde las estructuras de D1, D2, D3, D4 y D5 son:



En algunas realizaciones, el enlazador se selecciona del grupo que consiste en:



en donde la línea ondulada indica un punto de unión al resto de conjugación y el resto de fármaco o toxina.

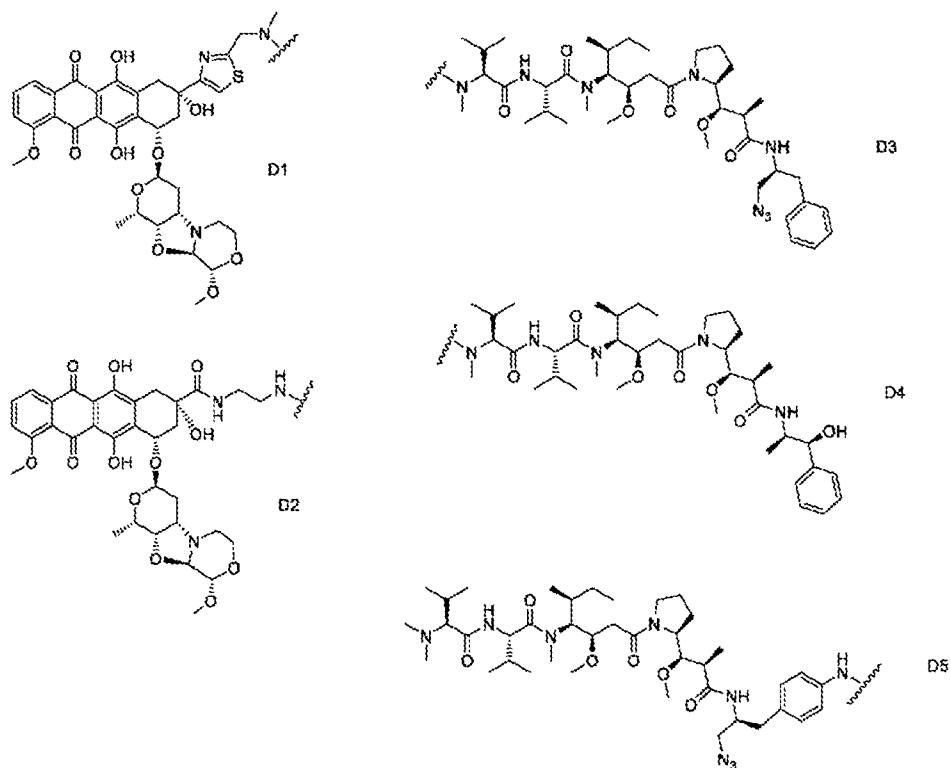


En algunas realizaciones, el resto de conjugación es

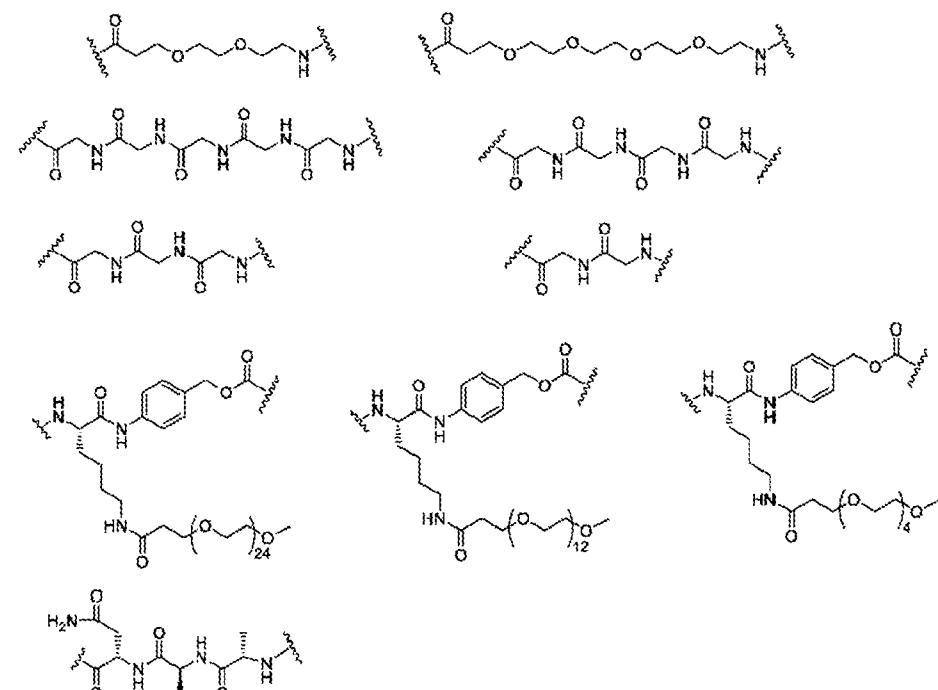
en donde la línea ondulada indica el punto de unión al enlazador.

- 10 En otro aspecto, se proporciona una composición de ADC anti-CD38 que comprende:
- un anticuerpo IgG anti-CD38 C38A2-SV (SEQ ID NO. 1/3 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria) o C38A2 de tipo salvaje (SEQ ID NO. 1/2 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria);
 - un resto de fármaco o toxina que es un inhibidor de tubulina o un análogo de doxorrubicina; y
 - un resto enlazador de conjugación, en donde el enlazador de conjugación comprende un enlazador y un resto de conjugación que se une covalentemente a un único residuo de Cys en una región bisagra de un anticuerpo IgG, y en donde una región bisagra de cadena pesada de un anticuerpo IgG puede mutarse de manera que la región bisagra de cadena pesada contenga solo un residuo de Cys, para su uso como medicamento.
- 15

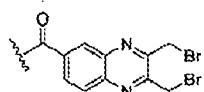
En algunas realizaciones, el resto de fármaco o toxina se selecciona del grupo que consiste en D1, D2, D3, D4, D5, y combinaciones de los mismos, en donde las estructuras son:



En algunas realizaciones, el enlazador se selecciona del grupo que consiste en:



en donde la línea ondulada indica un punto de unión al resto de conjugación y el resto de fármaco o toxina.



En algunas realizaciones, el resto de conjugación es

, en donde la línea ondulada indica el punto de unión al enlazador.

El resto de anticuerpo es una variante del anticuerpo de tipo salvaje CD38A2 divulgado y reivindicado en el Número de Serie US 15/094,384, presentado el 8 de abril de 2016, que se divulga en la presente memoria como SEQ ID NO.

- 5 1 de cadena pesada y SEQ ID NO. 2 de cadena ligera, en donde la secuencia variante altera el segundo y tercer aminoácidos del extremo N de la región variable de cadena ligera, o el resto de anticuerpo comprende CD38A2-SV (variante SV) que tiene la SEQ ID NO. 1 de cadena pesada y la SEQ ID NO. 3 de cadena ligera.

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1A muestra un estudio *in vivo* de ADC anti-CD38 en el modelo de linfoma de Burkitt. En el estudio, se inyectaron s.c. 10 millones de células Daudi a ratones Nu Nu. Se inyectó iv ADC #45 a ratones portadores de tumor después de que el volumen tumoral promedio alcanzara 200 mm³.

La Figura 1B muestra la medida del peso corporal de ratones tratados con ADC #45 a tres dosis indicadas diferentes.

15 La Figura 2A muestra un estudio *in vivo* de ADC anti-CD38 en el modelo de linfoma de Burkitt. En el estudio, se inyectaron s.c. 10 millones de células Ramos a ratones Nu Nu. Se inyectó iv ADC #45 a ratones portadores de tumor a las dosificaciones indicadas después de que el volumen tumoral promedio alcanzara 200 mm³.

La Figura 2B muestra la medida del peso corporal de ratones tratados con anti-CD38-ADC.

20 La Figura 3 muestra un estudio *in vivo* de ADC anti-CD38 en el modelo de linfoma de Burkitt. En el estudio, se inyectaron iv 10 millones de células Daudi-luc a ratones NOD-SCID. Se inyectaron iv anticuerpo anti-CD38 (A2) y dos ADC anti-CD38 preparados con el mismo anticuerpo A2 a ratones portadores de tumor 14 días después de la inyección de tumores

La Figura 4 muestra un estudio *in vivo* de ADC anti-CD38 en el modelo de linfoma de Burkitt. En el estudio, se inyectaron iv 10 millones de células Daudi-luc a ratones NOD-SCID. Se inyectaron iv ADC #45 y ADC#41 a ratones portadores de tumores 14 días después de la inyección de tumores.

25 La Figura 5 muestra un estudio *in vivo* de ADC anti-CD38 en el modelo de linfoma de Burkitt. En el estudio, se inyectaron iv 10 millones de células Daudi-luc a ratones NOD-SCID. Se inyectaron iv anticuerpo anti-CD38 y anti-CD38-ADC a ratones portadores de tumores 14 días después de la inyección de tumores. Se tomaron imágenes de los ratones una vez a la semana.

30 La Figura 6 muestra un estudio *in vivo* de ADC anti-CD38 en el modelo de linfoma de Burkitt. En el estudio, se inyectaron iv 10 millones de células Daudi-luc a ratones NOD-SCID. Se inyectaron iv ADC #45 y ADC #41 a ratones portadores de tumores 14 días después de la inyección de tumores. Se tomaron imágenes de los ratones una vez a la semana.

35 La Figura 7 muestra líneas celulares de cáncer que expresan CD38, Ramos, Raji y RPMI8226, junto con una línea celular negativa para CD38, PC-3 se sembraron en placas de 96 pocillos y se trataron con ADC#45, ADC#41 y ADC#46 diluidos en serie, comenzando a 100 nM. Las células se trataron durante 3-5 días, dependiendo de la naturaleza de la carga útil conjugada. Al final del tratamiento, las células se tiñeron con el kit luminiscente CellTiterGlo™ de Promega y las señales se capturaron mediante un lector de placas luminiscentes. La actividad de los ADC en la inhibición del crecimiento de células tumorales se expresó como la concentración requerida para una inhibición del crecimiento celular del 50 %, la denominada CE50 (en nM). Los datos indicaron que ADC#45, ADC#41 y ADC#46 mostraron una inhibición selectiva hacia células que expresaban CD38 en su superficie.

40 La Figura 8 muestra la superposición de HIC-HPLC del anticuerpo anti-CD38 de partida y del conjugado de ADC46 purificado a una detección de 280 nm.

La Figura 9 muestra la superposición de HIC-HPLC del anticuerpo anti-CD38 de partida y del conjugado de ADC41 purificado a 280 nm de detección.

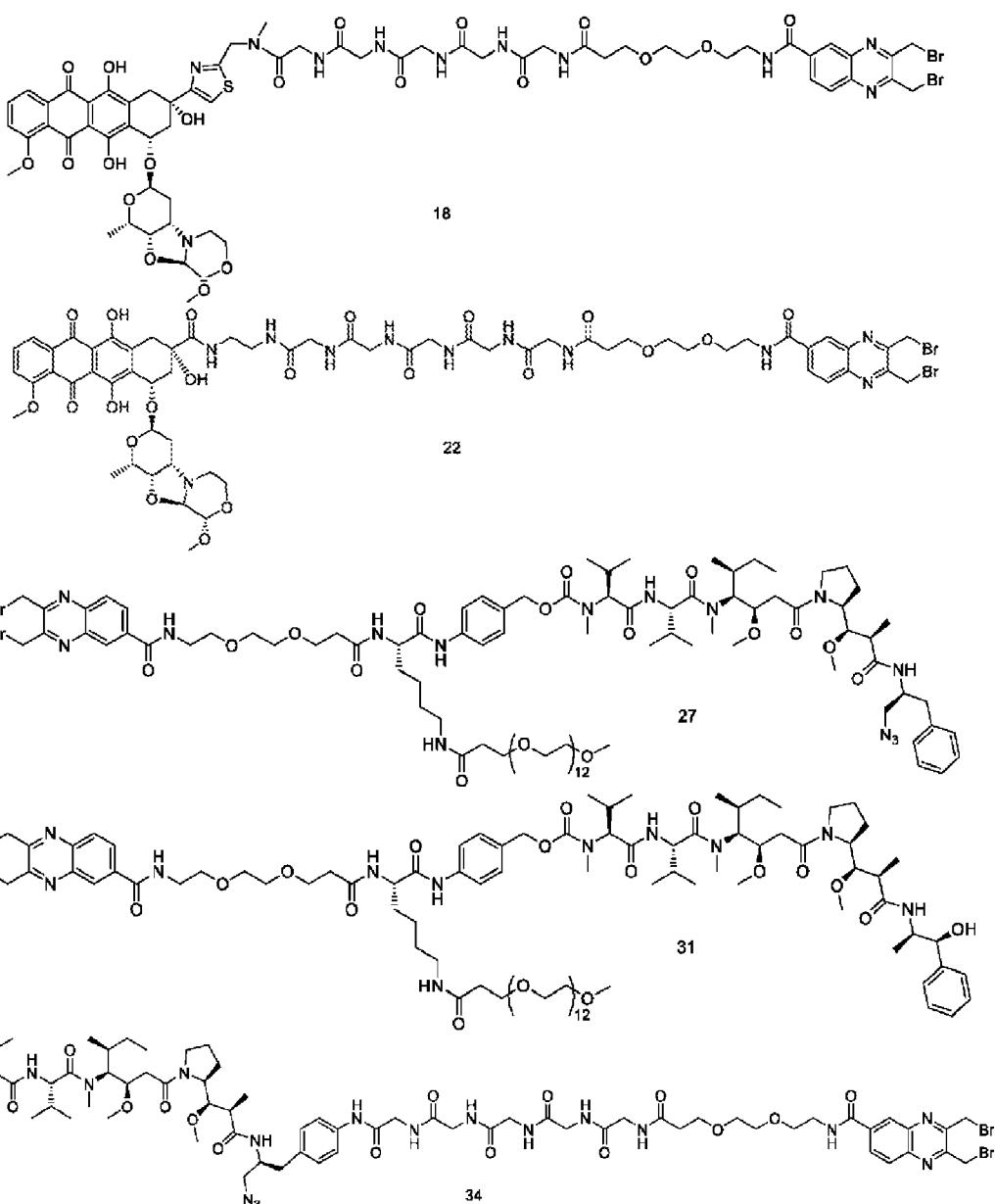
45 La Figura 10A muestra un estudio *in vivo* de ADC46 anti-CD38 en el modelo de linfoma de Burkitt. En el estudio, se inyectaron s.c. 10 millones de células Daudi a ratones Nu Nu. Se inyectó iv ADC 46 a ratones portadores de tumor después de que el volumen tumoral promedio alcanzara 200 mm³.

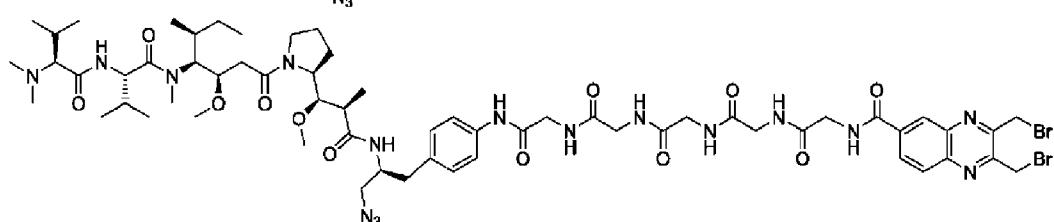
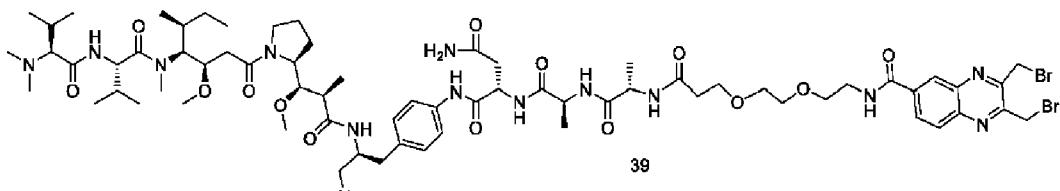
La Figura 10B muestra la medida del peso corporal de ratones tratados con ADC 46 a tres dosis indicadas diferentes.

Descripción detallada

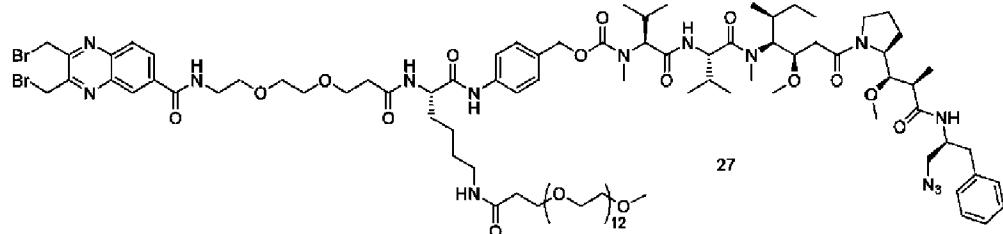
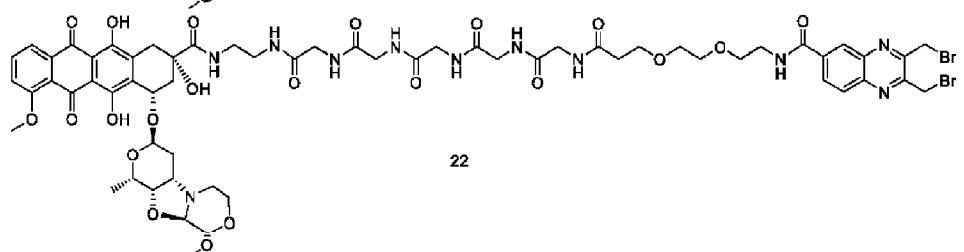
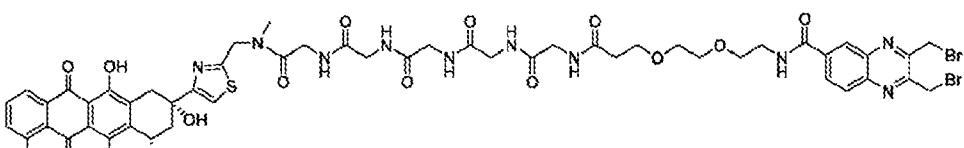
La presente divulgación proporciona conjugados de anticuerpo y fármaco que contienen un nuevo anticuerpo anti-CD38 humano (A2) (descrito en la solicitud de Patente de los Estados Unidos 2016/0297888 con número de serie 15/094.384, presentada el 08 de abril de 2016) con restos de toxina descritos en la presente memoria que incluyen un inhibidor de tubulina o un agente perjudicial para el ADN, tal como análogos de doxorrubicina. Los conjugados de ADC retuvieron la afinidad de unión y mostraron una potente destrucción celular en una variedad de líneas celulares positivas para CD38 e *in vivo*.

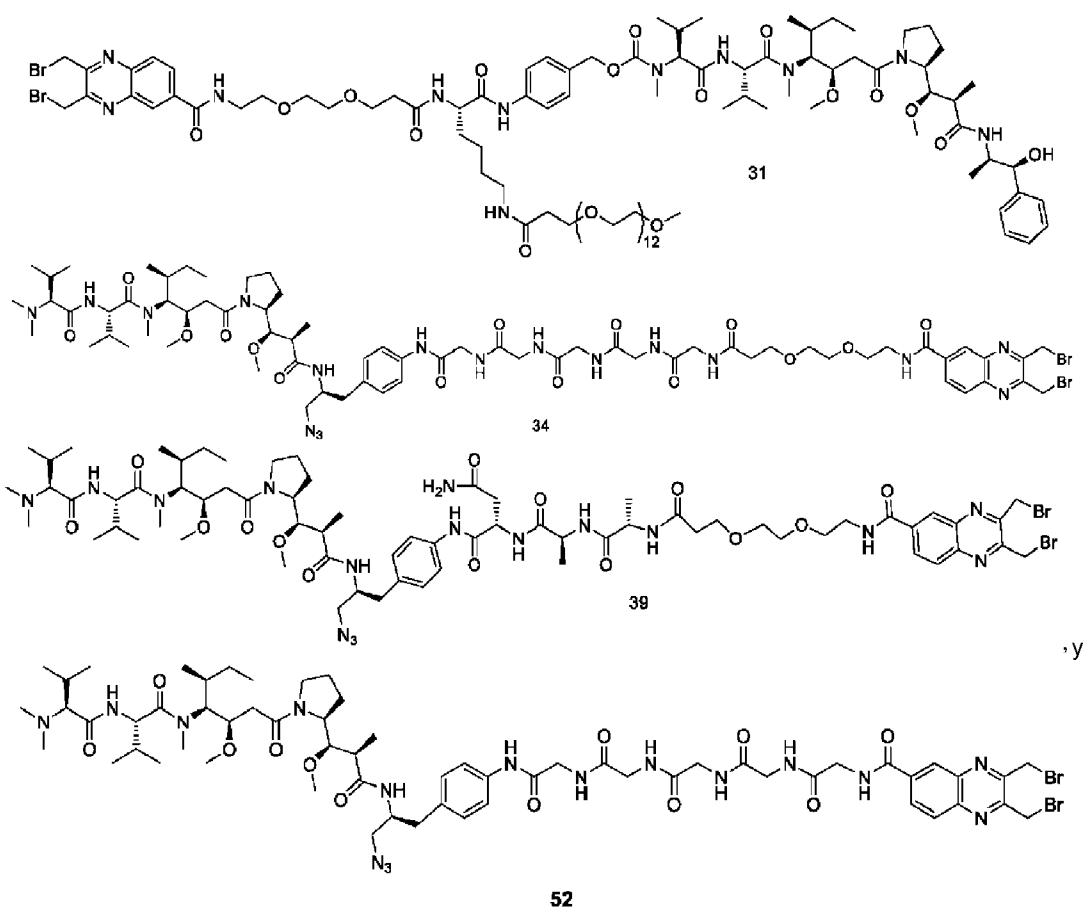
La presente divulgación proporciona una composición de conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) que comprende un anticuerpo IgG que se une a CD38, un resto enlazador de conjugación que se une a un único residuo de Cys en la región bisagra de un anticuerpo IgG, en donde la región bisagra puede mutarse de manera que la región bisagra de la cadena pesada contenga solo un residuo de Cys y no dos, y un resto de toxina seleccionado del grupo que consiste en derivados de antraciclinas y dolastatinas. Preferiblemente, el resto de toxina es un inhibidor de tubulina o un análogo de doxorrubicina. El anticuerpo es un anticuerpo IgG denominado familia de C38A2 humano (SEQ ID NO. 3/4 pesada/ligera en: la solicitud de patente US 2016/0297888 o SEQ ID NO. 1/2 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria) o es C38A2-SV (SEQ ID NO. 1/3 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria). Preferiblemente, la toxina conjugada con la estructura de enlazador se selecciona del grupo que consiste en:





La presente divulgación proporciona un método para tratar el mieloma múltiple, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición de conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) que comprende un anticuerpo IgG que se une a CD38, un resto enlazador de conjugación que se une a residuos de Cys en la región bisagra de un anticuerpo IgG y a un resto toxina. Por "se une a residuos de Cys" se entiende que el resto enlazador de conjugación puede unirse covalentemente a los átomos de azufre de residuos de Cys en la región bisagra del anticuerpo IgG. Preferiblemente, el resto de toxina es un inhibidor de tubulina o un análogo de doxorrubiciна. El anticuerpo es un anticuerpo IgG denominado familia de C38A2 humano (SEQ ID NO. 3/4 pesada/ligera en la solicitud de patente US 2016/0297888 o SEQ ID NO. 1/2 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria) o es C38A2-SV (SEQ ID NO. 1/3 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria). Un experto reconocerá que los restos de toxina como se divulga en la presente memoria, conjugados con un enlazador y un resto de conjugación como se divulga en la presente memoria, representan conjugados de enlazador y toxina intermedios, que, cuando se unen covalentemente (se conjugan a) el anticuerpo IgG como se divulga en la presente memoria, son los ADC como se divulga en la presente memoria. Preferiblemente, la toxina conjugada con la estructura de enlazador se selecciona del grupo que consiste en (con el número de cada compuesto indicado):



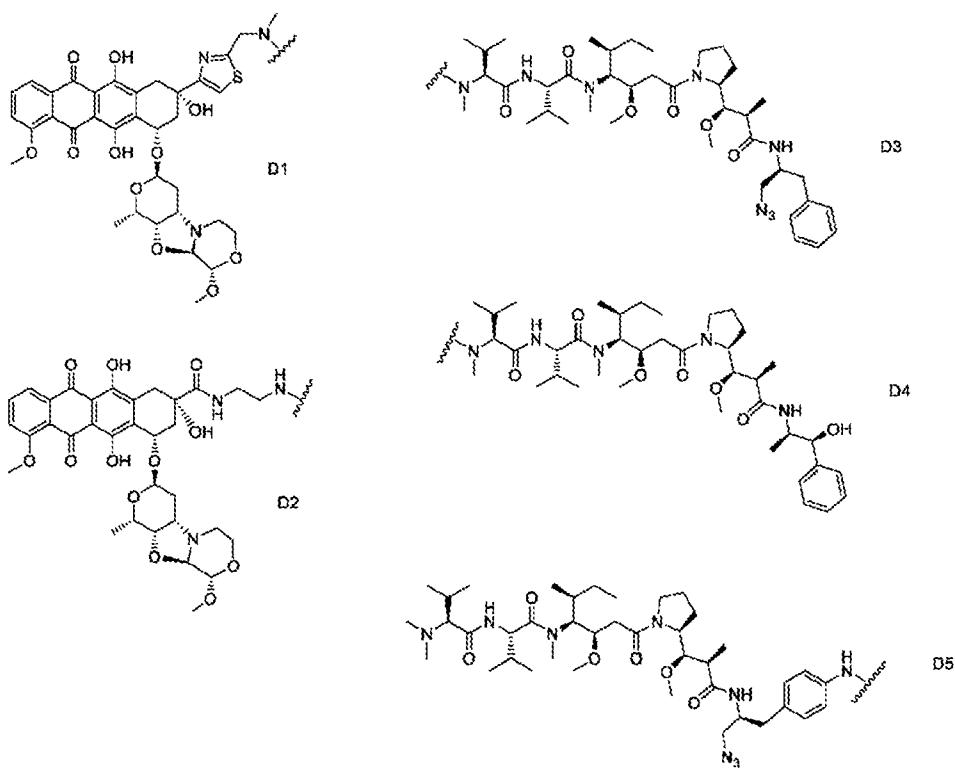


52

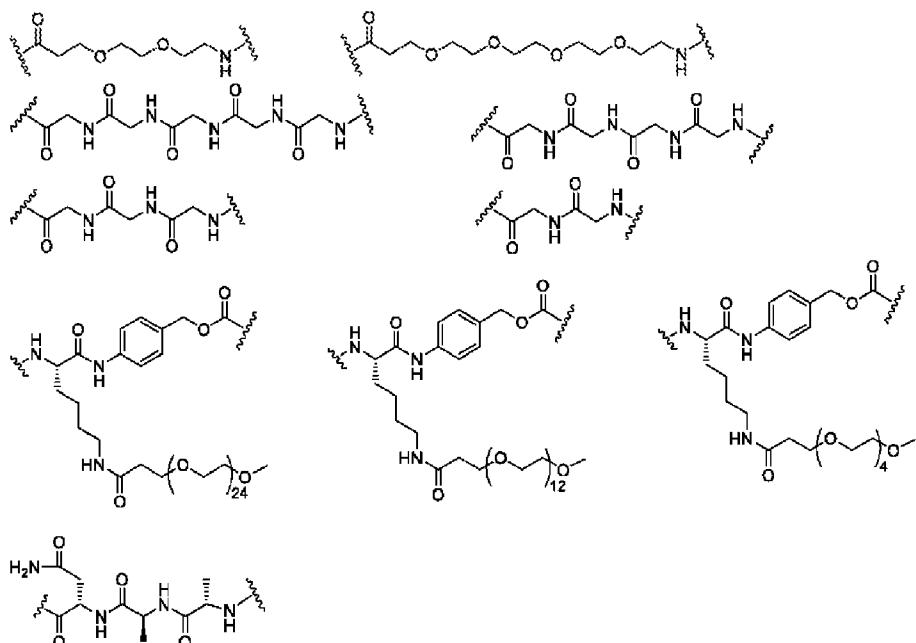
Entrada	Agente citotóxico (D)	Enlazador (L2)	Método de conjugación (L1)
D1		-C(=O), Gly, Ser, Thr, beta-Ala, -(CH ₂ CH ₂ O) _n , o combinaciones de los mismos, en donde n es un número entero de 1 a 24.	
D2		-C(=O), Gly, Ser, Thr, beta-Ala, -(CH ₂ CH ₂ O) _n , y combinaciones de los mismos, en donde n es un número entero de 1 a 24.	
D3		-C(=O), -(CH ₂ CH ₂ O) _n , Val, Phe, Lys, PAB, o combinaciones de los mismos, en donde n es un número entero de 1 a 24	

Entrada	Agente citotóxico (D)	Enlazador (L2)	Método de conjugación (L1)
D3		-C(=O), -(CH ₂ CH ₂ O) _n -, Val, Phe, Lys, PAB, o combinaciones de los mismos, en donde n es un número entero de 1 a 24	
D4		-C(=O), Gly, Ser, Thr, beta-Ala, -(CH ₂ CH ₂ O) _n -, o combinaciones de los mismos, en donde n es un número entero de 1 a 24	
D5		-C(=O), -(CH ₂ CH ₂ O) _n -, PAB, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Ala-Ala-Asn-PAB, o combinaciones de los mismos, en donde n es un número entero de 1 a 24	

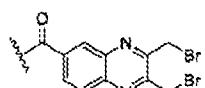
Restos de toxina (D): D1 y D2 son derivados de antraciclina. D3, D4 y D5 son inhibidores de tubulina.



Restos enlazadores (L2):

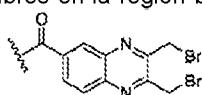


Método de conjugación (L1)



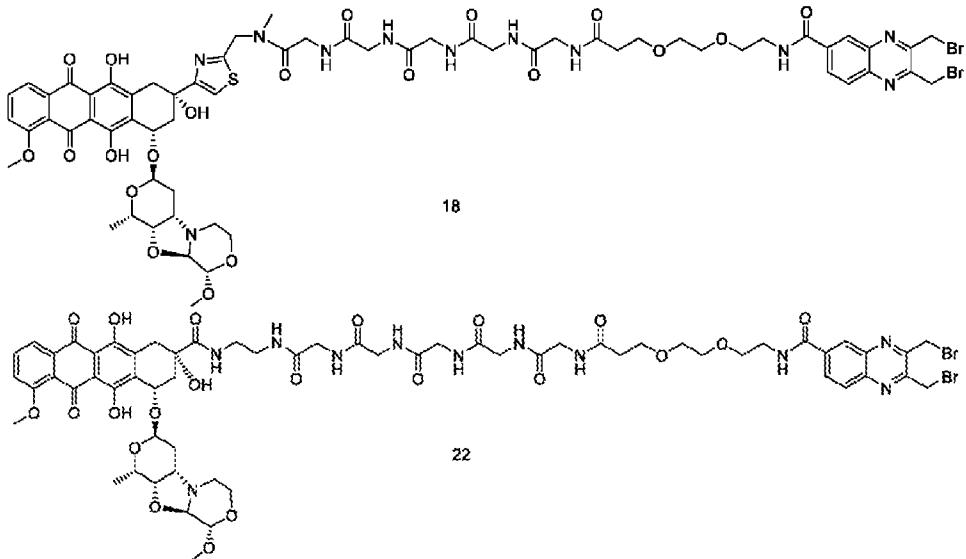
La línea ondulada indica el punto de unión al enlazador.

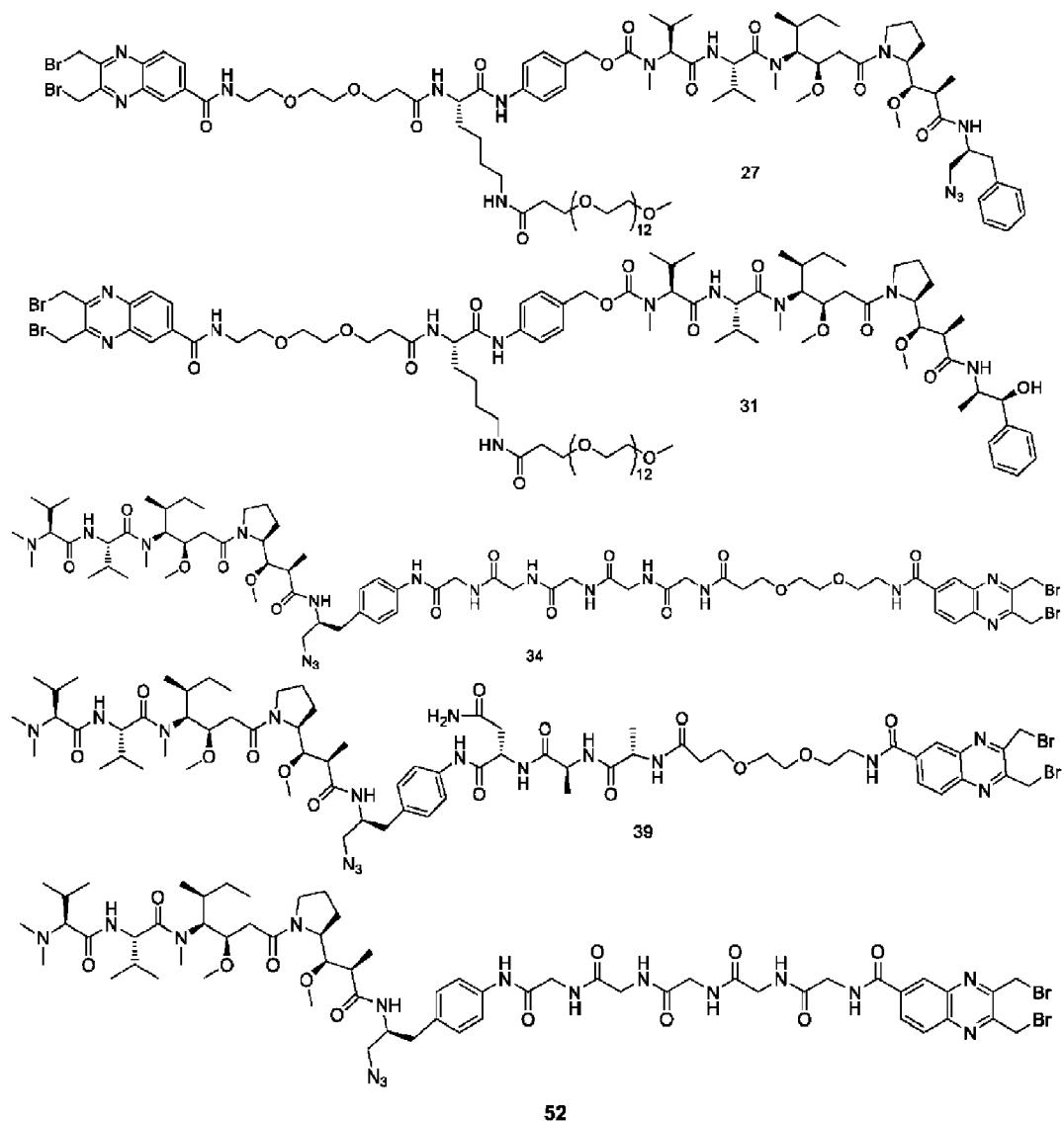
- 10 En algunas realizaciones, el conjugado de fármaco-enlazador comprende un enlazador L2 y un resto de conjugación, en donde el enlazador L2 está unido covalentemente al resto de conjugación; el resto de conjugación es capaz de reaccionar con grupos tiol de cisteína libres en la región bisagra de un anticuerpo IgG. En algunas realizaciones, el



resto de conjugación tiene la estructura ("método de conjugación L1").

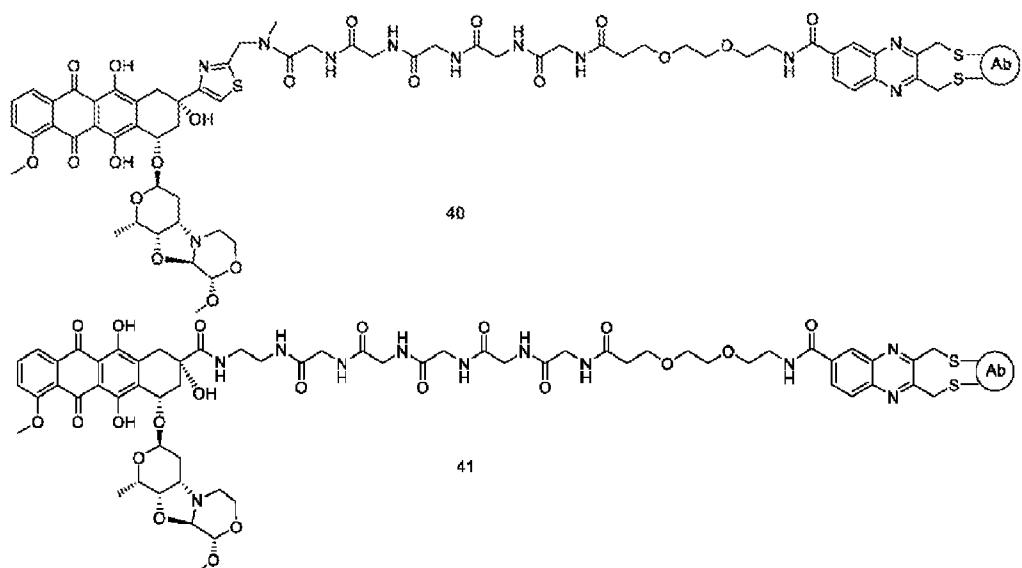
Ejemplos de conjugados de fármaco-conector

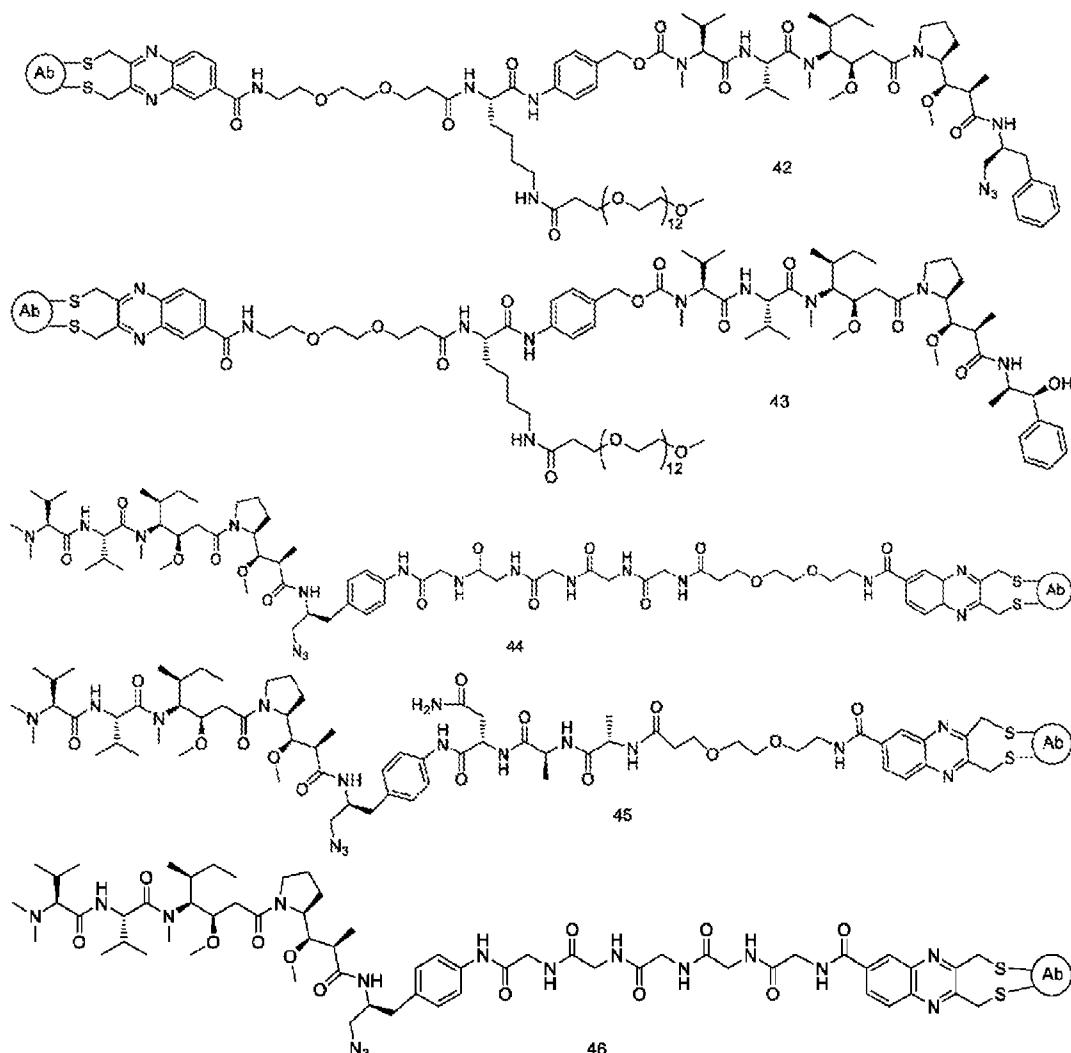




5

Ejemplos de ADC anti-CD 38





5

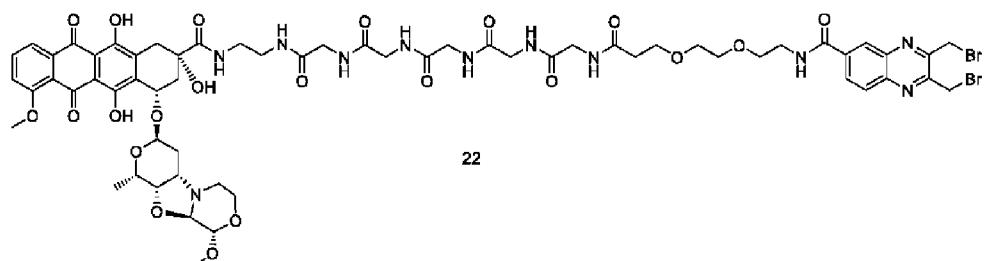
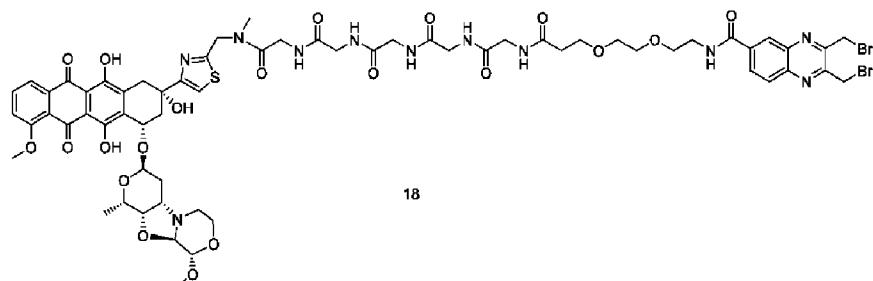
Definiciones

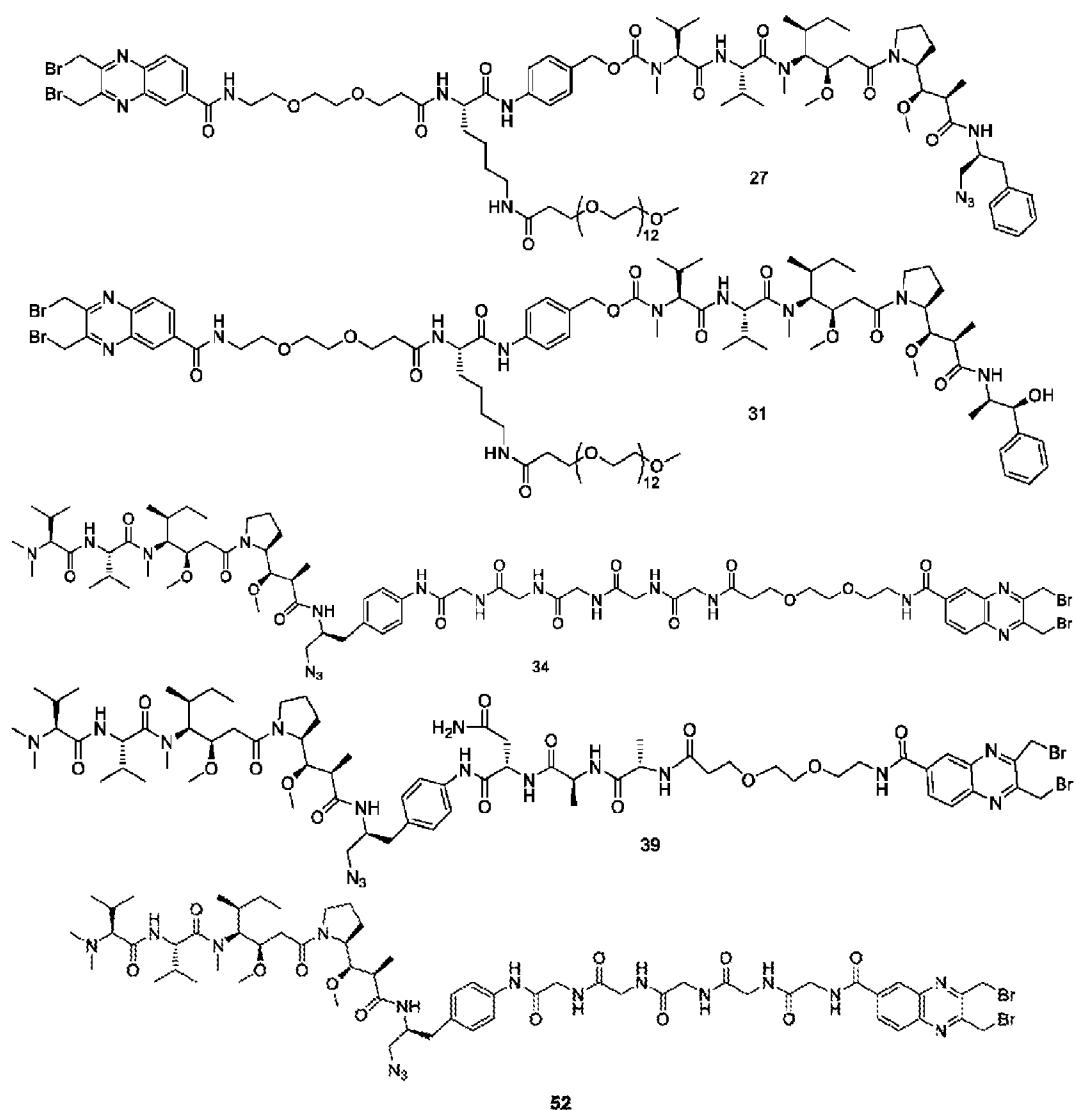
Como se usan en la presente memoria, las abreviaturas orgánicas comunes se definen como sigue:

Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
10 Ala	Alanina
Asn	Asparagina
ac.	Acuoso
BOC o Boc	terc-Butoxicarbonilo
°C	Temperatura en grados centígrados
15 Cit	Citrulina
DCM	diclorometano
DIEA	Diisopropiletilamina
DMF	N,N-Dimetilformamida
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
20 Et	Etilo
EtOAc	Acetato de etilo
Eq	Equivalentes

	Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo
	g	Gramo(s)
	h	Hora (horas)
	HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1 <i>H</i> -7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
5	HOBt	N-Hidroxibenzotriazol
	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
	LC/MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
	Me	Metilo
	mg	miligramos
10	MeOH	Metanol
	mL	Mililitro(s)
	µL/µL	Microlitro(s)
	mol	moles
	mmol	milimoles
15	µmol/umol	micromoles
	MS	espectrometría de masas
	NHS	N-Hidroxisuccinimida
	PAB	p-aminobencílo
	Pip	piperidina
20	RP-HPLC	HPLC de fase inversa
	rt	temperatura ambiente
	t-Bu	terc-Butilo
	Terc, t	terciario
	TFA	Ácido trifluoroacético
25	THF	Tetrahidrofurano
	Val	Valina

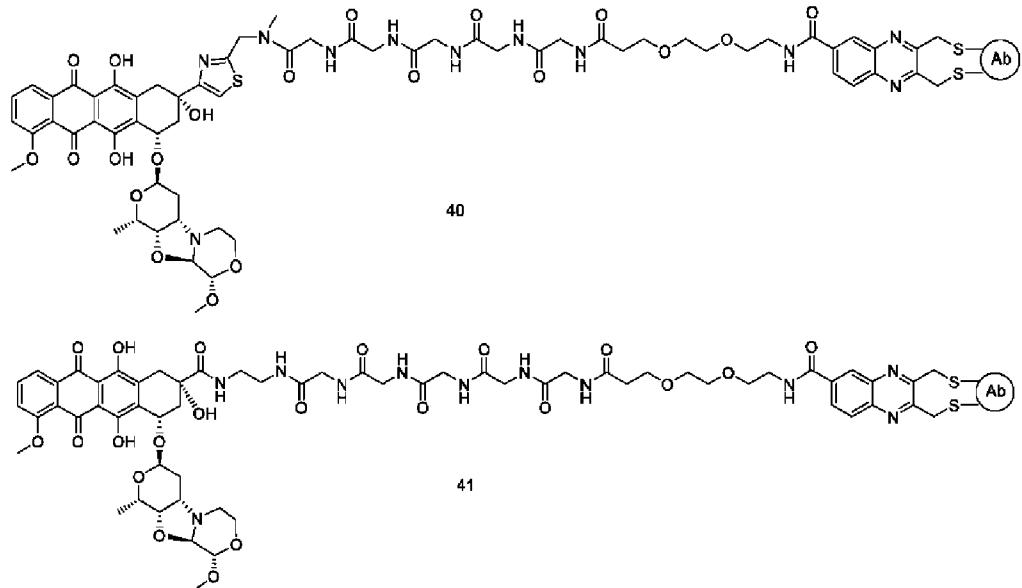
Ejemplos de conjugados de fármaco-conector

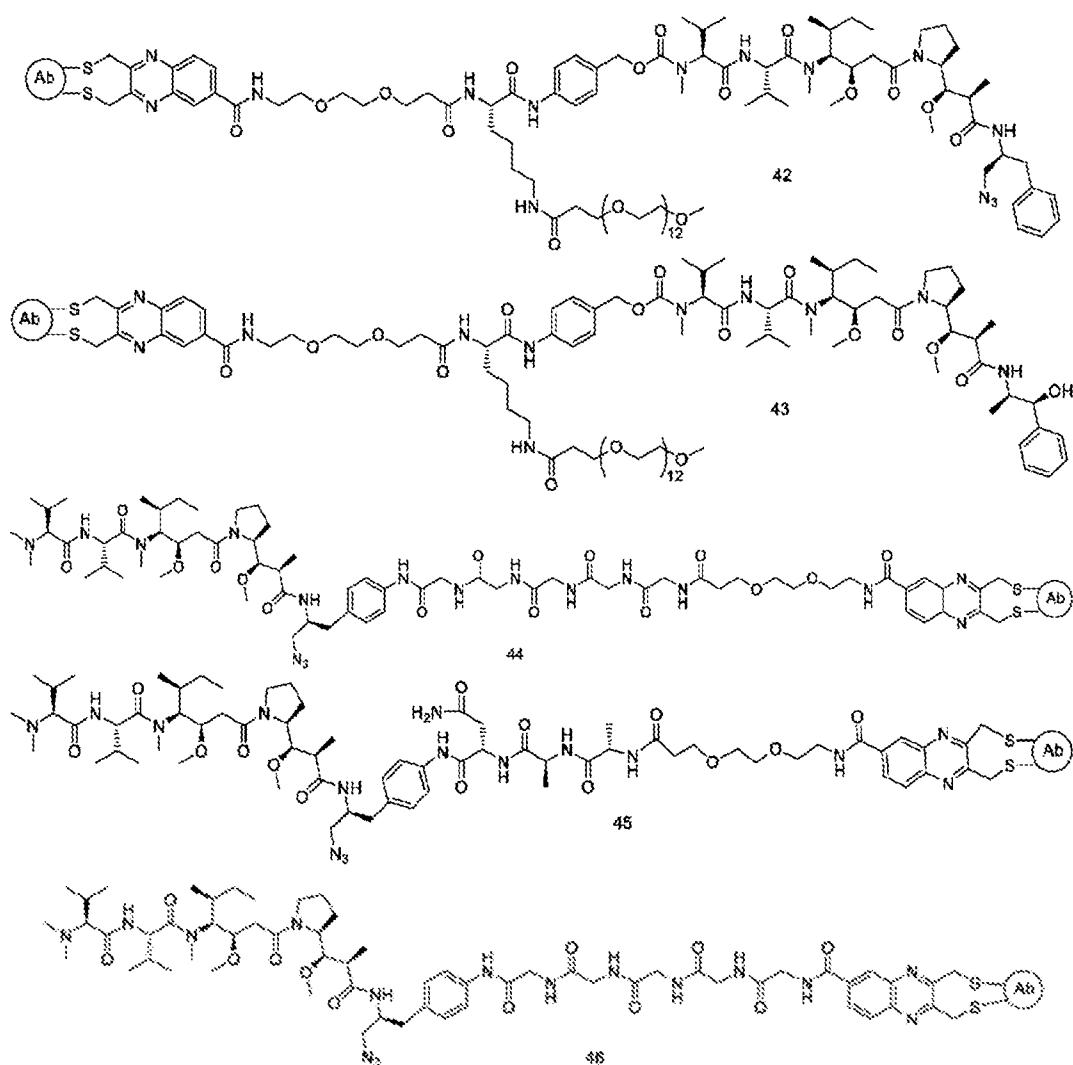




5

Ejemplos de ADC anti-CD38 (el componente de anticuerpo se denomina "Ab"):

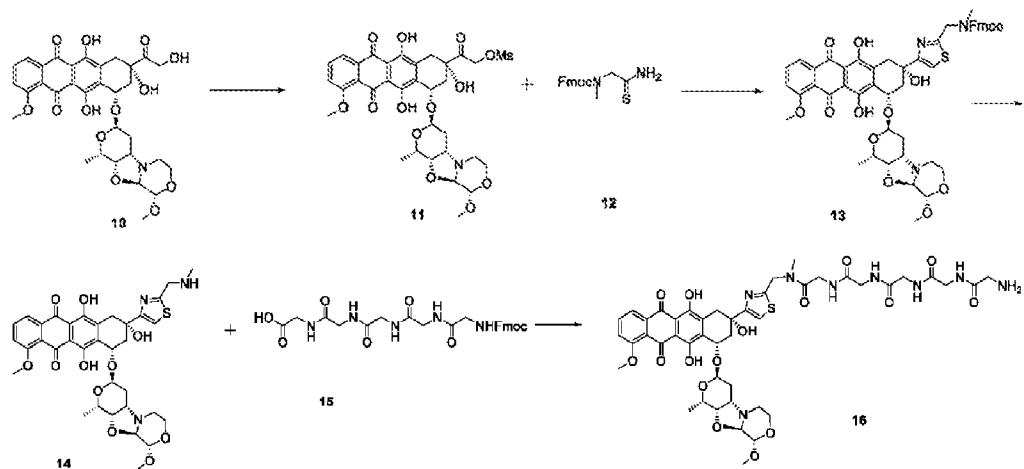


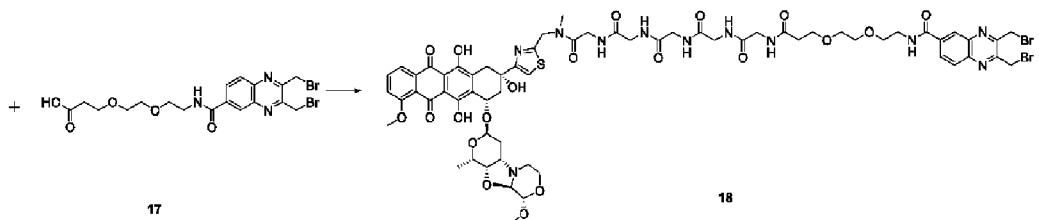


5

Ejemplos de síntesis 1

Síntesis del compuesto 18:





Síntesis del compuesto 11:

El compuesto **10** (30 mg, 46,8 μmol) se disolvió en 3 ml de DCM anhídrico bajo nitrógeno. Después, se añadió DIEA (24 μl, 140 μmol) y la mezcla de reacción se enfrió con un baño de hielo. Después, se añadió cloruro de metanosulfonilo (7,2 μl, 93,6 μmol) y la mezcla se agitó durante 30 min. La reacción se diluyó con 3 ml de DCM y se lavó con 4 ml de agua, se secó sobre Na₂SO₄ anhídrico y se evaporó para dar el compuesto **11** como un sólido rojo (33 mg, 98 %). MS m/z = 720,5 (M+H)

5

Síntesis del compuesto 13:

El compuesto **11** (20 mg, 27,8 μmol) se disolvió en 3 ml de etanol anhídrico bajo nitrógeno. Después, se añadió tioamida **12** (45 mg, 139 μmol) y la mezcla se calentó a 40 °C durante 24 h. La mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **13** como un sólido rojo (15 mg, 59%). MS m/z = 932,6 (M+H)

10

Síntesis del compuesto 14:

El compuesto **13** (15 mg, 16,1 μmol) se disolvió en 2 ml de DMF anhidra bajo nitrógeno. Después, se añadieron 60 μl de piperidina y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **14** como un sólido rojo (6,9 mg, 60 %). MS m/z = 710,4 (M+H)

15

Síntesis del compuesto 16:

El compuesto **15** (8,9 mg, 16,9 μmol) se disolvió en 2 ml de DMF, después se añadieron HATU (6,4 mg, 16,8 μmol) y DIEA (9 μl, 51,8 μmol). Después de 2 min, se añadió el compuesto **14** (10 mg, 14,1 μmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. A la mezcla se le añadieron 40 μl de DBU y se agitó durante 10 min. Después, la mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **16** como un sólido rojo (12,2 mg, 87 %). MS m/z = 995,4 (M+H)

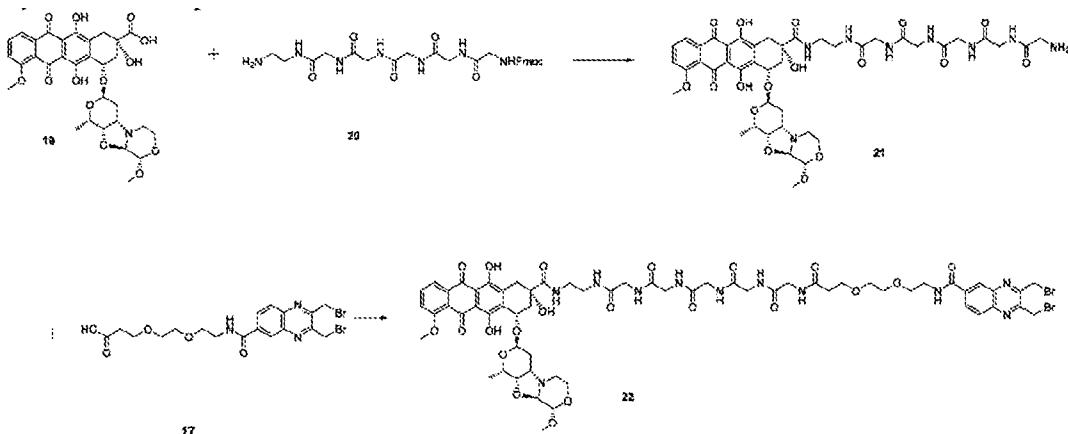
20

Síntesis del compuesto 18:

El compuesto **17** (12,5 mg, 24,2 μmol) se disolvió en 2 ml de DCM, después se añadió DIC (1,6 mg, 12,7 μmol). Después de 10 min, se añadió el compuesto **16** (12 mg, 12,1 μmol) disuelto en 0,5 ml de DMF y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Después, la mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **18** como un sólido rojo (12,8 mg, 71 %). MS m/z = 1.494,4 (M+H)

25

Síntesis del compuesto 22:



Síntesis del compuesto 21:

A una solución de ácido **19** (51 mg, 81 μmol) en 6 ml de DCM, añadir N-hidroxisuccinimida (46 mg, 400 μmol) y EDC (100 mg, 523 μmol). Después de 30 min, la mezcla se lavó con agua (2 x 6 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. El residuo se disolvió en 2 ml de DMF. Después, se añadió la amina **20** (55 mg, 81 μmol, como sal de TFA), seguido de DIEA (50 μl). La mezcla se agitó durante 1 h. Después, se añadió piperidina (40 μl) y se agitó durante 20 min. La mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **21** (34 mg, 44 %) como un sólido rojo; MS m/z 955,2 (M+H).

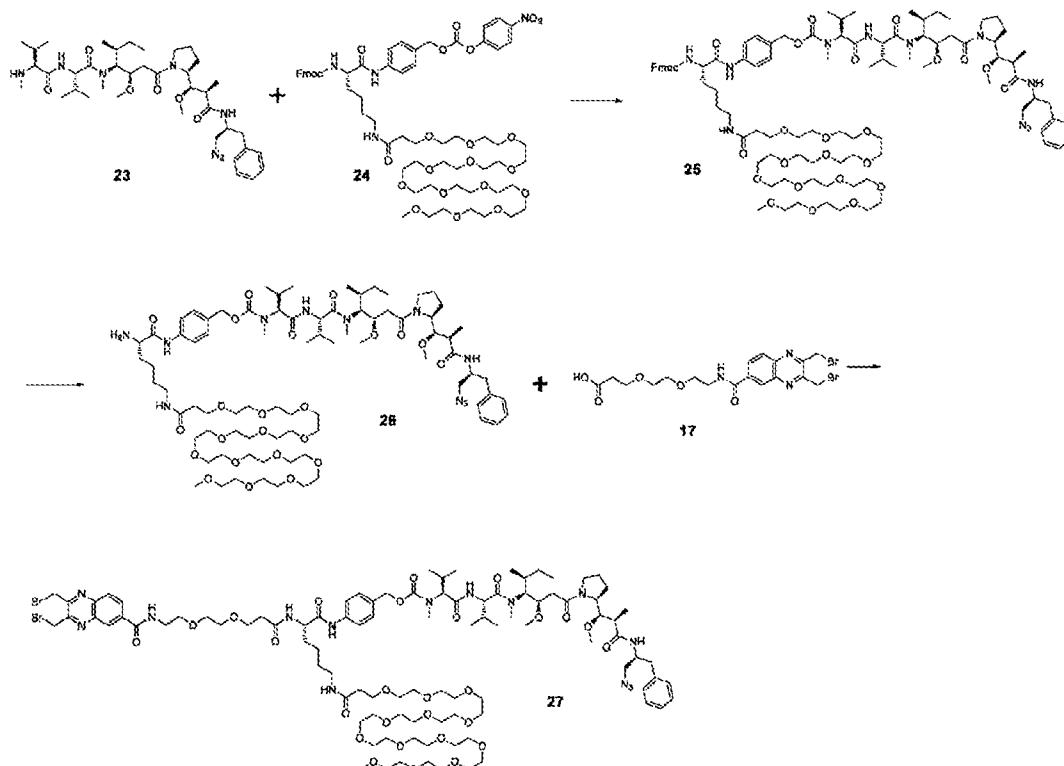
30

Síntesis del compuesto 22:

El compuesto **17** (12,5 mg, 24,2 μmol) se disolvió en 2 ml de DCM, después se añadió DIC (1,6 mg, 12,7 μmol). Despues de 10 min, se añadió el compuesto **21** (11,5 mg, 12,1 μmol) disuelto en 0,5 ml de DMF y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Despues, la mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **22** como un sólido rojo (7,0 mg, 42 %). MS m/z = 1.453,6 (M+H)

5

Síntesis del compuesto 27:



Síntesis del compuesto 26:

A una solución del compuesto **23** como sal de TFA (84,2 mg, 96,3 μmol) en 2 ml de DMF se añadió el compuesto **24** (120,6 mg, 96,2 μmol), DIEA (50 μl), HOBr (13 mg, 96,3 μmol). Despues de 24 h, la reacción se completó y despues se añadió piperidina (60 μl) y se agitó durante 10 min. La mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **26** (134 mg, 80 %) como un sólido blanco; MS m/z 1.635,3 (M+H).

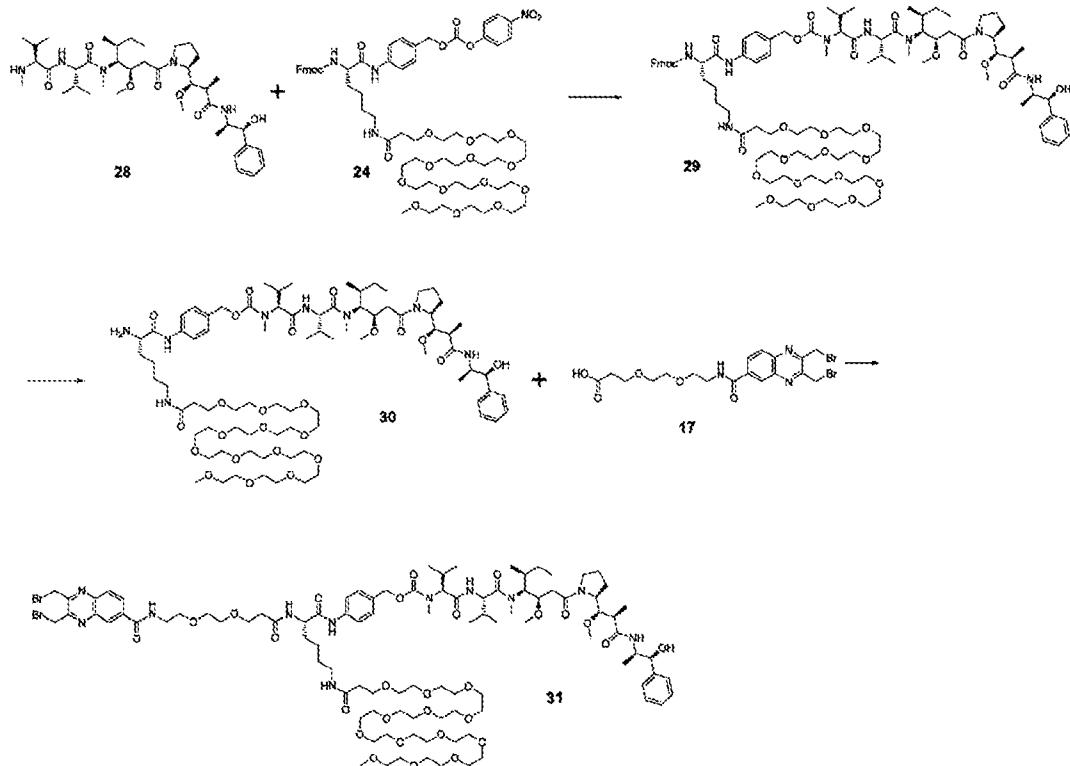
10

Síntesis del compuesto 27:

El compuesto **17** (25 mg, 48,4 μmol) se disolvió en 2 ml de DCM, después se añadió DIC (3,2 mg, 25,4 μmol). Despues de 10 min, se añadió el compuesto **26** (39,5 mg, 24,2 μmol) disuelto en 0,5 ml de DMF y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Despues, la mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **27** como un sólido blanco (32,0 mg, 62 %). MS m/z = 2.134,1 (M+H)

15

Síntesis del compuesto 31:



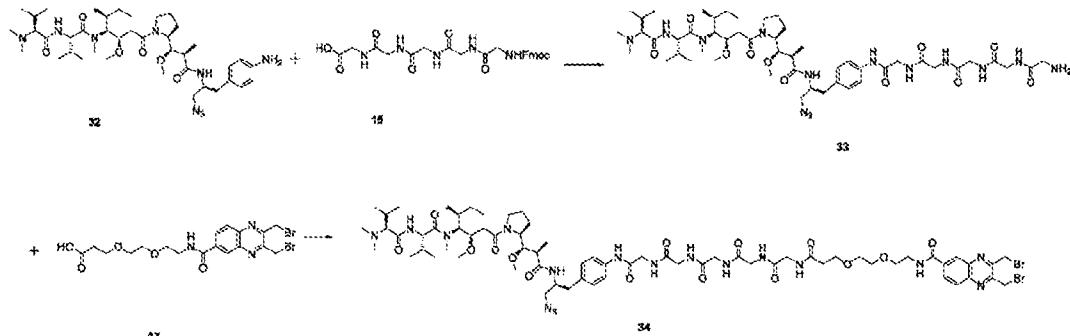
Síntesis del compuesto 30:

5 A una solución del compuesto **28** como sal de TFA (30 mg, 36 μ mol) en 1 ml de DMF se añadió el compuesto **24** (45 mg, 36 μ mol), DIEA (20 μ l), HOt (5 mg, 37 μ mol). Después de 24 h, la reacción se completó y después se añadió piperidina (20 μ l) y se agitó durante 30 min. La mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **30** (46 mg, 79 %) como un sólido blanco; MS m/z 1.635,3 (M+H).

Síntesis del compuesto 31:

10 El compuesto **17** (30 mg, 57,1 μ mol) se disolvió en 2 ml de DCM, después se añadió DIC (3,6 mg, 28,6 μ mol). Después de 10 min, se añadió el compuesto **30** (46 mg, 28,6 μ mol) disuelto en 0,5 ml de DMF y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Después, la mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **31** como un sólido blanco (44,8 mg, 59 %). MS m/z = 2.109,2 (M+H).

Síntesis del compuesto 34:



15 Síntesis del compuesto 33:

El compuesto **15** (17 mg, 33 μ mol) se disolvió en 2 ml de DMF, después, se añadieron HATU (12,5 mg, 32,9 μ mol) y DIEA (23 μ l). Después de 2 min, se añadió el compuesto **32** como sal de TFA (24 mg, 27,6 μ mol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. A la mezcla se le añadieron 40 μ l de DBU y se agitó durante 10 min. Después, la mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **33** como un sólido blanco (30,2 mg, 85 %). MS m/z = 1.057,8 (M+H)

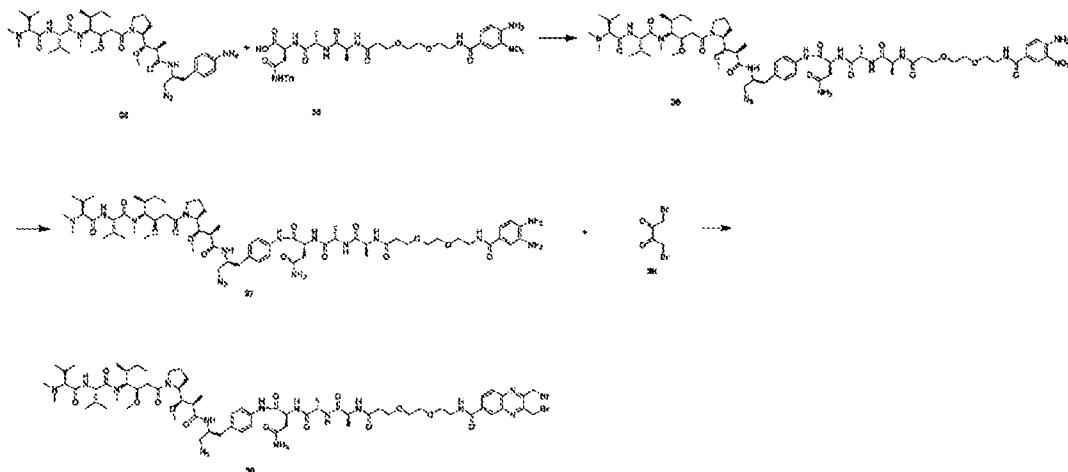
20

Síntesis del compuesto 34:

El compuesto **17** (12,5 mg, 24,2 μmol) se disolvió en 2 ml de DCM, después se añadió DIC (1,6 mg, 12,7 μmol). Despues de 10 min, se añadió el compuesto **33** (12,8 mg, 12,1 μmol) disuelto en 0,5 ml de DMF y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Despues, la mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **34** como un sólido blanco (14,5 mg, 77 %). MS m/z = 1.556,8 (M+H).

5

Síntesis del compuesto 39:



Síntesis del compuesto 36:

A un matraz de fondo redondo añadir el compuesto **33** como sal de TFA (88,6 mg, 0,1 mmol), el compuesto **35** (84 mg, 0,1 mmol), HOAt (41 mg, 0,3 mmol), DCM (5 ml), DIEA (104 μl) y DIC (25 mg, 0,2 mmol). Despues de 16 h de agitación, diluir la mezcla de reacción con 5 ml de DCM, despues, lavarla con 5 ml de agua, secar sobre Na_2SO_4 , evaporar el disolvente al vacío para dar un sólido vítreo bruto que se usó en la siguiente etapa. Disolver el sólido obtenido en una mezcla que consiste en 2 ml de DCM, 2 ml de TFA y 0,2 ml de triisopropilsilano y agitar durante 1 h. Evaporar el disolvente al vacío y purificar por HPLC para dar el compuesto **36** (81 mg, 60 %), MS m/z 1.351,5 (M+H).

10

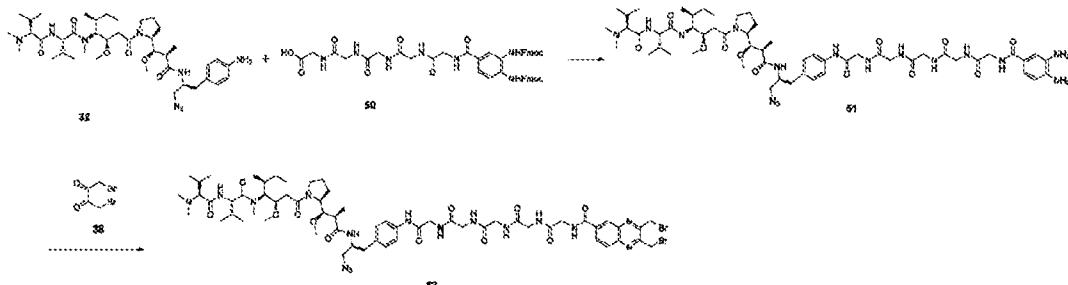
Síntesis del compuesto 37:

A un matraz de fondo redondo añadir el compuesto **36** (81 mg, 0,06 mmol), 2 ml de ACN, 1 ml de agua y 1 ml de NaHCO_3 ac. sat. Despues, añadir $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (42 mg, 0,24 mmol) y continuar agitando durante 20 min. Purificar la mezcla por HPLC para dar el compuesto **37** (55 mg, 70 %), MS m/z 1.321,7 (M+H).

Síntesis del compuesto 39:

20 El compuesto **37** (53 mg, 0,04 mmol) se disolvió en 2 ml de ACN y se añadió 1,4-dibromo-2,3-butanodiona (**38**) (29 mg, 0,12 mmol). Despues de agitar durante 20 min, la reacción se purificó por HPLC para dar el compuesto **39** (40 mg, 65 %), MS m/z 1.527,6 (M+H).

Síntesis del compuesto 52:



25

Síntesis del compuesto 51:

A una solución de la amina **32** (875 mg, 1,13 mmol) y el ácido **50** (1.000 mg, 1,13 mmol) en 10 ml de DMF, se añadió Oxima-puro (160 mg, 1,13 mmol), seguido de DIC (428 mg, 2,74 mmol). Despues de 2 h, se completó el acoplamiento y despues se añadió 1 ml de piperidina y se agitó durante 20 min. La mezcla se purificó por HPLC para dar la sal de TFA del compuesto **51** (1.020 mg, 69 %) como un sólido blanco; MS m/z 1.191,7 (M+H).

Síntesis del compuesto 52:

La sal de TFA del compuesto **51** (200 mg, 141 umol) se disolvió en 2 ml de ACN y 1 ml de agua. Después, se añadió una solución de 1,4-dibromo-2,3-butanodiona **38** (69 mg, 282 umol) en 1 ml de ACN. Después de agitar durante 15 min, la reacción se purificó por HPLC para dar el compuesto **52** como un sólido blanco (166 mg, 84 %). MS m/z = 5 1.397,6 (M+H)

Ejemplo de preparación de ADC 1**Preparación de ADC46**

Se intercambió el tampón del anticuerpo anti-CD38 purificado por afinidad en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0-7,2 con EDTA 4 mM a una concentración de 5-10 mg/ml. A una porción de esta preparación madre de anticuerpo 10 se le añadió una solución acuosa 10 mM recién preparada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en un exceso molar de hasta 20 veces. La mezcla resultante se incubó a 4-8 °C durante la noche. El exceso de TCEP se eliminó mediante cromatografía de filtración en gel o varias rondas de filtración centrífuga. La cuantificación por UV-Vis del material de anticuerpo reducido recuperado fue seguida de la confirmación de una proporción suficiente de tiol libre con respecto al anticuerpo. Brevemente, una parte alícuota 1 mM de (ácido 5,5'-ditriobis-(2-nitrobenzoico) recién preparado en 15 fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0-7,2, EDTA 4 mM se mezcló con un volumen igual de solución de anticuerpo purificado. Se midió la absorbancia resultante a 412 nm y se determinó el contenido de cisteína reducida usando el coeficiente de extinción de 14.150 M⁻¹cm⁻¹.

Para iniciar la conjugación del compuesto **52** al anticuerpo anti-CD38, L014-077 se disolvió primero en una mezcla 3:2 de acetonitrilo/agua a una concentración de 5 mM. Una parte alícuota de esta solución de toxina-enlazador recién 20 preparada se añadió entonces a una porción del intermedio de anticuerpo anti-CD38 purificado reducido en exceso molar de 4,5-5 veces. Después de mezclar concienzudamente e incubar a temperatura ambiente durante ≥ 1 h, la reacción de conjugación bruta se analizó por cromatografía de HIC-HPLC para confirmar la finalización de la reacción (desaparición del pico del anticuerpo de partida) a una detección de longitud de onda de 280 nm. La purificación de 25 ADC46 se llevó a cabo entonces mediante cromatografía de filtración en gel usando un sistema AKTA equipado con una columna Superdex 200 pg (GE Healthcare) equilibrada con PBS. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) se calculó basándose en UV-VIS e HIC-HPLC. La Figura 8 muestra una comparación representativa de HIC-HPLC del anticuerpo anti-CD38 de partida y el ADC46 purificado. La confirmación del bajo porcentaje (<5 %) de agregados de 30 alto peso molecular (HMW) para el ADC46 resultante se determinó usando SEC-HPLC analítica.

Preparación de ADC41

30 La reducción y el análisis del anticuerpo anti-CD38 para ADC41 se realizó de una manera idéntica al procedimiento usado para generar ADC46. Para iniciar la conjugación final de fármaco-enlazador con el anticuerpo, el Compuesto **22** se disolvió primero en una mezcla 2:3 de acetonitrilo/agua a una concentración de 5 mM. Después, se añadió propilenglicol (PG) a una parte alícuota del anticuerpo anti-CD38 reducido y purificado para dar una concentración final del 10-30 % (v/v) de PG antes de la adición de la solución del compuesto **22** recién preparada en un exceso molar de 4,5-5 veces. El análisis y purificación posteriores de ADC41 se llevaron a cabo de una manera idéntica al 35 procedimiento para ADC46. La Figura 9 muestra una comparación representativa de HIC-HPLC del anticuerpo anti-CD38 de partida y el ADC41 purificado.

Ejemplo de ensayo 1

40 Tras la recepción, los animales se alojaron con 5 ratones por jaula en una sala con un entorno controlado. A los animales se les proporcionó pienso para roedores y agua a voluntad. La aclimatación de los ratones a las condiciones de laboratorio fue de al menos 72 horas antes del inicio de la administración y dosificación celular. Durante el periodo de aclimatación, se determinó el estado de salud de los animales. Sólo se usaron animales que se observó que estaban sanos antes del inicio del estudio.

45 Este ejemplo proporciona un experimento *in vivo* que compara el tratamiento de ratones con control (PBS), anticuerpo IgG1 anti-CD38 (STI-0602 y STI-0607) y una variante de ADC de ambos anticuerpos. El procedimiento realiza primero una inoculación de células tumorales y el establecimiento de tumores:

50 a. Las células U87 se cultivaron con medio U87 con FBS al 10 % (EMEM) y se recogieron con tripsina al 0,05 %. Las células se lavaron 2 veces con EMEM libre de suero, se contaron y se resuspendieron a 5×10^6 células en 0,2 ml o, 25×10^6 células/ml en una mezcla 1:1 de EMEM libre de suero y matriz y se inyectaron por vía subcutánea en el flanco superior derecho de cada ratón.

55 b. El crecimiento tumoral se monitorizó mediante la medición del volumen tumoral usando un calibrador digital que comienza el Día 6-9 después de la inoculación, 2 veces por semana después y antes de la finalización del estudio.

c. Los tumores se midieron con calibradores digitales. Se midieron la longitud (la dimensión más larga) y la anchura (la distancia perpendicular a y en el mismo plano que la longitud). La fórmula para calcular el volumen tumoral fue TV (mm³) = $\frac{1}{2} \times L \times W^2$.

Tratamientos:

- a. Una vez que los tumores se estadificaron en el volumen deseado (promedio de 200 a 300 mm³), los animales se aleatorizaron y los ratones con tumores muy grandes o pequeños se sacrificaron. Los ratones se dividieron en 8 grupos de 10 ratones cada uno, aleatorizados por volumen tumoral.
- 5 b. Los ratones se trataron con vehículo o artículo de ensayo según la Figura 4. Los ratones recibieron un total de 5 dosis.
- c. Se monitorizaron las respuestas tumorales y se terminó el estudio una vez que se establecieron tendencias claras de tratamiento y/o cuando la carga tumoral en ratones tratados con vehículo alcanza los límites del protocolo IACUC (2.000 mm³).

10 Ejemplo de ensayo 2

Este ejemplo es un experimento *in vivo* que compara dos ADC de CD38 divulgados *in vivo* con ratones. En el estudio *in vivo*, se inyectaron iv 10 millones de células Daudi-fluc en ratones NOD-SCID. 4 días después de que se estableciera el tumor en ratones, se inyectaron anticuerpo anti-CD38 y ADC a ratones por vía IV. La inhibición del crecimiento tumoral por anticuerpo o ADC se monitorizó por el cambio en la intensidad de luminiscencia del tumor (Figuras 3, 4, 5 y 6).

15 20 Se ensayaron ADC#45 y ADC#41. Ambos ADC usan el mismo anticuerpo A2. La línea celular Daudi y Ramos se obtuvo de ATCC. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 1X con FBS al 10 % y a 37 °C en un ambiente humidificado con dióxido de carbono al 5 %. Las células se cultivaron durante un período de 2 semanas y se subcultivaron 3 veces antes de la recogida. Antes de la inyección, las células Daudi o Ramos se resuspendieron en una proporción 1:1 de HBSS (solución salina equilibrada de Hank) y Matrigel, y se inyectaron por vía subcutánea 10 millones de células por 0,2 ml en el flanco superior derecho de cada ratón.

Las células Daudi-luc se cultivaron en medio RPMI 1640 1X con FBS al 10 % y 0,2 ug/ml de puromicina a 37 °C en un ambiente humidificado con dióxido de carbono al 5 %. Las células se cultivaron durante un período de 2 semanas y se subcultivaron 3 veces antes de la recogida. Antes de la inyección, las células Daudi-luc se resuspendieron en HBSS. Se inyectaron 10 millones de células por 0,2 ml por vía intravenosa en la vena de la cola de cada ratón.

25 30 Se usaron ratones hembra NOD SCID de 6 semanas de edad (Charles River) para xenoinjertos subcutáneos Daudi y xenoinjertos intravenosos Daudi-luc. Se usaron ratones hembra Nu/Nu de 6 semanas de edad (Charles River) para xenoinjertos subcutáneos Ramos en los estudios. Tras la recepción, los ratones se alojaron con 5 ratones por jaula en una sala con un entorno controlado. Se proporcionó pienso para roedores y agua *ad libitum*. Los ratones se aclimataron a las condiciones de laboratorio durante 72 horas antes del inicio de la dosificación. El estado de salud de los animales se monitorizó durante el período de aclimatación. Cada jaula se identificó por el número de grupo y el número de estudio, y los ratones se identificaron individualmente por etiquetas en la oreja.

El diseño del estudio y los regímenes de dosificación se muestran en la siguiente tabla.

Modelos de Tumor	Grupo	# de Animal	Tratamiento	Dosis/frecuencia	Volumen/vía
Xenoinjerto subcutáneo de Daudi en ratones NOD SCID	1	7	PBS	0 mg/kg, única	0,2 ml/iv
	2	7	ADC#45	10 mg/kg, única	0,2 ml/iv
	3	7	ADC#45	3 mg/kg, única	0,2 ml/iv
	4	7	ADC#45	1 mg/kg, única	0,2 ml/iv
Xenoinjerto subcutáneo de Ramos en ratones Nu/Nu	1	7	PBS	0 mg/kg, única	0,2 ml/iv
	2	7	ADC#45	10 mg/kg, única	0,2 ml/iv
	3	7	ADC#45	3 mg/kg, única	0,2 ml/iv
	4	7	ADC#45	1 mg/kg, única	0,2 ml/iv
Modelo intravenoso de Daudi-luc en ratones NOD SCID	1	8	PBS	0 mg/kg, única	0,2 ml/iv
	2	8	Ab	3 mg/kg, única	0,2 ml/iv
	3	8	ADC#45	3 mg/kg, única	0,2 ml/iv
	4	8	ADC#41	3 mg/kg, única	0,2 ml/iv

El crecimiento tumoral se monitorizó midiendo la anchura y longitud del tumor usando un calibrador digital comenzando el día 5-7 después de la inoculación, y se siguió dos veces por semana hasta que el volumen tumoral alcanzó ~100-250 mm³. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula: Volumen (mm³) = [Longitud (mm) x Anchura (mm)²] / 2.

- 5 Una vez que los tumores se estadificaron en el volumen deseado, los animales se aleatorizaron y los ratones con tumores muy grandes o pequeños se sacrificaron. Los ratones se dividieron en grupos con números de animales por grupo como se indica en el diseño del estudio. Los ratones se trataron entonces por vía intravenosa (0,2 ml/animal) con PBS, Ab, ADC#45 o ADC#41. El crecimiento tumoral, la salud animal y el peso corporal se monitorizaron después del tratamiento. Los animales de ensayo se sacrificaron cuando la carga tumoral subcutánea promedio para el grupo excedía de 2.000 mm³, la pérdida de peso corporal del animal excedió del 20 %, o al final del estudio.
- 10 10 El volumen tumoral se midió dos veces por semana durante todo el período experimental. Se calculó el TGI (% de inhibición del crecimiento tumoral) usando la fórmula: TGI = [(Última Medición de Volumen del Grupo de PBS - Volumen del Grupo de Tratamiento el mismo día que el control de PBS)/(Última Medición de Volumen del Grupo de PBS)] x 100. El peso corporal de cada ratón se midió dos veces por semana mediante balanza eléctrica.
- 15 15 Se calcularon los datos sin procesar del peso corporal y el volumen tumoral individuales. Se calcularon el promedio del grupo y la desviación estándar, y se llevaron a cabo análisis estadísticos (ANOVA unidireccional con prueba de comparación múltiple de Dunnett; GraphPad Prism 6.0). Todos los grupos de tratamiento se compararon con el grupo de PBS. P<0,05 se consideró estadísticamente significativo.
- 20 20 ADC#45 a 10 mg/kg inhibió significativamente el crecimiento tumoral de Daudi en comparación con el grupo de control tratado con PBS. Aunque el tumor recuperó el crecimiento después de 3 semanas, el tratamiento individual de 10 mg/kg retrasó significativamente el crecimiento tumoral. En este caso, se puede ensayar un tratamiento múltiple para conseguir una inhibición tumoral sostenida. Aunque una dosis única de ADC#45 a 3 mg/kg o 1 mg/kg no inhibió significativamente el crecimiento tumoral. Sin embargo, aunque la diferencia no fue significativa, una dosis única de ADC#45 mostró una inhibición ligera del crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control tratado con PBS. Se observó respuesta a la dosis en este estudio, donde una dosis más alta mostró mejor inhibición del crecimiento tumoral (Figura 1A). No hubo pérdida de peso corporal en los animales de ensayo con una dosis única de ADC#45 administrado por vía intravenosa a 10 mg/kg o dosis inferior (Figura 1B).
- 25 25 De manera similar, ADC#45 a 10 mg/kg inhibió significativamente el crecimiento tumoral de Ramos en comparación con el grupo de control tratado con PBS y tuvo un efecto de inhibición tumoral sostenido durante hasta 60 días. Una dosis única de ADC#45 a 3 mg/kg o 1 mg/kg no inhibió significativamente el crecimiento tumoral. Sin embargo, aunque la diferencia no fue significativa, una dosis única de ADC#45 a 3 mg/kg o 1 mg/kg mostró una inhibición ligera del crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control tratado con PBS. Se observó respuesta a la dosis en este estudio, donde una dosis más alta mostró mejor inhibición del crecimiento tumoral (Figura 2A). No hubo pérdida de peso corporal en los animales de ensayo con una dosis única de ADC#45 administrado por vía intravenosa a 10 mg/kg o dosis inferior (Figura 2B).
- 30 30 35 ADC#45 a una dosis única de 3 mg/kg inhibió completamente el crecimiento tumoral con una supervivencia del 100 % hasta el Día 48 después del tratamiento. ADC#41 a una dosis única de 3 mg/kg inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control de PBS, y prolongó significativamente la supervivencia en ratones. (Figuras 3 y 4).
- 35 35 40 ADC#45 y ADC#41, a una dosis única de 10 mg/kg, inhibieron significativamente el crecimiento tumoral, mientras que a 3 mg/kg, o 1 mg/kg, ninguno de los dos mostró una inhibición tumoral significativa en el modelo de tumor de xenoinjerto inyectado por vía subcutánea con Daudi y Ramos en ratones. ADC#45 a una dosis única de 3 mg/kg inhibió completamente el crecimiento tumoral con una supervivencia del 100 % hasta 48 días en el modelo tumoral inyectado por vía intravenosa Daudi-luc en ratones NOD SCID hembra. ADC#41 a una dosis única de 3 mg/kg inhibió significativamente el crecimiento tumoral y prolongó la supervivencia en el modelo tumoral inyectado por vía intravenosa con Daudi-luc en ratones SCID NOD hembra. Se observó respuesta a la dosis para ADC#45 y ADC#41 en este estudio. ADC#45 mostró un mejor efecto de inhibición del crecimiento tumoral que ADC#41 con el mismo régimen de dosis (10 mg/kg o 3 mg/kg). No se observó ninguna pérdida de peso corporal relacionada con el tratamiento durante el estudio para ninguno de los grupos de tratamiento.

Listado de secuencias

Ligante	Región de dominio variable de cadena pesada	Región de dominio variable de cadena ligera
A2 wt	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLE WVASVSNGRPTTYYADSVRGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREDWGGEFTDWGRGTLV TVSS SEQ ID NO. 1	QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGS SSNIGINFVYWYQHLPGTAPKLLIY KNNQRPSGVDRFSGSKSGNSASL AISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSG YVFGSGTKVTVL SEQ ID NO. 2
A2-SV	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLE WVASVSNGRPTTYYADSVRGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREDWGGEFTDWGRGTLV TVSS SEQ ID NO. 1	QSVLTQPPSASGTSGQRVTISCGSSSNIGI NFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSGV DRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADYYCA AWDDSLSGYVFGSGTKVTVL SEQ ID NO. 3

REIVINDICACIONES

1. Una composición de ADC anti-CD38 que comprende:

(a) un anticuerpo IgG anti-CD38 C38A2-SV (SEQ ID NO. 1/3 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria) o C38A2 (SEQ ID NO. 1/2 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria);

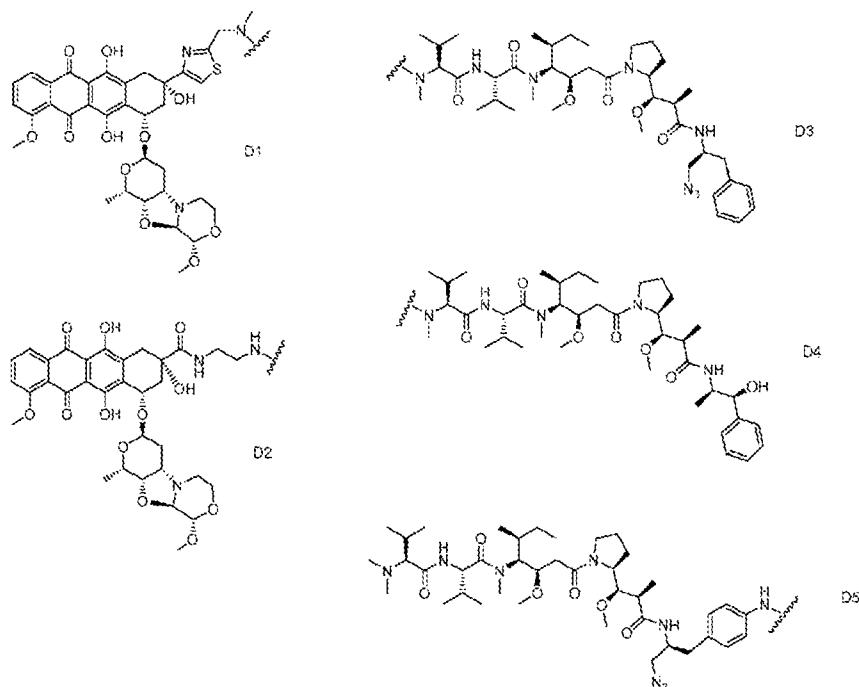
5

(b) un resto de fármaco o toxina que es un inhibidor de tubulina o un análogo de doxorrubicina; y

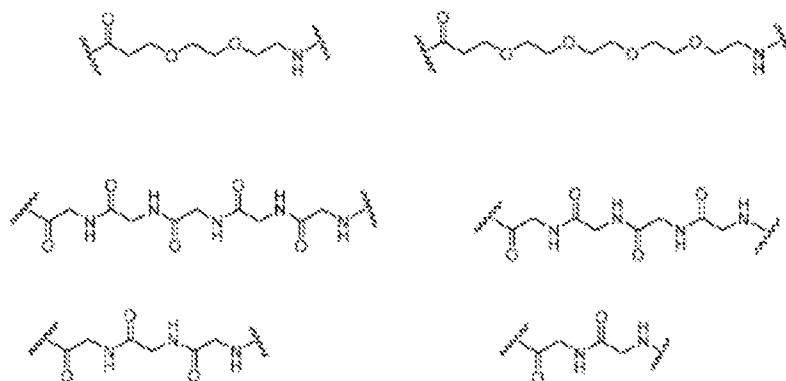
(c) un resto enlazador de conjugación, en donde el enlazador de conjugación comprende un enlazador y un resto de conjugación que se une covalentemente a un único residuo de Cys en una región bisagra de un anticuerpo IgG, y en donde una región bisagra de cadena pesada de un anticuerpo IgG puede mutarse de manera que la región bisagra de cadena pesada contenga solo un residuo de Cys.

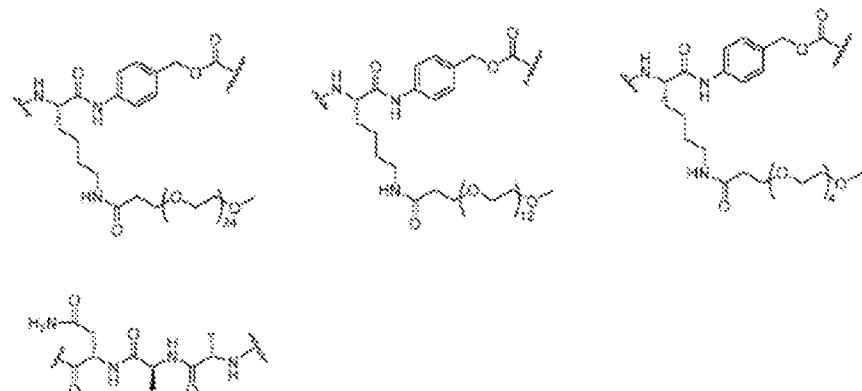
10

2. La composición de ADC anti-CD38 de la reivindicación 1, en donde el resto de fármaco o toxina se selecciona del grupo que consiste en D1, D2, D3, D4, D5, y combinaciones de los mismos, en donde las estructuras de D1, D2, D3, D4 y D5 son:

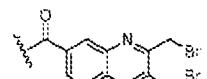


15 3. La composición de ADC anti-CD38 de la reivindicación 1, en donde el enlazador se selecciona del grupo que consiste en:





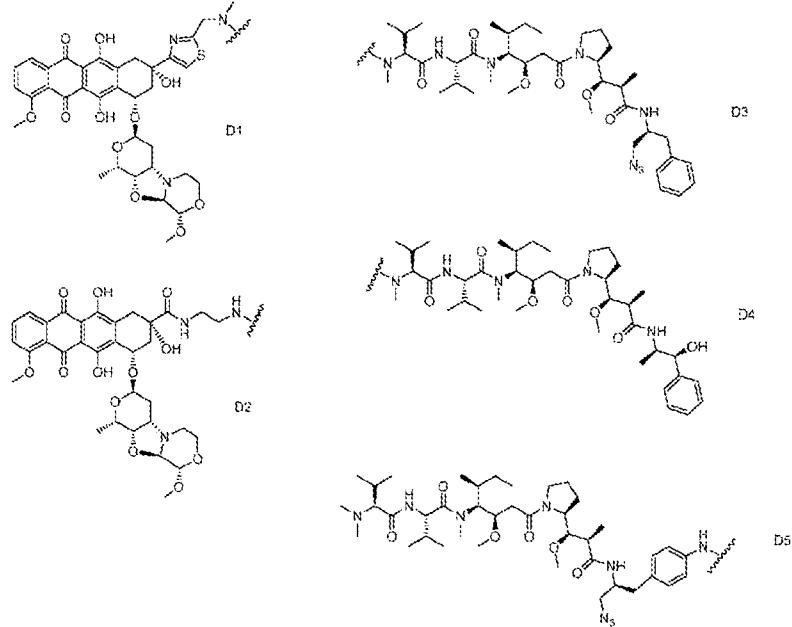
en donde la línea ondulada indica un punto de unión al resto de conjugación y el resto de fármaco o toxina.



4. La composición de ADC anti-CD38 de la reivindicación 1, en donde el resto de conjugación es en donde la línea ondulada indica el punto de unión al enlazador.

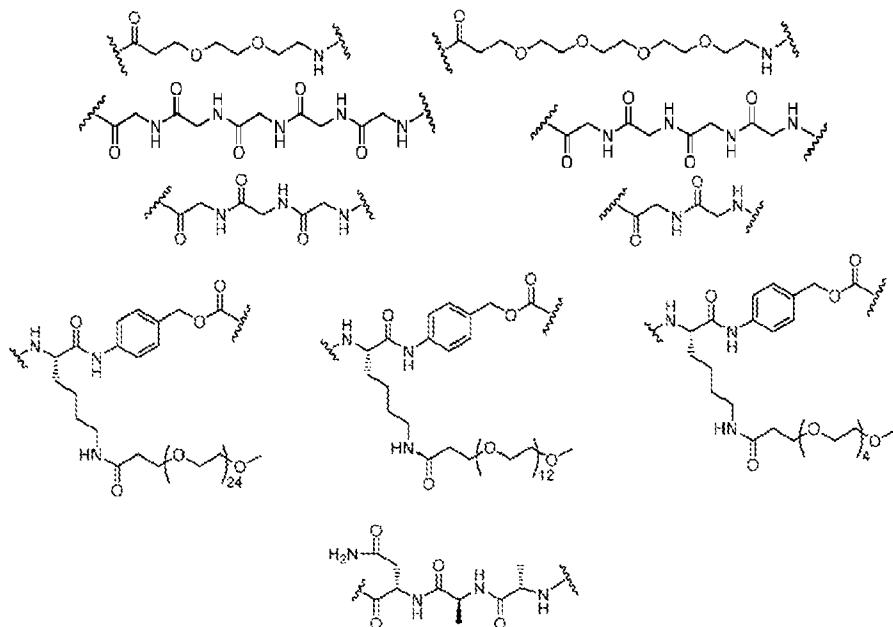
- 5 5. La composición de ADC anti-CD38 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la región bisagra de la cadena pesada del anticuerpo IgG está mutada de manera que la región bisagra de la cadena pesada contenga solo un residuo de Cys.
6. Una composición de ADC anti-CD38 que comprende:
- 10 (a) un anticuerpo IgG anti-CD38 C38A2-SV (SEQ ID NO. 1/3 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria) o C38A2 de tipo salvaje (SEQ ID NO. 1/2 para las regiones variables de la cadena pesada/ligera en la presente memoria);
- (b) un resto de fármaco o toxina que es un inhibidor de tubulina o un análogo de doxorrubicina; y
- 15 (c) un resto enlazador de conjugación, en donde el resto enlazador de conjugación comprende un enlazador y un resto de conjugación que se une covalentemente a un único residuo de Cys en una región bisagra de un anticuerpo IgG, y en donde una región bisagra de cadena pesada de un anticuerpo IgG puede mutarse de manera que la región bisagra de cadena pesada contenga solo un residuo de Cys para su uso como medicamento.

7. La composición de ADC anti-CD38 para el uso de la reivindicación 6, en donde el resto de fármaco o toxina se selecciona del grupo que consiste en D1, D2, D3, D4, D5, y combinaciones de los mismos, en donde las estructuras son:



8. La composición de ADC anti-CD38 para el uso de la reivindicación 6, en donde el enlazador se selecciona del grupo que consiste en:

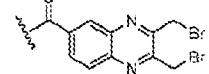
5



en donde la línea ondulada indica un punto de unión al resto de conjugación y el resto de fármaco o toxina.

9. La composición de ADC anti-CD38 para el uso de la reivindicación 6, en donde el resto de conjugación es

10



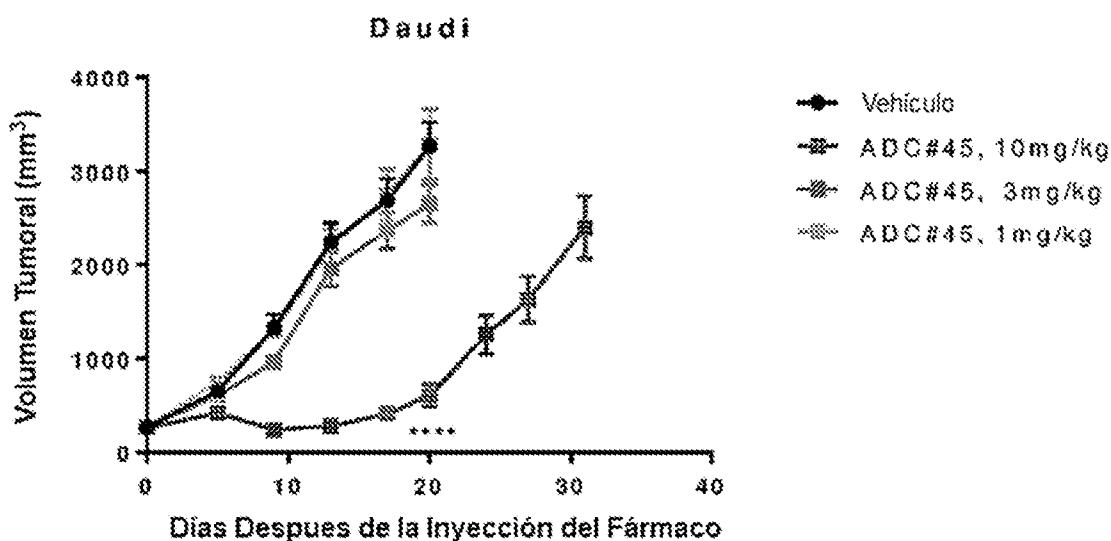
, en donde la línea ondulada indica el punto de unión al enlazador.

10. La composición de ADC anti-CD38 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde la composición es para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple.

15

11. La composición de ADC anti-CD38 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en donde la región bisagra de la cadena pesada del anticuerpo IgG está mutada de manera que la región bisagra de la cadena pesada contenga solo un residuo de Cys.

Figura 1A



* P< 0,05, ANOVA unidireccional en comparación con el grupo de control de vehículo.

Figura 1B

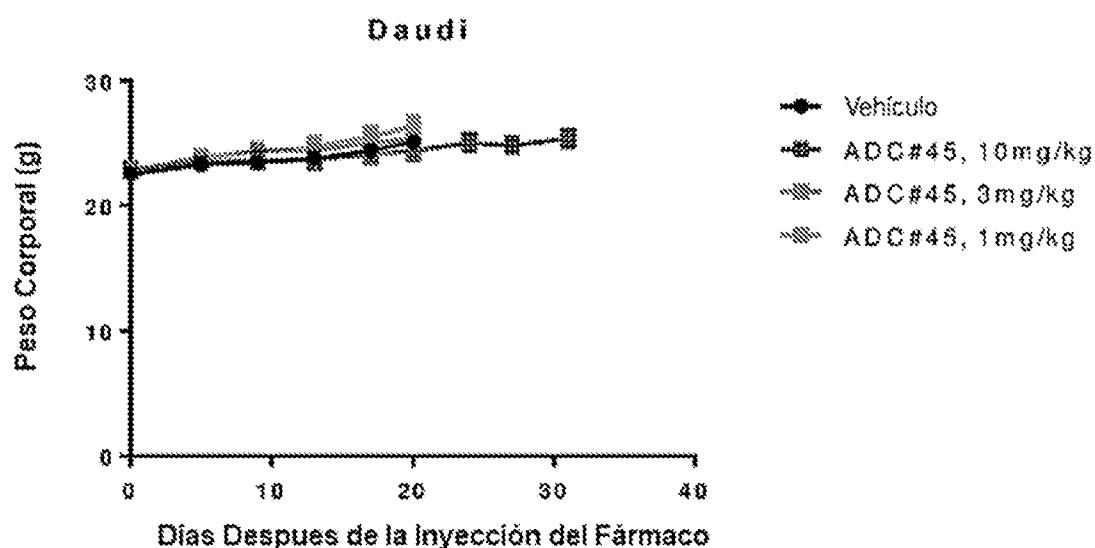


Figura 2A

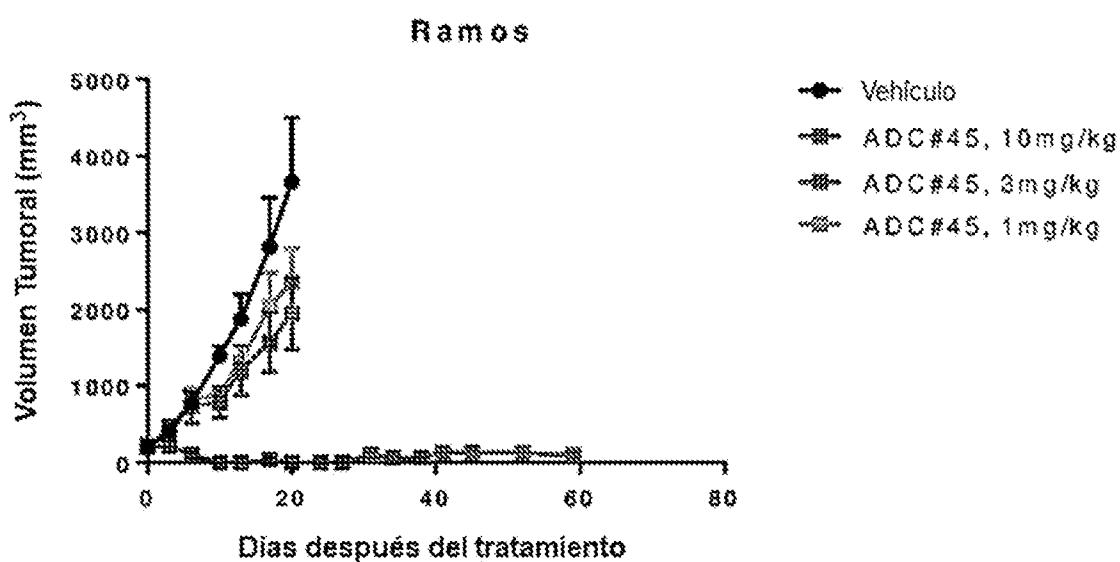


Figura 2B

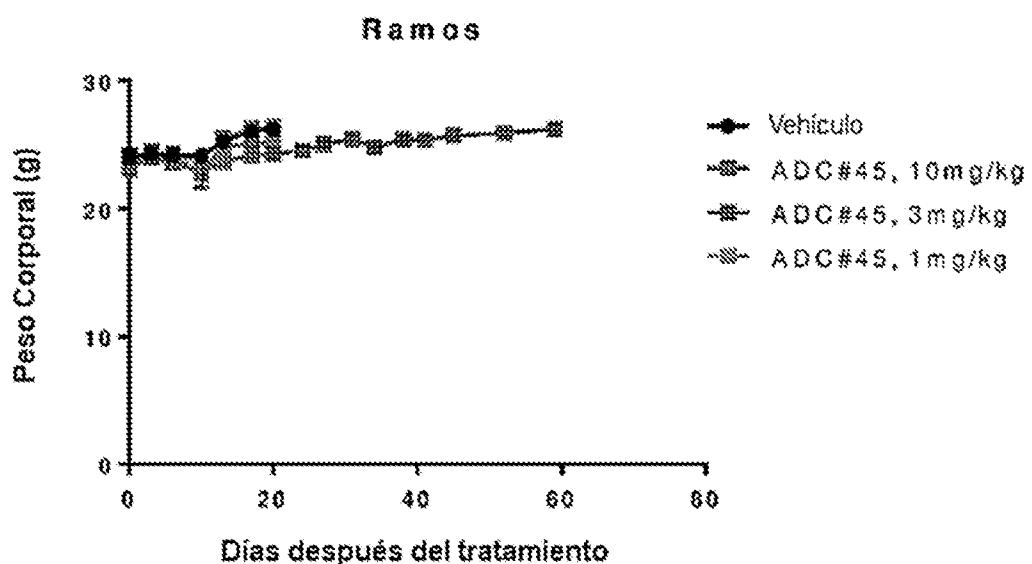


Figura 3

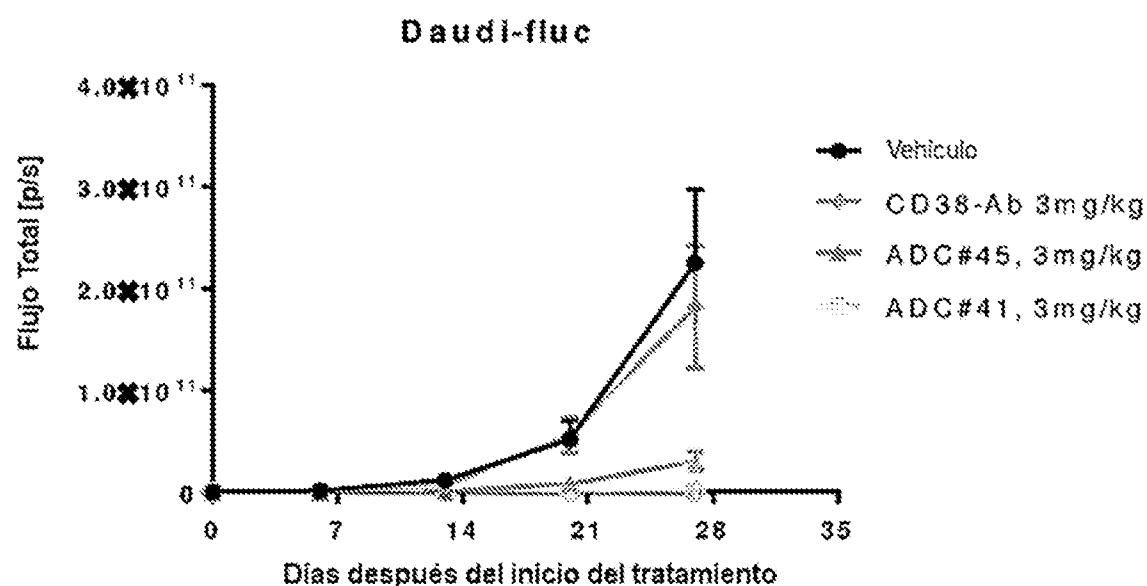


Figura 4

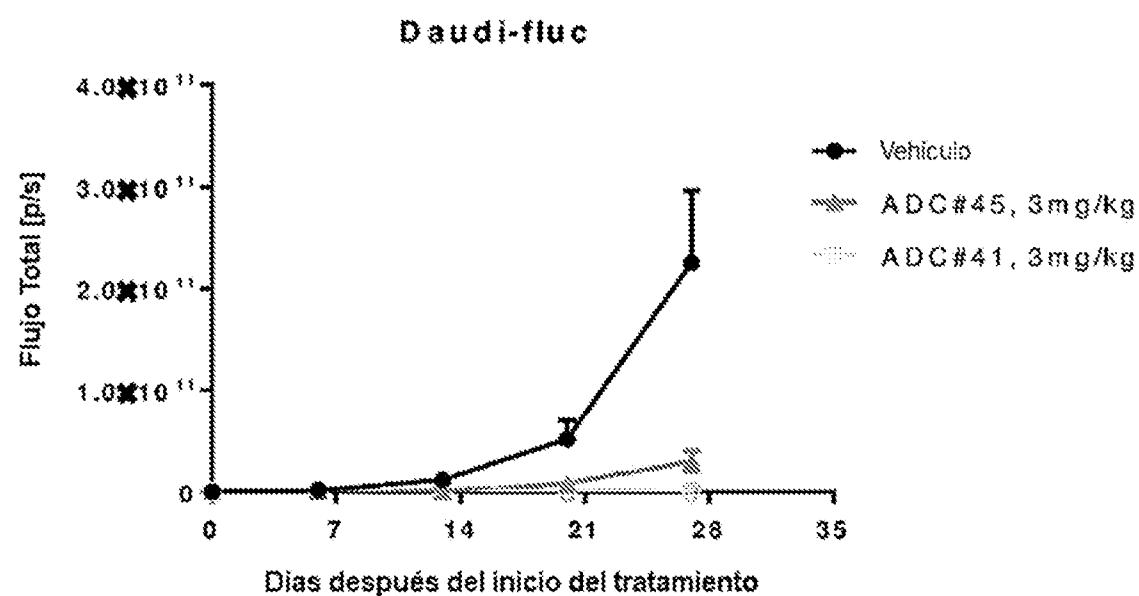


Figura 5

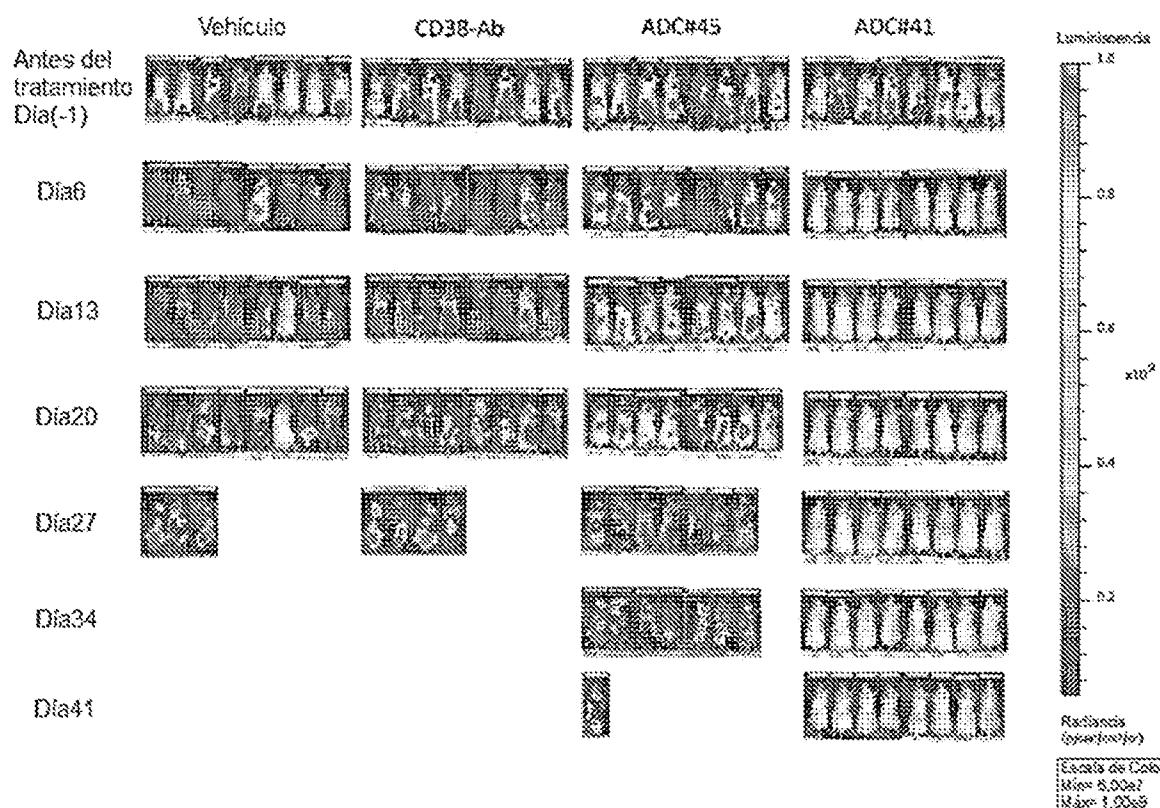


Figura 6

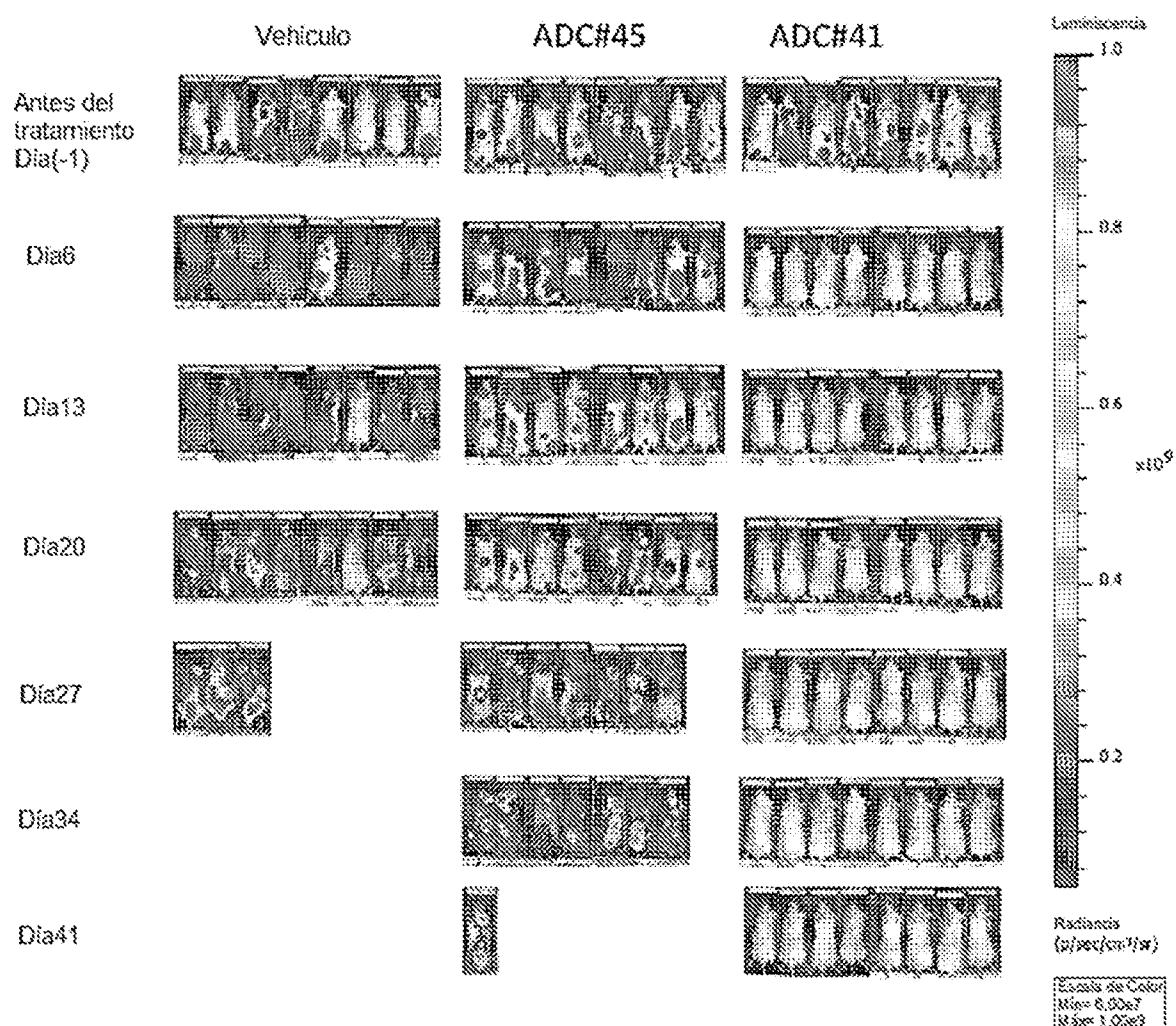


Figura 7

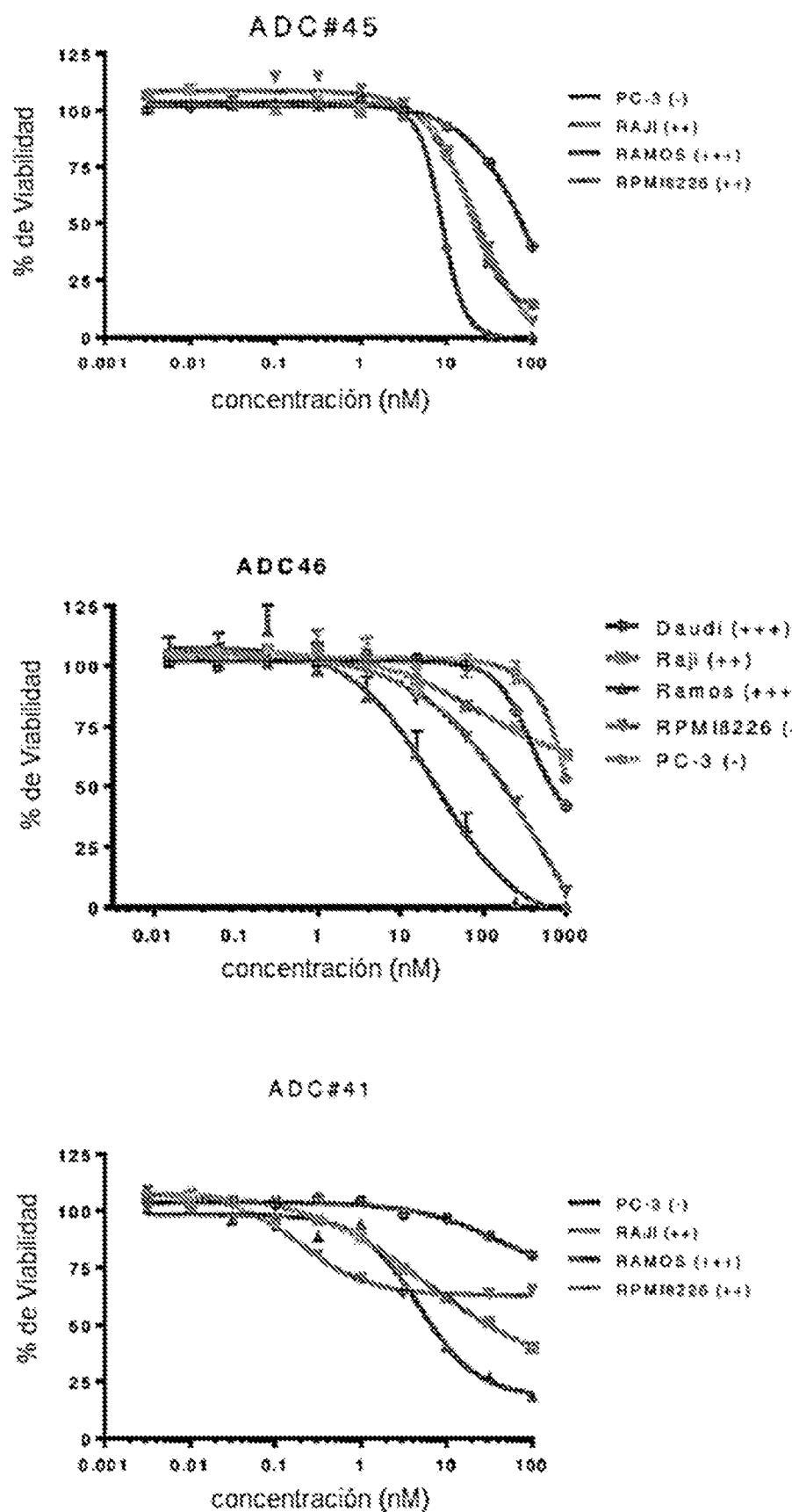


Figura 8

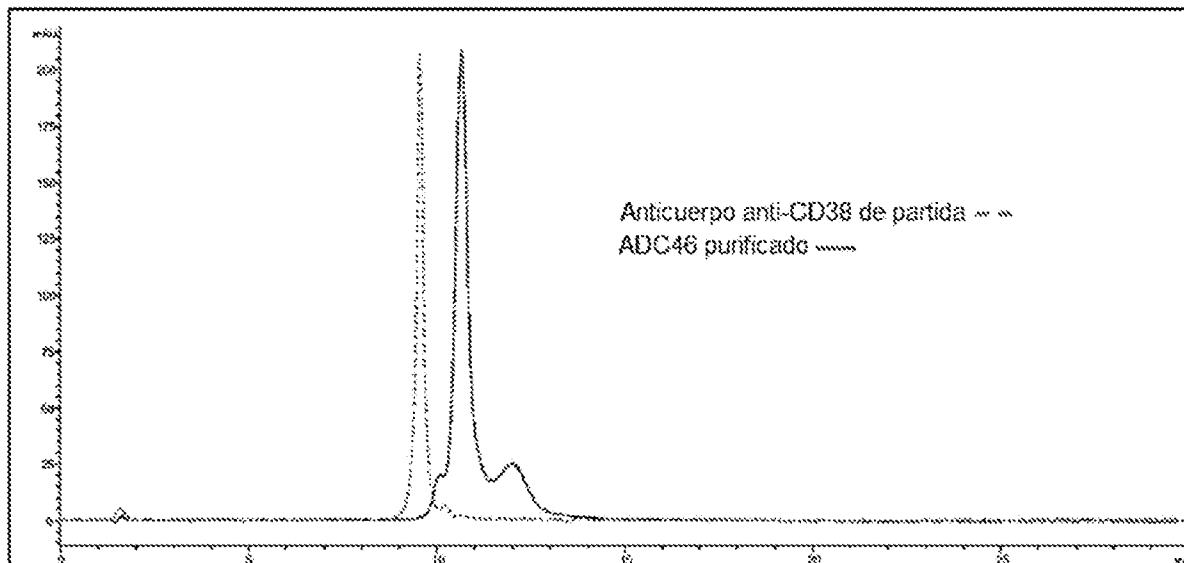


Figura 9.

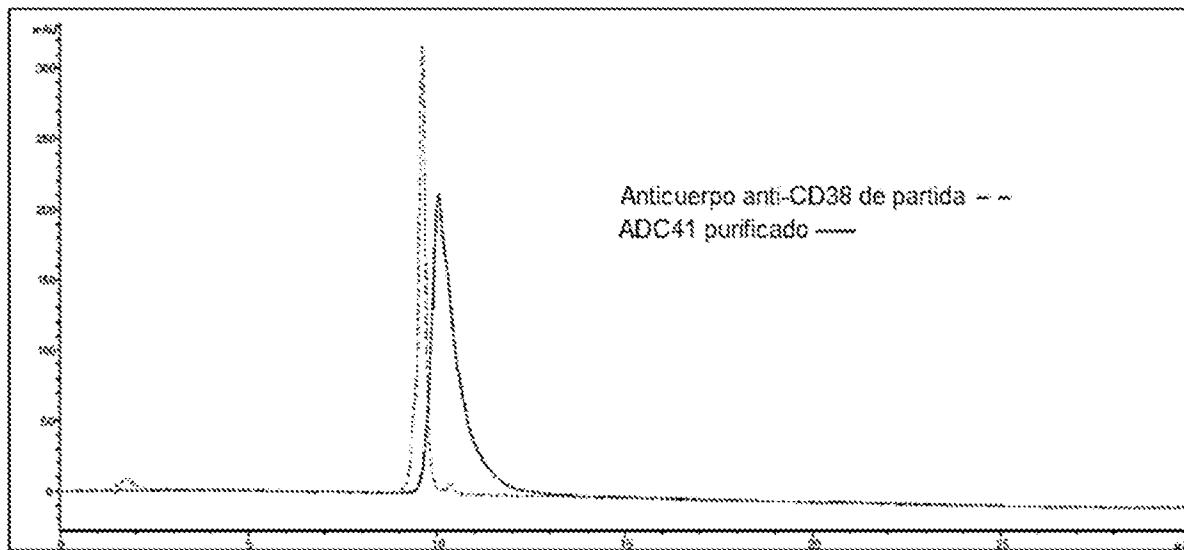


Figura 10A

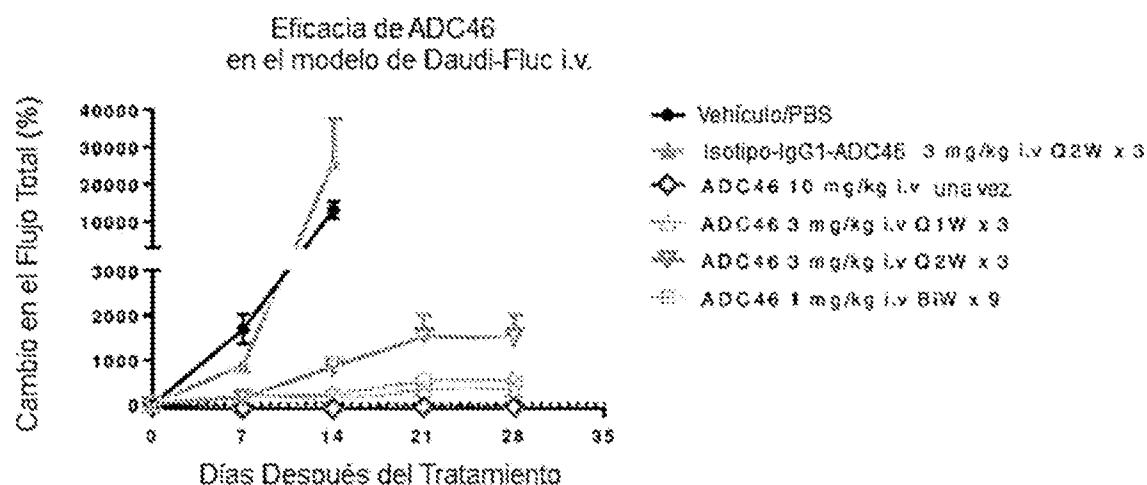


Figura 10B

