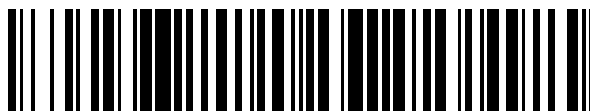


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 918 425**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/68** (2007.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

**C07K 5/06** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2016** **PCT/US2016/015482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016** **WO16123412**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2016** **E 16744147 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2022** **EP 3250238**

54 Título: **Conjugados de anticuerpo-fármaco**

30 Prioridad:

**28.01.2015 US 201562108894 P**

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

**15.07.2022**

73 Titular/es:

**SORRENTO THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**4955 Directors Place**  
**San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**MIAO, ZHENWEI;**  
**CHEN, GANG;**  
**ZHU, TONG;**  
**KHASANOV, ALISHER B.;**  
**DENG, DYLAN y**  
**ZHANG, HONG**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 918 425 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**

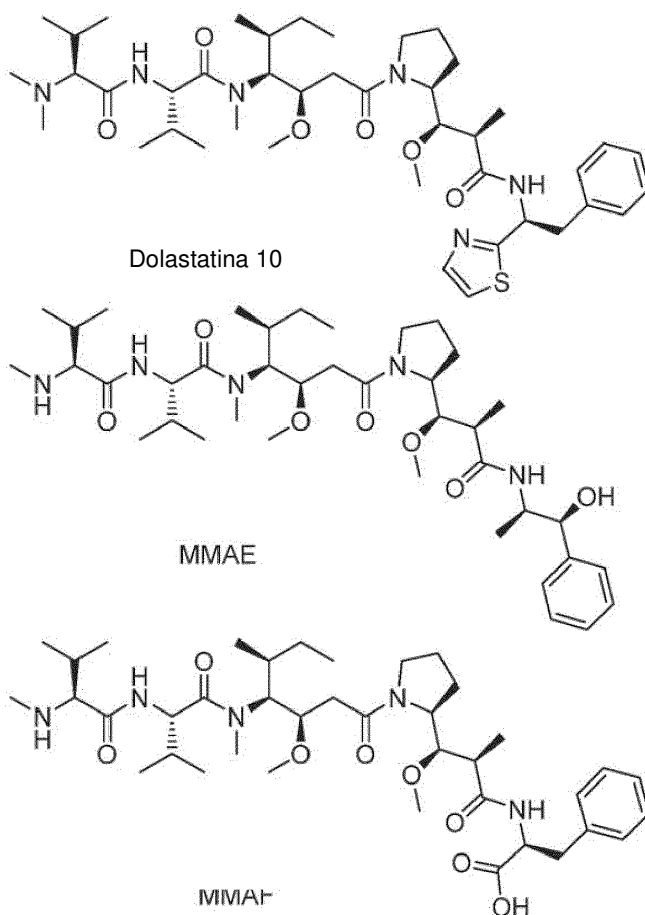
Conjugados de anticuerpo-fármaco

**Campo técnico**

La presente descripción proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco (fórmula I) que comprenden un resto derivado de dolastatina de fórmula II como el componente fármaco.

**Antecedentes**

Las dolastatinas, tales como el producto natural dolastatina 10, y sus derivados sintéticos la monometilauristatina E (MMAE) y monometilauristatina F (MMAF) son productos que muestran una potente propiedad antineoplásica e inhibidora de la tubulina. Debido a su alta toxicidad, el uso directo de dolastatinas como agentes terapéuticos no ha sido efectivo. En su lugar, se conjugaron con un anticuerpo para la administración dirigida para matar las células cancerosas.

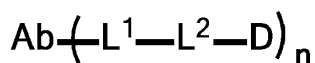


Los documentos WO2013/173392 y WO2013/173393 describen conjugados de fármacos, métodos de conjugación y usos de los mismos.

**Resumen**

Los aspectos y realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones.

La presente descripción proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la estructura de Fórmula I:



(I)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,

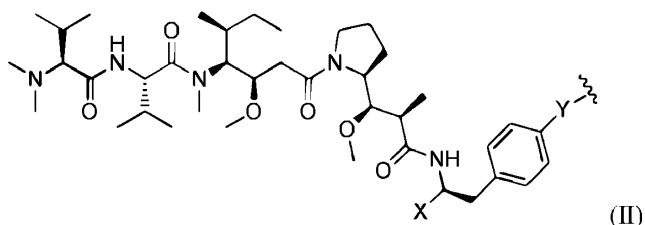
en donde:

**Ab** es un anticuerpo monoclonal

**L<sup>1</sup>** es un conector

**L<sup>2</sup>** es un ligador

**D** es un agente activo que tiene la estructura de fórmula II



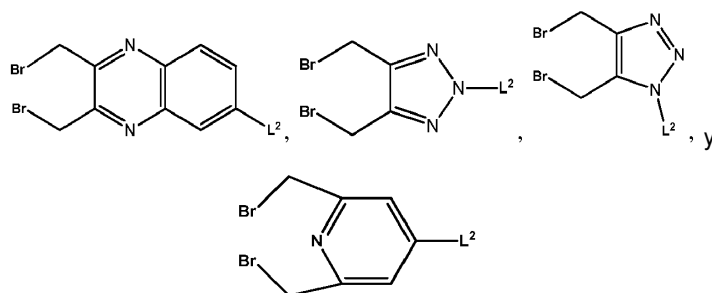
5

en donde Y es O o NH, la línea ondulada indica el punto de unión,

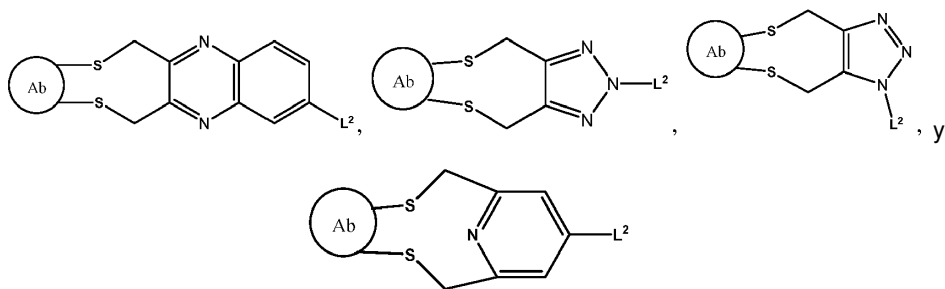
X es  $-\text{CH}_2\text{N}_3$  y

**n** es un número entero de 1-8.

10 Preferiblemente, **L<sup>2</sup>** se selecciona del grupo que consiste en un aminoácido, péptido,  $-(\text{CH}_2)_n-$ ,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ , Val-Cit (Citrulina, Val-Ala, Ala-Ala-Asn, o combinaciones de los mismos. Preferiblemente,  $-\text{L}^1-\text{L}^2$  se selecciona del grupo que consiste en

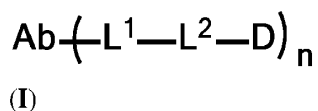


Preferiblemente,  $\text{Ab}-\text{L}^1-\text{L}^2$  se selecciona del grupo que consiste en



15

La presente descripción proporciona además un método para sintetizar un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la estructura de Fórmula I:



20 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,

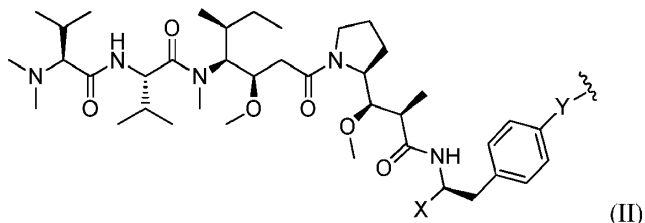
en donde:

**Ab** es un anticuerpo monoclonal

**L<sup>1</sup>** es un conector

**L<sup>2</sup>** es un ligador

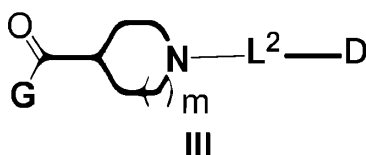
**D** es un agente activo que tiene la estructura de fórmula II



en donde Y = O o NH, la línea ondulada indica el punto de unión

X es  $-\text{CH}_2\text{N}_3$

- 5 n es un número entero de 1-8, que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula III con una Lys en un Ab



en donde **G** se selecciona del grupo que consiste en -F, -Cl, -Br, -I, -N<sub>3</sub>, -OR, SR, -ONRR,

RC(=O)O- y RSO<sub>2</sub>-O-; y

- 10 **R** es alquilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido.

m = 0 o 1.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una dosis única de conjugado 16 administrada a ratones atímicos BALB/c (n=8) por administración intravenosa.

- 15 La figura 2 muestra una dosis única de conjugado 16 administrada a ratones atímicos BALB/c (n=8) por administración intravenosa.

La Figura 3 muestra imágenes de los ratones 35 días después del tratamiento.

La Figura 4A muestra la actividad *in vitro* de ADC-23 (anticuerpo anti-Her2) en un grupo de líneas de células tumorales.

La figura 4B muestra la actividad *in vitro* de ADC-16 (anticuerpo anti-Her2) en un grupo de líneas de células tumorales.

- 20 La Figura 5 muestra la eficacia *in vivo* de ADC-65, ADC-23 y ADC-19 en varios modelos de tumores de xenoinjerto.

Las Figuras 6A y 6B muestran una dosis única de los conjugados 16 y 19 administrada a ratones atímicos BALB/c (n=8) por administración intravenosa.

#### Descripción detallada

- 25 La presente descripción proporciona compuestos y conjugados, tales como ADC (conjugados de anticuerpo-fármaco, por sus siglas en inglés *Antibody Drug Conjugates*), en los que un resto ligador que está basado en péptido tiene un punto de unión en su C terminal que reacciona con la Cys o Lys en un anticuerpo de forma controlada. Para la conjugación con Lys, por ejemplo, la DAR (relación de fármaco a anticuerpo) es 2. La DAR (relación de fármaco a anticuerpo) de la mayoría de los conjugados es 4, cuando la conjugación se producía en la Cys.

Tabla 1. Ejemplos de estructuras de restos de fármaco-ligador para la conjugación con Lys en un anticuerpo. Los compuestos 1 y 2 son compuestos de referencia.

| ID del compuesto | Estructuras |
|------------------|-------------|
| 1                |             |
| 2                |             |
| 4                |             |
| 62               |             |

5 Tabla 2. Ejemplos de estructuras de compuestos fármaco-ligador (para la conjugación con Cys) para conjugar en una región bisagra de un anticuerpo de clase IgG. Los compuestos 6-9 son compuestos de referencia.

| ID del compuesto | Estructuras |
|------------------|-------------|
| 6                |             |

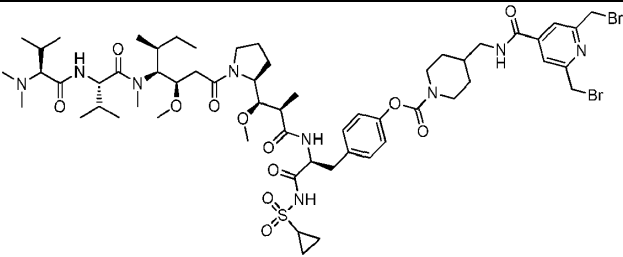
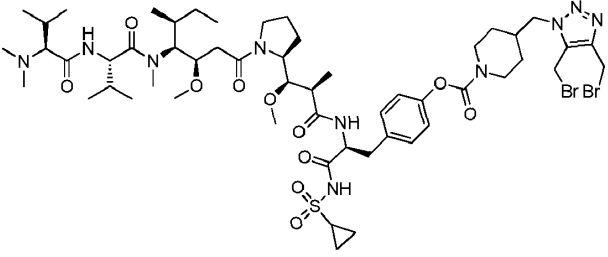
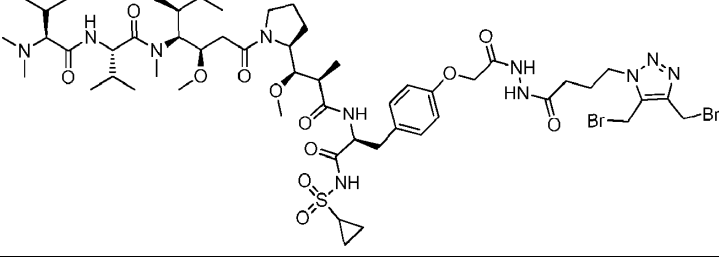
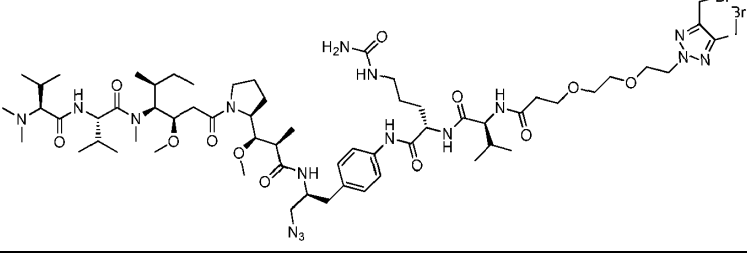
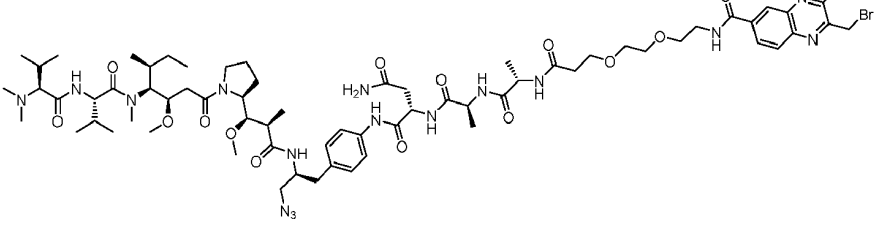
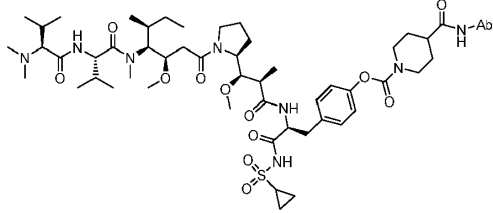
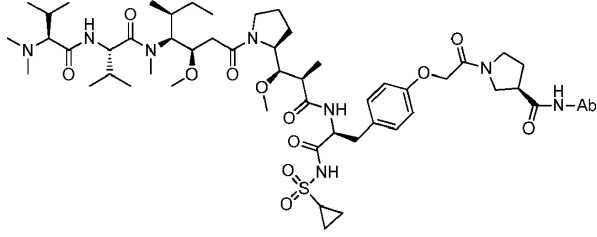
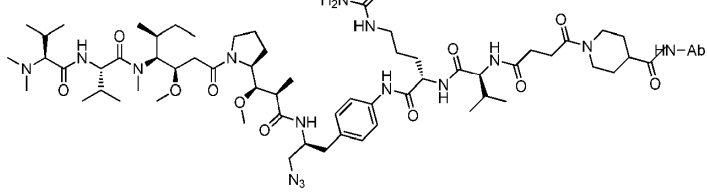
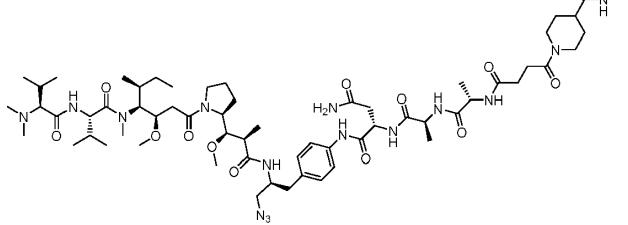
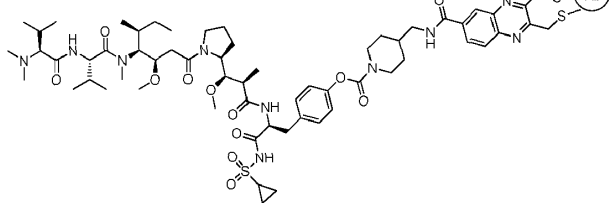
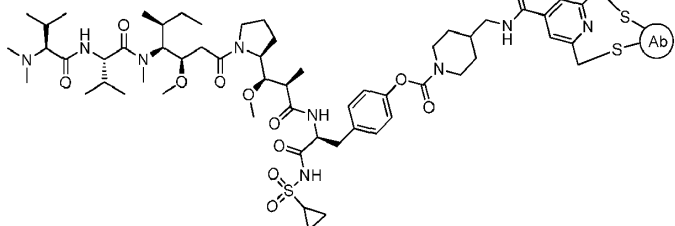
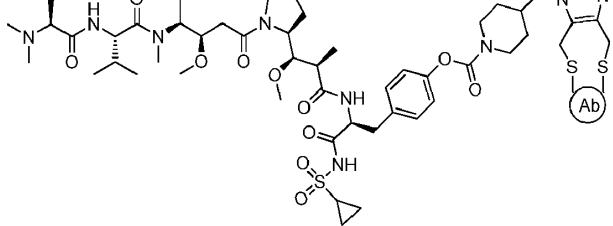
|    |                                                                                      |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 7  |    |
| 8  |    |
| 9  |   |
| 13 |  |
| 63 |  |

Tabla 3. Ejemplos de estructuras de conjugados de anticuerpo (Ab)-fármaco.

| ID del compuesto | Estructuras                                                                         |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 16               |  |

| ID del compuesto | Estructuras                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 17               |    |
| 19               |    |
| 64               |   |
| 21               |  |
| 22               |  |
| 23               |  |

| ID del compuesto | Estructuras |
|------------------|-------------|
| 24               |             |
| 28               |             |
| 65               |             |

Los conjugados 16, 17 y 21-24 de la Tabla 3 son conjugados de referencia.

#### Definiciones

Las abreviaturas se definen de la siguiente manera:

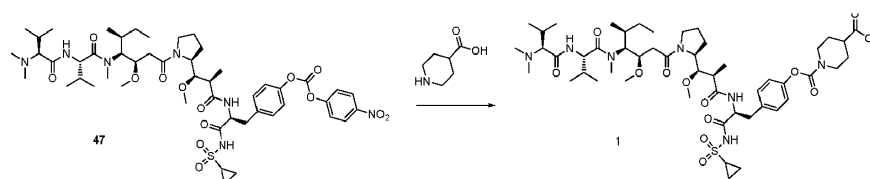
|    |           |                                                    |
|----|-----------|----------------------------------------------------|
| 5  | Ac        | Acetilo                                            |
|    | ac.       | Acuoso                                             |
|    | BOC o Boc | terc-Butoxicarbonilo                               |
|    | BrOP      | Hexafluorofosfato bromo-tris(dimetilamino)fosfonio |
|    | Bu        | n-Butilo                                           |
| 10 | °C        | Temperatura en grados centígrados                  |
|    | Cit       | Citrulina                                          |
|    | DCM       | cloruro de metileno                                |
|    | DEPC      | Cianofosfonato de dietilo                          |
|    | DIC       | Diisopropilcarbodiimida                            |
| 15 | DIEA      | Diisopropiletilamina                               |
|    | DMA       | <i>N,N'</i> -Dimetilacetamida                      |
|    | DMF       | <i>N,N'</i> -Dimetilformamida                      |
|    | EDC       | 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida        |
|    | Et        | Etilo                                              |
| 20 | EtOAc     | Acetato de etilo                                   |

|    |                                                                                                       |                                                                                      |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Eq                                                                                                    | equivalentes                                                                         |
|    | Fmoc                                                                                                  | 9-Fluorenilmetoxycarbonilo                                                           |
|    | g                                                                                                     | Gramo(s)                                                                             |
|    | h                                                                                                     | Hora (horas)                                                                         |
| 5  | HATU                                                                                                  | Hexafluorofosfato de 2-(1 <i>H</i> -7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio |
|    | HOBT                                                                                                  | N-hidroxibenzotriazol                                                                |
|    | HOSu                                                                                                  | N-hidroxisuccinimida                                                                 |
|    | HPLC                                                                                                  | Cromatografía líquida de alta resolución                                             |
|    | LC/MS                                                                                                 | Cromatografía líquida-espectrometría de masas                                        |
| 10 | Me                                                                                                    | Metilo                                                                               |
|    | MeOH                                                                                                  | Metanol                                                                              |
|    | MeCN                                                                                                  | Acetonitrilo                                                                         |
|    | ml                                                                                                    | Mililitro(s)                                                                         |
|    | MS                                                                                                    | espectrometría de masas                                                              |
| 15 | PAB                                                                                                   | p-aminobencilo                                                                       |
|    | RP-HPLC                                                                                               | HPLC de fase inversa                                                                 |
|    | Ta                                                                                                    | temperatura ambiente                                                                 |
|    | t-Bu                                                                                                  | terc-Butilo                                                                          |
|    | TEA                                                                                                   | Trietilamina                                                                         |
| 20 | Terc, t                                                                                               | terciario                                                                            |
|    | TFA                                                                                                   | Ácido trifluoroacético                                                               |
|    | THF                                                                                                   | Tetrahidrofurano                                                                     |
|    | TLC                                                                                                   | Cromatografía de capa fina                                                           |
|    | μl                                                                                                    | Microlitro(s)                                                                        |
| 25 | Procedimiento general de síntesis - Formación de un éster activado (p. ej., NHS) a partir de un ácido |                                                                                      |

Se disolvió un ácido en DCM (cloruro de metileno) y se añadió DMF (N,N'-dimetilformamida) para ayudar a la disolución si era necesario. Se añadió N-hidroxisuccinimida (1.5 eq), seguido de EDC.HCl (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (1.5 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h hasta que se consumió la mayor parte del ácido. El progreso de la reacción se controló por RP-HPLC. A continuación, la mezcla se diluyó con DCM y se lavó sucesivamente con ácido cítrico (acuoso al 10%) y salmuera. La capa orgánica se secó y se concentró a sequedad. El producto bruto se purificó opcionalmente por RP-HPLC o cromatografía en columna de gel de sílice.

#### Ejemplo de Referencia 1

#### Preparación del Compuesto 1

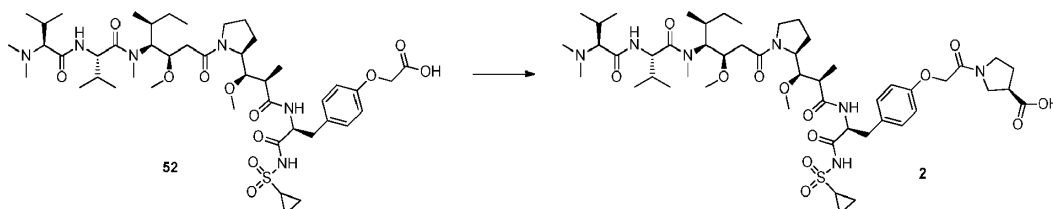


A una solución bruta del compuesto **47** (0.1 mmol) en THF (3 ml) se le añadió una solución de ácido piperidina-4-carboxílico (60 mg) en solución ac. sat. de NaHCO<sub>3</sub> (1 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30

min, luego se acidificó con solución ac. de HCl 1 N a pH = 4-5. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa para dar el compuesto **1** como un polvo blanco después de liofilización (68 mg). MS m/z 1020.7 (M+H).

#### Ejemplo de referencia 2

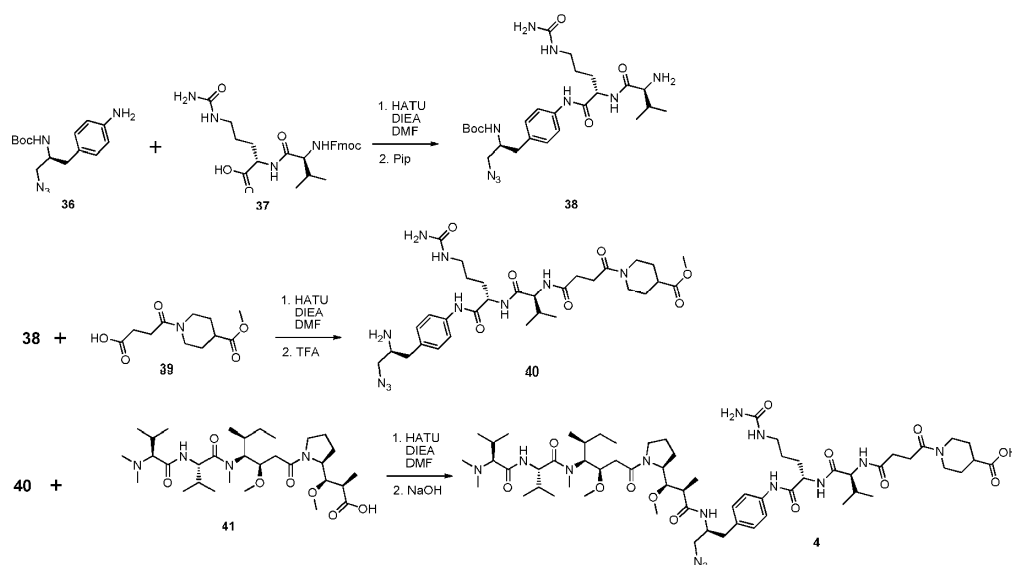
#### 5 Preparación del compuesto 2



El compuesto **52** (185 mg, 0.2 mmol) se disolvió en DCM/DMF (5/1, v/v, 5 ml). Se añadieron EDC.HCl (0.5 mmol) y HOSu (0.3 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El análisis por HPLC confirmó que se había consumido todo el compuesto **52**. La reacción se diluyó con DCM (50 ml) y se lavó con salmuera. La capa orgánica se concentró a 1 ml y se diluyó con acetonitrilo/agua (6/4, v/v, 3 ml). Se añadió una solución de ácido pirrolidina-3-carboxílico (60 mg) en solución ac. sat. de NaHCO<sub>3</sub> (1 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. La reacción se acidificó con HOAc y se concentró. El producto bruto se purificó por RP-HPLC para dar el compuesto **2** (138 mg, 68%). MS m/z 1020.6 (M+H).

#### Ejemplo 3

#### 15 Preparación del compuesto 4



#### Preparación del compuesto 38:

Al compuesto **37** (261 mg, 0.52 mmol) en 6 ml de DMF se le añadieron HATU (217 mg, 0.57 mmol), DIEA (362 µl, 2.08 mmol) y la amina **36** (213 mg, 0.52 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min, luego se añadieron 400 µl de piperidina y se agitó durante 10 min. La mezcla se evaporó y se purificó por HPLC para dar el compuesto **38** (171 mg, 60%). MS m/z 548.3 (M+H).

#### Preparación del compuesto 40:

Al compuesto **39** (37 mg, 0.15 mmol) en 4 ml de DMF se le añadieron HATU (59 mg, 0.15 mmol), DIEA (108 µl, 0.6 mmol) y la amina **38** (102 mg, 0.15 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min y luego se evaporó hasta sequedad. El residuo se disolvió en 2 ml de DCM, luego se añadió 1 ml de TFA y se agitó durante 10 min. La mezcla se evaporó y se purificó por HPLC para dar el compuesto **40** (94 mg, 78%). MS m/z 673.4 (M+H).

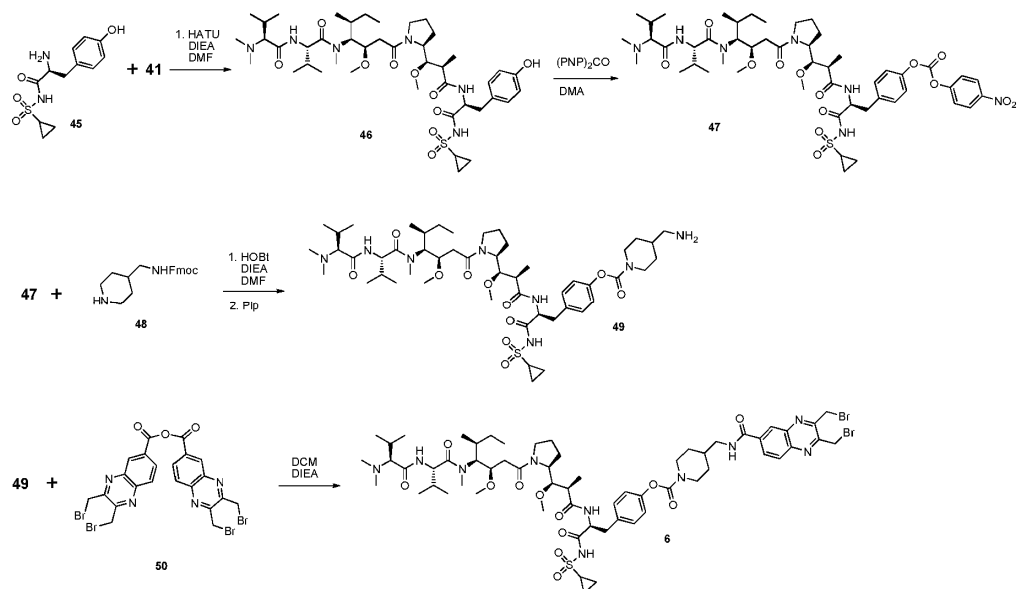
#### Preparación del compuesto 4:

Al compuesto **41** (85 mg, 0.12 mmol) en 2 ml de DMF se le añadieron HATU (48 mg, 0.12 mmol), DIEA (83 µl, 0.48 mmol) y la amina **40** (94 mg, 0.12 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min, luego se añadió una solución de 90 mg

de NaOH en 1 ml de agua y se agitó durante 30 min. La mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **4** (86 mg, 58%). MS m/z 1239.7 (M+H).

Ejemplo de referencia 4

Preparación del compuesto **6**



5

Preparación del compuesto **46**:

Al compuesto **41** (1000 mg, 1.67 mmol) en 20 ml de DMF se le añadieron HATU (640 mg, 1.68 mmol), DIEA (870  $\mu$ l, 5.00 mmol) y la amina **45** (535 mg, 1.67 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min, luego se evaporó y se purificó por HPLC para dar el compuesto **46** (1140 mg, 70%). MS m/z 865.5 (M+H).

10 Preparación del compuesto **47**:

Al compuesto **46** (500 mg, 0.57 mmol) en 10 ml de DMA se le añadieron carbonato de bis(p-nitrofenilo) (210 mg, 0.69 mmol) y DIEA (35  $\mu$ l, 0.2 mmol). La mezcla se agitó durante 18 h, luego se añadieron 100 ml de éter y el precipitado se recogió por filtración para dar el compuesto **47** (500 mg, 85%). MS m/z 1030.6 (M+H).

Preparación del compuesto **49**:

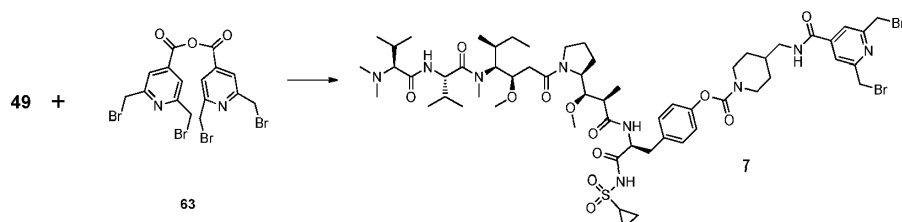
15 Al compuesto **47** (125 mg, 0.12 mmol) en 4 ml de DMF se le añadieron HOBt (7 mg, 0.05 mmol), DIEA (21  $\mu$ l, 0.12 mmol) y la amina **48** (40 mg, 0.12 milimoles). La mezcla se agitó durante 16 h, luego se añadieron 200  $\mu$ l de piperidina y se agitó durante 10 min. La mezcla se evaporó y purificó por HPLC para dar el compuesto **49** (72 mg, 60%). MS m/z 1005.6 (M+H).

Preparación del compuesto **6**:

20 Al compuesto **49** (30 mg, 0.027 mmol) en 2 ml de DCM se le añadieron DIEA (15  $\mu$ l, 0.086 mmol), DIEA (50  $\mu$ l, 0.288 mmol) y el anhídrido **50** (19 mg, 0.027 milimoles). La mezcla se agitó durante 30 min, luego se evaporó y se purificó por HPLC para dar el compuesto **6** (32 mg, 88%). MS m/z 1347.5 (M+H).

Ejemplo de referencia 5

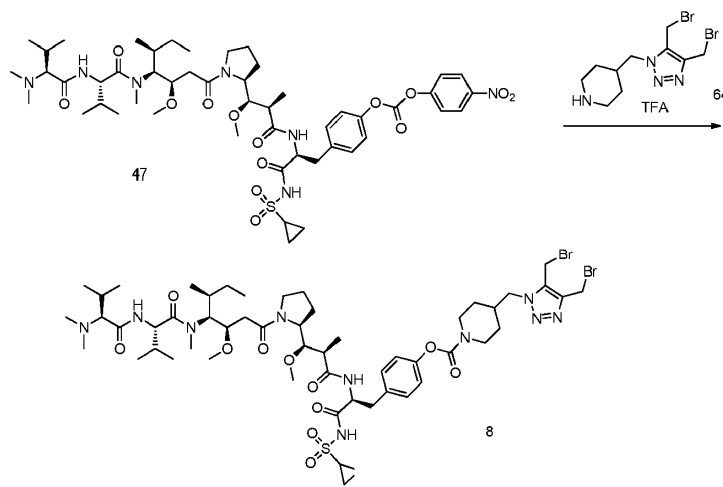
Preparación del compuesto **7**.



25

El compuesto **7** se sintetizó a partir del compuesto **49** (0.1 mmol) y el anhídrido **63** (0.1 mmol) como se describe para

la síntesis del compuesto **6**. Rendimiento: 79%. MS m/z 1296.8 (M+H).



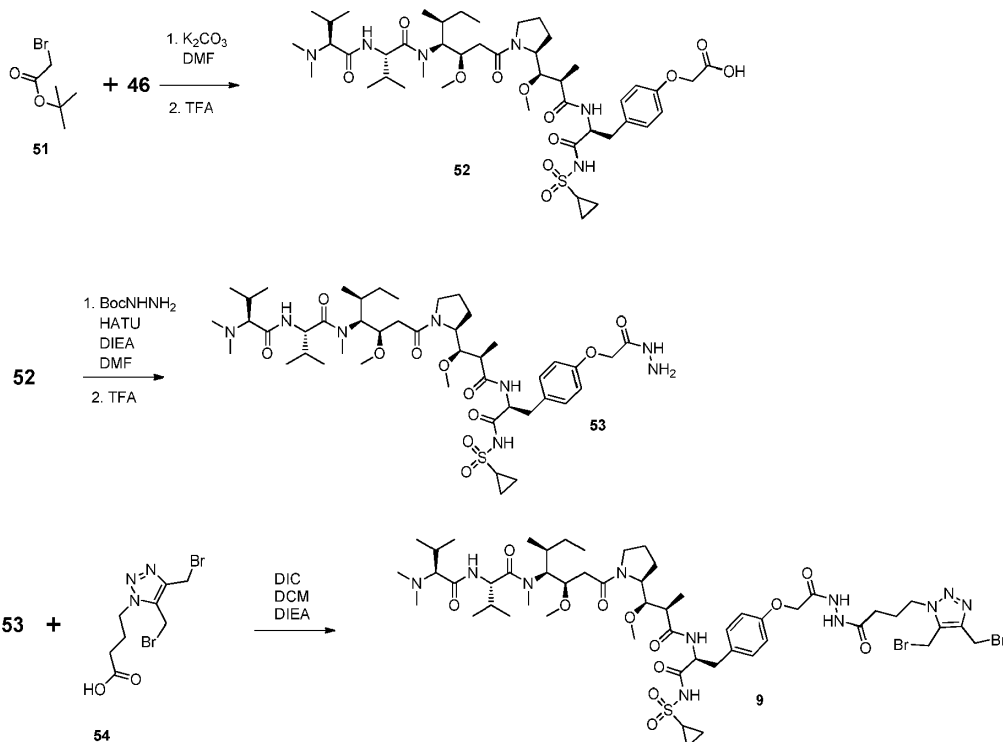
Ejemplo de referencia 6

Preparación del compuesto **8**.

- 5 A una solución de compuesto **47** (0.1 mmol) en THF (3 ml) se añadió una solución del compuesto **64** (0.15 mmol, 67 mg) en acetonitrilo/agua (1/1, v/v, 1 ml), seguido de DIEA (50  $\mu$ l). Después de 30 min, la reacción se acidificó y se concentró. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa para dar el compuesto **8** como un sólido blanco (87 mg). MS m/z 1243.6 [M+H]<sup>+</sup>.

Ejemplo de referencia 7

- 10 Preparación del compuesto **9**.



Preparación del compuesto **52**:

- 15 Al compuesto **46** (120 mg, 0.12 mmol) en 3 ml de DMF se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (118 mg, 0.85 mmol) y el bromoacetato **51** (35 mg, 0.18 milimoles). La mezcla se agitó durante 16 horas y luego se evaporó. El residuo se disolvió en 2 ml de DCM, se filtró y se añadieron 2 ml de TFA. Después de 20 min, la mezcla se evaporó y se purificó por HPLC para dar el compuesto **52** (92 mg, 83%). MS m/z 923.5 (M+H).

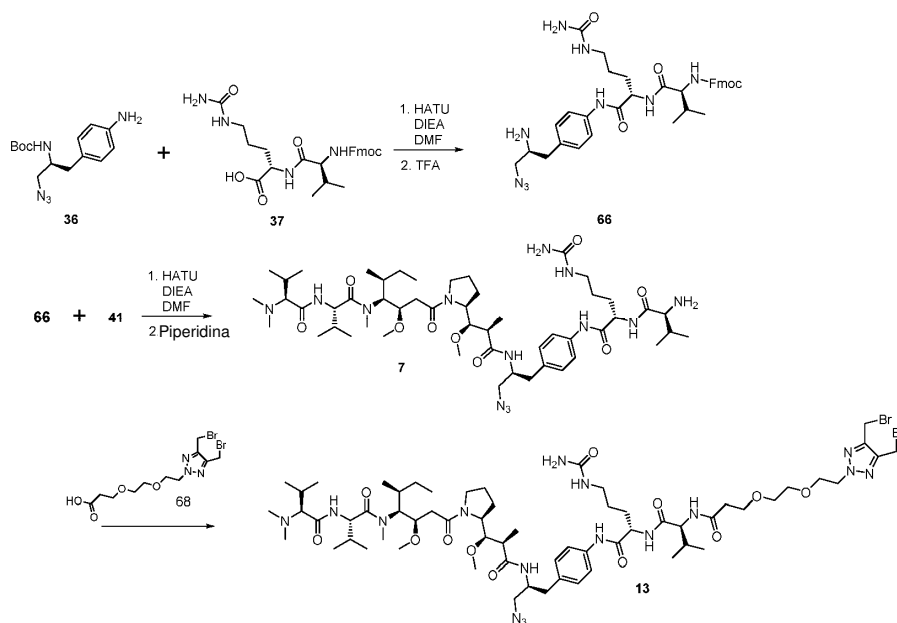
Preparación del compuesto **53**:

Al compuesto **52** (92 mg, 0,1 mmol) en 2 ml de DMF, se añadieron HATU (38 mg, 0.1 mmol), DIEA (70  $\mu$ l, 0.4 mmol) y boc-hidrazina (15 mg, 0.12 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min y luego se evaporó hasta sequedad. El residuo se disolvió en 2 ml de DCM, luego se añadió 1 ml de TFA y se agitó durante 10 min. La mezcla se evaporó y purificó por HPLC para dar el compuesto **53** (82 mg, 78%). MS m/z 937.5 (M+H).

Preparación del compuesto **9**:

Al compuesto **54** (53 mg, 0.156 mmol) en 2 ml de DCM, se añadió DIC (10 mg, 0.078 mmol) y se agitó durante 10 min. Luego se añadieron DIEA (54  $\mu$ l, 0.312 mmol) y la amina **53** (82 mg, 0.078 mmol) y la mezcla se agitó durante 15 min. La mezcla se evaporó y purificó por HPLC para dar el compuesto **9** (62 mg, 63%). MS m/z 1260.5 (M+H).

## Ejemplo 8

Preparación del compuesto **13**

Al compuesto **37** (130 mg, 0.26 mmol) en 3 ml de DMF, se añadieron HATU (110 mg, 0.29 mmol), DIEA (175  $\mu$ l, 1 mmol) y la amina **36** (110 mg, 0.27 milimoles). La mezcla se agitó durante 30 min y luego se concentró hasta sequedad. A continuación, el residuo se trató con TFA/DCM (1/4, v/v, 5 ml) durante 30 min. La mezcla se evaporó y purificó por HPLC para dar el compuesto **66** (108 mg, 65%). MS m/z 670.5 (M+H).

Al compuesto **41** (85 mg, 0.12 mmol) en 2 ml de DMF, se añadieron HATU (48 mg, 0.12 mmol), DIEA (83  $\mu$ l, 0.48 mmol) y la amina **66** (94 mg, 0.12 milimoles). La mezcla se agitó durante 30 min, luego se añadió piperidina (0.2 ml) y se agitó durante 30 min. La mezcla se concentró y purificó por HPLC para dar el compuesto **67** (87 mg, 63%). MS m/z 1028.7 (M+H).

A una solución del compuesto **67** (57 mg, 0.05 mmol) y el ácido **68** (22 mg) en DCM/DMF (3/1, v/v, 4 ml) se añadieron PyBrOP (0.055 mmol) y DIEA (35  $\mu$ l). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y luego se concentró hasta aproximadamente 2 ml. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa para dar el compuesto **13** (41 mg). MS m/z 1425.7 (M+H).

## Ejemplo 9.

Este ejemplo proporciona los resultados de los ensayos de EC50 de los anticuerpos conjugados con fármacos designados medidos *in vitro* en las células especificadas. El anticuerpo utilizado era un anticuerpo de clase IgG anti-HER2.

| ID del conjugado | SBKR3<br>(Her2+++) | HCC1954<br>(Her2+++) | SKOV-3<br>(Her2+++) | BT474<br>(Her2+++) | MDA-MB-453<br>(Her2 ++) | MDA-MB-175<br>(Her2+) | MDA-MB-361<br>(Her2+++) |
|------------------|--------------------|----------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| CE50 [nM]        |                    |                      |                     |                    |                         |                       |                         |
| 16               | 0.040              | 0.138                | 0.405               | 0.423              | 1.195                   | 3.635                 |                         |

|    |         |         |       |       |       |        |         |
|----|---------|---------|-------|-------|-------|--------|---------|
| 17 | 0.106   | 0.237   | 0.334 | 0.623 | 26.42 | 20.08  |         |
| 19 | 0.156   | 0.193   | 0.340 | 0.232 | 3.946 |        | 0.640   |
| 21 | 0.3432  | 0.1788  |       | 1.065 |       | 0.4904 | 0.1326  |
| 22 | 0.06349 | 0.04926 |       | 0.346 | 0.137 | 0.2628 | 0.04987 |
| 23 | 0.04644 | 0.03678 |       | 0.345 | 0.118 | 0.2095 | 0.04657 |
| 65 | 0.158   | 0.117   |       | 0.100 | 4.762 |        |         |

#### Ejemplo de referencia 10

5 Este ejemplo muestra la eficacia *in vivo* del ADC 16 (un conjugado de anticuerpo anti-Her2) en un modelo de xenoinjerto subcutáneo N87. La figura 1 muestra una dosis única de conjugado 16 administrada a ratones atímicos BALB/c por administración intravenosa. Había 8 ratones en cada grupo y se estudiaron un total de 6 grupos de ratones: a 3 grupos se les inyectó T-DM1 (conjugado de trastuzumab - DM1) en diferentes dosis; a 2 grupos se les inyectó ADC 16 en diferentes dosis; y a uno control de vehículo. Todos los fármacos se administraron de la misma manera (dosis única). Una sola dosis de ADC-16 iv de 1 mg/kg o 3 mg/kg superó a T-DM1 de 3 mg/kg o 10 mg/kg respectivamente. 3 mg/kg de ADC-16 inhibieron completamente el crecimiento tumoral hasta 100 días.

#### 10 Ejemplo de referencia 11

15 Este ejemplo muestra la seguridad *in vivo* del ADC 16 (un conjugado de anticuerpo anti-Her2) en un modelo de xenoinjerto subcutáneo N87. La figura 2 muestra una dosis única de conjugado 16 administrada a ratones atímicos BALB/c por administración intravenosa. Había 8 ratones en cada grupo y se estudiaron un total de 7 grupos de ratones: a 3 grupos se les inyectó T-DM1 (conjugado de trastuzumab - DM1) en diferentes dosis; a 3 grupos se les inyectó ADC 16 en diferentes dosis; y a uno control de vehículo. Todos los fármacos se administraron de la misma manera (dosis única). Una sola dosis de ADC-16 iv de 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg no retrasó el aumento de peso corporal. La diferencia de los pesos corporales entre los grupos de T-DM1 y ADC-16 se debía a la diferencia de peso del tumor. La Figura 3 muestra imágenes de los ratones 35 días después del tratamiento.

#### Ejemplo de referencia 12

20 Este ejemplo (Figura 4A) muestra que ADC-23 induce una actividad antiproliferativa equivalente o más fuerte en líneas celulares de cáncer de mama, en comparación con los conjugados de MMAE. En estos estudios, todas las células se trataron con conjugados ADC-23 o de MMAE durante 3 días. La IC50 se determina como la concentración que mostraba inhibición de 50% del crecimiento celular.

#### Ejemplo de referencia 13

25 Este ejemplo (Figura 4B) muestra que ADC-16 induce una actividad antiproliferativa equivalente o más fuerte en líneas celulares de cáncer de mama, en comparación con los conjugados de MMAE. En los estudios anteriores, todas las células se trataron con conjugados ADC-16 o de MMAE durante 3 días. La IC50 se determina como la concentración que mostraba inhibición de 50% del crecimiento celular.

#### Ejemplo 14

30 Este ejemplo (Figura 5) muestra la eficacia *in vivo* de ADC-65, ADC-23 y ADC-19 en ratones atímicos con xenoinjerto de LoVo (colon), MDA-MB-468 (mama), BxPC-3 (pancreático), PA-1 (ovárico) y NSCLC H1975. Todos los ADC se administraron como dosis única por vía iv en las concentraciones indicadas. Los ADC ensayados superaron la MMAF en la mayoría de los casos al mismo nivel e inhibieron completamente el crecimiento tumoral con una sola dosis.

#### Ejemplo 15

35 Este ejemplo muestra la seguridad y eficacia *in vivo* de ADC 19 (un conjugado de anticuerpo anti-Her2) en un modelo de xenoinjerto subcutáneo N87. Las Figuras 6A y 6B muestran una dosis única de conjugado 19 administrada a ratones atímicos BALB/c por administración intravenosa. Había 8 ratones en cada grupo y se estudiaron un total de 3 grupos de ratones: a 1 grupo de ratones se le inyectó ADC 16; a 1 grupo de ratones se les inyectó ADC 19; y a uno control de vehículo. Todos los fármacos se administraron de la misma manera (dosis única). Una sola dosis de ADC-19 iv de 2 mg/kg era comparable a la de ADC-16 en la misma dosis e inhibía completamente el crecimiento tumoral hasta 49 días y no retrasó el aumento de peso corporal que fue comparable a ADC-16.

#### Ejemplo 16

Este ejemplo muestra el procedimiento general de conjugación para sintetizar los conjugados de anticuerpo-fármaco

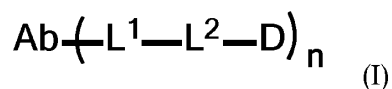
- 16, 17, 19 y 64. A una solución de 0.5-50 mg/ml de anticuerpo en tampón a pH 6.0-9.0 con 0-30% de disolvente orgánico, se añadieron 0.1-10 eq de conjugado de fármaco-ligador activado (1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 62) en forma de flujo continuo o en porciones. La reacción se llevó a cabo a 0-40°C durante 0.5-50 horas agitando o removiendo suavemente, vigilada por HIC-HPLC. El producto ADC bruto resultante se sometió a las etapas posteriores necesarias de desalinización, cambios de tampón/formulación y, opcionalmente, purificación, utilizando los procedimientos del estado de la técnica. El producto ADC se caracterizó por HIC-HPLC, SEC, RP-HPLC y, opcionalmente, LC-MS.

#### Ejemplo 17

- Este ejemplo muestra un procedimiento de conjugación general para sintetizar los conjugados de anticuerpo-fármaco 21, 22, 23, 24, 28 y 65. A una solución de anticuerpo, 0.5-50 mg/ml, en un determinado tampón a pH 5.0-9.0, tal como PBS, se añadieron 0.5-100 eq de agente reductor tal como TCEP y DTT. La reducción se llevó a cabo a 0-40°C durante 0.5-40 horas agitando o removiendo suavemente y luego se eliminó el agente reductor por columna o ultrafiltración. Al anticuerpo reducido, 0.5-50 mg/ml, en un determinado tampón a pH 5.0-9.0, tal como PBS, con 0-30% de codisolvente orgánico tal como DMA, se añadieron 0.5-10 eq del reaccionante fármaco-ligador (seleccionado del compuesto 6-15 o 63). La reacción se llevó a cabo a 0-40°C durante 0.5-40 horas agitando o removiendo suavemente, vigilada por HIC-HPLC. El producto ADC bruto resultante se sometió a las etapas posteriores necesarias de desalinización, cambios de tampón/formulación y, opcionalmente, purificación, utilizando los procedimientos del estado de la técnica. El producto ADC final se caracterizó por HIC-HPLC, SEC, RP-HPLC y, opcionalmente, LC-MS.

## REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

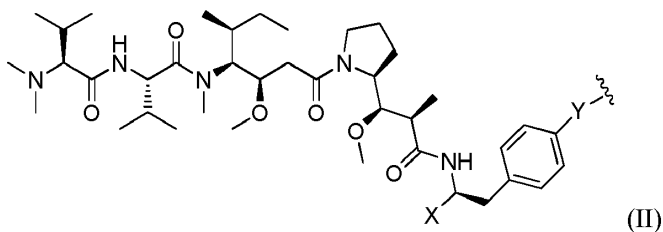
- 5 en donde:

**Ab** es un anticuerpo monoclonal;

**L<sup>1</sup>** es un conector;

**L<sup>2</sup>** es un ligador;

**D** es un agente activo que tiene la estructura de Fórmula II:

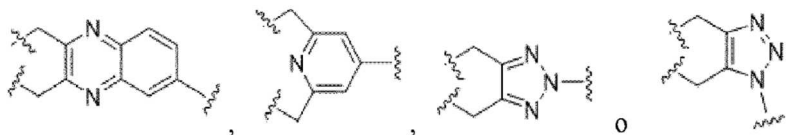


en donde Y es O o NH,

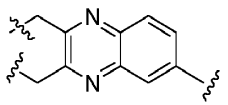
X es CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub> y

**n** es un número entero de 1-8.

2. El ADC de la reivindicación 1, en donde L<sup>1</sup> es:



3. El ADC de la reivindicación 1, en donde L<sup>1</sup> es

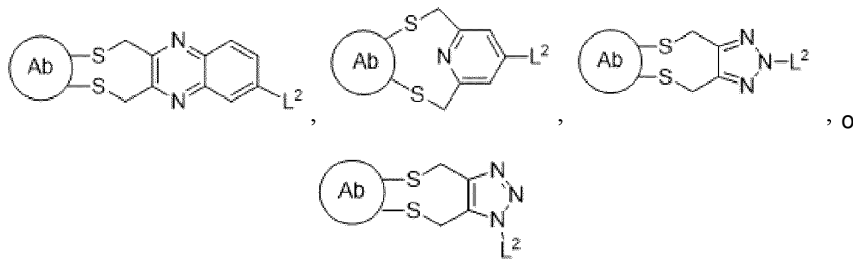


4. El ADC de la reivindicación 1, en donde Y es NH.

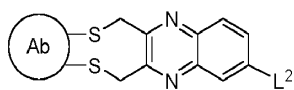
5. El ADC de la reivindicación 1, en donde Y es O.

6. El ADC de la reivindicación 1, en donde L<sup>2</sup> es un ligador seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido, un péptido, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-, Val-Cit, Val-Ala, Ala-Ala-Asn, o combinaciones de los mismos.

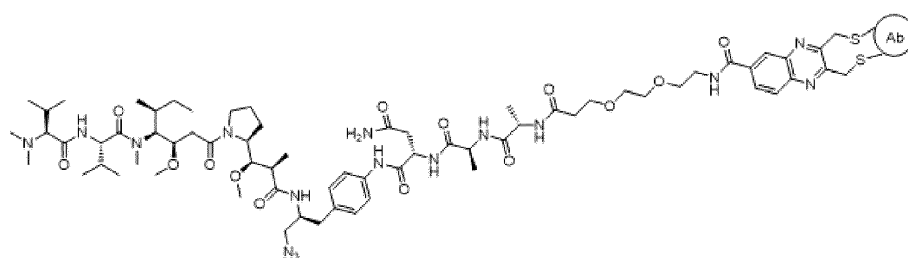
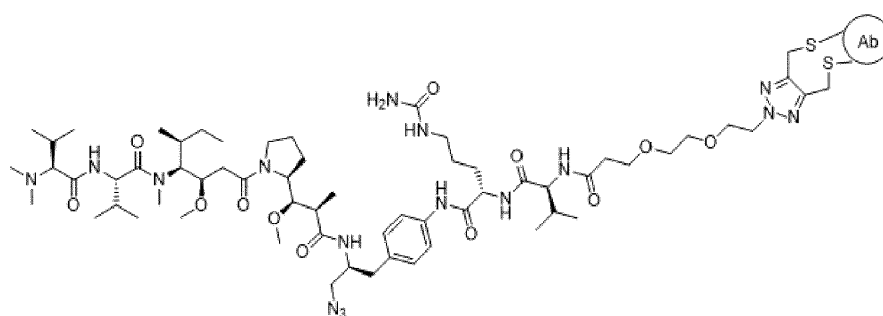
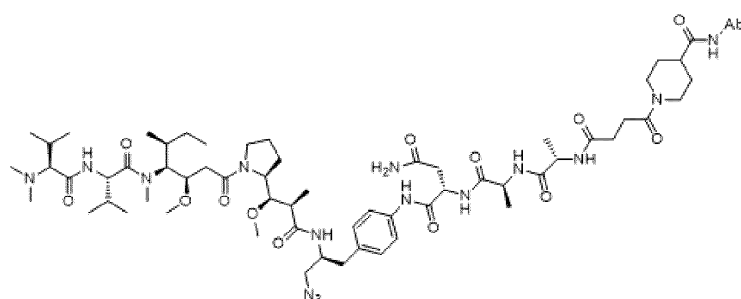
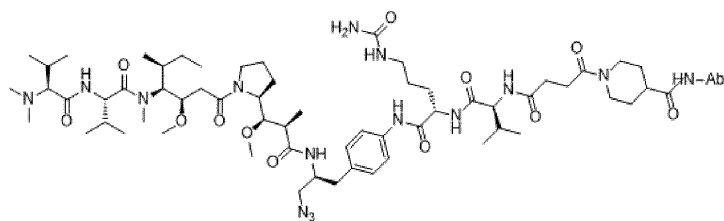
7. El ADC de la reivindicación 1, en donde -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>, considerado junto con el Ab, es:



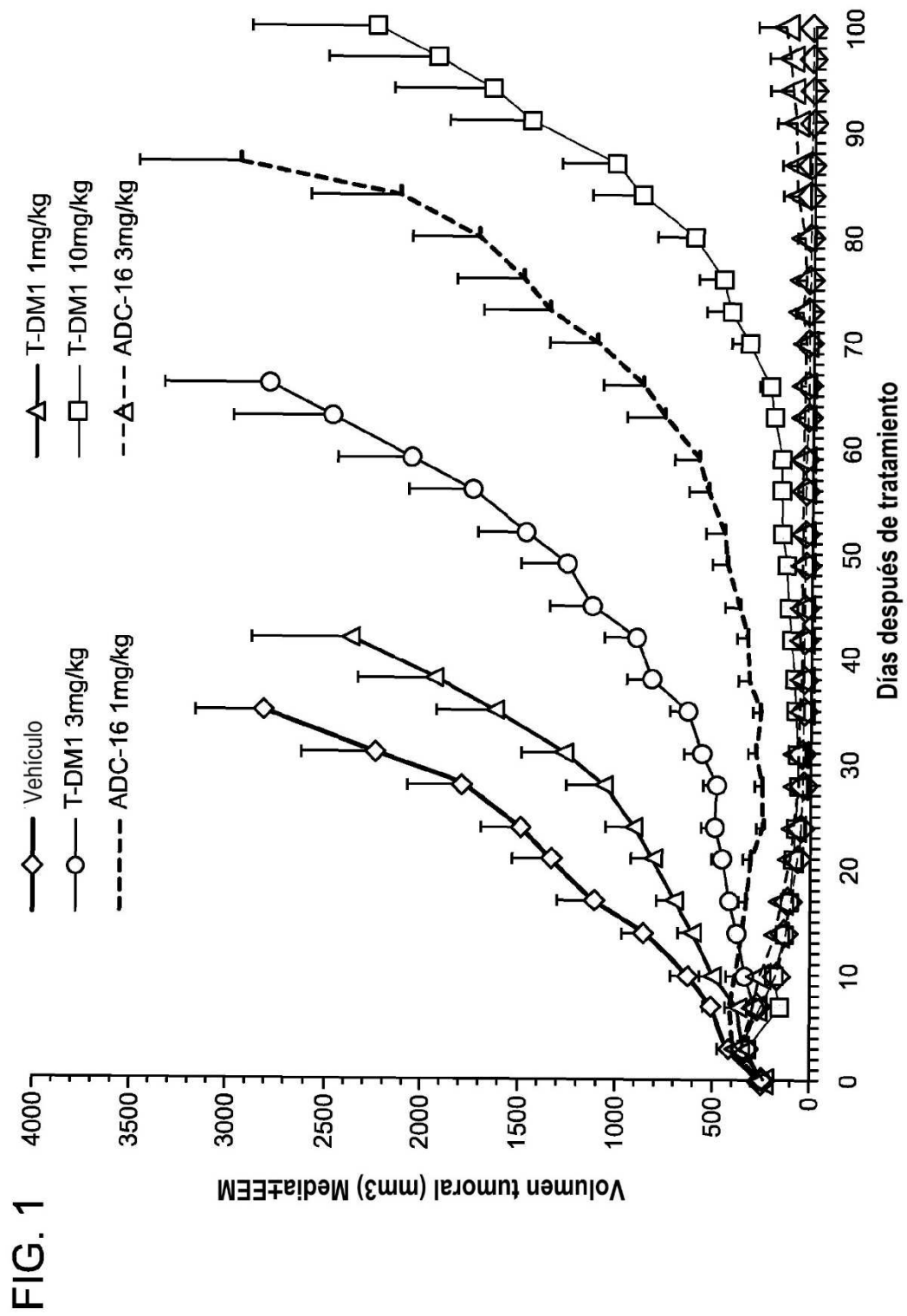
8. El ADC de la reivindicación 7, en donde  $-L^1-L^2$ , tomado junto con el Ab, es

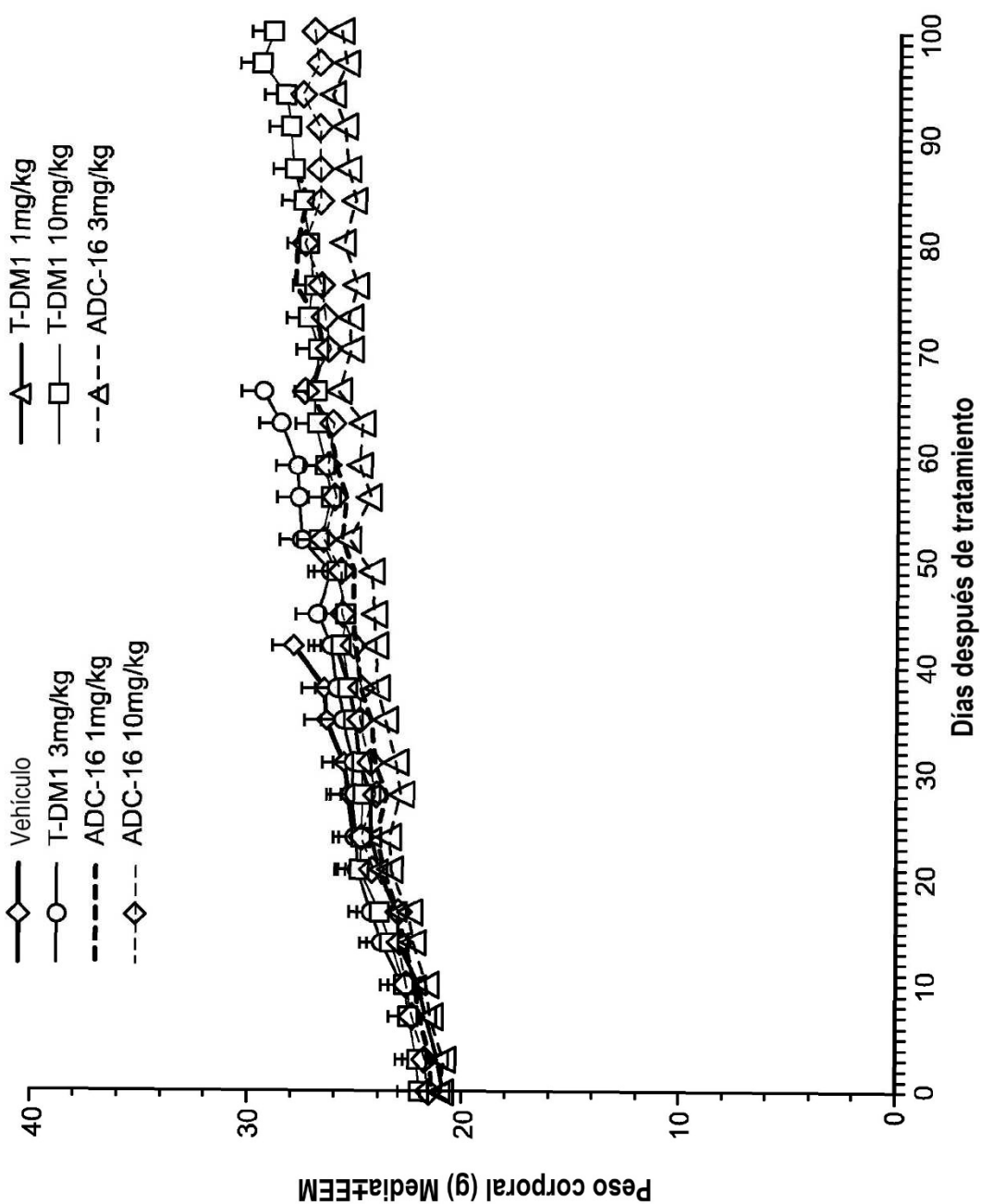


9. El ADC de la reivindicación 1, que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:



y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

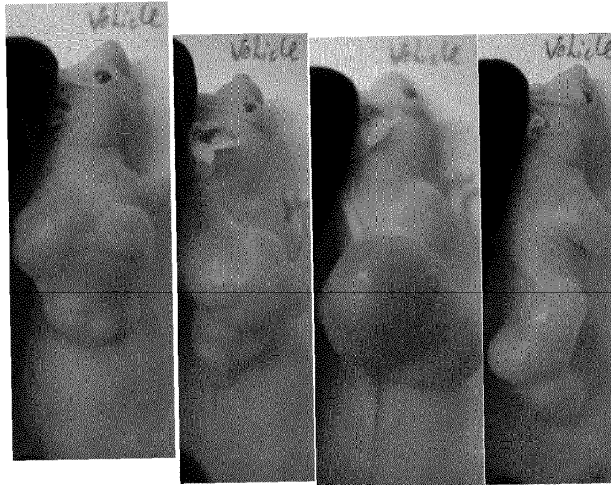




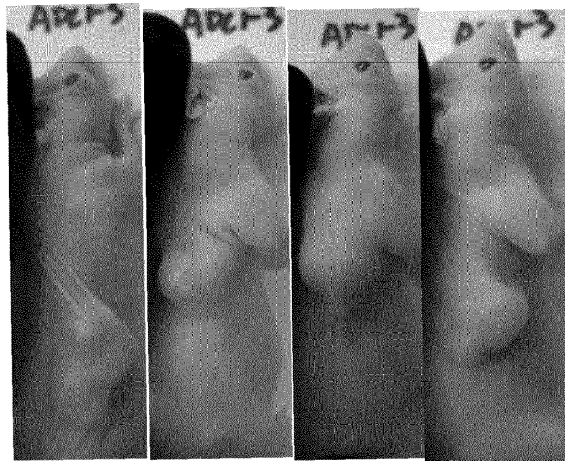
**FIG. 3**

Vehiculo

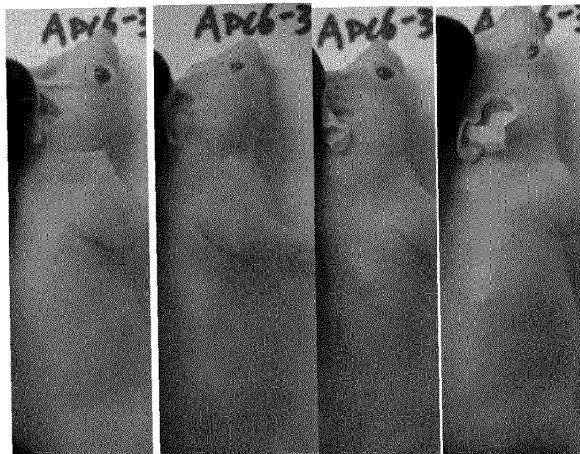
Vehicle



T-DM1, 3mg/kg



ADC 16, 3 mg/kg



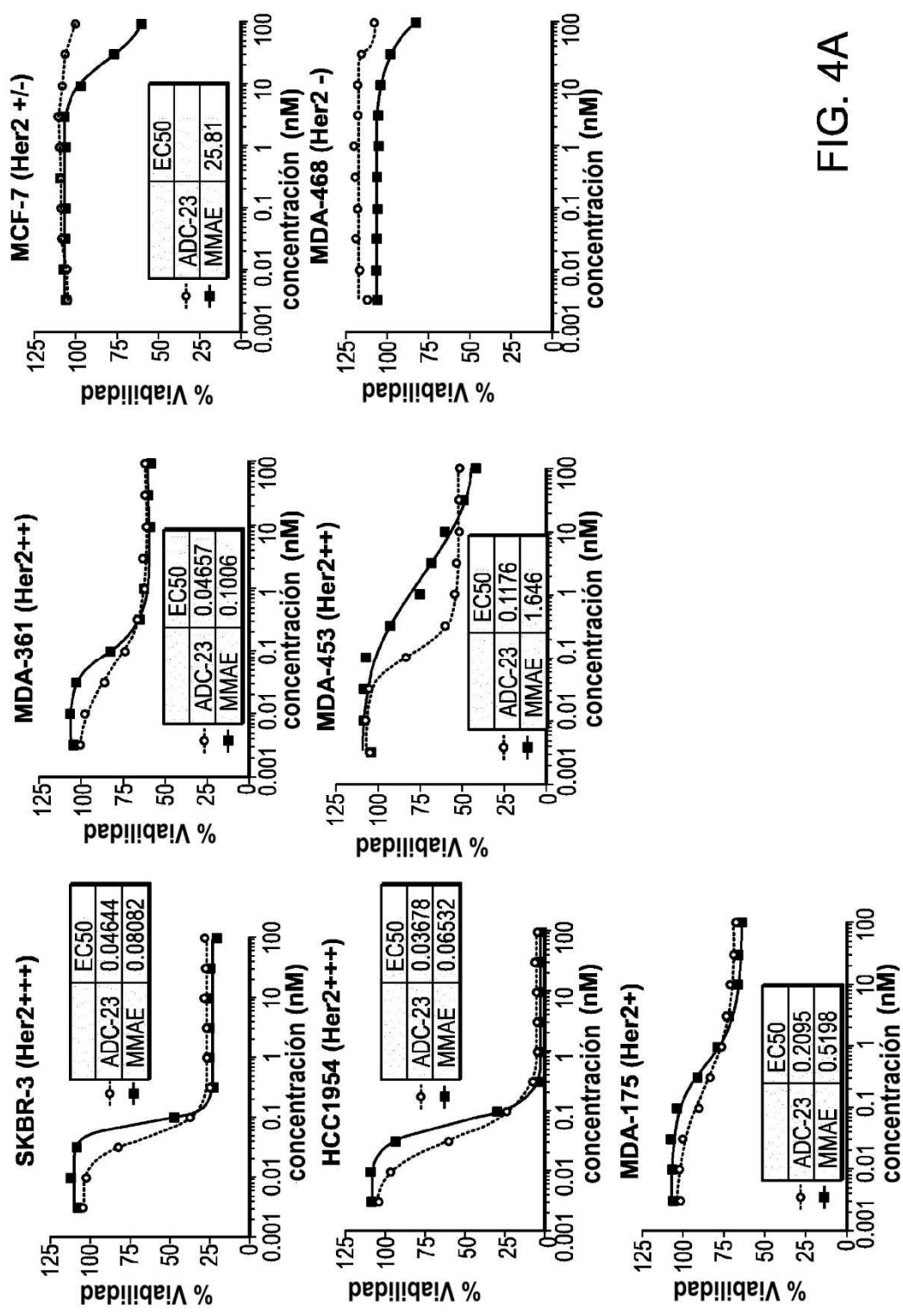


FIG. 4A

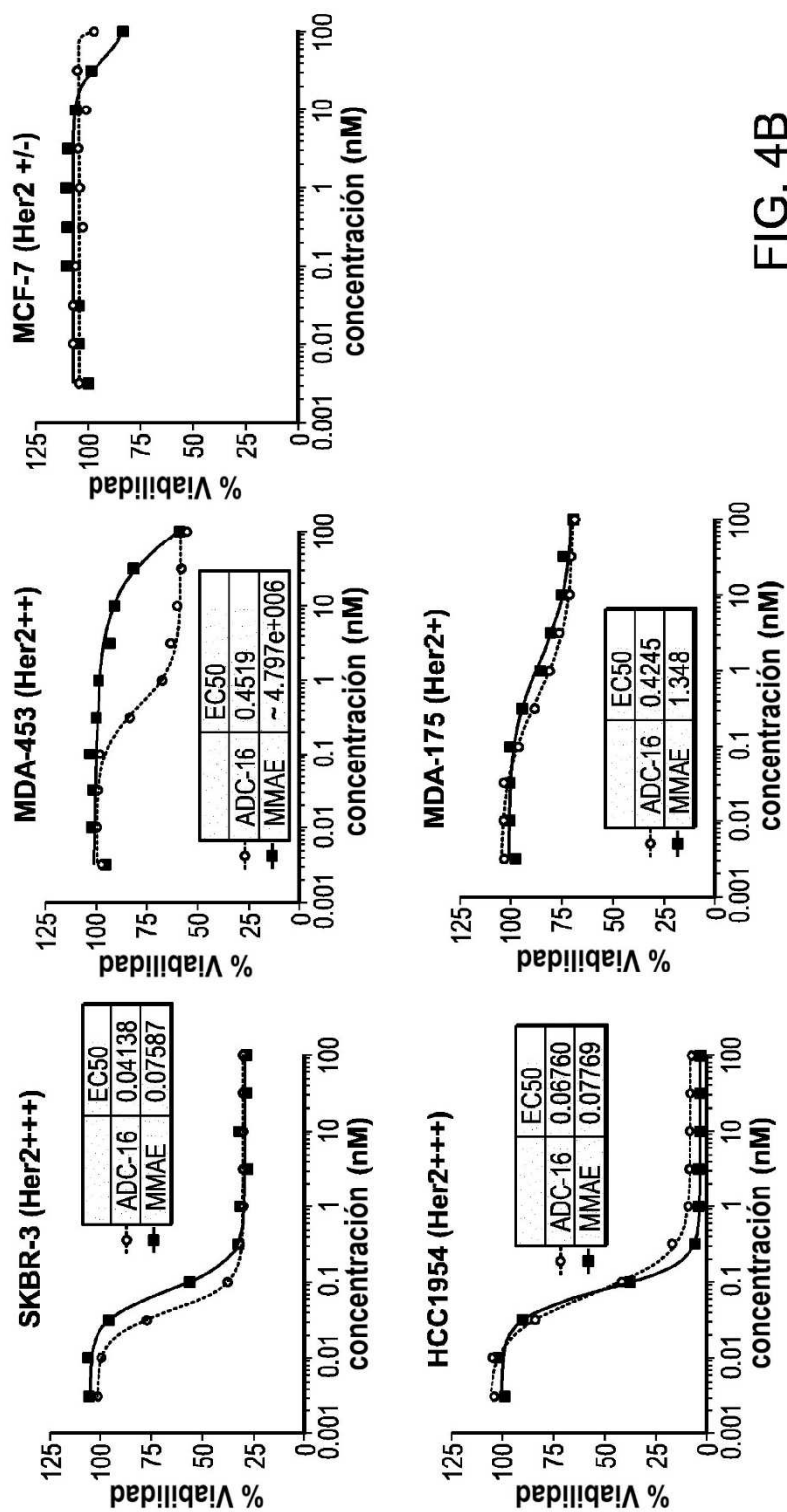


FIG. 4B

FIG. 5

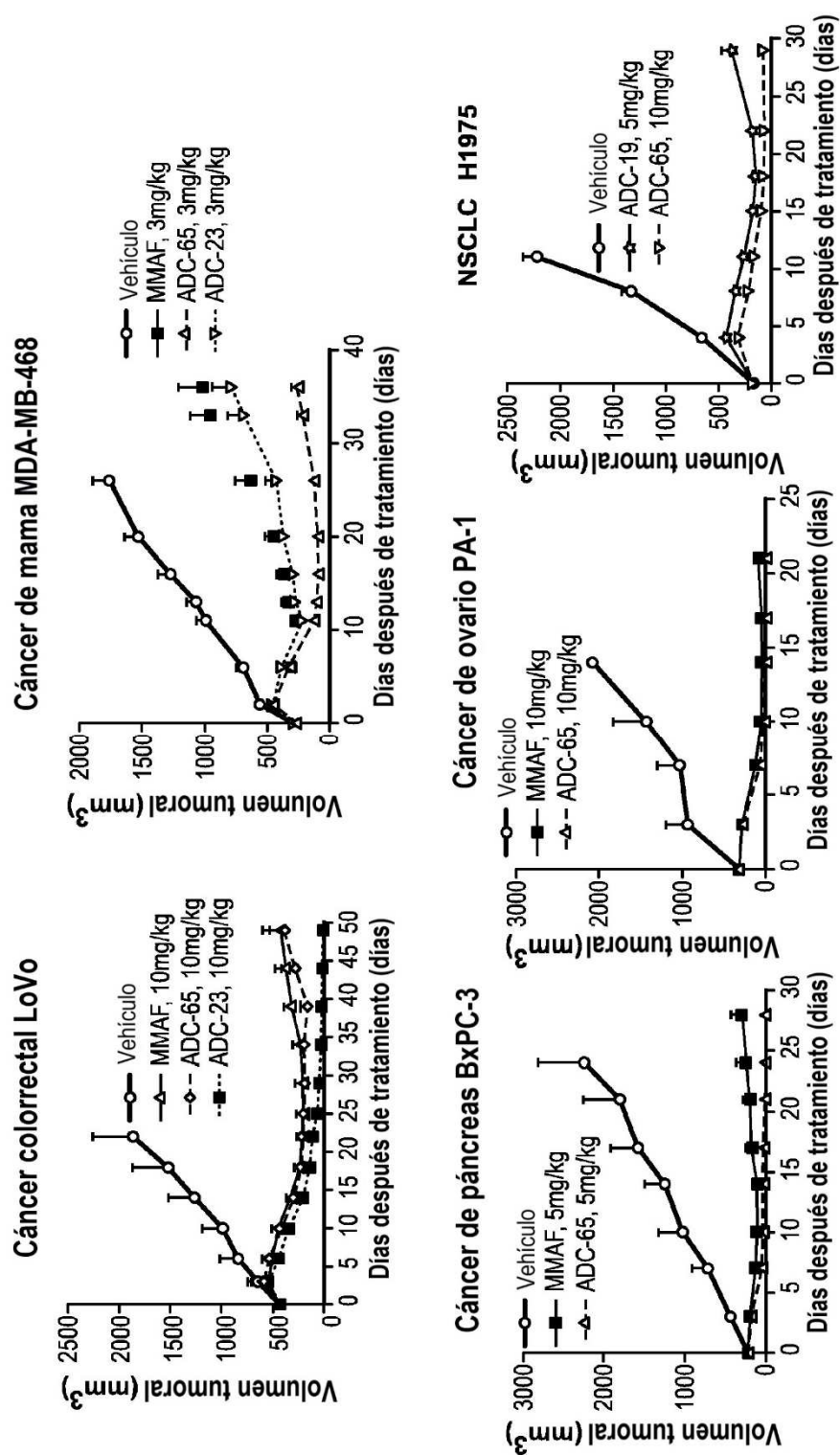


FIG. 6A

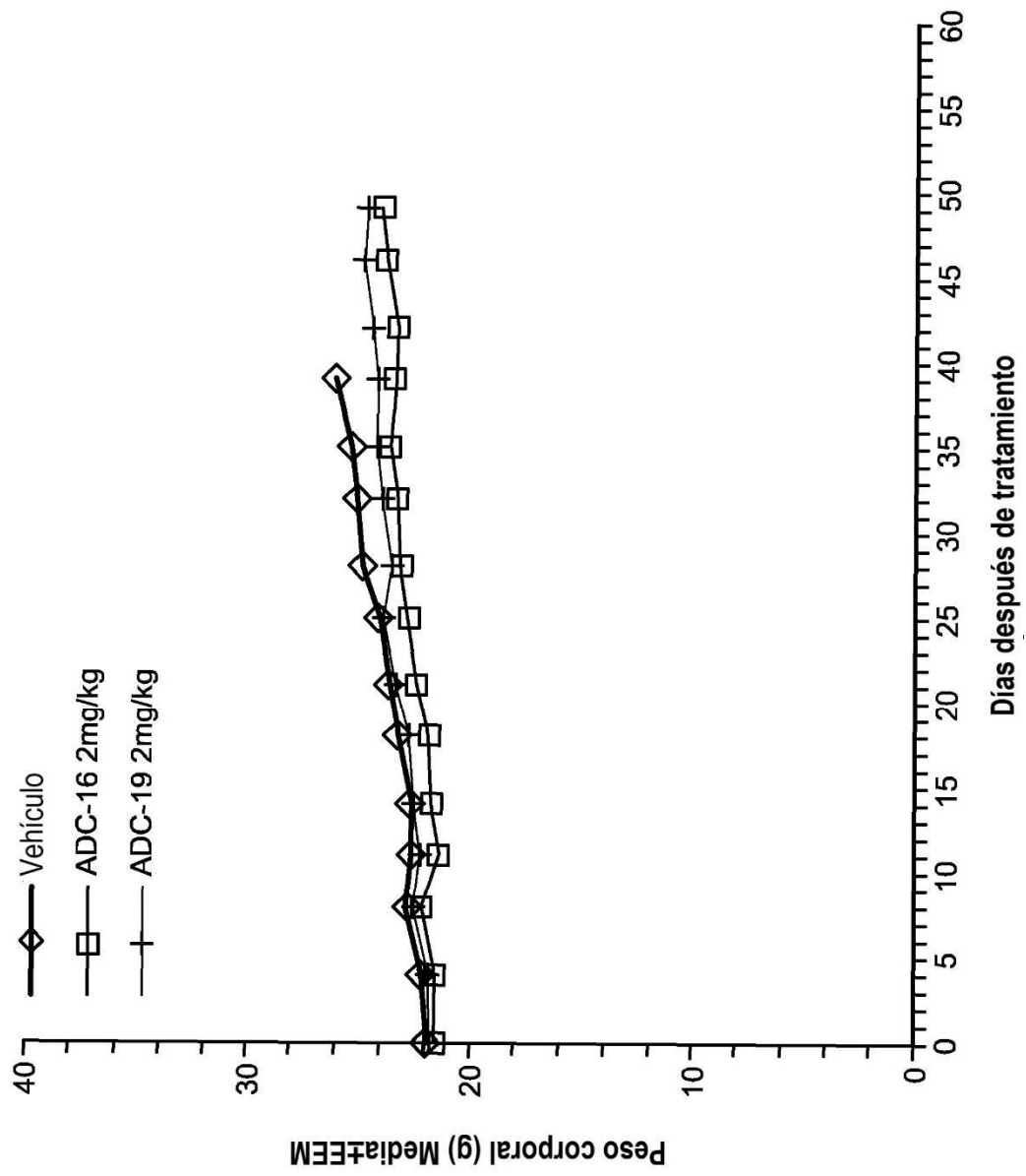


FIG. 6B

