

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 644**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/48 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2013** **PCT/JP2013/006069**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014** **WO14057687**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2013** **E 13845596 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 2907824**

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

30 Prioridad:

11.10.2012 JP 2012225887

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2018

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 671 644 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 - fármaco

Campo técnico

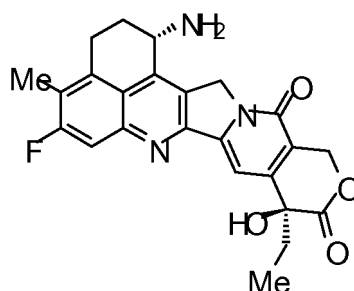
La presente invención se refiere a un conjugado de anticuerpo - fármaco que tiene un fármaco antitumoral conjugado con un anticuerpo capaz de seleccionar como diana células tumorales por medio de un resto de estructura de enlazador, siendo útil el conjugado como un fármaco antitumoral.

Antecedentes de la técnica

Un conjugado de anticuerpo - fármaco (ADC) que tiene un fármaco con citotoxicidad conjugado con un anticuerpo, cuyo antígeno se expresa sobre una superficie de células cancerosas y que también se une a un antígeno capaz de internalización celular y, por lo tanto, puede suministrar el fármaco selectivamente a células las cancerosas y se espera por lo tanto que dé lugar a la acumulación del fármaco dentro de las células cancerosas y que destruya las células cancerosas (véanse las literaturas no de patente 1 a 3). El documento JP2009-538629A desvela unos ADC en los que un fármaco citotóxico está conjugado con un anticuerpo anti-CD22, para seleccionar como diana células tumorales. Como un ADC, Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicina), en el que se conjuga caliqueamicina con un anticuerpo anti-CD33, está aprobado como un agente terapéutico para la leucemia mieloide aguda. Además, Adcetris (Brentuximab vedotina), en el que se conjuga auristatina E con un anticuerpo anti-CD30, se ha aprobado recientemente como un agente terapéutico para el linfoma de Hodgkin y el linfoma anaplásico de células grandes (véase la literatura no de patente 4). Los fármacos contenidos en los ADC que se han aprobado hasta la fecha seleccionan como diana ADN o tubulina.

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

[Fórmula 1]



(exatecán, nombre químico: (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H, 15H)-diona) es un derivado soluble en agua de camptotecina (literatura de patente 1 y 2). A diferencia del irinotecán ya usado en escenarios clínicos, no es necesaria una activación mediante una enzima. Además, la actividad inhibitoria sobre la topoisomerasa I es más alta que SN-38, que es una sustancia farmacéuticamente activa principal de irinotecán y topotecán también usada en escenarios clínicos, y se obtiene una actividad citocida in vitro más alta contra diversas células cancerosas. En particular, este muestra el efecto contra células cancerosas que tienen resistencia a SN-38 o similares debido a la expresión de P-glicoproteína. Además, en un modelo de ratón transplantado subcutáneamente con tumor humano, este mostró un efecto antitumoral potente y, por lo tanto, se ha sometido a los estudios clínicos, pero no se ha puesto aún en el mercado (véanse las literaturas no de patente 5 a 10). Sigue sin estar claro si exatecán funciona, o no, eficazmente como un ADC.

DE-310 es un complejo en el que se conjuga exatecán con un polímero de carboximetildextrano polialcohol biodegradable por medio de un espaciador peptídico de GGFG (literatura de patente 3). Convirtiendo el exatecán en una forma de un profármaco de polímero, de tal modo que puede mantenerse una propiedad de retención sanguínea alta y también se aumenta pasivamente una propiedad de direccionabilidad alta a un área tumoral utilizando la permeabilidad aumentada de los vasos sanguíneos recién formados dentro del tumor y la propiedad de retención en los tejidos tumorales. Con DE-310, a través de una escisión del espaciador peptídico mediante enzima, se liberan continuamente, como una sustancia activa principal, exatecán y exatecán con glicina conectada a un grupo amino. Como resultado, la farmacocinética se mejora y se halló que DE-310 tiene una efectividad más alta que exatecán administrado solo incluso si la dosificación de exatecán es menor que en el caso de la administración de exatecán solo de acuerdo con diversos modelos de evaluación tumoral en estudios no clínicos. Se llevó a cabo un estudio clínico para DE-310, y se confirmaron casos efectivos en seres humanos, en donde estaba presente un informe que sugiere que la sustancia activa principal se acumula en un tumor que en tejidos normales, sin embargo, también existe un informe que indica que la acumulación de DE-310 y la sustancia activa principal en un tumor no es muy

diferente de la acumulación en tejidos normales en seres humanos y, por lo tanto, no se observa selección como diana pasiva alguna en seres humanos (véanse las literaturas no de patente 11 a 14). Como resultado, tampoco se comercializó DE-310, y sigue sin estar claro si exatecán funciona, o no, eficazmente como un fármaco orientado para tal selección como diana.

- 5 Como un compuesto en relación con DE-310, también se conoce un complejo en el que un resto de estructura representado por $\text{-NH}(\text{C}_6\text{H}_4)_4\text{C(=O)-}$ se inserta entre el espaciador de GGFG y exatecán para formar $\text{-GGFG-NH}(\text{CH}_2)_4\text{C(=O)-}$, usado como una estructura espaciadora (literatura de patente 4). Sin embargo, el efecto antitumoral del complejo no es en absoluto conocido.

[Lista de citas]

- 10 [Literatura de patente]

[Literatura de patente 1] Patente japonesa abierta a inspección pública n.º 5-59061
 [Literatura de patente 2] Patente japonesa abierta a inspección pública n.º 8-337584
 [Literatura de patente 3] Publicación internacional n.º WO 1997/46260
 [Literatura de patente 4] Publicación internacional n.º WO 2000/25825

- 15 [Literatura no de patente]

- [Literatura no de patente 1] Ducry, L., y col. Bioconjugate Chem. (2010) 21,5-13.; Antibody-Drug Conjugates: Linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies.
 [Literatura no de patente 2] Alley, S. C., y col. Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.; Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer.
 20 [Literatura no de patente 3] Damle N. K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.; Tumour-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin.
 [Literatura no de patente 4] Senter P. D., y col. Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.; The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma.
 25 [Literatura no de patente 5] Kumazawa, E., Tohgo, A., Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632.; Antitumour activity of DX-8951f: a new camptothecin derivative.
 [Literatura no de patente 6] Mitsui, I., Kumazawa, E., Hirota, Y., y col. Jpn J. Cancer Res. (1995) 86, 776-782.; A new water-soluble camptothecin derivative, DX-8951f, exhibits potent antitumor activity against human tumors in vitro and in vivo.
 30 [Literatura no de patente 7] Takiguchi, S., Tohgo, A., y col. Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 760-769.; Antitumor effect of DX-8951, a novel camptothecin analog, on human pancreatic tumor cells and their CPT-11-resistant variants cultured in vitro and xenografted into nude mice.
 [Literatura no de patente 8] Joto, N. y col. Int J Cancer (1997) 72, 680-686.; DX-8951f, a water-soluble camptothecin analog, exhibits potent antitumor activity against a human lung cancer cell line and its SN-38-resistant variant.
 35 [Literatura no de patente 9] Kumazawa, E. y col. Cancer Chemother. Pharmacol. (1998) 42, 210-220.; Potent and broad antitumor effects of DX-8951f, a water-soluble camptothecin derivative, against various human tumors xenografted in nude mice.
 [Literatura no de patente 10] De Jager, R., y col. Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260-273.; DX-8951f: summary of phase I clinical trials.
 40 [Literatura no de patente 11] Inoue, K. y col. Polymer Drugs in the Clinical Stage, Editado por Maeda y col. (2003), 145-153.; CM-dextran-polyalcohol-camptothecin conjugate, DE-310 with a novel carrier system and its preclinical data.
 [Literatura no de patente 12] Kumazawa, E. y col. Cancer Sci (2004) 95, 168-175.; DE-310, a novel macromolecular carrier system for the camptothecin analog DX-8951f: Potent antitumor activities in various murine tumor models.
 45 [Literatura no de patente 13] Soepenbergh, O. y col. Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703-711.; Phase I and pharmacokinetic study of DE-310 in Patients with Advanced Solid Tumors.
 [Literatura no de patente 14] Wente M. N. y col. Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347.; DE-310, a macromolecular prodrug of the topoisomerase-I-inhibitor exatecan (DX-8951), in patients with operable solid tumors.
 50

[Resumen de la invención]

[Problema técnico]

- 55 Con respecto al tratamiento de un tumor mediante un anticuerpo, puede observarse un efecto antitumoral insuficiente incluso cuando el anticuerpo reconoce un antígeno y se une a células tumorales, y hay un caso en el que se necesita un anticuerpo antitumoral más eficaz. Además, muchos compuestos de bajo peso molecular antitumorales presentan un problema en la seguridad como un efecto secundario y la toxicidad y, aunque los compuestos tienen un efecto antitumoral excelente, sigue siendo un objeto lograr un efecto terapéutico superior

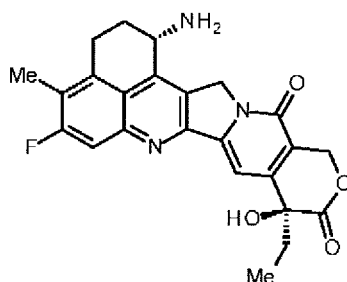
potenciando adicionalmente la seguridad. De ese modo, un objeto de la presente invención es obtener proporcionar un fármaco antitumoral que tenga un efecto terapéutico excelente, que sea excelente en términos del efecto antitumoral y la seguridad.

Los inventores de la presente invención pensaron que, cuando un compuesto antitumoral exatecán se convierte en un conjugado de anticuerpo - fármaco, por medio de un resto de estructura de enlazador, mediante conjugación con el anticuerpo, que es capaz de seleccionar como diana células tumorales, es decir, que tiene una propiedad de reconocer células tumorales, una propiedad de unirse a células tumorales, una propiedad de internalización dentro de células tumorales, una actividad citocida contra células tumorales, o similares, el compuesto antitumoral puede suministrarse más seguramente a las células tumorales para mostrar específicamente el efecto antitumoral del compuesto en células tumorales y, por lo tanto, el efecto antitumoral puede seguramente mostrarse y también se espera un efecto citocida potenciado del anticuerpo, y puede reducirse una dosis del compuesto antitumoral en comparación con un caso de administración del compuesto solo y, por lo tanto, puede aliviarse una influencia del compuesto antitumoral sobre las células normales de tal modo que puede lograrse una seguridad más alta.

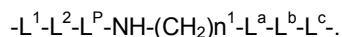
A este respecto, los inventores de la presente invención crearon un enlazador con una estructura específica y tuvieron éxito en la obtención de un conjugado de anticuerpo - fármaco en el que el anticuerpo y exatecán se conjugan entre sí por medio del enlazador, y confirmaron un efecto antitumoral excelente mostrado por el conjugado para completar de ese modo la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente.

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



está conjugado con un anticuerpo por medio de un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



En este caso, el anticuerpo está conectado al extremo terminal de L^1 , el compuesto antitumoral está conectado al extremo terminal de L^c con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como posición de conexión, en el que

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

L^1 representa $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$, $-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_{n^3}-C(=O)-$, $-C(=O)-\text{cic.Hex}(1,4)-CH_2-(N\text{-li-3-diminiccuS})-$ o $-C(=O)-(CH_2)_{n^4}-C(=O)-$,

en el que n^2 representa un número entero de 2 a 8, n^3 representa un número entero de 1 a 8, n^4 representa un número entero de 1 a 8,

L^2 representa $-NH-(CH_2-CH_2-O)_{n^5}-CH_2-CH_2-C(=O)-$, $-S-(CH_2)_{n^6}-C(=O)-$, o un enlace sencillo,

en el que n^5 representa un número entero de 1 a 6, n^6 representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa un residuo de tetrapéptido de GGFG,

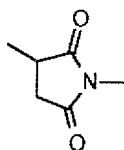
L^a representa $-O-$ o un enlace sencillo,

L^b representa $-CR^2(-R^3)-$ o un enlace sencillo,

en el que R^2 y R^3 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno,

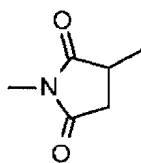
L^c representa $-C(=O)-$,

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



que está conectado al anticuerpo en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura de enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

$-(N\text{-li-3-diminiccuS})-$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



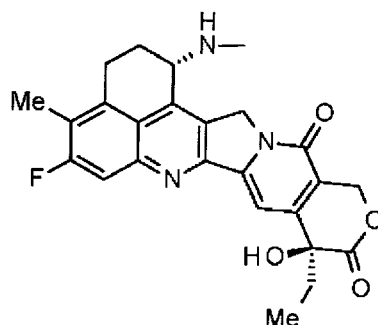
que está conectado a L^2 en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura de enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1, cic.Hex(1,4) representa un grupo 1,4-ciclohexileno y, cuando L^2 es $-S-(CH_2)_n-C(=O)-$, L^1 es $-C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH_2-(N-li-3-diminiccuS)-$.

La presente invención también se refiere a cada uno de lo siguiente.

[2] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con [1], en el que la estructura del enlazador es una estructura seleccionada de entre el siguiente grupo:

- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- $-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- $-C(=O)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- $-C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH_2-(N-li-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

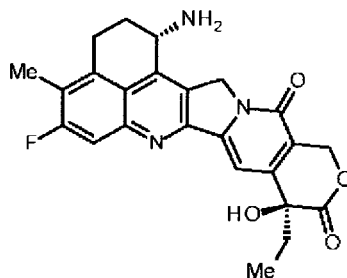
en el que $-(NH-DX)$ representa un grupo representado por la siguiente fórmula:



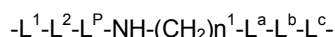
en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición de conexión, y

$-GGFG-$ representa un residuo de péptido de $-Gly-Gly-Phe-Gly-$.

[3] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con [1] en el que un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:



está conjugado con un anticuerpo por medio de un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



en el que el anticuerpo está conectado al extremo terminal de L^1 , el compuesto antitumoral está conectado al extremo terminal de L^c con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como la posición de conexión, en el que

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

L^1 representa $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)n^2-C(=O)-$, en el que n^2 representa un número entero de 2 a 5,

L^2 representa $-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$ o un enlace sencillo, en el que n^5 representa un número entero de 2 o 4,

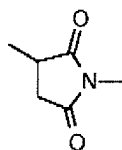
L^P representa un residuo de tetrapéptido de GGFG,

L^a representa $-O-$ o un enlace sencillo,

L^b representa $-CR^2(-R^3)-$ o un enlace sencillo, en el que R^2 y R^3 representan cada uno un átomo de hidrógeno,

L^c representa $-C(=O)-$, y

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



que está conectado al anticuerpo en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura de enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1.

[4] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con [3], en el que $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ es

$-NH-(CH_2)_3-C(=O)-$,

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$, o

$-NH-(CH_2)_2-O-CH_2-C(=O)-$.

[5] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con [4], en el que $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ es

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$.

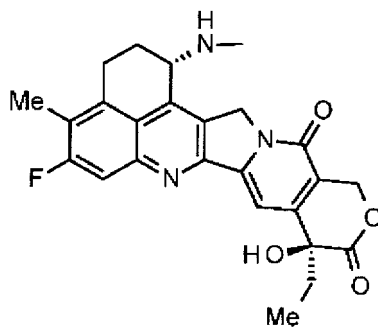
[6] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con una cualquiera de [3] a [5], en el que la estructura del enlazador es una estructura seleccionada de entre el siguiente grupo:

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

en el que $-(NH-DX)$ representa un grupo representado por la siguiente fórmula:



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

[7] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con [6], en el que la estructura del enlazador es:

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$.

[8] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en el que un número promedio de unidades de la estructura de fármaco - enlazador seleccionada conjugada por anticuerpo está en un intervalo de 2 a 8.

[9] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en el que un número promedio de unidades de la estructura de fármaco - enlazador seleccionada conjugada por anticuerpo está en un intervalo de 3 a 8.

[10] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en el que una célula que es seleccionada como diana por el conjugado de anticuerpo - fármaco es una célula tumoral.

[11] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-A33, un anticuerpo anti-B7-H3, un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-CD70,

un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-G250, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo anti-integrina, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo anti-tenascin-C, un anticuerpo anti-SLC44A4 o un anticuerpo anti-mesotelina.

[12] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-B7-H3, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33 o un anticuerpo anti-CD70.

[13] El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-B7-H3.

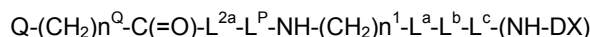
[14] Un fármaco que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], o una sal del mismo.

[15] Un fármaco antitumoral y/o fármaco anticancerígeno que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], o una sal del mismo.

[16] Un fármaco antitumoral y/o fármaco anticancerígeno como se define en cualquiera de [1] a [4], para su uso contra cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago o cáncer de esófago.

[17] Una composición farmacéutica que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], o una sal del mismo como un componente activo, y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.

[18] Un compuesto intermedio de fármaco - enlazador representado por la siguiente fórmula:



en el que Q representa (maleimid-N-il)-

n^O representa un número entero de 2 a 8,

L^{2a} representa $-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$ o un enlace sencillo,

en el que n^5 representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa un residuo de tetrapéptido de GGFG

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

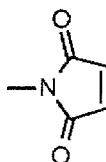
L^a representa $-O-$ o un enlace sencillo,

L^b representa $-CR^2(-R^3)-$ o un enlace sencillo,

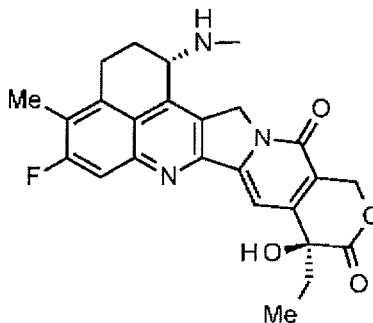
en el que R^2 y R^3 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno,

L^c representa $-C(=O)-$,

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



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



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

[19] El compuesto intermedio de fármaco - enlazador de acuerdo con [18], en el que

n^5 es un número entero de 2 o 4,

$-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ es

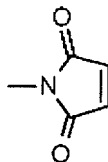
$-NH-CH_2CH_2CH_2-$,

$-NH-CH_2-O-CH_2-$, o

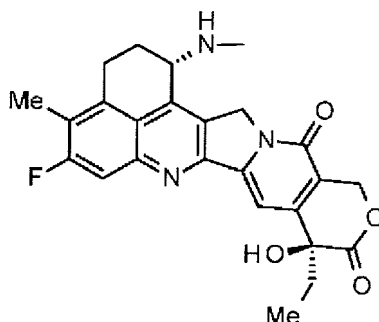
$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$.

[20] Un compuesto de los siguientes:

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX) o
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 en el que (maleimid-N-il)- es un grupo representado por la siguiente fórmula:



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

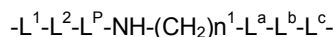


en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es una posición de conexión.

[21] El compuesto de acuerdo con [20] que es:

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

[22] Un enlazador representado por la siguiente fórmula:



para obtener un conjugado de anticuerpo - fármaco en el que un fármaco está conjugado con un anticuerpo por medio del enlazador, en el que L¹ es una posición de conexión para el anticuerpo, L^c es una posición de conexión para un compuesto antitumoral,

en el que

n¹ representa un número entero de 0 a 6,

L¹ representa -(Succinimid-3-il-N)-(CH₂)n²-C(=O)-, en el que n² representa un número entero de 2 a 8,

L² representa -NH-(CH₂-CH₂-O)n⁵-CH₂-CH₂-C(=O)- o un enlace sencillo,

en el que n⁵ representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa un residuo de tetrapéptido de GGFG,

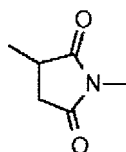
L^a representa -O- o un enlace sencillo,

L^b representa -CR²-(R³)-, o un enlace sencillo,

en el que R² y R³ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno,

L^c representa -C(=O)-,

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



que está conectado al anticuerpo en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura de enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1.

[23] El enlazador de acuerdo con [22], que se selecciona de entre el siguiente grupo, con la condición de que el extremo terminal izquierdo sea una posición de conexión con el anticuerpo y el extremo terminal derecho sea una posición de conexión con el compuesto antitumoral:

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

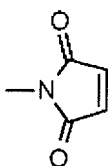
-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

[24] El enlazador de acuerdo con [23], que, con la condición de que el extremo terminal izquierdo sea una posición de conexión con el anticuerpo y el extremo terminal derecho sea una posición de conexión con el compuesto antitumoral, es:

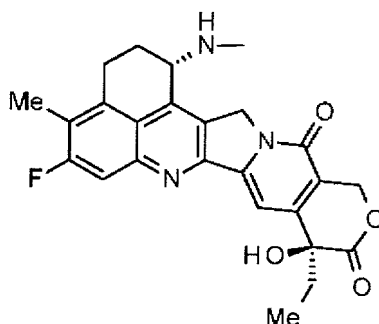
5 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-.

[25] Un procedimiento para preparar un conjugado de anticuerpo - fármaco, en el que el anticuerpo se trata en una condición reductora y a continuación se hace reaccionar con un compuesto seleccionado de entre el grupo de compuestos mostrado posteriormente:

10 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NHCH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), o
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 en lo anterior, (maleimid-N-il)- es un grupo representado por la siguiente fórmula:



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

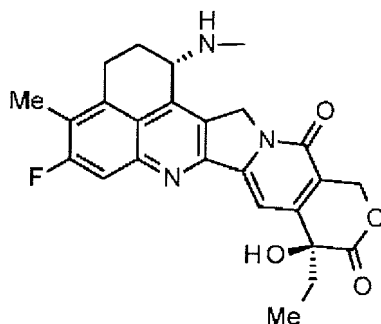


en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es una posición de conexión.

20 [26] El procedimiento de acuerdo con [25], en el que el anticuerpo se trata en una condición reductora y a continuación se hace reaccionar con el compuesto mostrado posteriormente:

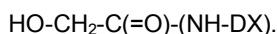
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

25 [27] Un compuesto seleccionado de entre un grupo de
 NH₂-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 NH₂-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), o
 HO-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 en el que -(NH-DX) es un grupo representado por la siguiente fórmula:



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

[28] El compuesto de acuerdo con [27], que es



Efectos ventajosos de la invención

Con un conjugado de anticuerpo - fármaco que tiene un compuesto antitumoral exatecán conjugado por medio de un enlazador con una estructura específica, pueden lograrse un efecto antitumoral y una seguridad excelentes.

5 **Breve descripción de los dibujos**

[Figura 1] La figura 1 muestra una secuencia de aminoácidos de la variante 1 de B7-H3 (SEQ ID NO: 1).

[Figura 2] La figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos de la variante 2 de B7-H3 (SEQ ID NO: 2).

[Figura 3] La figura 3 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo M30-H1 (SEQ ID NO: 9).

[Figura 4] La figura 4 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo M30-H2 (SEQ ID NO: 10).

[Figura 5] La figura 5 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo M30-H3 (SEQ ID NO: 11).

[Figura 6] La figura 6 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo M30-H4 (SEQ ID NO: 12).

[Figura 7] La figura 7 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo M30-L1 (SEQ ID NO: 13).

[Figura 8] La figura 8 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo M30-L2 (SEQ ID NO: 14).

[Figura 9] La figura 9 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo M30-L3 (SEQ ID NO: 15).

[Figura 10] La figura 10 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo M30-L4 (SEQ ID NO: 16).

[Figura 11] La figura 11 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo M30-L5 (SEQ ID NO: 17).

[Figura 12] La figura 12 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo M30-L6 (SEQ ID NO: 18).

[Figura 13] La figura 13 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo M30-L7 (SEQ ID NO: 19).

[Figura 14] La figura 14 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 20).

[Figura 15] La figura 15 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 21).

[Figura 16] La figura 16 muestra una secuencia de nucleótidos de la variante 1 de B7-H3 (SEQ ID NO: 26).

[Figura 17] La figura 17 muestra el efecto de un conjugado de anticuerpo - fármaco (2) sobre células de la línea de melanoma humano A375 subcutáneamente transplantadas. En el dibujo, la línea con rombos abiertos muestra resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con triángulos abiertos muestra el efecto de un anticuerpo M30-H1-L4P y la línea con círculos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2).

[Figura 18] La figura 18 muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) sobre células de la línea de melanoma humano A375 subcutáneamente transplantadas. La línea con rombos abiertos muestra resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con cuadrados sólidos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) administrado a 0,1 mg/kg, la línea con marcas X muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) administrado a 0,3 mg/kg, la línea con triángulos sólidos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) administrado a 1 mg/kg y la línea con círculos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) administrado a 3 mg/kg.

[Figura 19] La figura 19 muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) sobre células Calu-6 de línea de cáncer de pulmón no de células pequeñas humano subcutáneamente transplantadas. La línea con rombos abiertos muestra resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con triángulos abiertos muestra el efecto de un anticuerpo M30-H1-L4P y la línea con círculos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2).

[Figura 20] La figura 20 muestra los efectos de los conjugados de anticuerpo - fármaco (1), (13), (41) y (55) sobre células de la línea de melanoma humano A375 subcutáneamente transplantadas. En el dibujo, la línea con rombos abiertos muestra resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con círculos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (1), la línea con triángulos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (13), la línea con marcas X muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (41) y la línea con cuadrados abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (55).

[Figura 21] La figura 21 muestra los efectos de los conjugados de anticuerpo - fármaco (13), (41) y (55) sobre células Calu-6 de línea de cáncer de pulmón no de células pequeñas humano subcutáneamente transplantadas. La línea con rombos abiertos muestra resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con círculos abiertos muestra el efecto de DE-310, la línea con triángulos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (13), la línea con marcas X muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (41) y la línea con cuadrados abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (55).

[Figura 22] La figura 22 muestra los efectos de los conjugados de anticuerpo - fármaco (17), (18), (19), (59), (60) y (61) sobre células de la línea de melanoma humano A375 subcutáneamente transplantadas. En el dibujo, la línea con rombos sólidos muestra resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con cuadrados sólidos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (17), la línea con cuadrados abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (18), la línea con círculos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (19), la línea con triángulos sólidos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (59), la línea con triángulos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (60) y la línea con marcas X muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (61).

Descripción de realizaciones

El conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención es un fármaco antitumoral en el que un anticuerpo antitumoral está conjugado con un compuesto antitumoral por medio de un resto de estructura de enlazador y se explica con detalle en lo sucesivo en el presente documento.

[Anticuerpo]

El anticuerpo usado en el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención quiere decir una inmunoglobulina y es una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. La clase del anticuerpo de la presente invención puede ser cualquiera de IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY y es preferentemente IgG. La subclase del anticuerpo de la presente invención puede ser cualquiera de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 y es preferentemente IgG1 o IgG2. El anticuerpo puede derivarse de cualquier especie, y los ejemplos preferidos de la especie pueden incluir seres humanos, ratas, ratones y conejos. En el caso en el que se deriva de una especie que no sea la humana, preferentemente este se quimeriza o se humaniza usando una técnica bien conocida. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal y es preferentemente un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo de la presente invención puede ser uno que es capaz de seleccionar como diana células tumorales. Debido a que el anticuerpo de la presente invención está conjugado con un fármaco que tiene actividad antitumoral por medio de un enlazador, el anticuerpo preferentemente posee una o más de una propiedad de reconocer una célula tumoral, una propiedad de unirse a una célula tumoral, una propiedad de internalizarse en una célula tumoral y una propiedad de dañar una célula tumoral.

La actividad de unión del anticuerpo contra células tumorales puede confirmarse usando citometría de flujo. La internalización del anticuerpo en células tumorales puede confirmarse usando (1) un ensayo de visualización de un anticuerpo incorporado en células bajo un microscopio de fluorescencia usando un anticuerpo secundario (marcado fluorescentemente) que se une al anticuerpo terapéutico (Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761), (2) un ensayo de medición de la cantidad de fluorescencia incorporada en células usando un anticuerpo secundario (marcado fluorescentemente) que se une al anticuerpo terapéutico (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, diciembre de 2004) o (3) un ensayo de Mab-ZAP usando una inmunotoxina que se une al anticuerpo terapéutico en el que la toxina se libera tras la incorporación en células para inhibir el crecimiento celular (Bio Techniques 28: 162-165, enero de 2000).

La actividad antitumoral del anticuerpo se refiere a una actividad citotóxica o efecto citocida contra células tumorales y puede confirmarse *in vitro* determinando la actividad inhibitoria contra el crecimiento celular. Por ejemplo, se cultiva una línea de células cancerosas que sobreexpresa una proteína diana para el anticuerpo, y el anticuerpo se añade a concentraciones variables en el sistema de cultivo para determinar una actividad inhibitoria contra la formación de focos, la formación de colonias y el crecimiento de esferoides. La actividad antitumoral puede confirmarse *in vivo*, por ejemplo, administrando el anticuerpo a un ratón desnudo con una línea de células tumorales transplantadas que expresa altamente la proteína diana, y determinando el cambio en la célula cancerosa. Debido a que el fármaco conjugado en el conjugado de anticuerpo - fármaco ejerce un efecto antitumoral, se prefiere en mayor medida, pero no es esencial, que el propio anticuerpo tenga un efecto antitumoral. Para ejercer el efecto antitumoral y también para dañar específica y selectivamente células tumorales mediante el fármaco, es importante y también se prefiere que el anticuerpo tenga la propiedad de internalizarse para migrar a células tumorales.

Los ejemplos de un anticuerpo de este tipo pueden incluir, pero sin limitarse a, un anticuerpo anti-A33, un anticuerpo anti-B7-H3, un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-G250, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo anti-integrina, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo anti-tenascin-C, un anticuerpo anti-SLC44A4 y un anticuerpo anti-mesotelina.

El anticuerpo de la presente invención es preferentemente un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD70 o un anticuerpo anti-B7-H3 y, más preferentemente, un anticuerpo anti-B7-H3.

El anticuerpo de la presente invención puede obtenerse usando un procedimiento llevado habitualmente a cabo en la técnica, que implica inmunizar animales con un polipéptido antigénico y recoger y purificar anticuerpos producidos *in vivo*. El origen del antígeno no se limita a los seres humanos, y los animales pueden inmunizarse con un antígeno

derivado de un animal no humano tal como un ratón, una rata y similares. En este caso, la reactividad cruzada de los anticuerpos que se unen al antígeno heterólogo obtenido con antígenos humanos puede someterse a prueba para explorar un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

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

El antígeno puede obtenerse modificando por ingeniería genética células hospedadoras para producir un gen que codifica la proteína antigénica. Específicamente, se preparan unos vectores que permiten la expresión del gen de antígeno y se transfieren a células hospedadoras de tal modo que el gen se expresa. El antígeno expresado de este modo puede purificarse.

El anticuerpo anti-CD30, el anticuerpo anti-CD33 y el anticuerpo anti-CD70 pueden obtenerse mediante un enfoque conocido en la técnica con referencia al documento WO2002/043661, la patente de EE. UU. n.º 5.773.001 y el documento WO2006/113909, respectivamente.

El anticuerpo B7-H3 usado en la presente invención es preferentemente uno que tiene propiedades según se describe a continuación.

(1) Un anticuerpo que tiene las siguientes propiedades:

- (a) unirse específicamente a B7-H3,
- (b) tener una actividad de fagocitosis mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCP), y
- (c) tener actividad antitumoral *in vivo*.

(2) El anticuerpo de acuerdo con (1), en el que B7-H3 es una molécula que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o 2.

(3) El anticuerpo de acuerdo con (1) o (2), en el que el anticuerpo tiene CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 como regiones de determinación de complementariedad de cadena pesada, y CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6, CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7, y CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 como regiones de determinación de complementariedad de cadena ligera.

(4) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en el que la región constante del mismo es una región constante derivada de ser humano.

(5) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

(6) El anticuerpo de acuerdo con (5), en el que el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 20 a 141 en la SEQ ID NO: 9, (b) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 20 a 141 en la SEQ ID NO: 10, (c) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 20 a 141 en la SEQ ID NO: 11, (d) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 20 a 141 en la SEQ ID NO: 12, (e) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 95 % o más alta con cualquiera de las secuencias (a) a (d) y (f) una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las secuencias (a) a (d) por las eliminaciones, sustituciones o adiciones de al menos un aminoácido, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en (g) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 21 a 128 en la SEQ ID NO: 13, (h) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 21 a 128 en la SEQ ID NO: 14, (i) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 21 a 128 en la SEQ ID NO: 15, (j) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 21 a 128 en la SEQ ID NO: 16, (k) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 21 a 128 en la SEQ ID NO: 17, (l) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 21 a 128 en la SEQ ID NO: 18, (m) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 21 a 128 en la SEQ ID NO: 19, (n) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 95 % o más alta con cualquiera de las secuencias (g) a (m) y (o) una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las secuencias (g) a (m) por las eliminaciones, sustituciones o adiciones de al menos un aminoácido.

(7) El anticuerpo de acuerdo con (6), en el que el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 20 a 141 en la SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 21 a 128 en la SEQ ID NO: 13, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 20 a 141 en la SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las

aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 14, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 15, y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16.

(10) El anticuerpo de acuerdo con (8) o (9), en el que el anticuerpo carece de un aminoácido en el extremo carboxilo de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9 o 12 en la cadena pesada.

(11) Un anticuerpo obtenido mediante un procedimiento para producir el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (10), comprendiendo el procedimiento las etapas de: cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo; y recoger el anticuerpo de interés a partir de los cultivos obtenidos en la etapa anterior.

(12) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (11), en el que la modificación de un glicano se regula con el fin de potenciar la actividad citotóxica dependiente del anticuerpo.

En lo sucesivo en el presente documento, se describe el anticuerpo B7-H3 usado en la invención.

Los términos "cáncer" y "tumor", tal como se usan en el presente documento, se usan con el mismo significado.

El término "gen", tal como se usa en el presente documento, incluye no solamente ADN, sino también ARNm del mismo, ADNc del mismo y ARNc del mismo.

El término "polinucleótido", tal como se usa en el presente documento, se usa con el mismo significado que un ácido nucleico y también incluye ADN, ARN, sondas, oligonucleótidos y cebadores.

Los términos "polipéptido" y "proteína", tal como se usan en el presente documento, se usan indistintamente.

El término "célula", tal como se usa en el presente documento, también incluye células en un individuo animal y células cultivadas.

El término "B7-H3", tal como se usa en el presente documento, se usa con el mismo significado que proteína B7-H3, y también se refiere a la variante 1 de B7-H3 y/o la variante 2 de B7-H3.

El término "CDR", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una región determinante de la complementariedad (CDR), y se sabe que cada cadena pesada y ligera de una molécula de anticuerpo tiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La CDR también se denomina región hipervariable y está presente en una región variable de cada cadena pesada y ligera de un anticuerpo. Es un sitio que tiene una variabilidad inusualmente alta en su estructura primaria, y hay tres CDR independientes en la estructura primaria de cada cadena polipeptídica pesada y ligera. En la presente memoria descriptiva, con respecto a las CDR de un anticuerpo, las CDR de la cadena pesada están representadas por CDRH1, CDRH2 y CDRH3 desde el lado amino terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, y las CDR de la cadena ligera están representadas por CDRL1, CDRL2 y CDRL3 desde el lado amino terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera. Estos sitios están próximos entre sí en la estructura terciaria y determinan la especificidad para un antígeno al que se une el anticuerpo.

La frase "la hibridación se realiza en condiciones rigurosas", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento en el que la hibridación se realiza en condiciones en las cuales puede lograrse la identificación realizando hibridación a 68 °C en una solución de hibridación disponible en el mercado ExpressHyb Hybridization Solution (fabricada por Clontech, Inc.) o realizando hibridación a 68 °C en presencia de NaCl de 0,7 a 1,0 M usando un filtro que tiene ADN inmovilizado sobre él, seguido de realizar lavado a 68 °C usando solución 0,1 a 2 x de SSC (1 x solución de SSC está compuesta por NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM) o en condiciones equivalentes a las mismas.

1. B7-H3

B7-H3 es un miembro de la familia B7 expresado en células presentadoras de antígenos como una molécula coestimuladora, y se considera que actúa sobre un receptor en linfocitos T para potenciar o suprimir la actividad inmunitaria.

B7-H3 es una proteína que tiene una estructura transmembrana de un solo paso, y el dominio extracelular N-terminal de B7-H3 contiene dos variantes. La variante 1 de B7-H3 (4Ig-B7-H3) contiene un dominio de Ig de tipo V o de tipo C en dos sitios, respectivamente, y la variante 2 de B7-H3 (2Ig-B7-H3) contiene un dominio de Ig de tipo V o de tipo C en un sitio, respectivamente.

- 5 Con respecto a B7-H3 que se usará en la invención, B7-H3 puede purificarse directamente a partir de células que expresan B7-H3 de un ser humano o un mamífero no humano (tal como una rata o un ratón) y usarse, o puede prepararse y usarse una fracción de membrana celular de las células descritas anteriormente. Además, B7-H3 puede obtenerse mediante síntesis in vitro de la misma o producción de la misma en una célula hospedadora mediante ingeniería genética. En la ingeniería genética, específicamente, después de que el ADNc de B7-H3 se integre en un vector capaz de expresar ADNc de B7-H3, puede obtenerse B7-H3 sintetizándola en una solución que contiene una enzima, un sustrato y una sustancia energética requeridas para la transcripción y la traducción, o expresando B7-H3 en otra célula hospedadora transformada procariota o eucariota.

10 La secuencia de aminoácidos de un marco de lectura abierto (ORF) de un gen de la variante 1 de B7-H3 humana está representada por la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias. Además, la secuencia de la SEQ ID NO: 1 se muestra en la figura 1.

La secuencia de aminoácidos de un ORF de un gen de la variante 2 de B7-H3 humana está representada por la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias. Además, la secuencia de la SEQ ID NO: 2 se muestra en la figura 2.

Además, una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan y/o añaden en cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente de B7-H3 y también tiene una actividad biológica equivalente a la de la proteína está también incluida en B7-H3.

La variante 1 de B7-H3 humana madura de la que se ha eliminado la secuencia señal corresponde a una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 27 a 534 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 1. Además, la variante 2 de B7-H3 humana madura de la que se ha eliminado la secuencia señal corresponde a una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 27 a 316 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 2.

2. Producción del anticuerpo anti-B7-H3

El anticuerpo contra B7-H3 de la invención puede obtenerse inmunizando un animal con B7-H3 o un polipéptido arbitrario seleccionado entre la secuencia de aminoácidos de B7-H3, y recogiendo y purificando el anticuerpo producido in vivo de acuerdo con un procedimiento común. La especie biológica de B7-H3 que se usará como antígeno no está limitada al ser humano, y puede inmunizarse un animal con B7-H3 derivado de un animal que no sea humano, tal como un ratón o una rata. En este caso, examinando la reactividad cruzada entre un anticuerpo que se une al B7-H3 heterólogo obtenido y B7-H3 humano, puede seleccionarse un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

Además, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal a partir de un hibridoma establecido fusionando células productoras de anticuerpos que producen un anticuerpo contra B7-H3 con células de mieloma, de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, (1975) 256, págs. 495-497; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, págs. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980).

Puede obtenerse B7-H3 que se usará como un antígeno expresando el gen de B7-H3 en una célula hospedadora usando ingeniería genética.

40 Específicamente, se produce un vector capaz de expresar el gen de B7-H3, y el vector resultante se transfecta en una célula hospedadora para expresar el gen, y a continuación, se purifica el B7-H3 expresado. En lo sucesivo en el presente documento, se describe específicamente un procedimiento para obtener un anticuerpo contra B7-H3.

(1) Preparación del antígeno

Los ejemplos del antígeno que se usará para producir el anticuerpo anti-B7-H3 incluyen B7-H3, un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos parcial que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de B7-H3, y un derivado obtenido añadiendo una secuencia de aminoácidos o vehículo dado al mismo.

B7-H3 puede purificarse directamente a partir de tejidos tumorales o células tumorales humanas y usarse. Además, B7-H3 puede obtenerse sintetizándolo in vitro o produciéndolo en una célula hospedadora mediante ingeniería genética.

50 Con respecto a la ingeniería genética, específicamente, después de que el ADNc de B7-H3 se integre en un vector capaz de expresar ADNc de B7-H3, puede obtenerse B7-H3 sintetizándola en una solución que contiene una enzima, un sustrato y una sustancia energética requeridas para la transcripción y la traducción, o expresando B7-H3 en otra célula hospedadora transformada procariota o eucariota.

Además, el antígeno también puede obtenerse como una proteína secretora expresando una proteína de fusión

obtenida ligando el dominio extracelular de B7-H3, que es una proteína de membrana, a la región constante de un anticuerpo en un sistema hospedador-vector apropiado.

- 5 El ADNc de B7-H3 puede obtenerse mediante, por ejemplo, un llamado procedimiento de PCR en el que se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo denominada "PCR") usando una biblioteca de ADNc que expresa ADNc de B7-H3 como molde y cebadores que amplifican específicamente el ADNc de B7-H3 (véase Saiki, R. K., y col., Science, (1988) 239, págs. 487-489).

Como síntesis in vitro del polipéptido, por ejemplo, puede indicarse como ejemplo el sistema Rapid Translation System (RTS) fabricado por Roche Diagnostics, Inc., aunque sin limitarse al mismo.

- 10 Los ejemplos de las células hospedadoras procariotas incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Con el fin de transformar las células hospedadoras con un gen diana, las células hospedadoras se transforman mediante un vector plasmídico que comprende un replicón, es decir, un origen de replicación derivado de una especie compatible con el hospedador, y una secuencia reguladora. Además, el vector tiene preferentemente una secuencia capaz de imponer selectividad fenotípica en la célula transformada.

- 15 Los ejemplos de las células hospedadoras eucariotas incluyen células de vertebrados, células de insectos y células de levadura. Como células de vertebrados, por ejemplo, a menudo se usan células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, págs. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC n.º CRL-1658) y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, LA, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. (1980) 77, págs. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO, ATCC: CCL-61); y similares, sin embargo, las células no se limitan a éstas.

- 20 El transformante obtenido de este modo puede cultivarse de acuerdo con un procedimiento común, y mediante el cultivo del transformante, se produce un polipéptido diana intracelular o extracelularmente.

Un medio adecuado para usarlo para el cultivo puede seleccionarse entre diversos medios de cultivo usados comúnmente dependiendo de las células hospedadoras empleadas. Si se emplea *Escherichia coli*, por ejemplo, puede usarse un medio LB suplementado con un antibiótico tal como ampicilina o IPMG, según sea necesario.

- 25 Una proteína recombinante producida intracelular o extracelularmente por el transformante a través de dicho cultivo puede separarse y purificarse mediante cualquiera de diversos procedimientos de separación conocidos que utiliza la propiedad física o química de la proteína.

- 30 Los ejemplos específicos de los procedimientos incluyen tratamiento con un precipitante de proteína común, ultrafiltración, diversos tipos de cromatografía líquida tales como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, diálisis y una combinación de los mismos.

Además, uniendo un identificador de seis restos de histidina a una proteína recombinante a expresar, la proteína puede purificarse eficazmente con una columna de afinidad de níquel. Como alternativa, uniendo la región Fc de IgG a una proteína recombinante a expresar, la proteína puede purificarse eficazmente con una columna de proteína A.

- 35 Combinando los procedimientos descritos anteriormente, puede producirse fácilmente una gran cantidad de un polipéptido diana con alto rendimiento y alta pureza.

(2) Producción del anticuerpo monoclonal anti-B7-H3

Los ejemplos del anticuerpo que se une específicamente a B7-H3 incluyen un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a B7-H3, y un procedimiento de obtención del anticuerpo es tal como se describe a continuación.

- 40 La producción de un anticuerpo monoclonal generalmente requiere las siguientes etapas operativas de:

- (a) purificar un biopolímero que se usará como antígeno;
 (b) preparar células productoras de anticuerpos inmunizando un animal mediante inyección del antígeno, recoger la sangre, ensayar su título de anticuerpos para determinar cuándo se escinde el bazo;
 (c) preparar células de mieloma (en lo sucesivo denominadas como "mieloma");
 45 (d) fusionar las células productoras de anticuerpos con el mieloma;
 (e) cribar un grupo de hibridomas que producen un anticuerpo deseado;
 (f) dividir los hibridomas en clones de una sola célula (clonación);
 (g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar un animal implantado con el hibridoma para producir una gran cantidad de un anticuerpo monoclonal;
 50 (h) examinar el anticuerpo monoclonal producido de este modo para determinar la actividad biológica y la especificidad de unión, o evaluar el mismo para determinar propiedades como un reactivo etiquetado; y similares.

En lo sucesivo en el presente documento, el procedimiento de producción de un anticuerpo monoclonal se describirá en detalle siguiendo las etapas anteriores, sin embargo, el procedimiento no se limita a esto, y, por ejemplo, pueden usarse células productoras de anticuerpos diferentes de células esplénicas y mieloma.

(a) Purificación de antígeno

Como antígeno, puede usarse B7-H3 preparada mediante el procedimiento descrito anteriormente o un péptido parcial de la misma.

- 5 Además, también puede usarse como el antígeno una fracción de membrana preparada a partir de células recombinantes que expresan B7-H3 o las propias células recombinantes que expresan B7-H3, y también un péptido parcial de la proteína de la invención químicamente sintetizado mediante un procedimiento conocido por los expertos en la materia.

(b) Preparación de células productoras de anticuerpos

- 10 El antígeno obtenido en la etapa (a) se mezcla con un adyuvante tal como adyuvante completo o incompleto de Freund o sulfato de aluminio y potasio y la mezcla resultante se usa como inmunógeno para inmunizar un animal experimental. Como animal experimental, puede usarse sin ningún problema cualquier animal usado en un procedimiento de producción de hibridoma conocido. Específicamente, por ejemplo, puede usarse un ratón, una rata, una cabra, vacas, un caballo o similar. Sin embargo, desde el punto de vista de la facilidad de disponibilidad de las células de mieloma para fusionarse con las células productoras de anticuerpos extraídas, se usa preferentemente un
15 ratón o una rata como animal a inmunizar.

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

- 20 Estos ratones y ratas están disponibles en el mercado de criadores/distribuidores de animales experimentales, por ejemplo, CLEA Japan, Inc. y Charles River Laboratories Japan, Inc.

Entre estos, teniendo en cuenta la compatibilidad de fusión con células de mieloma descritas a continuación, en el caso de un ratón, la cepa BALB/c, y en el caso de una rata, las cepas Wistar y Low se prefieren particularmente como animal a inmunizar.

- 25 Además, teniendo en cuenta la homología antigénica entre seres humanos y ratones, También se prefiere usar un ratón que tiene función biológica reducida para eliminar autoanticuerpos, es decir, un ratón con una enfermedad autoinmunitaria.

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

- 30 Con el fin de inmunizar un animal con B7-H3 o un recombinante de la misma, por ejemplo, puede usarse un procedimiento conocido descrito en detalle en, por ejemplo, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) o similares.

- 35 Entre todos estos procedimientos de inmunización, un procedimiento específico preferido en la invención es, por ejemplo, de la siguiente manera.

Es decir, en primer lugar, una fracción de proteína de membrana que sirve como antígeno o células a las que se hizo expresar el antígeno se administran por vía intradérmica o intraperitoneal a un animal.

- 40 Sin embargo, se prefiere la combinación de ambas vías de administración para aumentar la eficacia de inmunización y, cuando la administración intradérmica se realiza en la primera mitad y la administración intraperitoneal se realiza en la segunda mitad o sólo en la última dosificación, la eficacia de la inmunización puede aumentarse particularmente.

- 45 El programa de administración del antígeno varía dependiendo del tipo de animal a inmunizar, diferencia individual o similares. Sin embargo, en general, es preferido un programa de administración en el que la frecuencia de administración del antígeno es de 3 a 6 veces y el intervalo de dosificación es de 2 a 6 semanas, y es más preferido un programa de administración en el que la frecuencia de administración del antígeno es de 3 a 4 veces y el intervalo de dosificación es de 2 a 4 semanas.

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

- 50 Se realiza una inmunización de refuerzo de 1 a 6 semanas, preferentemente de 2 a 4 semanas, más preferentemente de 2 a 3 semanas después de la administración del antígeno tal como se ha descrito anteriormente.

La dosis del antígeno en el momento de realizar la inmunización de refuerzo varía dependiendo del tipo o tamaño del animal o similar, sin embargo, en el caso de, por ejemplo, un ratón, la dosis generalmente se establece en de 0,05 a

5 mg, preferentemente de 0,1 a 0,5 mg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg.

Las células esplénicas o linfocitos que incluyen células productoras de anticuerpos se extirpan asépticamente del animal inmunizado de 1 a 10 días, preferentemente de 2 a 5 días, más preferentemente de 2 a 3 días después de la inmunización de refuerzo. En este momento, se mide el título del anticuerpo y, si se usa un animal que tiene un título de anticuerpos suficientemente aumentado como fuente de suministro de las células productoras de anticuerpos, el procedimiento posterior puede llevarse a cabo de manera más eficiente.

Los ejemplos del procedimiento de medición del título de anticuerpos que se usarán aquí incluyen un procedimiento RIA y un procedimiento ELISA, pero el procedimiento no está limitado a estos.

Por ejemplo, si se emplea un procedimiento ELISA, la medición del título de anticuerpos en la invención puede llevarse a cabo de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación.

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

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

La separación de las células productoras de anticuerpos de las células esplénicas o linfocitos del animal inmunizado puede llevarse a cabo de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, Kohler y col., Nature (1975), 256, pág. 495; Kohler y col., Eur. J. Immunol. (1977), 6, pág. 511; Milstein y col., Nature (1977), 266, pág. 550; Walsh, Nature (1977), 266, pág. 495). Por ejemplo, en el caso de las células esplénicas, puede emplearse un procedimiento general en el que las células productoras de anticuerpos se separan homogeneizando el bazo para obtener las células mediante filtración con una malla de acero inoxidable y suspendiendo las células en Medio Mínimo Esencial (MEM) de Eagle.

(c) Preparación de células de mieloma (en lo sucesivo denominadas como "mieloma")

Las células de mieloma que se usarán para la fusión celular no están particularmente limitadas y las células adecuadas pueden seleccionarse de líneas celulares conocidas. Sin embargo, teniendo en cuenta la conveniencia cuando un hibridoma se selecciona de entre células fusionadas, se prefiere usar una cepa deficiente en HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa) cuyo procedimiento de selección se ha establecido.

De manera más específica, los ejemplos de la cepa deficiente en HGPRT incluyen X63-Ag8 (X63), NS1-ANS/1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO y BU.1 derivadas de ratones; 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) derivada de ratas; y U266AR(SKO-007), GM1500-GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) y 8226AR/NIP4-1(NP41) derivadas de seres humanos. Estas cepas deficientes en HGPRT están disponibles de, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) o similar.

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

(d) Fusión celular

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

Como dicho procedimiento, por ejemplo, puede usarse un procedimiento químico en el que las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se mezclan en una solución que contiene un polímero tal como polietilenglicol a alta concentración, un procedimiento físico que usan estimulación eléctrica, o similar. Entre estos procedimientos, un ejemplo específico del procedimiento químico es tal como se describe a continuación.

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

5 (e) Selección de un grupo de hibridomas

El procedimiento de selección de hibridomas obtenidos mediante la fusión celular descrita anteriormente no está particularmente limitado. Normalmente, se usa un procedimiento de selección HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) (Kohler y col., Nature (1975), 256, pág. 495; Milstein y col., Nature (1977), 266, pág. 550).

10 Este procedimiento es eficaz cuando se obtienen hibridomas usando células de mieloma de una cepa deficiente en HGPRT que no pueden sobrevivir en presencia de aminopterina.

Es decir, cultivando células no fusionadas e hibridomas en un medio HAT, sólo se permite selectivamente sobrevivir y proliferar a los hibridomas resistentes a la aminopterina.

(f) División en clones de una sola célula (clonación)

15 Como procedimiento de clonación para hibridomas, puede usarse un procedimiento conocido tal como un procedimiento de metilcelulosa, un procedimiento de agarosa suave o un procedimiento de dilución limitante (véase, por ejemplo, Barbara, B. M. y Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Entre estos procedimientos, particularmente, se prefiere un procedimiento de cultivo tridimensional tal como un procedimiento de metilcelulosa. Por ejemplo, el grupo de hibridomas producidos por fusión celular se suspenden en un medio de metilcelulosa tal como ClonaCell-HY Selection Medium D (fabricado por StemCell Technologies, Inc., nº 03804) y se cultiva. A continuación, se recogen las colonias de hibridoma formadas, con lo que pueden obtenerse hibridomas monoclonales. Las colonias de hibridoma recogidas respectivas se cultivan, y se selecciona un hibridoma que se ha confirmado que tiene un título de anticuerpo estable en un sobrenadante de cultivo de hibridoma obtenido como una cepa de hibridoma productor de anticuerpo monoclonal B7-H3.

25 Los ejemplos de la cepa de hibridoma establecida de este modo incluyen el hibridoma M30 de B7-H3. En la presente memoria descriptiva, un anticuerpo producido por el hibridoma M30 de B7-H3 se denomina "anticuerpo M30" o simplemente "M30".

30 La cadena pesada del anticuerpo M30 tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20 en el listado de secuencias. Además, la cadena ligera del anticuerpo M30 tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 21 en el listado de secuencias. En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 20 en el listado de secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 1 a 19 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 es una región variable, y una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 142 a 471 es una región constante. Además, en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 21 en el listado de secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 1 a 22 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 23 a 130 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 131 a 235 es una región constante.

(g) Preparación del anticuerpo monoclonal mediante cultivo de hibridoma

40 Cultivando el hibridoma seleccionado de este modo, puede obtenerse de manera eficiente un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, antes del cultivo, se prefiere realizar el cribado de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal diana.

En dicho cribado, puede emplearse un procedimiento conocido.

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

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

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

50 El cultivo a gran escala se lleva a cabo mediante cultivo de rotación usando una botella de cultivo grande o mediante un cultivo giratorio. A partir del sobrenadante obtenido mediante el cultivo a gran escala, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína de la invención por purificación usando un procedimiento conocido por los expertos en la materia, tales como filtración en gel.

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

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

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

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

El anticuerpo monoclonal obtenido de este modo tiene una alta especificidad por el antígeno para B7-H3.

(h) Ensayo de anticuerpo monoclonal

El isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal obtenido de este modo pueden determinarse de la siguiente manera.

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

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

- 25 Por otra parte, cuando se utiliza un procedimiento ELISA o un procedimiento RIA, haciendo reaccionar directamente el sobrenadante del cultivo con una fase sólida adsorbida al antígeno y usando anticuerpos correspondientes a diversos tipos de isotipos y subclases de inmunoglobulinas como anticuerpos secundarios, pueden identificarse el isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal.

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

- 30 Además, la determinación cuantitativa de una proteína puede realizarse mediante el procedimiento de Folin Lowry y un procedimiento de cálculo basado en la absorbancia a 280 nm [$1,4 \text{ (DO 280)} = \text{Inmunoglobulina } 1 \text{ mg/ml}$].

- 35 Además, incluso cuando el anticuerpo monoclonal se obtiene por separado e independientemente realizando nuevamente las etapas de (a) a (h) en (2), es posible obtener un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo M30. Como ejemplo de dicho anticuerpo, puede indicarse como ejemplo un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30. El M30 reconoce un epítipo en el dominio IgC1 o IgC2, que es un dominio en el dominio extracelular de B7-H3, y se une al dominio IgC1 o al dominio IgC2 o a ambos. Por lo tanto, como el epítipo para el anticuerpo de la invención, particularmente, puede indicarse como ejemplo un epítipo presente en el dominio IgC1 o IgC2 de B7-H3. Si un anticuerpo monoclonal recién producido se une a un epítipo parcial o a una estructura terciaria parcial a la que se une el anticuerpo M30, puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30. Además, confirmando que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo M30 por la unión a B7-H3 (es decir, el anticuerpo monoclonal inhibe la unión entre el anticuerpo M30 y B7-H3), puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30 incluso si no se ha determinado la secuencia o estructura específica del epítipo. Cuando se confirma que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30, se espera fuertemente que el anticuerpo monoclonal tenga una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo M30.

(3) Otros anticuerpos

- 50 El anticuerpo de la invención incluye no solamente el anticuerpo monoclonal descrito anteriormente contra B7-H3 sino también un anticuerpo recombinante obtenido mediante modificación artificial con el fin de disminuir la antigenicidad heteróloga en seres humanos, tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos pueden producirse usando un procedimiento conocido.

Como el anticuerpo quimérico, puede indicarse como ejemplo un anticuerpo en el que las regiones variable y constante de anticuerpo se derivan de diferentes especies, por ejemplo, un anticuerpo quimérico en el que una región variable de anticuerpo derivada de ratón o rata se conecta a una región constante de anticuerpo derivada de humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 81,6851-6855, (1984).

Como el anticuerpo humanizado, puede indicarse como ejemplo un anticuerpo obtenido integrando solamente una región determinante de complementariedad (CDR) en un anticuerpo derivado de un ser humano (véase Nature (1986) 321, págs. 522-525), y un anticuerpo obtenido injertando una parte de los restos de aminoácido del marco así como la secuencia de CDR para un anticuerpo humano mediante un procedimiento de injerto de CDR (documento WO 90/07861).

Sin embargo, el anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo M30 no está limitado a un anticuerpo humanizado específico, siempre que el anticuerpo humanizado tenga los 6 tipos de secuencias de CDR del anticuerpo M30 y tenga una actividad antitumoral. La región variable de cadena pesada del anticuerpo M30 tiene CDRH1 (NYVMH) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias, CDRH2 (YINPYNDDVKYNEKFKG) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4, en el listado de secuencias, y CDRH3 (WGYGSPLYYFDY) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 en el listado de secuencias. Además, la región variable de cadena ligera del anticuerpo M30 tiene CDRL1 (RASSRLIYMH) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 en el listado de secuencias, CDRL2 (ATSNLAS) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7, en el listado de secuencias, y CDRL3 (QQWNSNPPT) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 en el listado de secuencias.

Como un ejemplo del anticuerpo humanizado de un anticuerpo de ratón M30, puede indicarse como ejemplo una combinación arbitraria de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una cualquiera de (1) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 de la SEQ ID NO: 9, 10, 11 o 12 en el listado de secuencias, (2) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 95 % o más con la secuencia de aminoácidos (1) descrita anteriormente, y (3) una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos secuencia de aminoácidos (1) descrita anteriormente se eliminan, se sustituyen o se añaden y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en cualquiera de (4) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 de la SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 en el listado de secuencias, (5) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 95 % o más con secuencia de aminoácidos (4) descrita anteriormente, y (6) una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (4) descrita anteriormente se eliminan, se sustituyen o se añaden.

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

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

Como un anticuerpo que tiene una combinación preferida de una cadena pesada y una cadena ligera descrito anteriormente, un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 de la SEQ ID NO: 13; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 de la SEQ ID NO: 14; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 de la SEQ ID NO: 15; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 de la SEQ ID NO: 16; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 de la SEQ ID NO: 17; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende una región

variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 de la SEQ ID NO: 19; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 de la SEQ ID NO: 13; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 de la SEQ ID NO: 15; y un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 de la SEQ ID NO: 16 pueden indicarse como ejemplo.

[illegible]

Además, como un anticuerpo que tiene otra combinación más preferida de una cadena pesada y una cadena ligera descrito anteriormente, un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada

que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; y un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 pueden indicarse como ejemplo.

Combinando una secuencia que tiene una alta homología con la secuencia de aminoácidos de cadena pesada descrita anteriormente con una secuencia que tiene una alta homología con la secuencia de aminoácidos de cadena ligera descrita anteriormente, es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. Dicha homología es generalmente una homología del 80 % o más, preferentemente una homología del 90 % o más, más preferentemente una homología del 95 % o más, lo más preferentemente una homología del 99 % o más. Además, combinando una secuencia de aminoácidos en la que uno a varios restos de aminoácido se sustituyen, eliminan o añaden en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada o cadena ligera, también es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente.

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

En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 9, 10, 11 o 12 en el listado de secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 1 a 19 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 20 a 141 es una región variable, y una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 142 a 471 es una región constante. La secuencia de la SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12 se muestran en las figuras 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

Además, en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 en el listado de secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 1 a 20 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 21 a 128 es una región variable, y una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 129 a 233 es una región constante. La secuencia de la SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 se muestran en las figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, respectivamente.

Además, el anticuerpo de la invención incluye un anticuerpo humano que se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30. Un anticuerpo humano anti-B7-H3 se refiere a un anticuerpo humano que tiene solamente una secuencia de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano. El anticuerpo humano anti-B7-H3 puede obtenerse mediante un procedimiento que usa un ratón productor de anticuerpos humanos que tiene un fragmento de cromosoma humano que comprende genes de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano (véase Tomizuka, K. y col., *Nature Genetics* (1997) 16, págs. 133-143; Kuroiwa, Y. y col., *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, págs. 3447-3448; Yoshida, H. y col., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, págs. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. e Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (2000) 97, págs. 722-727, etc.).

Dicho ratón productor de anticuerpos humanos puede crearse específicamente de la siguiente manera. Un animal genéticamente modificado en el que se han alterado loci génicos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, y en su lugar, se han introducido loci génicos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana a través de un vector cromosómico artificial de levadura (YAC) o similar se crea produciendo un animal genomanipulado y un animal transgénico y haciendo aparearse a estos animales.

Además, de acuerdo con una técnica de ADN recombinante, usando ADNc que codifican cada una de dichas cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo humano, y preferentemente un vector que comprende dichos ADNc, se transforman células eucariotas, y se cultiva una célula transformante que produce un anticuerpo monoclonal humano recombinante, por lo que el anticuerpo también puede obtenerse del sobrenadante del cultivo.

En este caso, como hospedador, por ejemplo, pueden usarse células eucariotas, preferentemente células de mamífero tales como células CHO, linfocitos o células de mieloma.

Además, También se conoce un procedimiento para obtener un anticuerpo humano derivado de presentación en

fagos seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos (véase Wormstone, I. M. y col., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. (2002) 43 (7), págs. 2301-2308; Carmen, S. y col., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), págs. 189-203; Siriwardena, D. y col., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), págs. 427-431, etc.).

- 5 Por ejemplo, puede usarse un procedimiento de presentación en fagos en el que una región variable de un anticuerpo humano se expresa en la superficie de un fago como un anticuerpo monocatenario (scFv), y se selecciona un fago que se une a un antígeno (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), págs. 1105-1116).

Analizando el gen del fago seleccionado basándose en la unión a un antígeno, puede determinarse una secuencia de ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humano que se une a un antígeno.

- 10 Si se determina la secuencia de ADN de scFv que se une a un antígeno, puede obtenerse un anticuerpo humano preparando un vector de expresión que comprende la secuencia e introduciendo el vector en un hospedador apropiado para expresarlo (WO 92/01047, el documento WO 92/20791, el documento WO 93/06213, el documento WO 93/11236, el documento WO 93/19172, el documento WO 95/01438, el documento WO 95/15388, *Annu. Rev. Immunol.* (1994) 12, págs. 433-455, *Nature Biotechnology* (2005) 23 (9), págs. 1105-1116).

- 15 Si un anticuerpo humano recién producido se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la que se une el anticuerpo M30, puede determinarse que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30. Además, confirmando que el anticuerpo humano compite con el anticuerpo M30 por la unión a B7-H3 (es decir, el anticuerpo humano inhibe la unión entre el anticuerpo M30 y B7-H3), puede determinarse que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30 incluso si no se ha determinado la secuencia o estructura específica del epítipo. Cuando se confirma que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo que el anticuerpo M30, se espera fuertemente que el anticuerpo humano tenga una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo M30.

- 25 Los anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos obtenidos mediante el procedimiento descrito anteriormente se evalúan para determinar su propiedad de unión a un antígeno mediante un procedimiento conocido o similares, y puede seleccionarse un anticuerpo preferido.

- Como ejemplo de otro índice para su uso en la comparación de las propiedades de los anticuerpos, puede indicarse como ejemplo la estabilidad de los anticuerpos. El calorímetro diferencial de barrido (DSC) es un dispositivo capaz de medir de forma rápida y precisa una temperatura de punto medio de desnaturalización térmica (T_m) que se usará como un índice favorable de la estabilidad conformacional relativa de las proteínas. Midiendo los valores de T_m usando un DSC y comparando los valores, puede compararse una diferencia en la estabilidad térmica. Se sabe que la estabilidad en almacenamiento de los anticuerpos muestra cierta correlación con la estabilidad térmica de los mismos (Lori Burton, et. al., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, págs. 265-273), y puede seleccionarse un anticuerpo preferido usando la estabilidad térmica como índice. Los ejemplos de otros índices para seleccionar anticuerpos incluyen las siguientes características: el rendimiento en una célula hospedadora apropiada es alto; y la agregabilidad en una solución acuosa es baja. Por ejemplo, un anticuerpo que muestra el rendimiento más alto no siempre muestra la estabilidad térmica más alta y, por lo tanto, es necesario seleccionar el anticuerpo más adecuado para la administración a seres humanos realizando una evaluación exhaustiva basada en los índices descritos anteriormente.

- 40 En la invención, también se incluye una variante modificada del anticuerpo. La variante modificada se refiere a una variante obtenida sometiendo al anticuerpo de la invención a una modificación química o biológica. Los ejemplos de la variante químicamente modificada incluyen variantes químicamente modificadas enlazando un resto químico a una cadena principal de aminoácido, variantes químicamente modificadas con una cadena de carbohidrato enlazada a N o enlazada a O, etc. Los ejemplos de la variante biológicamente modificada incluyen variantes obtenidas por modificación después de la traducción (como glucosilación enlazada a N o enlazada a O, procesamiento N- o C-terminal, desamidación, isomerización de ácido aspártico u oxidación de metionina), y variantes en las que se ha añadido un resto de metionina al extremo N al expresarse en una célula hospedadora procarionte.

- Además, un anticuerpo etiquetado para permitir la detección o el aislamiento del anticuerpo o un antígeno de la invención, por ejemplo, un anticuerpo etiquetado con una enzima, un anticuerpo etiquetado con fluorescencia y un anticuerpo etiquetado por afinidad también están incluidos en el significado de la variante modificada. Dicha variante modificada del anticuerpo de la invención es útil para mejorar la estabilidad y la retención sanguínea del anticuerpo original de la invención, reduciendo la antigenicidad del mismo, detectando o aislando dicho anticuerpo o un antígeno, y así sucesivamente.

- Además, regulando la modificación de un glicano que está enlazado al anticuerpo de la invención (glucosilación, defucosilación, etc.), es posible potenciar una actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo. Como la técnica para regular la modificación de un glicano de anticuerpos, se conocen los documentos WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, etc. Sin embargo, la técnica no está limitada a estas. En el anticuerpo de la invención, también está incluido un anticuerpo en el que la modificación de un glicano está regulada.

En el caso en el que se produce un anticuerpo aislando en primer lugar un gen de anticuerpo e introduciendo, a

continuación, el gen en un hospedador apropiado, puede usarse una combinación de un hospedador apropiado y un vector de expresión apropiado. Los ejemplos específicos del gen de anticuerpo incluyen una combinación de un gen que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente memoria descriptiva y un gen que codifica una secuencia de cadena ligera del mismo. Cuando se transforma una célula hospedadora, es posible insertar el gen de la secuencia de cadena pesada y el gen de la secuencia de cadena ligera en el mismo vector de expresión, y también en diferentes vectores de expresión por separado.

En el caso en el que se usan células eucariotas como hospedador, pueden usarse células animales, células vegetales y microorganismos eucariotas. Como las células animales, pueden indicarse como ejemplo células de mamífero, por ejemplo, células COS de simio (Gluzman, Y., *Cell*, (1981) 23, págs. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC n.º CRL-1658), y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, LA, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (1980) 77, págs. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61).

En el caso en el que se usan células procariotas, por ejemplo, pueden indicarse como ejemplo *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

Introduciendo un gen de anticuerpo deseado en estas células mediante transformación, y cultivando las células transformadas de este modo in vitro, puede obtenerse el anticuerpo. En el procedimiento de cultivo descrito anteriormente, el rendimiento puede, algunas veces, variar dependiendo de la secuencia del anticuerpo y, por lo tanto, es posible seleccionar un anticuerpo que se produzca fácilmente como un producto farmacéutico usando el rendimiento como índice entre los anticuerpos que tienen una actividad de unión equivalente. Por lo tanto, en el anticuerpo de la invención, un anticuerpo obtenido mediante un procedimiento de producción de un anticuerpo, caracterizado por incluir una etapa de cultivar la célula hospedadora transformada y una etapa de recoger un anticuerpo deseado a partir de un producto cultivado obtenido en la etapa de cultivo también está incluido.

Se sabe que se elimina un resto de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada (*Journal of Chromatography A*, 705: 129-134 (1995)), y también se sabe que se eliminan dos restos de aminoácido (glicina y lisina) en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada y se amida un resto de prolina recién localizado en el extremo carboxilo (*Analytical Biochemistry*, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, dicha eliminación y modificación de la secuencia de cadena pesada no afecta la afinidad de unión al antígeno y la función efectora (la activación de un complemento, la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, etc.) del anticuerpo. Por lo tanto, en la invención, también se incluye un anticuerpo sometido a dicha modificación, y una variante de eliminación en la que se han eliminado uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada, una variante obtenida por la amidación de la variante de eliminación (por ejemplo, una cadena pesada en la que se ha amidado el resto de prolina carboxilo terminal) y similares pueden indicarse como ejemplo. El tipo de variante de eliminación que tiene una eliminación en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la invención no se limita a las variantes anteriores siempre que se conserven la afinidad de unión al antígeno y la función efectora. Las dos cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de acuerdo con la invención pueden ser de un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en una cadena pesada de longitud completa y la variante de eliminación descrita anteriormente, o pueden ser de dos tipos en combinación seleccionados a partir del mismo. La relación de la cantidad de cada variante de eliminación puede verse afectada por el tipo de células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la invención y las condiciones de cultivo, sin embargo, un caso en el que un resto de aminoácido en el extremo carboxilo se ha eliminado en ambos de las dos cadenas pesadas contenidas como componentes principales en el anticuerpo de acuerdo con la invención puede indicarse como ejemplo.

Puede indicarse como ejemplo un isótopo del anticuerpo de la invención, por ejemplo, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), y, preferentemente, puede indicarse como ejemplo IgG1 o IgG2.

Como la función del anticuerpo, generalmente una actividad de unión a antígeno, una actividad de neutralización de la actividad de un antígeno, una actividad de potenciación de la actividad de un antígeno, una actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) pueden indicarse como ejemplo. la función del anticuerpo de la invención es una actividad de unión a B7-H3, preferentemente una actividad de fagocitosis mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCP), más preferentemente una actividad citotóxica (actividad antitumoral) frente a célula tumoral mediada por una actividad ADCP. Además, el anticuerpo de la invención puede tener una actividad ADCC y/o una actividad CDC además de una actividad ADCP.

El anticuerpo obtenido puede purificarse hasta homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo pueden realizarse empleando un procedimiento convencional de separación y purificación de proteínas. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse y purificarse seleccionando y combinando adecuadamente cromatografía en columna, filtración en filtro, ultrafiltración, precipitación con sales, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa, electroforesis de enfoque isoelectrico y similares (*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Daniel R. Marshak y col., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero el procedimiento no está limitado a estos.

Los ejemplos de dicha cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción.

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

- 5 Como columna para usar en cromatografía de afinidad, pueden indicarse como ejemplo una columna de Proteína A y una columna de Proteína G. Por ejemplo, como una columna que usa una columna de Proteína A, pueden indicarse como ejemplo Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) y similares.

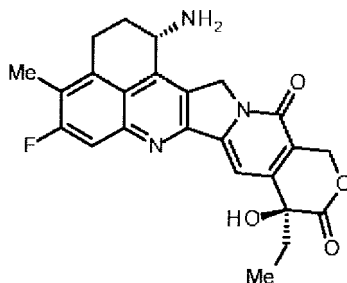
Además, usando un vehículo que tiene un antígeno inmovilizado sobre él, el anticuerpo también puede purificarse usando la propiedad de unión del anticuerpo al antígeno.

10 [Compuesto antitumoral]

Se explica el compuesto antitumoral que se conjugará con el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención. El compuesto antitumoral no está particularmente limitado si el mismo es un compuesto que tiene un efecto antitumoral y un grupo sustituyente o una estructura parcial que permite conectar con una estructura de enlazador. Cuando una parte o la totalidad de un enlazador se escinde en células tumorales, el resto de compuesto antitumoral se libera para mostrar el efecto antitumoral del compuesto antitumoral. Cuando el enlazador se escinde en una posición de conexión a fármaco, el compuesto antitumoral se libera en su estructura intrínseca para mostrar su efecto antitumoral intrínseco.

Los ejemplos del compuesto antitumoral pueden incluir doxorrubicina, daunorrubicina, mitomicina C, bleomicina, ciclocitidina, vincristina, vinblastina, metotrexato, agente antitumoral a base de platino (cisplatino o derivados del mismo), taxol o derivados del mismo, y camptotecina o derivados de la misma (agente antitumoral descrito en la patente japonesa abierta a inspección pública n.º 6-87746). En el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención, puede usarse preferentemente exatecán como un derivado de camptotecina (((1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-10,13(9H,15H)-diona; mostrada en la siguiente fórmula).

[Fórmula 43]



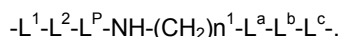
25 Pese a tener un efecto antitumoral excelente, exatecán no se ha comercializado como un fármaco antitumoral. El compuesto puede obtenerse fácilmente mediante un procedimiento conocido y el grupo amino en la posición 1 puede usarse preferentemente como una posición de conexión a la estructura de enlazador. Además, aunque exatecán también puede liberarse en células tumorales mientras parte del enlazador sigue estando unida al mismo, este es un compuesto excelente que muestra un efecto antitumoral excelente incluso en tal caso.

30 Con respecto al conjugado de anticuerpo - fármaco, el número de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo es un factor clave que tiene influencia sobre la eficacia y la seguridad. La producción del conjugado de anticuerpo - fármaco se realiza definiendo la condición de reacción incluyendo las cantidades de uso de materiales de partida y reactivos para la reacción con el fin de tener un número constante de moléculas de fármaco conjugadas, una mezcla que contiene diferentes números de moléculas de fármaco conjugadas se obtiene generalmente a diferencia de la reacción química de un compuesto de bajo peso molecular. El número de fármacos conjugados en una molécula de anticuerpo se expresa o especifica mediante el valor promedio, es decir, el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas. A menos que específicamente se describa lo contrario como un principio, el número de moléculas de fármaco conjugadas significa un valor promedio excepto en un caso en el que este representa un conjugado de anticuerpo - fármaco que tiene un número específico de moléculas de fármaco conjugadas que se incluye en una mezcla de conjugado de anticuerpo - fármaco que tiene un diferente número de moléculas de fármaco conjugadas. El número de moléculas de exatecán conjugadas con una molécula de anticuerpo es controlable y, como un número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por anticuerpo, pueden unirse aproximadamente de 1 a 10 exatecanos. Preferentemente, este es de 2 a 8 y, más preferentemente, de 3 a 8. Mientras tanto, un experto en la materia puede diseñar una reacción para conjugar un número requerido de moléculas de fármaco con una molécula de anticuerpo basándose en la descripción de los ejemplos de la presente solicitud y puede obtener un anticuerpo conjugado con un número controlado de moléculas de exatecán.

Debido a que exatecán tiene una estructura de camptotecina, se sabe que el equilibrio se desplaza a una estructura con un anillo de lactona cerrado (anillo cerrado) en un medio ácido acuoso (por ejemplo, pH 3 o así) pero este se desplaza a una estructura con un anillo de lactona abierto (anillo abierto) en un medio básico acuoso (por ejemplo, pH 10 o así). También se espera que un conjugado de fármaco que se introduce con un residuo de exatecán que se corresponde con la estructura de anillo cerrado y la estructura de anillo abierto tenga el mismo efecto antitumoral, y no resulta necesario indicar que cualquiera de los mismos está dentro del ámbito de la presente invención.

[Estructura de enlazador]

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

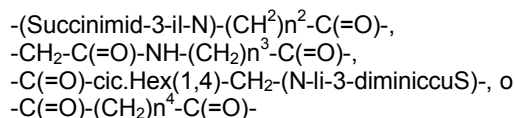


El anticuerpo está conectado al extremo terminal de L^1 (extremo terminal opuesto a la conexión a L^2), y el fármaco antitumoral está conectado al extremo terminal de L^c (extremo terminal opuesto a la conexión a L^b).

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

1. L^1

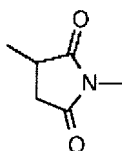
L^1 es un resto en el enlazador representado por la siguiente estructura:



En lo anterior, n^2 es un número entero de 2 a 8, n^3 es un número entero de 1 a 8, y n^4 es un número entero de 1 a 8.

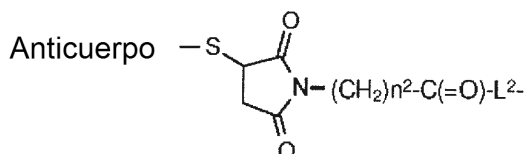
En el enlazador que tiene una estructura representada por $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)n^2-C(=O)-$ de L^1 , " $-(\text{Succinimid-3-il-N})-$ " tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 44]



La posición 3 de la estructura parcial anterior es una posición de conexión al anticuerpo. El enlace al anticuerpo en la posición 3 está caracterizado por unirse con formación de tioéter. Por otra parte, el átomo de nitrógeno en la posición 1 del resto de estructura está conectado al átomo de carbono de metileno que está presente dentro del enlazador que incluye la estructura. Específicamente, $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)n^2-C(=O)-L^2-$ es una estructura representada por la siguiente fórmula (en el presente documento, "anticuerpo-S-" se origina a partir de un anticuerpo).

[Fórmula 45]

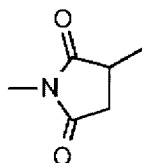


En la fórmula, n^2 es un número entero de 2 a 8 y, preferentemente, de 2 a 5.

En el enlazador que tiene una estructura representada por $-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^3-C(=O)-$ de L^1 , n^3 es un número entero de 1 a 8, preferentemente de 2 a 6. Este enlazador está conectado al anticuerpo en su átomo de carbono del metileno terminal y tiene la siguiente estructura para conectarse mediante formación de tioéter, al igual que con el enlazador anterior (en el presente documento, "anticuerpo-S-" se origina a partir de un anticuerpo). Anticuerpo-S- $CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^3-C(=O)-L^2-$.

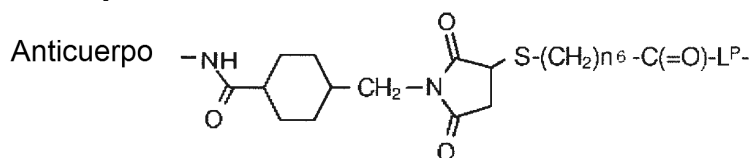
En el enlazador que tiene una estructura representada por $-C(=O)-\text{cic.Hex}(1,4)-CH_2-(N\text{-li-3-diminiccuS})-$ de L^1 , " $-(N\text{-li-3-diminiccuS})-$ " tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 46]



En este resto de estructura, el átomo de nitrógeno en la posición 1 está conectado al átomo de carbono de metileno presente en la estructura de enlazador que contiene esta estructura. El átomo de carbono en la posición 3 está conectado al átomo de azufre terminal de $-S-(CH_2)_n-C(=O)-$ de L^2 en el enlazador. Este resto $-S-(CH_2)_n-C(=O)-$ de L^2 en el enlazador forma una estructura de enlazador combinada solo con $-C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH_2-(N-li-3-diminiccuS)-$ de L^1 en el enlazador. En lo anterior, " $cic.Hex(1,4)-$ " contenido en el enlazador representa un grupo 1,4-ciclohexileno. En el enlazador, $-C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH_2-(N-li-3-diminiccuS)-$ está conectado al anticuerpo con formación de enlace de amida en su carbono de carbonilo terminal (en el presente documento, "anticuerpo-NH-" se origina a partir de un anticuerpo).

[Fórmula 47]



el grupo amino del anticuerpo para esta formación de enlace de amida es el grupo amino terminal de una cadena lateral de un residuo de lisina en el anticuerpo o un grupo amino en el N terminal del anticuerpo. Dicho enlazador de una estructura puede conectarse formando un enlace de éster con el grupo hidroxilo de un aminoácido en el anticuerpo que no sea tal enlace de amida.

El resto de estructura " $cic.Hex(1,4)-$ " contenido en dicho enlazador puede ser un grupo alquileo cíclico saturado divalente que no sea el grupo 1,4-ciclohexileno, es decir, un grupo hidrocarburo saturado cíclico divalente tal como un grupo ciclobutileno, un grupo ciclopentileno, un grupo cicloheptileno o un grupo ciclooctileno, un grupo hidrocarburo aromático divalente tal como un grupo fenileno o un grupo naftileno, o un grupo heterocíclico divalente aromático, parcialmente saturado o saturado de 5 o 6 miembros que contiene 1 o 2 heteroátomos. Como alternativa, este resto puede ser un grupo alquileo divalente que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. La conexión al grupo divalente puede tener lugar en posiciones adyacentes o en posiciones distantes.

En el enlazador que tiene una estructura representada por $-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-$ como L^1 , n^4 es un número entero de 1 a 8 y, preferentemente, de 2 a 6. Este enlazador también está conectado mediante formación de enlace de amida en su grupo carbonilo terminal con un grupo amino del anticuerpo, al igual que con los enlazadores mencionados anteriormente (véase la siguiente fórmula; en la estructura de la misma, "anticuerpo-NH-" se origina a partir de un anticuerpo).

anticuerpo-NH-C(=O)-(CH₂)_n⁴-C(=O)-L².

Ejemplos específicos de L^1 en el enlazador pueden incluir

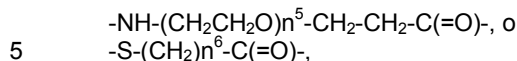
$-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-CH_2C(=O)NH-CH_2-C(=O)-$,
 $-CH_2C(=O)NH-CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-CH_2C(=O)NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-CH_2C(=O)NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-CH_2C(=O)NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH_2-(N-li-3-diminiccuS)-$
 $-C(=O)-aril-CH_2-(N-li-3-diminiccuS)-$
 $-C(=O)-cic.Het-CH_2-(N-li-3-diminiccuS)-$
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-C(=O)-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-C(=O)-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-C(=O)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
 $-C(=O)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$.

(Arilo representa un grupo hidrocarburo aromático divalente, y $cic.Het$ representa un grupo cíclico heterocíclico)

divalente).

2. L^2

L^2 es un enlazador representado por la siguiente estructura:

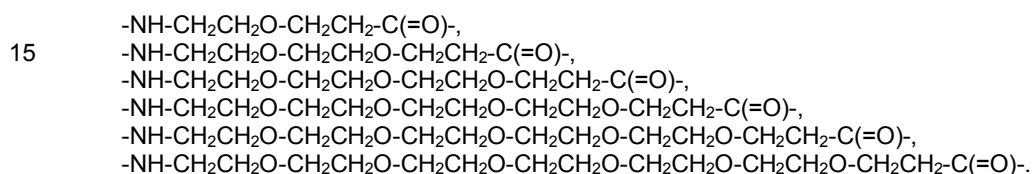


L^2 puede no estar presente, y en un caso de este tipo, L^2 es un enlace sencillo. En lo anterior, n^5 es un número entero de 1 a 6, y n^6 es un número entero de 1 a 6.

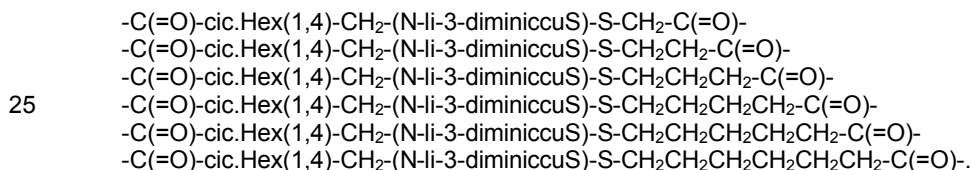
10 En el enlazador que tiene una estructura de $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ como L^2 , n^5 es un número entero de 1 a 6 y, preferentemente, de 2 a 4. Este resto en el enlazador está conectado a L^1 en su grupo amino terminal y está conectado a L^P en su grupo carbonilo en el otro extremo terminal.

En el enlazador que tiene una estructura de $-\text{S}-(\text{CH}_2)^{n^6}-\text{C}(=\text{O})-$ como L^2 , n^6 es un número entero de 1 a 6 y, preferentemente, de 2 a 4.

Ejemplos específicos de L^2 pueden incluir



20 Cuando L^2 es $-\text{S}-(\text{CH}_2)^{n^6}-\text{C}(=\text{O})-$, L^1 que se va a combinar con el mismo es $-\text{C}(=\text{O})-\text{cic.Hex}(1,4)-\text{CH}_2-(\text{N-li-3-diminiccuS})-$. Ejemplos específicos de $-L^1-L^2-$ pueden incluir



3. L^P

30 El enlazador L^P es un residuo de tetrapéptido de GGFG, que representa un residuo de péptido de $-\text{Gly-Gly-Phe-Gly}-$. El enlazador L^P está conectado a L^2 en su N terminal y está conectado al grupo amino del resto de $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-L^a-L^b-L^c$ del enlazador en su C terminal.

En la estructura representada por $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-$ dentro del enlazador, n^1 es un número entero de 0 a 6 y es preferentemente un número entero de 1 a 5 y, más preferentemente, de 1 a 3. el grupo amino de este resto está conectado al C terminal de L^P en el enlazador.

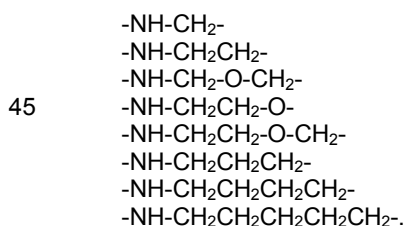
4. L^a

El enlazador L^a está representado por $-\text{O}-$ o es un enlace sencillo.

5. L^b

El enlazador L^b es $-\text{CR}^2(-\text{R}^3)-$ o es un enlace sencillo. En lo anterior, R^2 y R^3 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno.

40 Ejemplos específicos preferidos de la estructura representada por $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-L^a-L^b-$ como el enlazador pueden incluir



50 Ejemplos preferidos adicionales de la misma pueden incluir

-NH-(CH₂)₃-,
 -NH-CH₂-O-CH₂-, y
 -NH-(CH₂)₂-O-CH₂-.

6. L^c

- 5 El enlazador L^c es -C(=O)-. Dicho enlazador está conectado al compuesto antitumoral.

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

- 10 Con respecto al conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención, cuando este se transfiere al interior de células tumorales, el resto de enlazador se escinde y el derivado de fármaco que tiene una estructura representada por NH₂-(CH₂)ⁿ-L^a-L^b-L^c-(NH-DX) se libera para expresar una acción antitumoral. Los ejemplos del derivado antitumoral que muestra un efecto antitumoral liberándose del conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención incluyen un derivado antitumoral que tiene un resto de estructura en el que la estructura representada por -NH-(CH₂)ⁿ-L^a-L^b- del enlazador se une con L^c y tiene un grupo amino terminal, y los particularmente preferidos incluyen los siguientes.

- 15 NH₂-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 NH₂-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 NH₂-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 NH₂-CHCH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

- 20 Mientras tanto, en el caso de NH₂-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), se confirmó que, debido a que la estructura de amina en la molécula es inestable, esta experimenta de nuevo una autodegradación para liberar lo siguiente

HO-CH₂-C(=O)-(NH-DX). Esos compuestos también pueden usarse preferentemente como un intermedio de producción del conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención.

- 25 Para el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención en el que exatecan se usa como un fármaco, es preferible que el resto de estructura de fármaco - enlazador que tiene la siguiente estructura [-L¹-L²-L^p-NH-(CH₂)ⁿ-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)] esté conectado a un anticuerpo. El número conjugado promedio del resto de estructura de fármaco - enlazador por anticuerpo puede ser de 1 a 10. Preferentemente, este es de 2 a 8 y, más preferentemente, de 3 a 8.

- 30 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 35 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 40 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH₂-(N-li-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

- 45 Entre ellos, los más preferidos son los siguientes.

- 50 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 55 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH₂-(N-li-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Los particularmente preferidos son los siguientes.

-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

5 Con respecto a la estructura de enlazador para conjugar el anticuerpo y un fármaco en el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente solicitud, el enlazador preferido puede construirse conectando estructuras preferidas mostradas para cada parte del enlazador anteriormente explicado. Con respecto a la estructura de enlazador, pueden usarse preferentemente los que tienen la siguiente estructura. Mientras tanto, el extremo terminal izquierdo de la estructura es una posición de conexión con el anticuerpo y el extremo terminal derecho es una posición de

10
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
 15 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂O-CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 20 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 CH₂CH₂-C(=O)- -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 25 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)- -C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH₂-(N-li-3-
 diminiccuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

Entre ellos, los más preferidos son los siguientes.

30 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 CH₂CH₂CH₂-C(=O)- -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 35 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)- -C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH₂-(N-li-3-
 diminiccuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

Los particularmente preferidos incluyen los siguientes.

-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

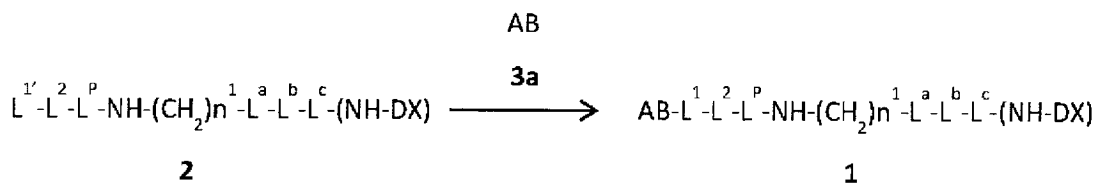
[Procedimiento de producción]

A continuación, se dan explicaciones para el procedimiento representativo para producir el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención o un intermedio de producción del mismo. Mientras tanto, los compuestos se describen en lo sucesivo en el presente documento con el número de compuestos mostrado en cada fórmula de reacción. Específicamente, se hace referencia a los mismos como "compuesto de la fórmula (1)", un "compuesto (1)", o similares. Los compuestos con números que no sean esos también se describen de forma similar.

1. Procedimiento de producción 1

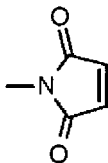
El conjugado de anticuerpo - fármaco representado por la fórmula (1) en el que el anticuerpo se une a la estructura de enlazador por medio de tioéter puede producirse mediante el siguiente procedimiento, por ejemplo.

[Fórmula 48]



[En la fórmula, AB representa un anticuerpo con un grupo sulfhidrilo, y L^1 representa una estructura de enlazador de L^1 en la que el extremo terminal de enlazador es un grupo maleimidilo (fórmula mostrada posteriormente)

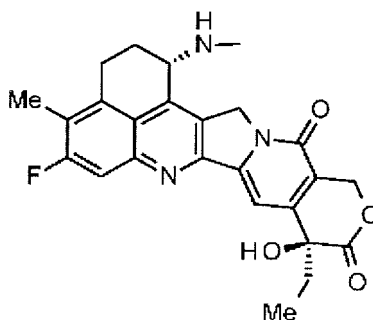
[Fórmula 49]



(en la fórmula, el átomo de nitrógeno es la posición de conexión)

- 5 o el extremo terminal es halógeno, y representa un grupo en el que el resto de -(Succinimid-3-il-N)- en -(Succinimid-3-il-N)-(CH₂)ⁿ-C(=O)- de L^1 es un grupo maleimidilo o un grupo halógeno-CH₂C(=O)NH-(CH₂)ⁿ-C(=O)- en el que el metileno terminal en -CH₂C(=O)NH-(CH₂)ⁿ-C(=O)- de L^1 se halogena para formar haloacetamida. Además, el -(NH-DX) representa una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 50]



y este representa un grupo que se obtiene retirando un átomo de hidrógeno del grupo amino en la posición 1 de exatecán.

- 10 Además, el compuesto de la fórmula (1) en la fórmula de reacción anterior se describe como una estructura en la que un resto de estructura desde el fármaco hasta el extremo terminal de enlazador conecta con un anticuerpo. Sin embargo, la descripción solo se da por razones de conveniencia, y en realidad hay muchos casos en los que una pluralidad de los restos de estructura están conectados a una molécula de anticuerpo. Esto mismo es de aplicación a la explicación del procedimiento de producción descrito posteriormente.]

- 15 Específicamente, el conjugado de anticuerpo - fármaco (1) puede producirse haciendo reaccionar el compuesto (2), que puede obtenerse mediante el procedimiento descrito posteriormente, con el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo.

- 20 El anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo puede obtenerse mediante un procedimiento bien conocido en la técnica (Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, págs. 56-136, págs. 456-493, Academic Press (1996)). Los ejemplos incluyen: reactivo de Traut se hace reaccionar con el grupo amino del anticuerpo; S-acetiltoalcanoatos de N-succinimidilo se hacen reaccionar con el grupo amino del anticuerpo seguido de reacción con hidroxilamina; después de hacerse reaccionar con 3-(piridilditio)propionato de N-succinimidilo, el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor; el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor tal como ditiotretol, 2-mercaptoetanol y clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para reducir el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo para formar un grupo sulfhidrilo, aunque sin limitarse al mismo.

- 25 Específicamente, usando de 0,3 a 3 equivalentes molares de TCEP como un agente reductor por disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo y haciéndolo reaccionar con el anticuerpo en una solución tampón que contiene un agente quelante, puede obtenerse el anticuerpo con un disulfuro parcial o completamente reducido en una parte de bisagra en el anticuerpo. Los ejemplos del agente quelante incluyen ácido etileno diamina tetraacético (EDTA) y ácido dietilenotriamina pentaacético (DTPA). Este puede usarse a una concentración de 1 mM a 20 mM. Los ejemplos de la solución tampón que puede usarse incluyen una solución de fosfato sódico, borato sódico o acetato sódico. Como ejemplo específico, haciendo reaccionar el anticuerpo con TCEP de 4 °C a 37 °C durante de 1 a 4 horas, puede obtenerse el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo parcial o completamente reducido.

- 35 Mientras tanto, realizando la reacción para añadir un grupo sulfhidrilo a un resto de fármaco - enlazador, el resto de fármaco - enlazador puede conjugarse mediante un enlace de tioéter.

A continuación, usando de 2 a 20 equivalentes molares del compuesto (2) por anticuerpo (3a) que tiene un grupo

sulfhidrido, puede producirse el conjugado de anticuerpo - fármaco (1) en el que están conjugadas de 2 a 8 moléculas de fármaco por anticuerpo. Específicamente, es suficiente que la solución que contiene el compuesto (2) disuelto en la misma se añada a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrido para la reacción. En el presente documento, los ejemplos de la solución tampón que puede usarse incluyen solución de acetato sódico, fosfato sódico y borato sódico. El pH para la reacción es de 5 a 9 y, más preferentemente, la reacción se realiza cerca de pH 7. Los ejemplos del disolvente para disolver el compuesto (2) incluyen un disolvente orgánico tal como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetil acetamida (DMA) y N-metil-2-piridona (NMP). Es suficiente que la solución de disolvente orgánico que contiene el compuesto (2) disuelto en la misma se añada a 1 a 20 % v/v a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrido para la reacción. La temperatura de reacción es de 0 a 37 °C, más preferentemente de 10 a 25 °C, y el tiempo de reacción es de 0,5 a 2 horas. La reacción puede terminarse desactivando la reactividad del compuesto sin reaccionar (2) con un reactivo que contiene tiol. Los ejemplos del reactivo que contiene tiol incluyen cisteína y N-acetil-L-cisteína (NAC). De manera más específica, se añaden de 1 a 2 equivalentes molares de NAC al compuesto (2) usado e, incubando a temperatura ambiente durante de 10 a 30 minutos, puede terminarse la reacción.

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

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

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

Procedimiento común B: Medición de concentración de anticuerpo

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

Procedimiento común C-1: Intercambio de tampón para anticuerpo

Una columna NAP-25 (n.º de cat. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) usando vehículo Sephadex G-25 se equilibró con tampón de fosfato (10 mM, pH 6,0) (a lo que se hace referencia como PBS6,0/EDTA en la memoria descriptiva) que contiene cloruro sódico (137 mM) y ácido etilen diamina tetraacético (EDTA, 5 mM) de acuerdo con el procedimiento definido por el manual de instrucciones del fabricante. Una solución acuosa del anticuerpo se aplicó en una cantidad de 2,5 ml a una única columna NAP-25, y entonces se recogió la fracción (3,5 ml) eluyendo con 3,5 ml de PBS6,0/EDTA. La fracción resultante se concentró mediante el procedimiento común A. Después de la medición de la concentración del anticuerpo usando el procedimiento común B, la concentración de anticuerpo se ajustó a 10 mg/ml usando PBS6,0/EDTA.

Procedimiento común C-2: Intercambio de tampón para anticuerpo

Una columna NAP-25 (n.º de cat. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) usando vehículo Sephadex G-25 se equilibró con tampón de fosfato (50 mM, pH 6,5) (a lo que se hace referencia como PBS6,5/EDTA en la memoria descriptiva) que contiene cloruro sódico (50 mM) y EDTA (2 mM) de acuerdo con el procedimiento definido por el fabricante. Una solución acuosa del anticuerpo se aplicó en una cantidad de 2,5 ml a una única columna NAP-25, y entonces se recogió la fracción (3,5 ml) eluyendo con 3,5 ml de PBS6,5/EDTA. La fracción resultante se concentró mediante el procedimiento común A. Después de la medición de la concentración del anticuerpo usando el procedimiento común B, la concentración de anticuerpo se ajustó a 20 mg/ml usando PBS6,5/EDTA.

Procedimiento común D-1: Purificación del conjugado de anticuerpo - fármaco

Una columna NAP-25 se equilibró con cualquier tampón seleccionado de entre tampón de fosfato comercialmente disponible (PBS7,4, n.º de cat. 10010-023, Invitrogen), tampón de fosfato sódico (10 mM, pH 6,0; a lo que se hace referencia como PBS6,0) que contiene cloruro sódico (137 mM), y tampón de acetato que contiene sorbitol (5 %) (10 mM, pH 5,5; a lo que se hace referencia como ABS en la memoria descriptiva). Una solución acuosa de la reacción de conjugado de anticuerpo - fármaco se aplicó en una cantidad de aproximadamente 1,5 ml a la columna NAP-25, y entonces se eluyó con el tampón en una cantidad definida por el fabricante para recoger la fracción de anticuerpo. La fracción recogida se aplicó de nuevo a la columna NAP-25 y, repitiendo de 2 a 3 veces en total el proceso de purificación de filtración en gel para eluir con tampón, se obtuvo el conjugado de anticuerpo - fármaco excluyendo enlazador de fármaco no conjugado y un compuesto de bajo peso molecular, clorhidrato de (tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), N-acetil-L-cisteína (NAC) y dimetilsulfóxido). Procedimiento común E: Medición de concentración de anticuerpo en conjugado de anticuerpo - fármaco y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo.

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

- Debido a que la absorbancia total a cualquier longitud de onda es igual a la suma de la absorbancia de cada una de las especies químicas que absorben luz que están presentes en un sistema [aditividad de absorbancia], cuando los coeficientes de absorción molar del anticuerpo y el fármaco permanecen sin cambios antes y después de la conjugación entre el anticuerpo y el fármaco, la concentración de anticuerpo y la concentración de fármaco en el conjugado de anticuerpo - fármaco se expresan con las siguientes ecuaciones.

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A \quad \text{Ecuación (1)}$$

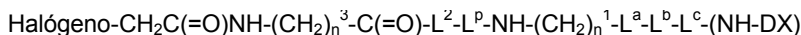
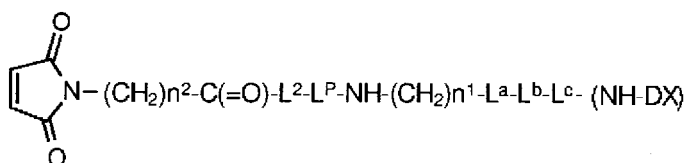
$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370}C_D + \epsilon_{A,370}C_A \quad \text{Ecuación (2)}$$

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

- Con respecto a $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,370}$, $\epsilon_{D,280}$, y $\epsilon_{D,370}$ en lo anterior, se usan valores previamente preparados (valor estimado basándose en el valor de cálculo o de medición obtenido mediante medición UV del compuesto). Por ejemplo, $\epsilon_{A,280}$ puede estimarse a partir de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo usando un procedimiento de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). $\epsilon_{A,370}$ es generalmente cero. $\epsilon_{D,280}$ y $\epsilon_{D,370}$ pueden obtenerse basándose en la ley de Lambert-Beer (Absorbancia = concentración molar x coeficiente de absorción molar x longitud de ruta celular) midiendo la absorbancia de una solución en la que el precursor de conjugado que se va a usar se disuelve a una determinada concentración molar. Midiendo A_{280} y A_{370} de una solución acuosa del conjugado de anticuerpo - fármaco y resolviendo las ecuaciones simultáneas (1) y (2) usando los valores, pueden obtenerse C_A y C_D . Además, al dividir C_D entre C_A , puede obtenerse el número promedio de fármaco conjugado por anticuerpo.

El compuesto representado por la fórmula (2) en el procedimiento de producción 1 es cualquier compuesto representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 51]



- En la fórmula, n^1 , n^2 , n^3 , L^2 , L^P , L^a , L^b , y L^c son como ya se ha definido, y L^c es una posición de conexión para el fármaco.

- En un intermedio útil en la producción de tal compuesto de la presente invención, preferentemente, n^2 es un número entero de 2 a 5, L^2 es $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n^5\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ o un enlace sencillo, n^5 es un número entero de 2 a 4, L^P es GGFG, y $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_n^1\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-L}^c\text{-}$ es una estructura parcial de $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ o $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$. El halógeno es preferentemente bromo o yodo. Ejemplos específicos de estos compuestos pueden incluir los siguientes [en el presente documento, (maleimid-N-il) representa un grupo maleimidilo (grupo 2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-ilo)].

- (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$

- (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 5 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 10 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 15 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
 C(=O)-(NH-DX)
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 20 CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 25 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 30 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 35 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

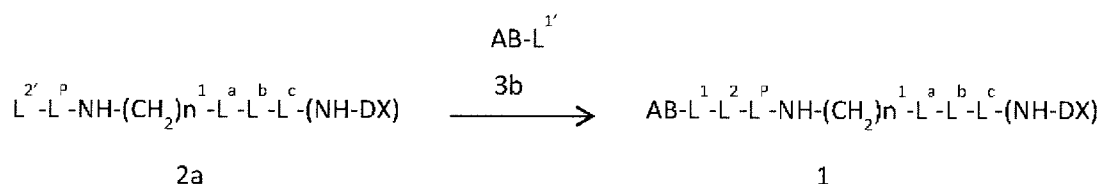
En la fórmula, X representa un átomo de bromo o un átomo de yodo. Todos estos compuestos de bromo y de yodo pueden usarse preferentemente como intermedios de producción.

- Con el fin de asegurar la cantidad del conjugado, se pueden mezclar una pluralidad de conjugados obtenidos en condiciones de producción similares para tener un número equivalente de fármacos (por ejemplo, aproximadamente ± 1) para preparar nuevos lotes. En este caso, el número promedio de fármacos cae entre los números promedio de fármacos en los conjugados antes del mezclado.

2. Procedimiento de producción 2

- El conjugado de anticuerpo - fármaco representado por la fórmula (1) en el que el anticuerpo está conectado por medio de un grupo amida a un enlazador y que tiene un enlace de tioéter dentro del enlazador, específicamente, una estructura en la que $-L^1-L^2-$ es $-C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH_2-(N-li-3-diminiccuS)-S-(CH_2)^n-C(=O)-$, también puede producirse mediante el siguiente procedimiento.

[Fórmula 52]

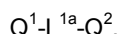


- En la fórmula, $AB-L^{1'}$ representa un grupo en el que el anticuerpo y el enlazador L^1 están conectados y, además, el extremo terminal de L^1 se convierte en un grupo N-maleimidilo. Este grupo tiene específicamente una estructura en la que $-(N-li-3-diminiccuS)-$ en $AB-C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH_2-(N-li-3-diminiccuS)-$ se convierte en un grupo maleimidilo. $L^{2'}$ representa un grupo $HS-(CH_2)^n-C(=O)-$ en el que el extremo terminal es un grupo mercapto, y AB representa el

anticuerpo.

Específicamente, el conjugado de anticuerpo - fármaco (1) puede producirse haciendo reaccionar el compuesto (2a), que puede obtenerse mediante el procedimiento descrito posteriormente, con el anticuerpo (3b) que está conectado al enlazador que tiene un grupo maleimidilo.

- 5 El anticuerpo (3b) que tiene un grupo maleimidilo también puede obtenerse mediante un procedimiento bien conocido en la técnica (Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, págs. 56-136, págs. 456-493, Academic Press (1996)). Los ejemplos incluyen: un enlazador bifuncional, tal como succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), que es capaz de unirse a un grupo amino o un grupo hidroxilo y tiene un grupo maleimidilo se deja reaccionar en el grupo amino del ligando para introducir un grupo maleimidilo, aunque sin limitarse al mismo.
- 10 Por ejemplo, puede usarse preferentemente un compuesto que tiene un resto reactivo con grupo amino y un resto reactivo con grupo tiol unido por medio de un enlazador. En este caso, el resto reactivo con grupo amino puede ser éster activo, éster de imida, o similares, y el resto reactivo con tiol puede ser maleimidilo, haluro de acetilo, haluro de alquilo, ditiopiridilo, o similares.
- 15 Como un procedimiento para construir el enlazador con grupo amino o grupo hidroxilo de un aminoácido que constituye el anticuerpo, particularmente por medio de un enlace de amida con el grupo amino, el compuesto que se va a hacer reaccionar en primer lugar con el anticuerpo puede ser un compuesto representado por la siguiente fórmula:



- 20 [En la fórmula, Q^1 representa (pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-, (3-sulfo-pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-, R^Q -O-C(=N)- u O=C=N-, L^{1a} representa -cic.Hex(1,4)-CH₂-, un grupo alquileo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un grupo fenileno, -(CH₂)^{n⁴}-C(=O)-, -(CH₂)^{n^{4a}}-NH-C(=O)-(CH₂)^{n^{4b}}-, o-(CH₂)^{n^{4a}}-NH-C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH₂-, Q^2 representa (maleimid-N-ilo), un átomo de halógeno o -S-S-(2-piridilo), R^Q representa un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono,
- 25 ^{n⁴} representa un número entero de 1 a 8, ^{n^{4a}} representa un número entero de 0 a 6, y ^{n^{4b}} representa un número entero de 1 a 6.]

En lo anterior, R^Q es un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono y, más preferentemente, un grupo metilo o un grupo etilo.

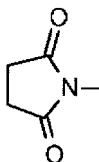
- 30 El grupo alquileo de L^{1a} puede ser uno que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. El grupo fenileno puede ser de cualquiera de las configuraciones orto, meta y para y, más preferentemente, es un grupo para- o meta-fenileno.

Los ejemplos preferidos de L^{1a} pueden incluir -cic.Hex(1,4)-CH₂-, -(CH₂)₅-NH-C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH₂-, -(CH₂)₂-NH-C(=O)-CH₂-, -(CH₂)₅-NH-C(=O)-(CH₂)₂-, -CH₂-, -(CH₂)₂-, -(CH₂)₃-, -(CH₂)₅-, -(CH₂)₁₀-, -(para-Ph)-, -(meta-Ph)-, -(para-Ph)-CH(-CH₃)-, -(CH₂)₃-(meta-Ph)- y -(meta-Ph)-NH-C(=O)-CH₂-.

- 35 Q^1 es preferentemente (pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-, Q^2 es preferentemente (maleimid-N-ilo), o puede usarse -S-S-(2-piridil) cuando se va a formar un enlace de disulfuro.

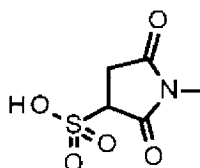
En lo anterior, (pirrolidina-2,5-diona-N-il)- es un grupo representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 53]



en la que el átomo de nitrógeno como una posición de conexión, y (3-sulfo-pirrolidina-2,5-diona-N-il)- es un grupo representado por la siguiente fórmula:

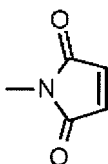
[Fórmula 54]



en la que el átomo de nitrógeno es una posición de conexión, y este ácido sulfónico es capaz de formar una sal de litio, sal de sodio o sal de potasio, y preferentemente sal de sodio,

cic.Hex(1,4) representa un grupo 1,4-ciclohexileno, (maleimid-N-il) es un grupo representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 55]



en la que el átomo de nitrógeno es una posición de conexión, (2-piridil) representa un grupo 2-piridilo, (para-Ph) representa un grupo para-fenileno, y (meta-Ph) representa un grupo meta-fenileno.

Los ejemplos de tal compuesto incluyen sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidilmetil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidilmetil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), éster N-succinimidílico del ácido κ -maleimidil undecanoico (KMUA), éster N-succinimidílico del ácido γ -maleimidil butírico (GMBS), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido ϵ -maleimidil caproico (EMCS), éster de m-maleimidilbenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α -maleimidilacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidilpropionamida)hexanoato (SMPH), N-succinimidil 4-(p-maleimidilfenil)-butirato (SMPB), N-(p-maleimidilfenil)isocianato (PMPI), N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA), 3-(bromoacetamida)propionato de N-succinimidilo (SBAP), N-succinimidil-3-(2-piridoditio)propionato (SPDP) y succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-piridiliditio)tolueno (SMPT).

Específicamente, por ejemplo, haciendo reaccionar de 2 a 6 equivalentes de SMCC con el anticuerpo (3) en un tampón de fosfato de pH 6 a 7 a temperatura ambiente durante de 1 a 6 horas, el éster activo de SMCC puede reaccionar con el anticuerpo para producir el anticuerpo (3b) que tiene un grupo maleimidilo. El anticuerpo obtenido (3b) puede purificarse mediante el procedimiento común D-2 descrito posteriormente, y usarse para la siguiente reacción con el compuesto (2a).

Procedimiento común D-2: Purificación de anticuerpo derivatizado con 4-(N-maleimidilmetil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC)

Una columna NAP-25 se equilibró con PBS6,5/EDTA. La solución de reacción que contiene el anticuerpo derivatizado con 4-(N-maleimidilmetil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (al que se hace referencia en el presente documento como SMCC) se aplicó en una cantidad de aproximadamente 0,5 ml a la columna NAP-25, y entonces se eluyó con el tampón en una cantidad definida por el fabricante para recoger la fracción de anticuerpo para la purificación.

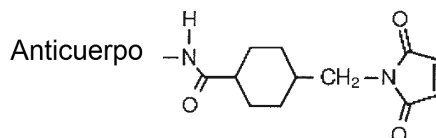
el grupo amino del anticuerpo para conectar con el enlazador puede ser un grupo amino N-terminal y/o un grupo amino portado por un residuo de lisina, aunque sin limitarse al mismo. Como alternativa, el anticuerpo puede conectarse al enlazador con formación de enlace de éster mediante el uso de un grupo hidroxil portado por un residuo de serina.

La reacción del compuesto (2a) con el anticuerpo (3b) conectado al enlazador que tiene un grupo maleimidilo puede realizarse de la misma forma que en el procedimiento para hacer reaccionar el compuesto (2) con el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo tal como se menciona en el procedimiento de producción 1.

Para el conjugado de anticuerpo - fármaco (1) preparado, puede realizarse la concentración, intercambio de tampón, purificación e identificación del conjugado de anticuerpo - fármaco (1) mediante la medición de concentración de anticuerpo y un número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo de la misma forma que en el procedimiento de producción 1.

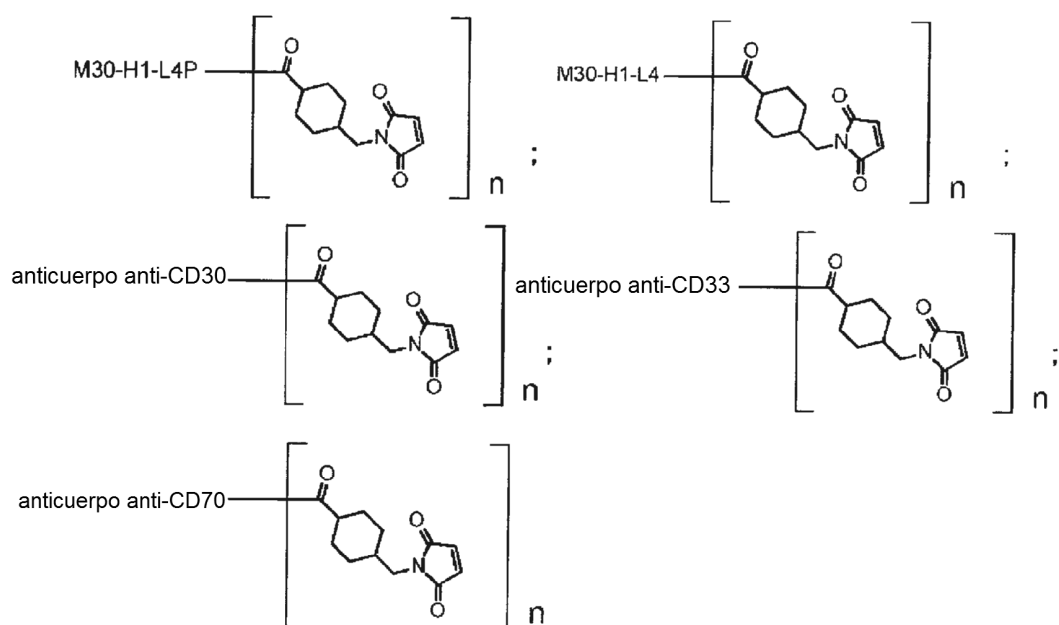
El compuesto representado por la fórmula (3b) en el procedimiento de producción 2 tiene la siguiente estructura (véase la siguiente fórmula; en la estructura de la misma, "anticuerpo -NH-" se origina a partir de un anticuerpo).

[Fórmula 56]



Un compuesto que es un intermedio para producir el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención y tiene la estructura anterior es como se describe a continuación (en la fórmula, n es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 2 a 8 y, más preferentemente, de 3 a 8).

[Fórmula 57]



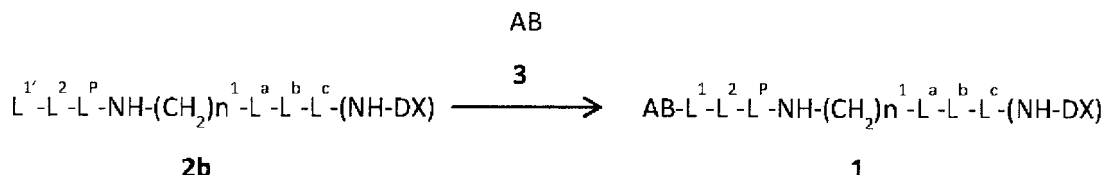
Además, los ejemplos del compuesto de la presente invención en los que el extremo terminal es un grupo mercapto pueden incluir los siguientes.

- HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- 10 HS-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- 15 HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- 20 HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- 25 HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

3. Procedimiento de producción 3

El conjugado de anticuerpo - fármaco representado por la fórmula (1) en el que el anticuerpo está conjugada con el resto de enlazador de fármaco por medio de un enlace de amida puede producirse mediante un procedimiento descrito posteriormente. Por ejemplo, con respecto a $-C(=O)-(CH_2)_n^4-C(=O)-$ de L^1 , su éster activo L^1 , por ejemplo, (pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-(CH₂)_n⁴-C(=O)-, puede usarse preferentemente. Cuando L^2 es un enlace sencillo, el conjugado de anticuerpo - fármaco (1) puede producirse mediante el siguiente procedimiento, por ejemplo.

[Fórmula 58]



Específicamente, el conjugado de anticuerpo - fármaco (1) puede producirse haciendo reaccionar el compuesto (2b), que puede obtenerse mediante el procedimiento descrito posteriormente, con el anticuerpo (3).

El compuesto (2b) es capaz de conectar con el grupo amino o grupo hidroxilo del anticuerpo. El grupo amino y grupo hidroxilo del anticuerpo se refieren a, como se describe en el procedimiento de producción 2, por ejemplo, un grupo amino N-terminal portado por el anticuerpo y/o un grupo amino portado por un residuo de lisina y un grupo hidroxilo portado por un residuo de serina, respectivamente, pero estos no se limitan a los mismos.

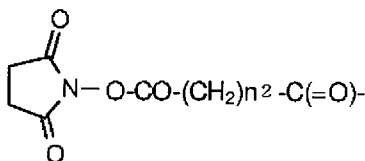
El compuesto (2b) es un éster activo compuesto por un grupo éster N-hidroxisuccinimidílico. Como alternativa, pueden usarse otros ésteres activos, por ejemplo, un grupo éster sulfosuccinimidílico, éster N-hidroxiftalimidílico, éster N-hidroxisulfoftalimidílico, éster orto-nitrofenílico, éster para-nitrofenílico, éster 2,4-dinitrofenílico, éster 3-sulfonyl-4-nitrofenílico, éster 3-carboxi-4-nitrofenílico y éster pentafluorofenílico.

Usando de 2 a 20 equivalentes molares del compuesto (2b) por anticuerpo (3) en la reacción del compuesto (2b) con el anticuerpo(3), puede producirse el conjugado de anticuerpo - fármaco (1) en el que se conjugan de 1 a 10 moléculas de fármaco por anticuerpo. Específicamente, la solución que contiene el compuesto (2b) disuelto en la misma se puede añadir a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3) para la reacción para producir el conjugado de anticuerpo - fármaco (1). En el presente documento, los ejemplos de la solución tampón que puede usarse incluyen solución de acetato sódico, fosfato sódico y borato sódico. El pH para la reacción puede ser de 5 a 9 y, más preferentemente, la reacción se realiza cerca de pH 7. Los ejemplos del disolvente para disolver el compuesto (2b) incluyen un disolvente orgánico tal como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA) y N-metil-2-piridona (NMP). Es suficiente que la solución de disolvente orgánico que contiene el compuesto (2b) disuelto en la misma se añada a 1 a 20 % v/v a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3) para la reacción. La temperatura de reacción es de 0 a 37 °C, más preferentemente de 10 a 25 °C, y el tiempo de reacción es de 0,5 a 20 horas.

Para el conjugado de anticuerpo - fármaco producido (1), puede realizarse la concentración, intercambio de tampón, purificación e identificación del conjugado de anticuerpo - fármaco (1) mediante la medición de concentración de anticuerpo y un número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo de la misma forma que en el procedimiento de producción 1.

El resto (pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-(CH₂)_n⁴-C(=O)- en el procedimiento de producción 3 tiene la siguiente estructura.

[Fórmula 59]



Los ejemplos del compuesto de la presente invención que tiene la estructura parcial anterior pueden incluir los siguientes.

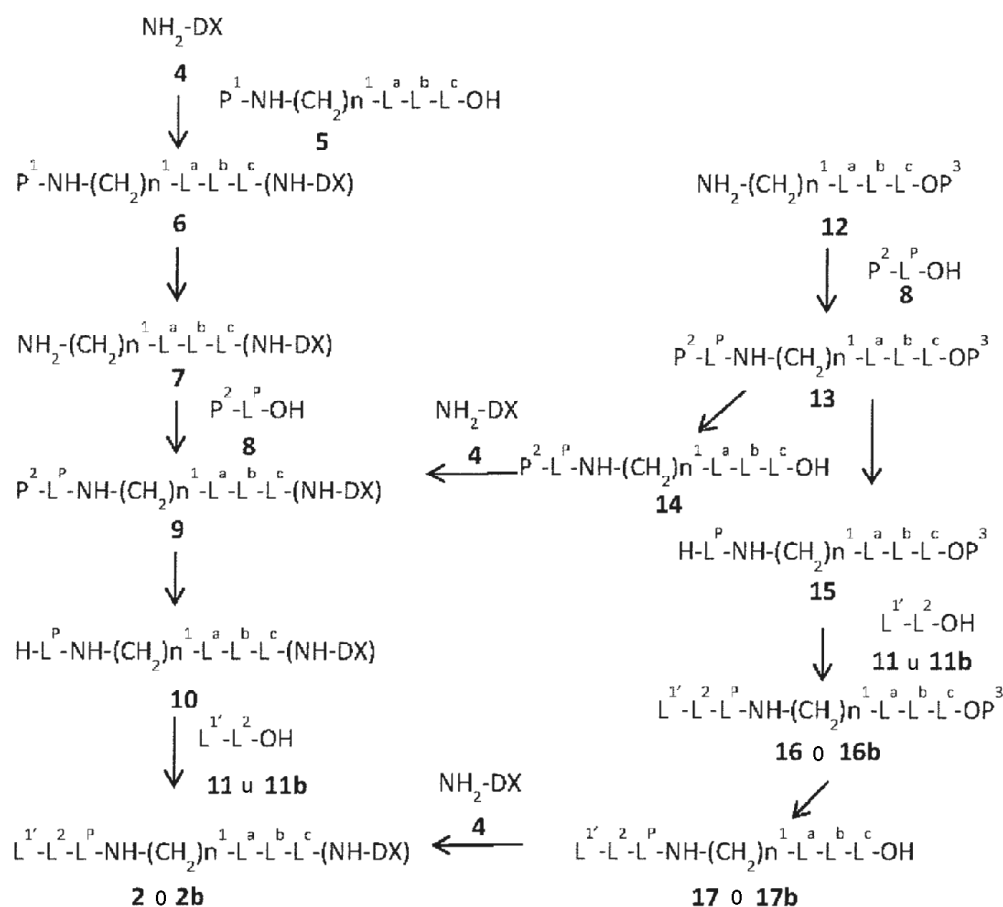
- (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

- (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 5 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 10 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 15 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 20 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
 NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (Pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-
 C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

4. Procedimiento de producción 4

- El compuesto representado por la fórmula (2) o (2b) como un intermedio usado en el procedimiento de producción
 25 previo y una sal farmacológicamente aceptable del mismo puede producirse mediante el siguiente procedimiento,
 por ejemplo.

[Fórmula 60]



En la fórmula, L^c es $-C(=O)-$ y está conectado a $-(NH-DX)$ con formación de enlace de amida, $L^{1'}$ representa una estructura L^1 en la que el extremo terminal se convierte en un grupo maleimidilo o un grupo haloacetilo, o en (pirrolidina-2,5-diona-N-il)-O-C(=O)-(CH₂)_n-C(=O)-, y P^1 , P^2 , y P^3 representan cada uno un grupo protector.

El compuesto (6) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico (5) para dar un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con NH_2-DX [que indica exatecán; nombre químico: (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-diona] (4) o una sal farmacológicamente aceptable del mismo.

Para la reacción pueden emplearse reactivos y condiciones de reacción que se usan habitualmente para la síntesis de péptidos. Hay diversos tipos de éster activo. Por ejemplo, este puede producirse haciendo reaccionar fenoles tales como p-nitrofenol, N-hidroxi benzotriazol, N-hidroxi succinimida, o similares, con el ácido carboxílico (5) usando un agente de condensación tal como N,N'-diciclohexilcarbodiimida o clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Además, el éster activo también puede producirse mediante una reacción del ácido carboxílico (5) con trifluoroacetato de pentafluorofenilo o similares; una reacción del ácido carboxílico (5) con oxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfito de 1-benzotriazolilo; una reacción del ácido carboxílico (5) con cianofosfonato de dietilo (procedimiento de disolución de proteínas por adición de sal); una reacción del ácido carboxílico (5) con trifenilfosfina y disulfuro de 2,2'-dipiridilo (procedimiento de Mukaiyama); una reacción del ácido carboxílico (5) con un derivado de triazina tal como cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM); o similares. Además, la reacción también puede realizarse mediante, por ejemplo, un procedimiento de haluro de ácido mediante el cual el ácido carboxílico (5) se trata con haluro de ácido tal como cloruro de tionilo y cloruro de oxalilo en presencia de una base. Haciendo reaccionar el éster activo, anhídrido de ácido mixto o haluro de ácido del ácido carboxílico (5) obtenido en consecuencia con el compuesto (4) en presencia de una base adecuada en un disolvente inerte de -78 °C a 150 °C, puede producirse el compuesto (6) (paralelamente, "disolvente inerte" indica un disolvente que no inhibe una reacción para la que se usa el disolvente).

Ejemplos específicos de la base usada para cada etapa anteriormente descrita incluyen carbonato de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo, un alcóxido de metal alcalino, hidróxido o hidruro de un metal alcalino incluyendo carbonato sódico, carbonato potásico, etóxido sódico, butóxido potásico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidruro sódico e hidruro potásico, base organometálica representada por un alquil litio incluyendo n-butil-litio, dialquilamino litio incluyendo diisopropilamida de litio; base organometálica de bis-sililamina incluyendo bis(trimetilsilil)amida de litio; y base orgánica incluyendo piridina, 2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, N-metilmorfolina, diisopropiletilamina y diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU).

Los ejemplos del disolvente inerte que se usa para la reacción de la presente invención incluyen un disolvente de hidrocarburo halogenado tal como diclorometano, cloroformo y tetracloruro de carbono; un disolvente de éter tal como tetrahidrofurano, 1,2-dimetoxietano y dioxano; un disolvente de hidrocarburo aromático tal como benceno y tolueno; y un disolvente de amida tal como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida y N-metilpirrolidin-2-ona. Además de estos, se pueden usar, dependiendo de un caso, un disolvente de sulfóxido, tal como dimetilsulfóxido y sulfolano, y un disolvente de cetona tal como acetona y metil etil cetona.

El grupo hidroxilo, grupo carboxi, grupo amino, o similares de L^a y L^b en el compuesto (6) puede protegerse con un grupo protector que se usa habitualmente en la síntesis de compuestos orgánicos, como se menciona posteriormente. Específicamente, los ejemplos del grupo protector para un grupo hidroxilo incluyen un grupo alcoximetilo tal como grupo metoximetilo; un grupo arilmetilo tal como grupo bencilo, grupo 4-metoxibencilo y grupo trifenilmetilo; un grupo alcanóilo tal como grupo acetilo; un grupo aroílo tal como grupo benzoílo; y un grupo sililo tal como grupo terc-butil difenilsililo. El grupo carboxi puede protegerse, por ejemplo, como un éster con un grupo alquilo tal como grupo metilo, grupo etilo y grupo terc-butilo, un grupo alilo, o un grupo arilmetilo tal como grupo bencilo. Un grupo amino puede protegerse con un grupo protector para un grupo amino que se usa generalmente para la síntesis de péptidos, por ejemplo, un grupo alquilo carbonilo tal como grupo terc-butiloxi carbonilo, grupo metoxycarbonilo y grupo etoxycarbonilo; un grupo arilmetilo tal como aliloxycarbonilo, grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo, grupo benciloxi carbonilo, grupo parametoxibenciloxi carbonilo y grupo para (u orto)nitroilbenciloxi carbonilo; un grupo alcanóilo tal como grupo acetilo; un grupo arilmetilo tal como grupo bencilo y grupo trifenil metilo; un grupo aroílo tal como grupo benzoílo; y un grupo aril sulfonilo tal como grupo 2,4-dinitrobenceno sulfonilo o grupo ortonitrobenceno sulfonilo. La protección con y la desprotección del grupo protector pueden realizarse de acuerdo con un procedimiento llevado a cabo habitualmente.

Con respecto al grupo protector P^1 para el grupo amino terminal del compuesto (6), se puede usar un grupo protector para un grupo amino que se usa generalmente para la síntesis de péptidos, por ejemplo, grupo terc-butiloxi carbonilo, grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo y grupo benciloxi carbonilo. Los ejemplos del otro grupo protector para un grupo amino incluyen un grupo alcanóilo tal como grupo acetilo; un grupo alcoxycarbonilo tal como grupo metoxycarbonilo y grupo etoxycarbonilo; un grupo arilmetoxi carbonilo tal como grupo parametoxibenciloxi carbonilo, y grupo para (u orto)nitroilbenciloxi carbonilo; un grupo arilmetilo tal como grupo bencilo y grupo trifenil metilo; un grupo aroílo tal como grupo benzoílo; y un grupo aril sulfonilo tal como grupo 2,4-dinitrobenceno sulfonilo y grupo ortonitrobenceno sulfonilo. El grupo protector P^1 puede seleccionarse dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tiene un grupo amino que se va a proteger.

Desprotegiendo el grupo protector P^1 para el grupo amino terminal del compuesto (6) obtenido, puede producirse el compuesto (7). Los reactivos y condiciones pueden seleccionarse dependiendo del grupo protector.

El compuesto (9) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico peptídico (8) que tiene el N terminal protegido con P^2 para dar un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (7) obtenido. Las condiciones de reacción, reactivos, base y disolvente inerte usados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (8) y el compuesto (7) se pueden seleccionar adecuadamente de entre los descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^2 puede seleccionarse adecuadamente de entre los descritos para el grupo protector del compuesto (6), y la selección se puede realizar basándose en, por ejemplo, las propiedades del compuesto que tiene un grupo amino que se va a proteger. Debido a que el mismo se usa generalmente para la síntesis de péptidos, el compuesto (9) también puede producirse repitiendo secuencialmente la reacción y desprotección del aminoácido o péptido que constituye el ácido carboxílico peptídico (8) para su alargamiento.

Desprotegiendo P^2 como el grupo protector para el grupo amino del compuesto (9) obtenido, puede producirse el compuesto (10). Los reactivos y condiciones pueden seleccionarse dependiendo del grupo protector.

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

El compuesto (9) también puede producirse mediante el siguiente procedimiento, por ejemplo.

El compuesto (13) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico peptídico (8) que tiene el N terminal protegido con P^2 para dar un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto de amina (12) que tiene el grupo carboxi protegido con P^3 en presencia de una base. Las condiciones de reacción, reactivos, base y disolvente inerte usados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (8) y el compuesto (12) se pueden seleccionar adecuadamente de entre los descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^2 para el grupo amino del compuesto (13) puede seleccionarse adecuadamente de entre los descritos para el grupo protector del compuesto (6). Con respecto al grupo protector P^3 para un grupo carboxi, puede usarse un grupo protector usado habitualmente como un grupo protector para un grupo carboxi en la química de síntesis orgánica, en particular, síntesis de péptidos. Específicamente, este puede seleccionarse adecuadamente de entre los descritos para el grupo protector del compuesto (6), por ejemplo, ésteres con un grupo alquilo tal como un grupo metilo, un grupo etilo, o un terc-butilo, ésteres alílicos y ésteres bencílicos. En tal caso, es necesario que el grupo protector para un grupo amino y el grupo protector para un grupo carboxi se puedan retirar mediante un procedimiento diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P^2 es un grupo terc-butiloxi carbonilo y P^3 es un grupo bencilo. Los grupos protectores se pueden seleccionar de entre los mencionados anteriormente, dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tiene un grupo amino y un grupo carboxi que se va a proteger. Para la retirada de los grupos protectores, los reactivos y condiciones pueden seleccionarse dependiendo del grupo protector.

Desprotegiendo el grupo protector P^3 para el grupo carboxi del compuesto (13) obtenido, puede producirse el compuesto (14). Los reactivos y condiciones se seleccionan dependiendo del grupo protector.

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

El compuesto (2) o (2b) también puede producirse mediante el siguiente procedimiento, por ejemplo.

Desprotegiendo el grupo protector P^2 para el grupo amino del compuesto (13), puede producirse el compuesto (15). Los reactivos y condiciones pueden seleccionarse dependiendo del grupo protector.

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

Desprotegiendo el grupo protector para el grupo carboxi del compuesto (16) o (16b) obtenido, puede producirse el compuesto (17) o (17b). Este puede realizarse de forma similar a la desprotección del grupo carboxi para producir el compuesto (14).

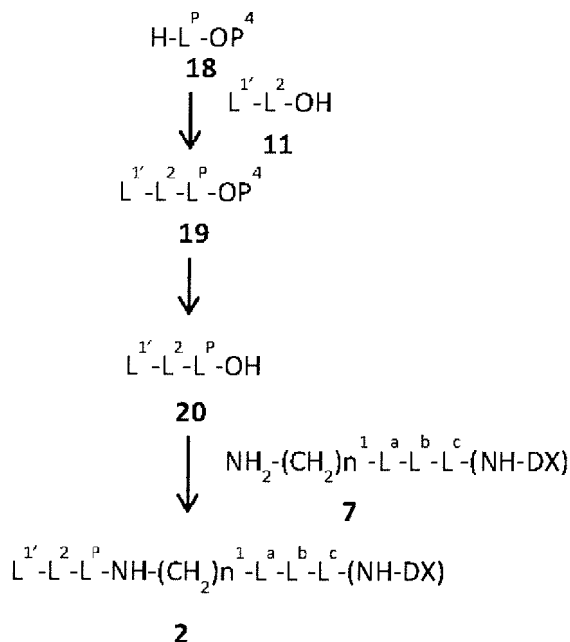
El compuesto (2) o (2b) puede producirse derivatizando el compuesto (17) o (17b) para dar un éster activo, anhídrido

de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, también pueden usarse reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos, y las condiciones de reacción, reactivos, base y disolvente inerte usados para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente de entre los descritos para la síntesis del compuesto (6).

5. Procedimiento de producción 5

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

[Fórmula 61]



En la fórmula, $\text{L}^{1'}$ se corresponde con L^1 que tiene una estructura en la que el extremo terminal se convierte en un grupo maleimidilo o un grupo haloacetilo, y P^4 representa un grupo protector.

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

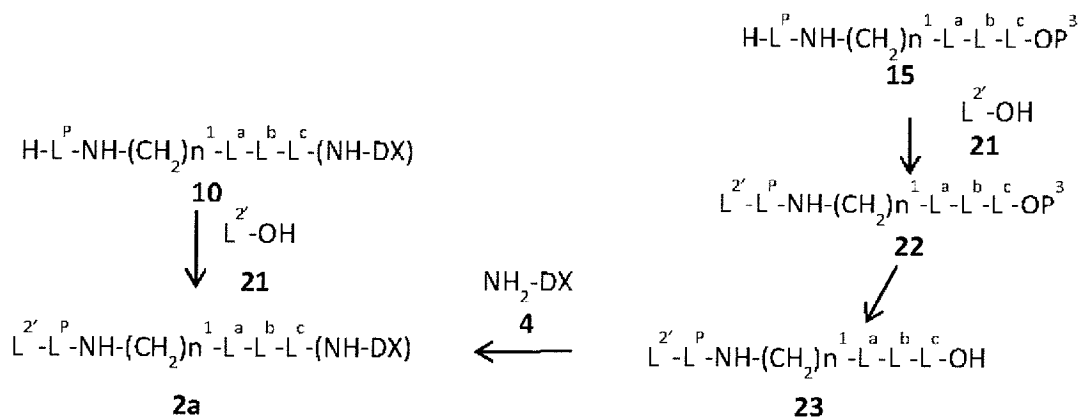
Desprotegiendo el grupo protector para el grupo carboxi del compuesto (19) obtenido, puede producirse el compuesto (20). Esto puede realizarse de forma similar a la desprotección del grupo carboxi para producir el compuesto (14).

- 20 El compuesto (2) puede producirse derivatizando el compuesto (20) obtenido para dar éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (7). Para la reacción, también pueden usarse reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos, y las condiciones de reacción, reactivos, base y disolvente inerte usados para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente de entre los descritos para la síntesis del compuesto (6).

25 6. Procedimiento de producción 6

El intermedio de producción (2a) descrito en el procedimiento de producción 2 en el que $\text{L}^{2'}$ se corresponde con L^2 que tiene una estructura en la que el extremo terminal se convierte en un grupo mercaptoalcanoilo puede producirse mediante el siguiente procedimiento.

[Fórmula 62]



El compuesto (2a) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico (21) que tiene el grupo mercapto terminal para dar un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (10). Para la reacción, también pueden usarse reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos, y las condiciones de reacción, reactivos, base y disolvente inerte usados para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente de entre los descritos para la síntesis del compuesto (4).

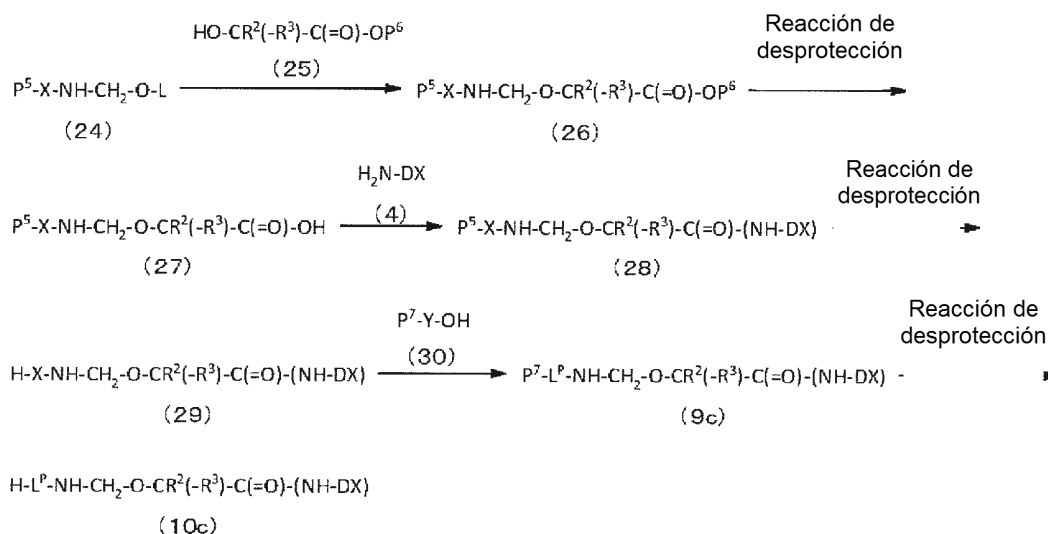
Además, el compuesto (23) puede producirse derivatizando el compuesto (21) para dar un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares, haciéndolo reaccionar con el compuesto (15), y desprotegiendo el grupo protector para el grupo carboxi del compuesto (22) obtenido.

El compuesto (2a) puede producirse derivatizando el compuesto (23) para dar un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, también pueden usarse reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos, y las condiciones de reacción, reactivos, base y disolvente inerte usados para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente de entre los descritos para la síntesis del compuesto (6).

7. Procedimiento de producción 7

En lo sucesivo en el presente documento, se describe con detalle el procedimiento para producir el compuesto (10c) que tiene $n^1 = 1$, $L^a = O$ y $L^b = CR^2(-R^3)$ en el intermedio de producción (10) descrito en el procedimiento de producción 4. El compuesto representado por la fórmula (10c), una sal o un solvato del mismo puede producirse de acuerdo con el siguiente procedimiento, por ejemplo.

[Fórmula 63]



En la fórmula, L^{P} , R^2 , y R^3 son como se han definido anteriormente, L representa un grupo acetilo, un átomo de

hidrógeno, o similares, X e Y representan, cada uno, un oligopéptido que consiste en 1 a 3 aminoácidos, P⁵ y P⁷ representan, cada uno, un grupo protector para un grupo amino, y P⁶ representa un grupo protector para un grupo carboxi.

Un compuesto representado por la fórmula (24) puede producirse usando o aplicando el procedimiento descrito en la patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2002-60351 o la literatura (J. Org. Chem., Vol. 51, página 3196, 1986) y, si es necesario, retirando los grupos protectores o modificando los grupos funcionales. Como alternativa, este también puede obtenerse tratando un aminoácido con un grupo amino terminal protegido o amida de ácido de oligopéptido con un grupo amino protegido con aldehído o cetona.

Haciendo reaccionar el compuesto (24) con el compuesto (25) que tiene un grupo hidroxilo a una temperatura que varía desde con enfriamiento a temperatura ambiente en un disolvente inerte en presencia de un ácido o una base, puede producirse el compuesto (26). Los ejemplos del ácido que puede usarse incluyen ácido inorgánico tal como ácido fluorhídrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácido bórico; un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido paratolueno sulfónico y ácido metano sulfónico; y un ácido de Lewis tal como tetrafluoroborato, cloruro de cinc, cloruro de estaño, cloruro de aluminio y cloruro de hierro. El ácido paratolueno sulfónico es particularmente preferible. Con respecto a la base que se va a usar, puede seleccionarse y usarse adecuadamente una cualquiera de las bases anteriormente mencionadas. Los ejemplos preferidos de las mismas incluyen un alcóxido de metal alcalino tal como terc-butoxido potásico, un hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido sódico e hidróxido potásico; hidruro de metal alcalino tal como hidruro sódico e hidruro potásico; base organometálica representada por dialquilamino litio tal como diisopropilamida de litio; y base organometálica de bis-sililamina tal como bis(trimetilsilil)amida de litio. Los ejemplos del disolvente que se va a usar para la reacción incluyen un disolvente de éter tal como tetrahidrofurano y 1,4-dioxano; y un disolvente de hidrocarburo aromático tal como benceno y tolueno. Esos disolventes pueden prepararse como una mezcla con agua. Además, el grupo protector para un grupo amino como se ilustra mediante P⁵ no está particularmente limitado si este es un grupo usado habitualmente para la protección de un grupo amino. Los ejemplos representativos incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describen en el procedimiento de producción 4. Sin embargo, en la presente reacción, el grupo protector para un grupo amino como se ilustra mediante P⁵ puede retirarse por escisión. En tal caso, es necesario realizar una reacción con un reactivo adecuado para proteger un grupo amino según pueda requerirse.

El compuesto (27) puede producirse retirando el grupo protector P⁶ del compuesto (26). En el presente documento, aunque los ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxi como se ilustra mediante P⁶ se describen en el procedimiento de producción 4, es deseable en este caso que el grupo protector P⁵ para un grupo amino y el grupo protector P⁶ para un grupo carboxi sean los grupos protectores que pueden retirarse mediante un procedimiento diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P⁵ es un grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo y P⁶ es un grupo bencilo. Los grupos protectores pueden seleccionarse dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tiene un grupo amino y un grupo carboxi que se va a proteger. Para la retirada de los grupos protectores, los reactivos y condiciones se seleccionan dependiendo del grupo protector.

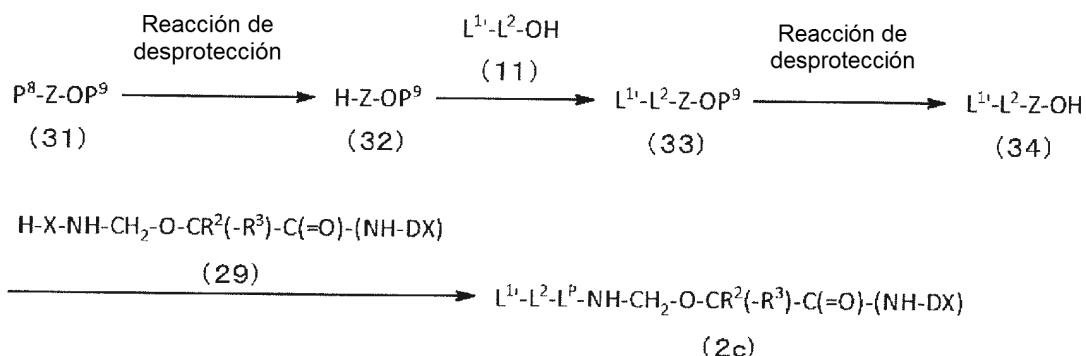
El compuesto (29) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico (27) para dar un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) y una sal farmacológicamente aceptable del mismo para producir el compuesto (28) seguido de retirar el grupo protector P⁵ del compuesto (28) obtenido. Para la reacción entre el compuesto (4) y el ácido carboxílico (27) y la reacción para retirar el grupo protector P⁶, pueden usarse los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el procedimiento de producción 4.

El compuesto (10c) puede producirse haciendo reaccionar el compuesto (29) con un aminoácido con grupo amino terminal protegido o el oligopéptido (30) con un grupo amino protegido para producir el compuesto (9c) y retirando el grupo protector P⁷ del compuesto (9c) obtenido. El grupo protector para un grupo amino como se ilustra mediante P⁷ no está particularmente limitado si este se usa generalmente para la protección de un grupo amino. Los ejemplos representativos del mismo incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describen en el procedimiento de producción 4. Para retirar el grupo protector, los reactivos y condiciones se seleccionan dependiendo del grupo protector. Para la reacción entre el compuesto (29) y el compuesto (30), pueden emplearse reactivos y condiciones de reacción que se usan habitualmente para la síntesis de péptidos. El compuesto (10c) producido mediante el procedimiento anteriormente mencionado puede derivatizarse para dar el compuesto (1) de la presente invención de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito.

8. Procedimiento de producción 8

En lo sucesivo en el presente documento, se describe con detalle el procedimiento para producir el compuesto (2c) que tiene n¹ = 1, L^a = O y L^b = CR²(-R³) en el intermedio de producción (2) descrito en el procedimiento de producción 4. El compuesto representado por la fórmula (2c), una sal o un solvato del mismo puede producirse de acuerdo con el siguiente procedimiento, por ejemplo.

[Fórmula 64]



En la fórmula, L^1 , L^2 , L^p , R^2 , y R^3 son como se han definido anteriormente, Z representa un oligopéptido que consiste en 1 a 3 aminoácidos, P^8 representa un grupo protector para un grupo amino, y P^9 representa un grupo protector para un grupo carboxi.

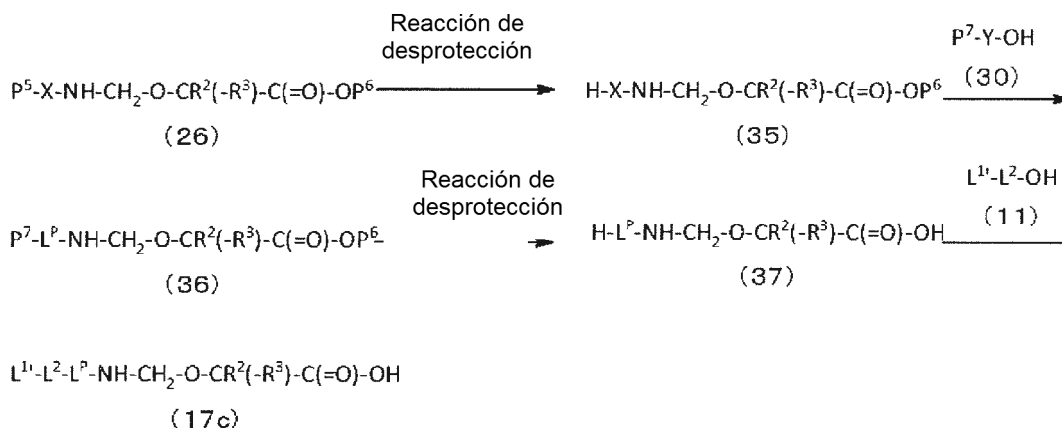
- 5 El compuesto (33) puede producirse retirando el grupo protector P^8 del aminoácido u oligopéptido (31) con grupo amino terminal protegido y grupo carboxi para producir el compuesto (32) y haciendo reaccionar la forma de amina obtenida (32) con el compuesto (11). El grupo protector para un grupo amino como se ilustra mediante P^8 no ésta particularmente limitado si este es un grupo usado habitualmente para la protección de un grupo amino. Los ejemplos representativos incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describen en el procedimiento de producción 4. Además, para retirar el grupo protector P^8 , los reactivos y condiciones pueden seleccionarse dependiendo del grupo protector. Para la reacción entre el compuesto (32) y el ácido carboxílico (11), pueden usarse los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el procedimiento de producción 4.

- 15 El intermedio de producción (2c) puede producirse retirando el grupo protector P^9 del compuesto (33) para producir el compuesto (34) y haciendo reaccionar el ácido carboxílico (34) obtenido con el compuesto (29). Los ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxi como se ilustra mediante P^9 se describen en el procedimiento de producción 4. Para la reacción de desprotección del mismo, pueden usarse los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el procedimiento de producción 4. Para la reacción entre el compuesto (29) y el ácido carboxílico (34), también pueden usarse reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos. El compuesto (2c) producido mediante el procedimiento anteriormente mencionado puede derivatizarse para dar el compuesto (1) de la presente invención de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito.

9. Procedimiento de producción 9

- 25 En lo sucesivo en el presente documento, se describe con detalle el procedimiento para producir el compuesto (17c) que tiene $n^1 = 1$, $L^a = O$ y $L^b = CR^2(-R^3)$ en el intermedio de producción (17) descrito en el procedimiento de producción 4. El compuesto representado por la fórmula (17c), una sal o un solvato del mismo también puede producirse de acuerdo con el siguiente procedimiento, por ejemplo.

[Fórmula 65]



En la fórmula, L^1 , L^2 , L^P , R^2 , R^3 , X , Y , P^5 , P^6 y P^7 son como se han definido anteriormente.

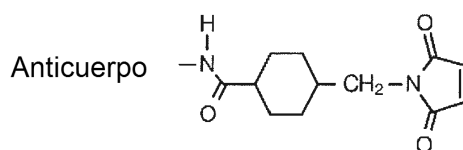
El compuesto (36) puede producirse desprotegiendo el grupo protector P^5 para el grupo amino del compuesto (26) con grupo amino terminal protegido y grupo carboxi para producir el compuesto (35) y haciendo reaccionar la forma de amina obtenida (35) con el oligopéptido (30) con grupo amino terminal protegido o grupo amino protegido. El grupo protector para un grupo amino como se ilustra mediante P^5 no está particularmente limitado si este es un grupo usado habitualmente para la protección de un grupo amino. Los ejemplos representativos incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describen en el procedimiento de producción 4. Además, para retirar el grupo protector P^5 , los reactivos y condiciones pueden seleccionarse dependiendo del grupo protector. En el presente documento, aunque los ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxi como se ilustra mediante P^6 y el grupo protector para un grupo amino como se ilustra mediante P^7 incluyen los grupos protectores para un grupo carboxi y un grupo amino que se describen en el procedimiento de producción 4, es deseable que el grupo protector P^6 para un grupo carboxi y el grupo protector P^7 para un grupo amino sean los grupos protectores que pueden retirarse mediante el mismo procedimiento o las mismas condiciones. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P^6 es un grupo éster bencílico y P^7 es un grupo benciloxi carbonilo.

El compuesto (37) puede producirse retirando el grupo protector P^6 para el grupo carboxi del compuesto (36) y el grupo protector P^7 para el grupo amino del compuesto (36). El compuesto (37) también puede producirse retirando secuencialmente el grupo protector P^6 para el grupo carboxi y el grupo protector P^7 para el grupo amino, o el compuesto (37) puede producirse retirando al mismo tiempo ambos de los grupos protectores P^6 y P^7 que pueden retirarse mediante el mismo procedimiento o las mismas condiciones.

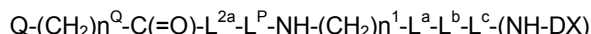
El compuesto (17c) puede producirse haciendo reaccionar el compuesto obtenido (37) con el compuesto (11). Para la reacción entre el compuesto (37) y el compuesto (11), pueden usarse los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el procedimiento de producción 4.

En lo anterior, el compuesto representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 66]



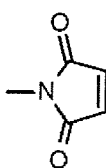
se describe como un intermedio de producción útil para producir el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención. Además, un grupo de compuestos representada por la siguiente fórmula:



también son compuestos que sirven como intermedios de producción útiles para producir el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención.

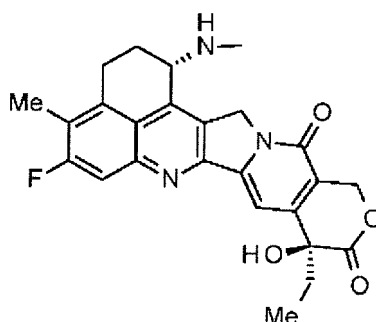
Específicamente, en la fórmula anterior, Q es (maleimid-N-il)-, n^Q es un número entero de 2 a 5, L^{2a} representa $-NH-(CH_2-CH_2-O)_{n^5}-CH_2-CH_2-C(=O)-$ o un enlace sencillo, en el que n^5 representa un número entero de 2 a 4, L^P representa un residuo de tetrapéptido de GGFG, n^1 representa un número entero de 0 a 6, L^a representa $-O-$ o un enlace sencillo, L^b representa $-CR^2(-R^3)-$ o un enlace sencillo, en el que R^2 y R^3 representan, independientemente cada uno, un átomo de hidrógeno, L^c representa $-C(=O)-$, (maleimid-N-il)- es un grupo que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 67]



(en la fórmula, el átomo de nitrógeno es la posición de conexión), y $-(NH-DX)$ es un grupo que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 69]



(en la fórmula, el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición de conexión).

Además, con respecto al $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-}$, un compuesto de $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ o $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ se prefiere como un intermedio de producción. Un compuesto de $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ o $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ es más preferido.

Un compuesto en el que L^{2a} es un enlace sencillo o n^5 es un número entero de 2 a 4 se prefiere como un intermedio de producción.

Un compuesto en el que n^Q es un número entero de 2 a 5, L^{2a} es un enlace sencillo y $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-}$ es $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ o $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ se prefiere como un intermedio de producción. Un compuesto en el que $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-}$ es $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ o $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ es más preferido. Un compuesto en el que n^Q es un número entero de 2 o 5 se prefiere adicionalmente.

Además, un compuesto en el que n^Q es un número entero de 2 a 5, L^{2a} es $\text{-NH-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{n^5}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(=O)-}$, n^5 es un número entero de 2 a 4, y $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-}$ es $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ o $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ se prefiere como un intermedio de producción. Un compuesto en el que n^5 es un número entero de 2 o 4 es más preferido. Un compuesto en el que $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-}$ es $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ o $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ se prefiere adicionalmente.

De manera más específica, los siguientes son compuestos preferidos como intermedios de producción.

(maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$

Mientras tanto, el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención, cuando el mismo se deja al aire o se recristaliza, puede absorber humedad para tener agua de adsorción o convertirse en un hidrato, y también se incluyen en la presente invención tal compuesto y una sal que contiene agua.

Un compuesto etiquetado con diversos isótopos radiactivos o no radiactivos también se incluye en la presente invención. Uno o más átomos que constituyen el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención pueden contener un isótopo atómico en una relación no natural. Los ejemplos del isótopo atómico incluyen deuterio (^2H), tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) y carbono-14 (^{14}C). Además, el compuesto de la presente invención se puede etiquetar radiactivamente con un isótopo radiactivo tal como tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I), carbono-14 (^{14}C), cobre-64 (^{64}Cu), zirconio-89 (^{89}Zr), yodo-124 (^{124}I), flúor-18 (^{18}F), indio-111 (^{111}In), carbono-11 (^{11}C) y yodo-131 (^{131}I). El compuesto etiquetado con un isótopo radiactivo es útil como un agente terapéutico o profiláctico, un reactivo para investigación tal como un reactivo de ensayo y un agente para diagnóstico tal como un agente de obtención de imágenes de diagnóstico *in vivo*. Sin relación con la radiactividad, cualquier tipo de variante de isótopo del conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención está dentro del ámbito de la presente invención.

[Fármacos]

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

- 5 Los ejemplos del tipo de cáncer al que se aplica el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención incluyen cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago o cáncer de esófago, sin embargo, este no se limita a los mismos siempre que sea una célula cancerosa que expresa, en una célula cancerosa como un sujeto de tratamiento, una proteína que puede ser reconocida por el anticuerpo dentro del conjugado de anticuerpo - fármaco.

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

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

El conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención puede administrarse como una composición farmacéutica que contiene al menos un ingrediente farmacéuticamente adecuado.

- 20 Por ejemplo, la composición farmacéutica anterior típicamente contiene al menos un vehículo farmacéutico (por ejemplo, líquido esterilizado), por ejemplo, agua y aceite (crudo de petróleo y aceite de origen animal, origen vegetal u origen sintético (el aceite puede ser, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo o similares)). El agua es un vehículo más típico cuando la composición farmacéutica anterior se administra por vía intravenosa. También pueden usarse solución salina, una solución acuosa de dextrosa y una solución acuosa de glicerol como un vehículo líquido, en particular, para una solución en inyección. Se conoce en la técnica un vehículo farmacéutico adecuado. Si se desea, la composición anterior también puede contener una cantidad traza de un agente humectante, un agente emulsionante o un agente de tamponamiento de pH. Se describen algunos ejemplos de vehículo farmacéutico adecuado en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Las formulaciones se corresponden con un modo de administración.

- 30 Se conocen diversos sistemas de administración, y estos pueden usarse para administrar el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención. Los ejemplos de la ruta de administración incluyen las rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea, pero sin limitarse a las mismas. La administración puede realizarse mediante inyección o inyección en bolo, por ejemplo. De acuerdo con una realización preferida específica, la administración del conjugado de anticuerpo - fármaco se realiza mediante inyección. La administración parenteral es una ruta de administración preferida.

- 35 De acuerdo con una realización representativa, la composición farmacéutica se prescribe, como una composición farmacéutica adecuada para la administración intravenosa a un ser humano, de acuerdo con los procedimientos convencionales. La composición para la administración intravenosa es típicamente una solución en una solución tampón acuosa estéril e isotónica. Si fuera necesario, el fármaco puede contener un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en un sitio de inyección (por ejemplo, lignocaína). Generalmente, el ingrediente anterior se proporciona individualmente como uno cualquiera de polvo liofilizado o un concentrado anhidro contenido en un recipiente que se obtiene mediante sellado en una ampolla o un sobre que tiene una cantidad del agente activo o como una mezcla en una forma de dosificación unitaria. Cuando el fármaco se va a administrar mediante inyección, este puede administrarse a partir de una botella de inyección que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando el fármaco se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril o solución salina para su inyección de tal modo que los ingredientes anteriormente mencionados se mezclan entre sí antes de la administración.

- 50 La composición farmacéutica de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que contiene solo el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención o una composición farmacéutica que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco y al menos un agente para tratar el cáncer que no sea el conjugado. El conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención puede administrarse con otro agente para tratar el cáncer. El efecto anti-cancerígeno puede potenciarse en consecuencia. Otro agente anti-cancerígeno usado para tal fin puede administrarse a un individuo de forma simultánea con, por separado de o subsiguientemente al conjugado de anticuerpo - fármaco, y este puede administrarse al tiempo que se varía el intervalo de administración para cada uno. Los ejemplos del agente para tratar el cáncer incluyen abraxano, carboplatino, cisplatino, gemcitabina, irinotecán (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinorelbina, fármacos descritos en la publicación internacional n.º WO 2003/038043, análogos de LH-RH (leuporelina, goserelina, o similares), fosfato de estramustina, antagonista de estrógenos (tamoxifeno, raloxifeno, o similares), y un inhibidor de la aromatasa (anastrozol, letrozol, exemestano, o similares), pero este no está limitado siempre que el mismo sea un fármaco que tiene una actividad antitumoral.

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

La composición y la concentración de la composición farmacéutica pueden variar dependiendo del procedimiento de administración. Sin embargo, el conjugado de anticuerpo - fármaco contenido en la composición farmacéutica de la presente invención puede mostrar el efecto farmacéutico incluso a una dosificación pequeña cuando el conjugado de anticuerpo - fármaco tiene una afinidad más alta por un antígeno, es decir, una afinidad más alta (= valor de K_d más bajo) en términos de la constante de disociación (es decir, valor de K_d) para el antígeno. De ese modo, para determinar la dosificación del conjugado de anticuerpo - fármaco, la dosificación puede determinarse a la vista de una situación en relación con la afinidad entre el conjugado de anticuerpo - fármaco y antígeno. Cuando el conjugado de anticuerpo - fármaco de la presente invención se administra a un ser humano, por ejemplo, aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg pueden administrarse una vez o administrarse varias veces con un intervalo de una vez durante de 1 a 180 días.

Ejemplos

La presente invención se describe específicamente a la vista de los ejemplos mostrados posteriormente. Sin embargo, la presente invención no se limita a los mismos. Además, esta no se ha de interpretar en modo alguno en un sentido limitado. Además, a menos que específicamente se describa lo contrario, el reactivo, disolvente, y material de partida descritos en la memoria descriptiva pueden obtenerse fácilmente a partir de un proveedor comercial.

Ejemplo de referencia 1 Anticuerpo M30-H1-L4

De anticuerpos humanizados de un anticuerpo anti-B7-H3, un anticuerpo compuesto por una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 20 a 471 en la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 21 a 233 en la SEQ ID NO: 16 se produjo de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica para producir anticuerpo anti-B7-H3 humanizado designado como un anticuerpo M30-H1-L4 (o al que se hace referencia simplemente como "M30-H1-L4").

Ejemplo de referencia 2 Anticuerpo M30-H1-L4P

La modificación de un glicano unido al anticuerpo M30-H1-L4 obtenido anteriormente se reguló mediante defucosilación de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica para producir anticuerpo con la modificación regulada de un glicano designado como un anticuerpo M30-H1-L4P (o al que se hace referencia simplemente como "M30-H1-L4P").

Ejemplo de referencia 3 Anticuerpo anti-CD30

Un anticuerpo anti-CD30 se produjo con referencia a la publicación nacional de la solicitud de patente internacional n.º 2005-506035. Su secuencia se muestra en las SEQ ID NO: 27 y 28.

Ejemplo de referencia 4 Anticuerpo anti-CD33

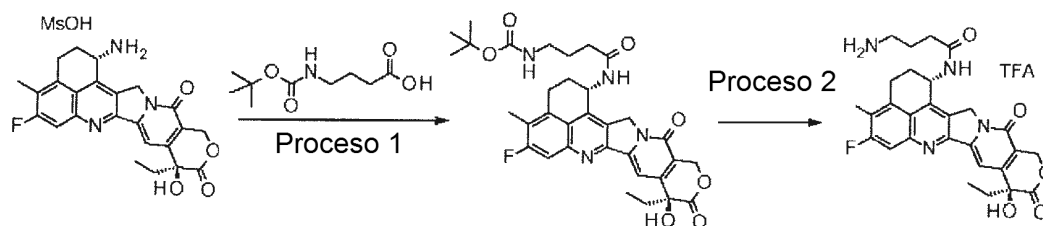
Un anticuerpo anti-CD33 se produjo con referencia a la patente japonesa abierta a inspección pública n.º 8-48637. Su secuencia se muestra en las SEQ ID NO: 29 y 30.

Ejemplo de referencia 5 Anticuerpo anti-CD70

Un anticuerpo anti-CD70 se produjo con referencia a la publicación nacional de la solicitud de patente internacional n.º 2008-538292. Su secuencia se muestra en las SEQ ID NO: 31 y 32.

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

[Fórmula 70]



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

Se disolvió ácido 4-(terc-butoxicarbonilamino)butanoico (0,237 g, 1,13 mmol) en diclorometano (10 ml). Se añadieron N-hidroxisuccinimida (0,130 g, 1,13 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,216 g, 1,13 mmol), y se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (10 ml) cargada con mesilato del compuesto (4) (0,500 g, 0,94 mmol) y trietilamina (0,157 ml, 1,13 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para producir el compuesto del título (0,595 g, cuantitativo). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,31 (9H, s), 1,58 (1H, t, J = 7,2 Hz), 1,66 (2H, t, J = 7,2 Hz), 1,82-1,89 (2H, m), 2,12-2,21 (3H, m), 2,39 (3H, s), 2,92 (2H, t, J = 6,5 Hz), 3,17 (2H, s), 5,16 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,24 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,59-5,55 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,78 (1H, t, J = 6,3 Hz), 7,30 (1H, s), 7,79 (1H, d, J = 11,0 Hz), 8,40 (1H, d, J = 8,6 Hz). EM (APCI) m/z: 621 (M+H)⁺

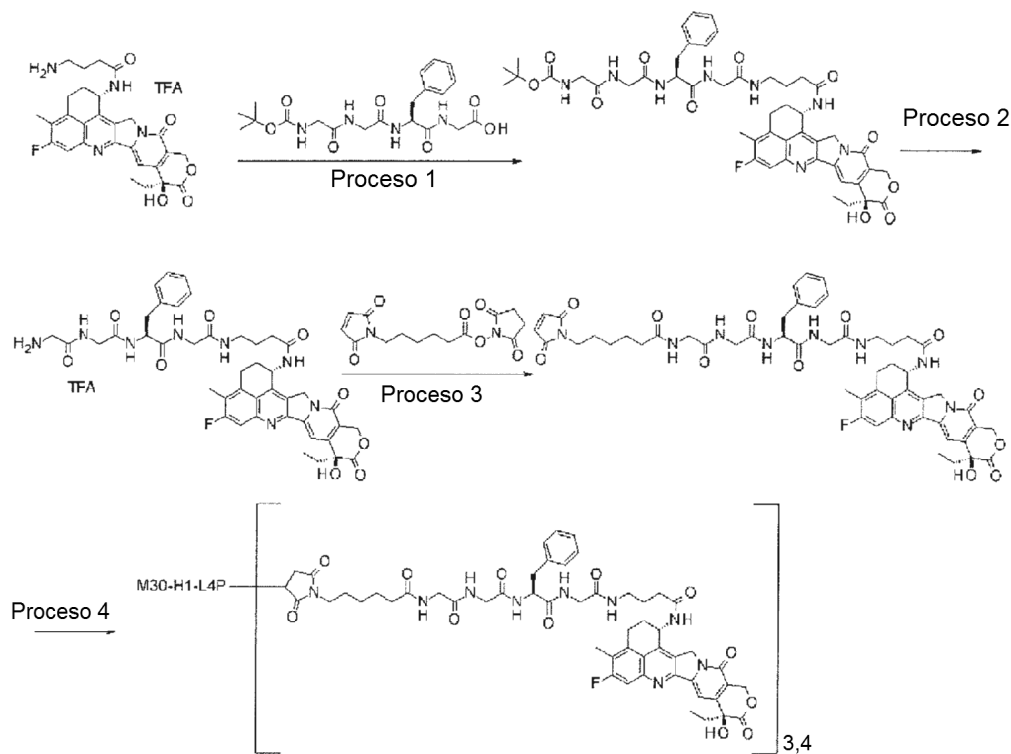
Proceso 2: 4-Amino-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]butanamida

El compuesto (0,388 g, 0,61 mmol) obtenido en el proceso 1 anterior se disolvió en diclorometano (9 ml). se añadió ácido trifluoroacético (9 ml) y se agitó durante 4 horas. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir trifluoroacetato del compuesto del título (0,343 g, cuantitativo). Este compuesto se confirmó en el tumor de un ratón portador de cáncer que recibió el conjugado de anticuerpo - fármaco (13) o (14).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,79-1,92 (4H, m), 2,10-2,17 (2H, m), 2,27 (2H, t, J = 7,0 Hz), 2,40 (3H, s), 2,80-2,86 (2H, m), 3,15-3,20 (2H, m), 5,15 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,26 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,54-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,72 (3H, s a), 7,82 (1H, d, J = 11,0 Hz), 8,54 (1H, d, J = 8,6 Hz). EM (APCI) m/z: 521 (M+H)⁺

Ejemplo 2 Conjugado de anticuerpo - fármaco (1)

[Fórmula 71]



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

Se disolvió N-(terc-butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanilglicina (0,081 g, 0,19 mmol) en diclorometano (3 ml), se añadieron N-hidroxisuccinimida (0,021 g, 0,19 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,036 g, 0,19 mmol) y después se agitó durante 3,5 horas. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (1,5 ml) cargada con el compuesto (0,080 g, 0,15 mmol) del Ejemplo 1, y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para producir el compuesto del título (0,106 g, 73 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,36 (9H, s), 1,71 (2H, m), 1,86 (2H, t, J = 7,8 Hz), 2,15-2,19 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,77 (1H, dd, J = 12,7, 8,8 Hz), 3,02 (1H, dd, J = 14,1, 4,7 Hz), 3,08-3,11 (2H, m), 3,16-3,19 (2H, m), 3,54 (2H, d, J = 5,9 Hz), 3,57-3,77 (4H, m), 4,46-4,48 (1H, m), 5,16 (1H, d, J = 19,2 Hz), 5,25 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,00 (1H, t, J = 6,3 Hz), 7,17-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,71 (1H, t, J = 5,7 Hz), 7,80 (1H, d, J = 11,0 Hz), 7,92 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,15 (1H, d, J = 8,2 Hz), 8,27 (1H, t, J = 5,5 Hz), 8,46 (1H, d, J = 8,2 Hz). EM (APCI) m/z: 939 (M+H)⁺

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

El compuesto (1,97 g, 2,10 mmol) obtenido en el proceso 1 anterior se disolvió en diclorometano (7 ml). Después de añadir ácido trifluoroacético (7 ml), se agitó durante 1 hora. El disolvente se retiró a presión reducida, y se cargó con tolueno para la destilación azeotrópica. Los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo : metanol: agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título (1,97 g, 99 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,71-1,73 (2H, m), 1,82-1,90 (2H, m), 2,12-2,20 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,75 (1H, dd, J = 13,7, 9,4 Hz), 3,03-3,09 (3H, m), 3,18-3,19 (2H, m), 3,58-3,60 (2H, m), 3,64 (1H, d, J = 5,9 Hz), 3,69 (1H, d, J = 5,9 Hz), 3,72 (1H, d, J = 5,5 Hz), 3,87 (1H, dd, J = 16,8, 5,9 Hz), 4,50-4,56 (1H, m), 5,16 (1H, d, J = 19,2 Hz), 5,25 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 7,17-7,27 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,78-7,81 (2H, m), 7,95-7,97 (3H, m), 8,33-8,35 (2H, m), 8,48-8,51 (2H, m). EM (APCI) m/z: 839 (M+H)⁺

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

il]amino}-4-oxobutil)glicinamida

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

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,87 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,66-1,76 (2H, m), 1,80-1,91 (2H, m), 2,05-2,21 (6H, m), 2,39 (3H, s), 2,79 (1H, dd, J = 14,0, 9,8 Hz), 2,98-3,21 (5H, m), 3,55-3,77 (8H, m), 4,41-4,48 (1H, m), 5,15 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,24 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,40 (1H, d, J = 17,1 Hz), 5,44 (1H, d, J = 17,1 Hz), 5,54-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,20-7,27 (5H, m), 7,30 (1H, s), 7,70 (1H, t, J = 5,5 Hz), 7,80 (1H, d, J = 11,0 Hz), 8,03 (1H, t, J = 5,8 Hz), 8,08 (1H, t, J = 5,5 Hz), 8,14 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,25 (1H, t, J = 6,1 Hz), 8,46 (1H, d, J = 8,5 Hz). EM (APCI) m/z: 1032 (M+H) $^+$

Proceso 4: Conjugado de anticuerpo - fármaco (1)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml) se puso en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,025 ml; 3,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

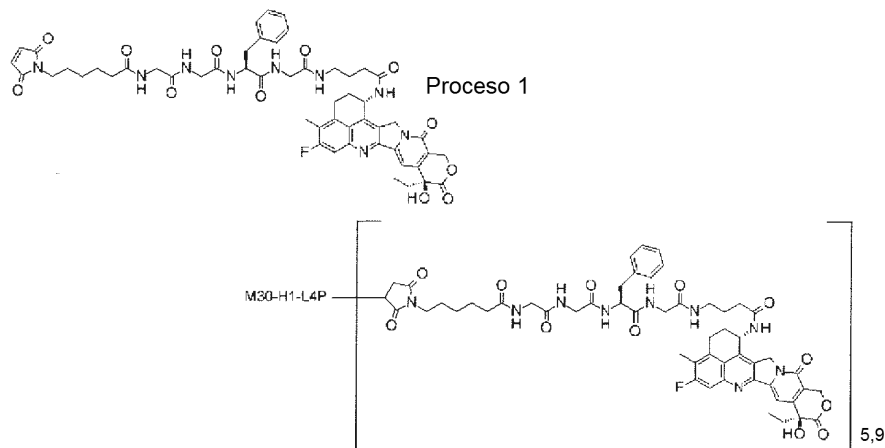
Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,109 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 anterior (0,039 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,008 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante otros 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 13,02 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 9,1 mg (73%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,4.

Ejemplo 3 Conjugado de anticuerpo - fármaco (2)

[Fórmula 72]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (2)

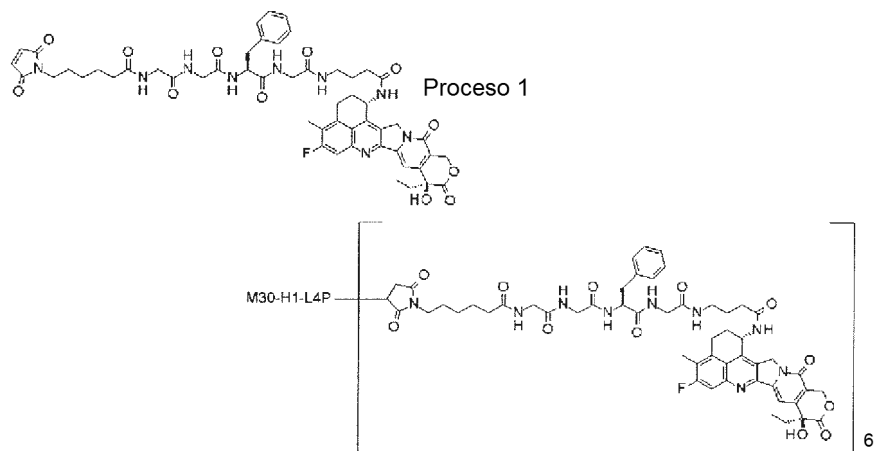
Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (4,0 ml) se recogió en un tubo de 15 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,118 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,200 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora. Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de incubar la solución anterior durante 10 minutos a 22°C , una solución de dimetilsulfóxido (0,236 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 2 se añadió a la misma y se incubó para conjugarse el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22°C durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,00471 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a 22°C durante otros 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 17,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 1,80 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 26,1 mg (65%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,9.

Ejemplo 4 Conjugado de anticuerpo - fármaco (3)

[Fórmula 73]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (3)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml) se puso en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,051 ml; 6,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,067 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 2 (0,085 ml; 10,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugarse el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 60 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,013 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) a la misma y se agitó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

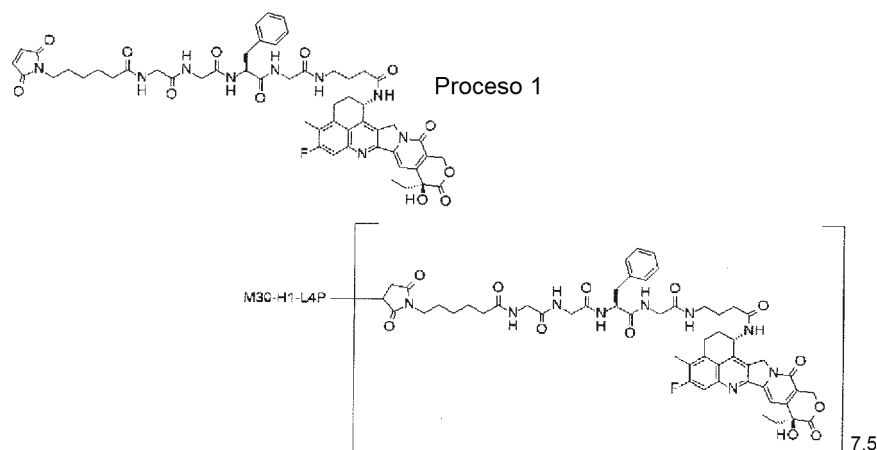
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como

solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 1,67 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 10,02 mg (80%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,3.

Ejemplo 5 Conjugado de anticuerpo - fármaco (4)

[Fórmula 74]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (4)

- 10 Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1} \text{cm}^{-1}$) descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml) se puso en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,051 ml; 6,0 equivalentes por
- 15 molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

- Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,025 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 del
- 20 Ejemplo 2 (0,127 ml; 15,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 60 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,019 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) a la misma y se agitó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

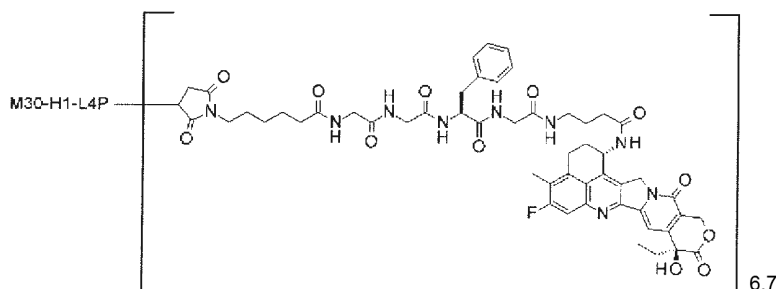
- 25 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

- Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 1,19 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 7,14 mg (57%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 7,5.

Ejemplo 6 Conjugado de anticuerpo - fármaco (5)

35

[Fórmula 75]

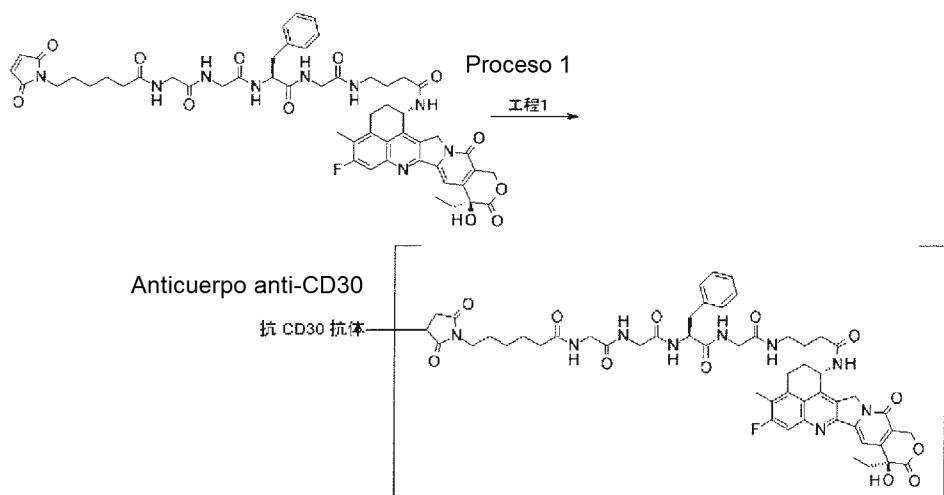


Casi la totalidad de las cantidades de los conjugados de anticuerpo - fármaco de Ejemplos 4 y 5 se mezclaron y la solución se concentró mediante el procedimiento común A para producir el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

- 5 Concentración de anticuerpo: 10,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 15,37 mg, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,7.

Ejemplo 7 Conjugado de anticuerpo - fármaco (6)

[Fórmula 76]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (6)

- 10 Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD30 producido en el Ejemplo de Referencia 3 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,75) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,0 ml) se recogió en un tubo de 2 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0297 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora.

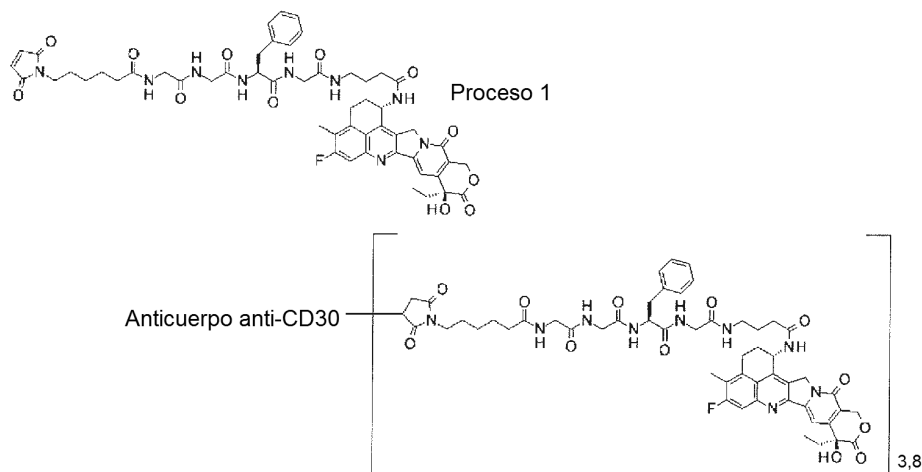
- 20 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de incubar la solución anterior a 22 °C durante 10 minutos, una solución de dimetilsulfóxido (0,0593 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 2 se añadió a la misma y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,0119 ml; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a 22 °C durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 270400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

- 5 Concentración de anticuerpo: 0,99 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 5,94 mg (59%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,3.

Ejemplo 8 Conjugado de anticuerpo - fármaco (7)

[Fórmula 77]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (7)

- 10 Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD30 producido en el Ejemplo de Referencia 3 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,75) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,0 ml) se recogió en un tubo de 2 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 30 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0148 ml; 6,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora.
- 15

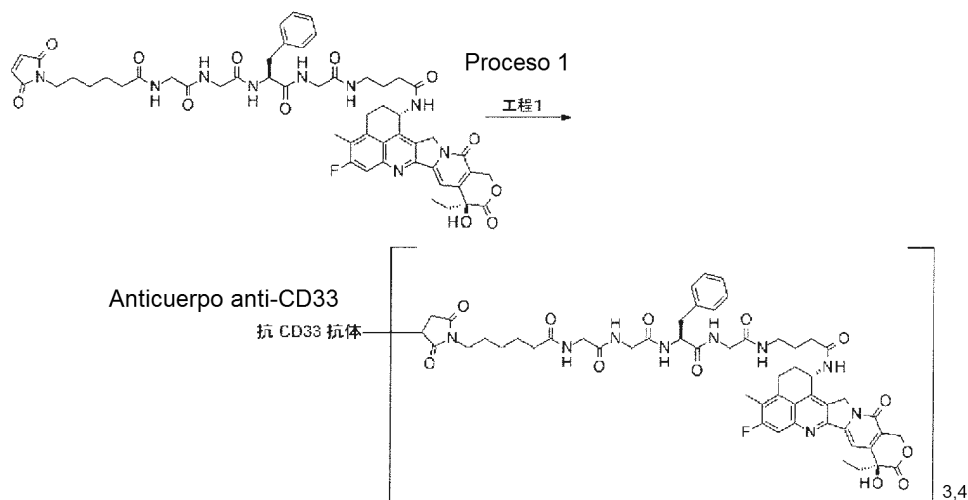
- 20 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de incubar la solución anterior durante 10 minutos a 22 °C, una solución de dimetilsulfóxido (0,0297 ml; 13,8 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene 30 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 2 se añadió a la misma y se incubó durante 40 minutos a 22 °C para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo. A continuación, una solución acuosa (0,0178 ml; 27,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a 22 °C durante otros 20 minutos.

- 25 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

- 30 Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 270400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 0,99 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 5,94 mg (59%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,8.

Ejemplo 9 Conjugado de anticuerpo - fármaco (8)

[Fórmula 78]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (8)**

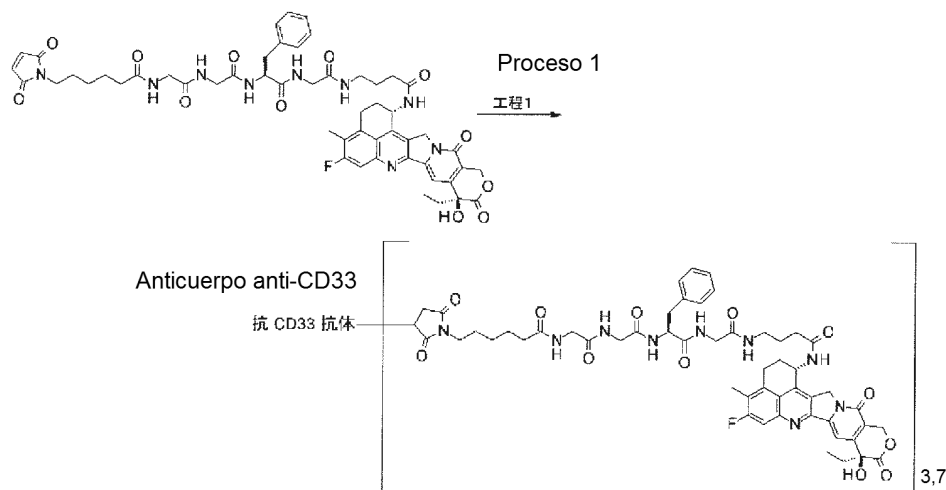
Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD33 producido en el Ejemplo de Referencia 4 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,66) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,0 ml) se recogió en un tubo de 2 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0297 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de incubar la solución anterior durante 10 minutos a 22 °C, una solución de dimetilsulfóxido (0,0593 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 2 se añadió a la misma y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,0119 ml; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a 22 °C durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 256400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 1,06 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 6,36 mg (64%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,4.

Ejemplo 10 Conjugado de anticuerpo - fármaco (9)

[Fórmula 79]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (9)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD33 producido en el Ejemplo de Referencia 4 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,66) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,0 ml) se recogió en un tubo de 2 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 30 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0148 ml; 6,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora.

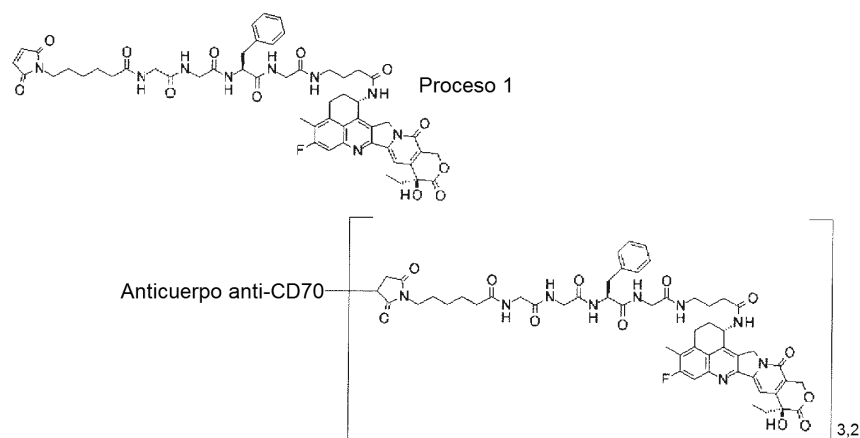
Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de incubar la solución anterior durante 10 minutos a 22 °C, una solución de dimetilsulfóxido (0,0297 ml; 13,8 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene 30 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 2 se añadió a la misma y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,0178 ml; 27,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a 22 °C durante otros 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 256400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 0,95 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 5,70 mg (57%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,7.

Ejemplo 11 Conjugado de anticuerpo - fármaco (10)

[Fórmula 80]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (10)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD70 producido en el Ejemplo de Referencia 5 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,69) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,0 ml) se recogió en un tubo de 2 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0297 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora.

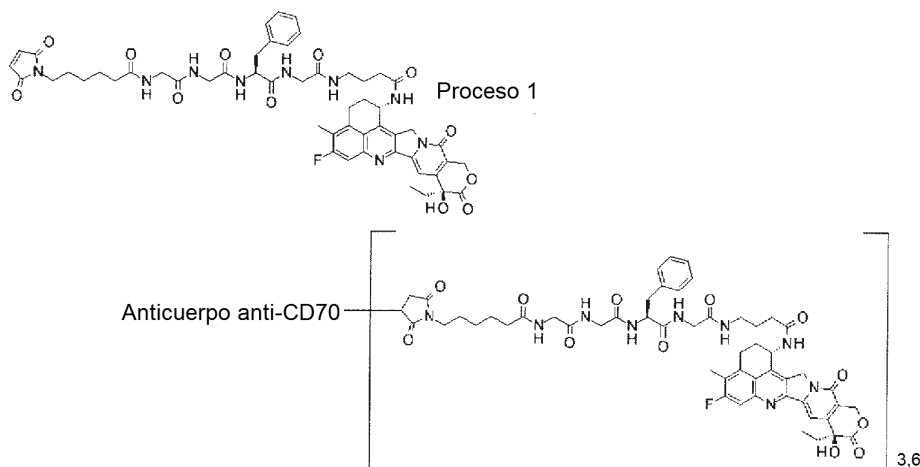
Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de incubar la solución anterior a 22 °C durante 10 minutos, una solución de dimetilsulfóxido (0,0593 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 2 se añadió a la misma y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,0119 ml; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a 22 °C durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 262400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,00 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 6,00 mg (60%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,2.

Ejemplo 12 Conjugado de anticuerpo - fármaco (11)

[Fórmula 81]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (11)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD70 producido en el Ejemplo de Referencia 5 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,69) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,0 ml) se recogió en un tubo de 2 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 30 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0148 ml; 6,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

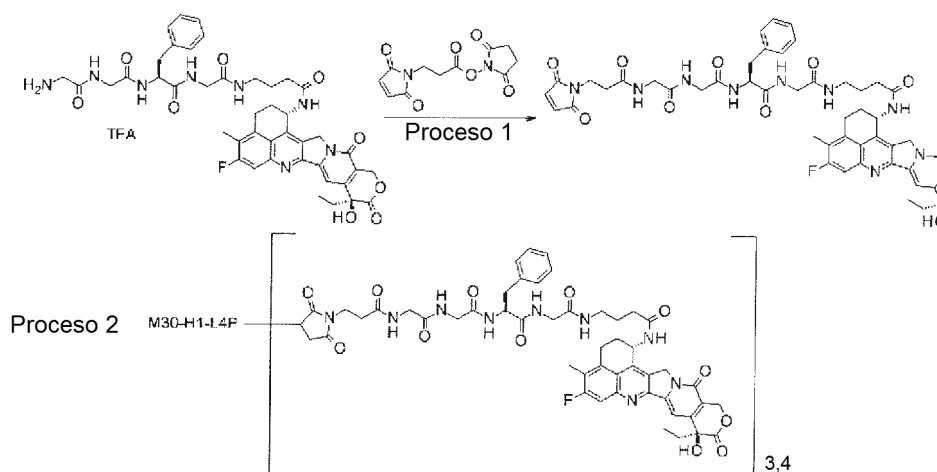
Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de incubar la solución anterior a 22 °C durante 10 minutos, una solución de dimetilsulfóxido (0,0297 ml; 13,8 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene 30 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 2 se añadió a la misma y se incubó durante 40 minutos a 22 °C para conjuguar el enlazador de fármaco con el anticuerpo. A continuación, una solución acuosa (0,0178 ml; 27,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a 22 °C durante otros 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 262400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,370} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 0,96 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 5,76 mg (58 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,6.

Ejemplo 13 Conjugado de anticuerpo - fármaco (12)

[Fórmula 82]



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

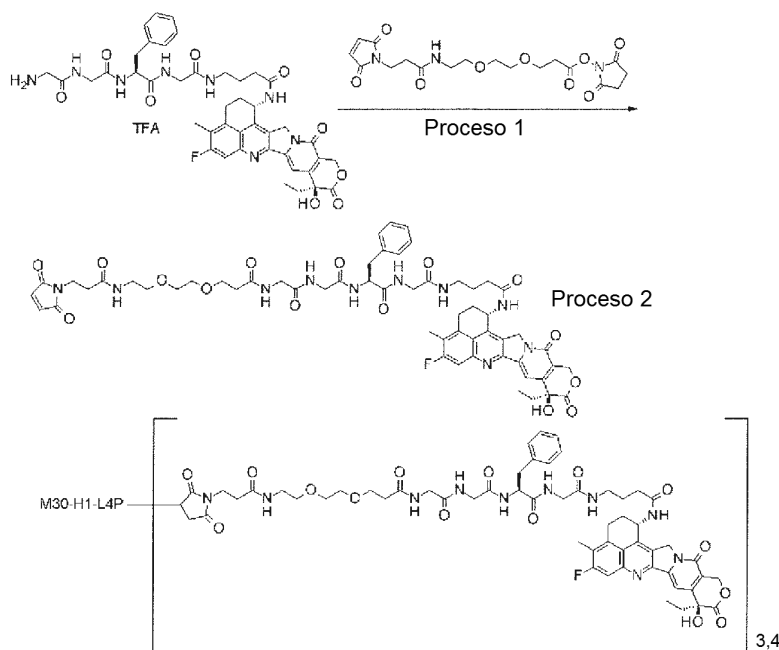
- 5 El compuesto (80 mg, 0,084 mmol) obtenido en el proceso 2 del Ejemplo 2 se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 3 del Ejemplo 2 usando propionato de N-succinimidil 3-maleimida (24,6 mg, 0,0924 mmol) en lugar de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (60,0 mg, 73 %).
- 10 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,89 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,70-1,78 (2H, m), 1,81-1,94 (2H, m), 2,12-2,23 (4H, m), 2,42 (3H, s), 2,81 (1H, dd, J = 13,7, 9,8 Hz), 3,01-3,15 (3H, m), 3,16-3,23 (2H, m), 3,30-3,35 (1H, m), 3,58-3,71 (6H, m), 3,71-3,79 (1H, m), 4,44-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J = 19,0 Hz), 5,27 (1H, d, J = 19,0 Hz), 5,43 (1H, d, J = 17,6 Hz), 5,47 (1H, d, J = 17,6 Hz), 5,57-5,63 (1H, m), 6,56 (1H, s), 7,02 (2H, s), 7,17-7,22 (1H, m), 7,22-7,30 (5H, m), 7,34 (1H, s), 7,73 (1H, t, J = 5,6 Hz), 7,83 (1H, d, J = 10,7 Hz), 8,08 (1H, t, J = 5,6 Hz), 8,15 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,30 (2H, dt, J = 18,7, 5,7 Hz), 8,49 (1H, d, J = 8,8 Hz).
- 15 EM (APCI) m/z: 990 (M+H)⁺

Proceso 2: Conjugado de anticuerpo - fármaco (12)

- Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 1 anterior, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 4 del Ejemplo 2. Concentración de anticuerpo: 12,16 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 8,5 mg (68%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,4.
- 20

Ejemplo 14 Conjugado de anticuerpo - fármaco (13)

[Fórmula 83]



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

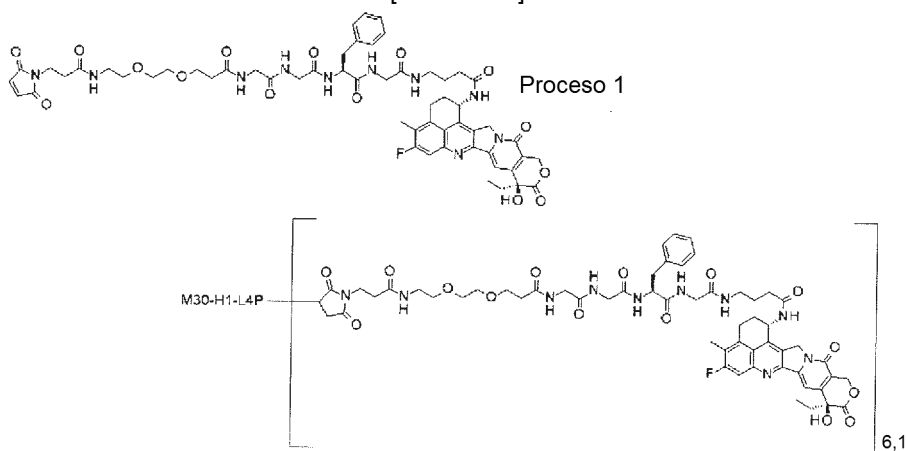
- 5 El compuesto (100 mg, 0,119 mmol) obtenido en el proceso 2 del Ejemplo 2 se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 3 del Ejemplo 2 usando diisopropiletilamina (20,8 µl, 0,119 mmol) en lugar de trietilamina y 3-(2-(2-(3-maleimidapropanamida)etoxi)etoxi)propanoato de N-succinimidilo (50,7 mg, 0,119 mmol) en lugar de hexanoato de N-succinimidilo 6-maleimida para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (66,5 mg, 48 %).
- 10 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,85 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,65-1,74 (2H, m), 1,77-1,90 (2H, m), 2,07-2,19 (4H, m), 2,30 (2H, t, J = 7,2 Hz), 2,33-2,36 (2H, m), 2,38 (3H, s), 2,76 (1H, dd, J = 13,7, 9,8 Hz), 2,96-3,18 (9H, m), 3,42-3,44 (4H, m), 3,53-3,76 (10H, m), 4,43 (1H, td, J = 8,6, 4,7 Hz), 5,14 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,38 (1H, d, J = 17,2 Hz), 5,42 (1H, d, J = 17,2 Hz), 5,52-5,58 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,98 (2H, s), 7,12-7,17 (1H, m), 7,18-7,25 (4H, m), 7,29 (1H, s), 7,69 (1H, t, J = 5,5 Hz), 7,78 (1H, d, J = 11,3 Hz), 7,98-8,03 (2H, m), 8,11 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,16 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,23 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,44 (1H, d, J = 9,0 Hz).
- 15 EM (APCI) m/z: 1149 (M+H)⁺

Proceso 2: Conjugado de anticuerpo - fármaco (13)

- Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 1 anterior, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 4 del Ejemplo 2. Concentración de anticuerpo: 12,76 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 8,9 mg (71%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,4.
- 20

Ejemplo 15 Conjugado de anticuerpo - fármaco (14)

[Fórmula 84]

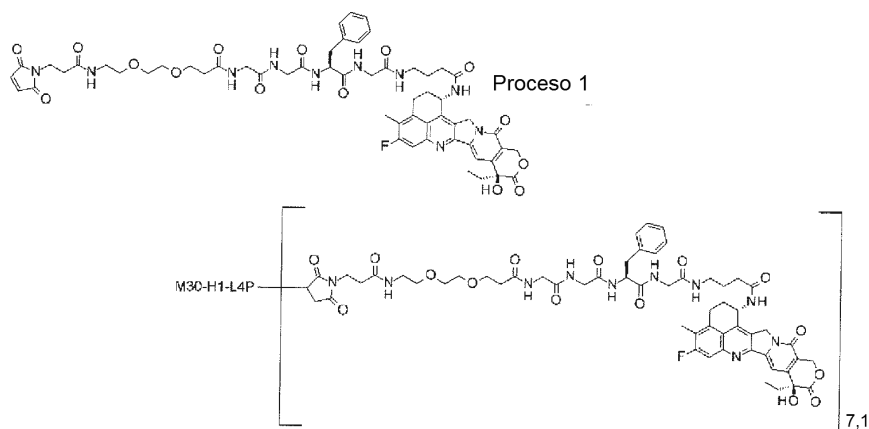


Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (14)

- 5 Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 4. Concentración de anticuerpo: 1,60 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 9,60 mg (77%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,1.

Ejemplo 16 Conjugado de anticuerpo - fármaco (15)

[Fórmula 85]

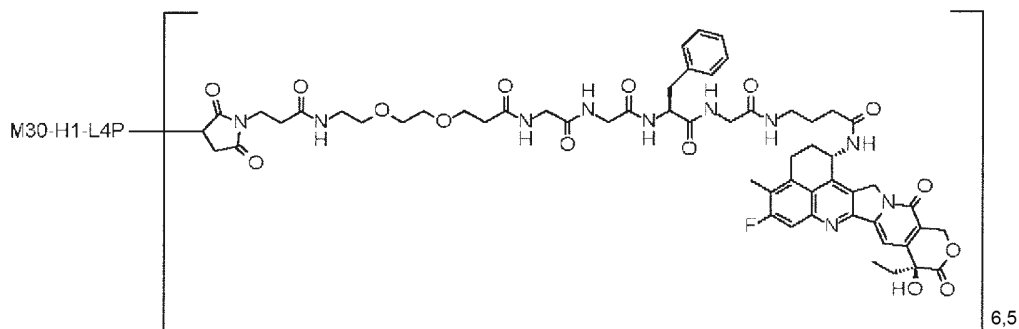


- 10 Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (15)

Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 5. Concentración de anticuerpo: 1,64 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 9,84 mg (79%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 7,1.

- 15 **Ejemplo 17 Conjugado de anticuerpo - fármaco (16)**

[Fórmula 86]

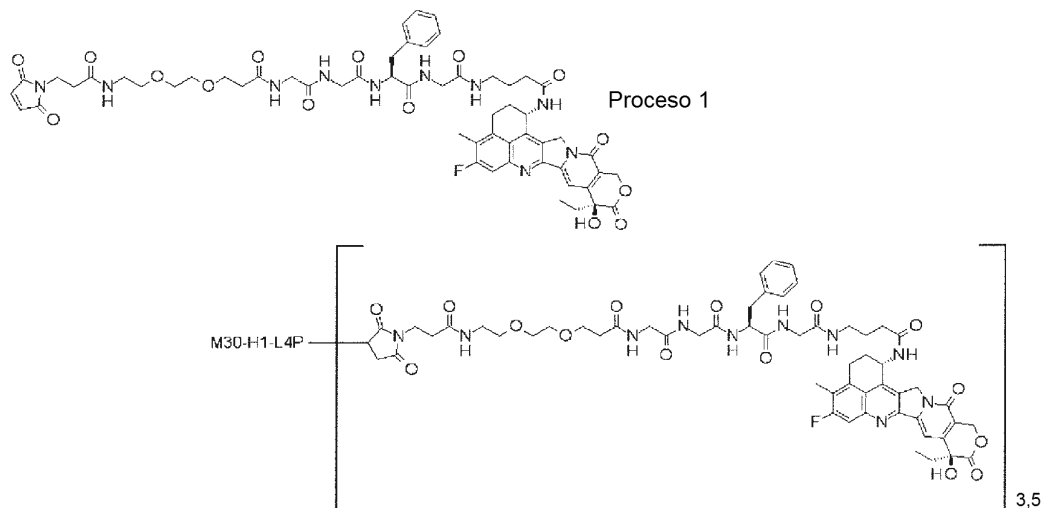


Casi la totalidad de las cantidades de los conjugados de anticuerpo - fármaco de Ejemplos 15 y 16 se mezclaron y la solución se concentró mediante el procedimiento común A para producir el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

- 5 Concentración de anticuerpo: 10,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 17,30 mg, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,5.

Ejemplo 18 Conjugado de anticuerpo - fármaco (17)

[Fórmula 87]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (17)

- 10 Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (100 ml, 1 g del anticuerpo) se puso en un matraz de 250 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (2,43 ml; 3,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y adicionalmente con una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (5 ml).
- 15 Después de confirmar que la solución tenía un pH cerca de 7,4 usando un pehachímetro, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora.

- 20 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (2,14 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14 (3,51 ml; 5,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó con un agitador para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 130 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,547 ml) de NAC 100 mM se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

- 25 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación por ultrafiltración usando un aparato de ultrafiltración compuesto por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Casete Pellicon XL, Biomax 50 KDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, Bomba MasterFlex modelo 77521-40, Cabezal de Bomba modelo 7518-00), y un

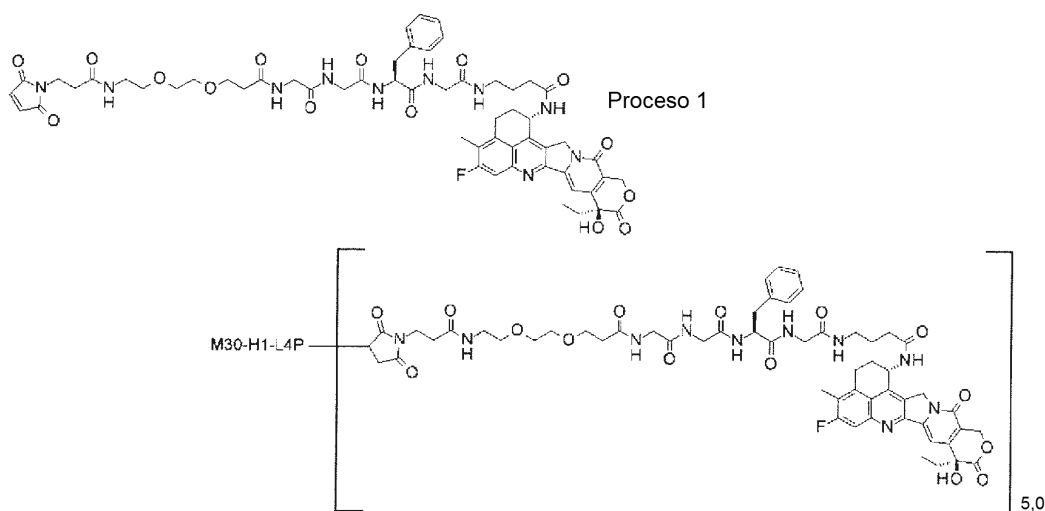
tubo (Cole-Parmer International, Tubo MasterFlex L/S16). Específicamente, al tiempo que se añadía ABS gota a gota (un total de 800 ml) como una solución tampón para la purificación a la solución de reacción, se realizó una purificación por ultrafiltración para retirar enlazadores de fármaco no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, sustituir también la solución tampón con ABS, y concentrar adicionalmente la solución, para producir aproximadamente 70 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 14,5 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 1,0 g (aproximadamente 100 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,5.

Ejemplo 19 Conjugado de anticuerpo - fármaco (18)

[Fórmula 88]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (18)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (5 ml, 50 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 15 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,135 ml; 4 equivalentes por molécula de anticuerpo). Después de confirmar que la solución tenía un pH cerca de 7,4 usando un pehachímetro, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (0,064 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14 (0,219 ml; 6,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior, se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 90 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,033 ml; 9,8 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

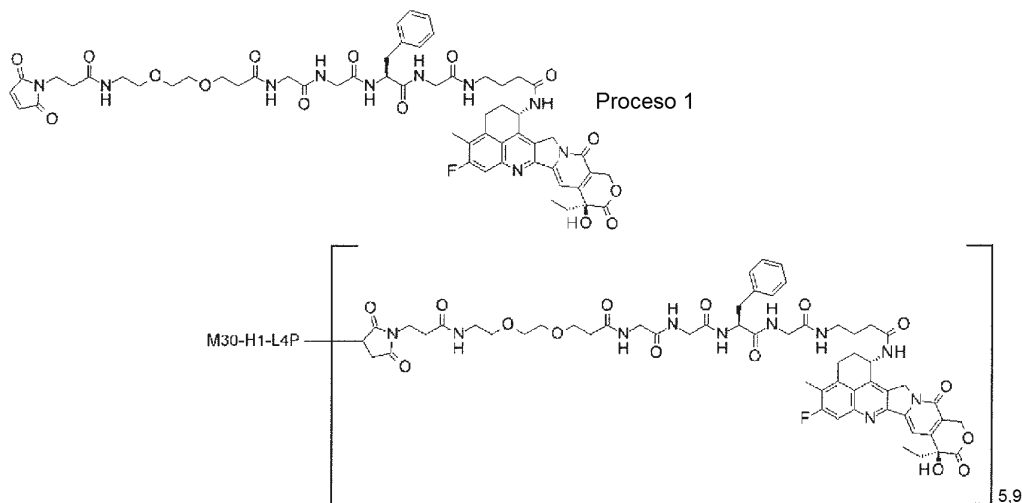
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 19 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 2,17 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 41 mg (82%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,0.

Ejemplo 20 Conjugado de anticuerpo - fármaco (19)

[Fórmula 89]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (19)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (4 ml, 40 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 15 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,140 ml; 5,2 equivalentes por molécula de anticuerpo). Después de confirmar que la solución tenía un pH cerca de 7,4 usando un pehachímetro, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora. Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14 (0,232 ml; 8,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior, se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 90 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,035 ml; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

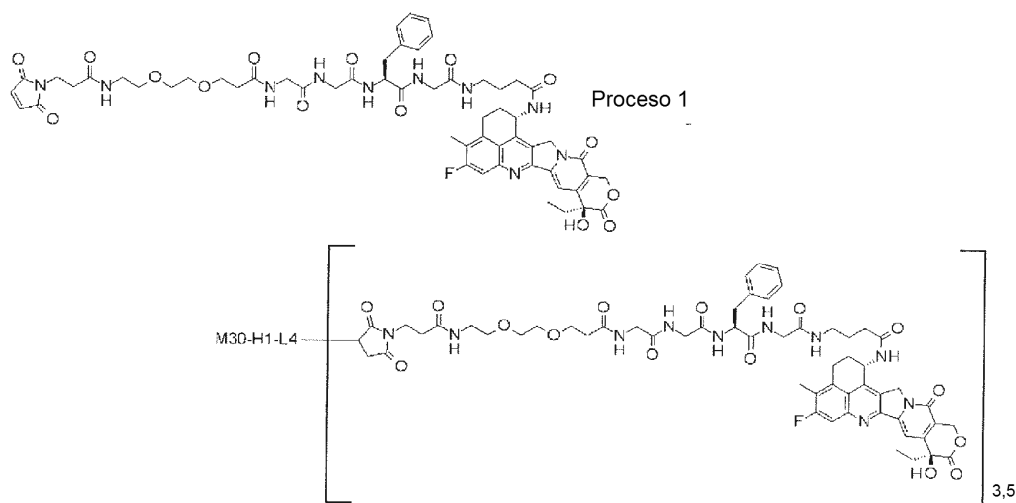
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 13 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D2S0} = 4964$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 2,36 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 31 mg (77%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,9.

Ejemplo 21 Conjugado de anticuerpo - fármaco (20)

[Fórmula 90]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (20)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4 producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml, 12,5 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0287 ml; 3,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (0,0267 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14 (0,0439 ml; 5,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15°C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0066 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

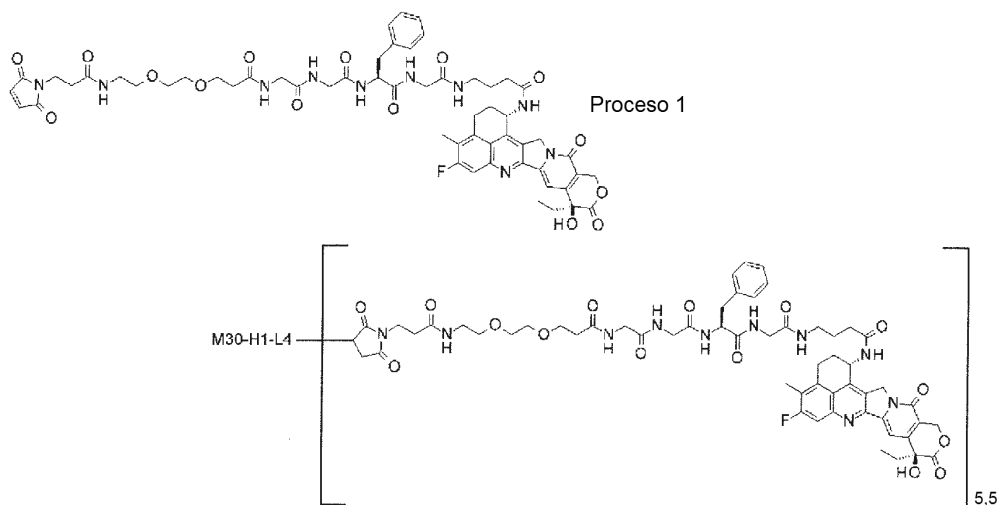
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 10,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 8,7 mg (70%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,5.

Ejemplo 22 Conjugado de anticuerpo - fármaco (21)

[Fórmula 91]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (21)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4 producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml, 12,5 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0439 ml; 5,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) (0,0287 ml; 3,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14 (0,0726 ml; 8,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15°C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,011 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

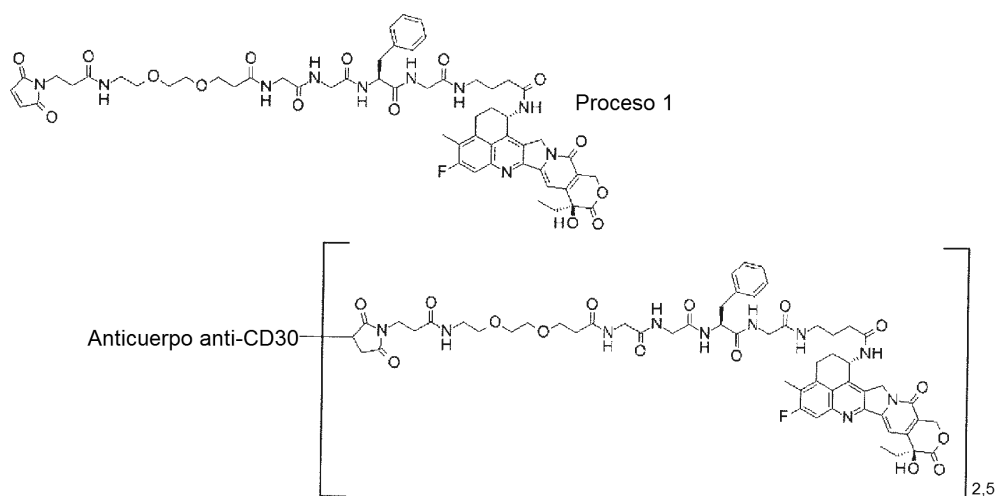
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 10,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 8,3 mg (66%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,5.

Ejemplo 23 Conjugado de anticuerpo - fármaco (22)

[Fórmula 92]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (22)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD30 producido en el Ejemplo de Referencia 3 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,75 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0065 ml; 2,5 equivalentes por molécula de anticuerpo). El enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (0,0098 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14 (0,0116 ml; 4,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0017 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

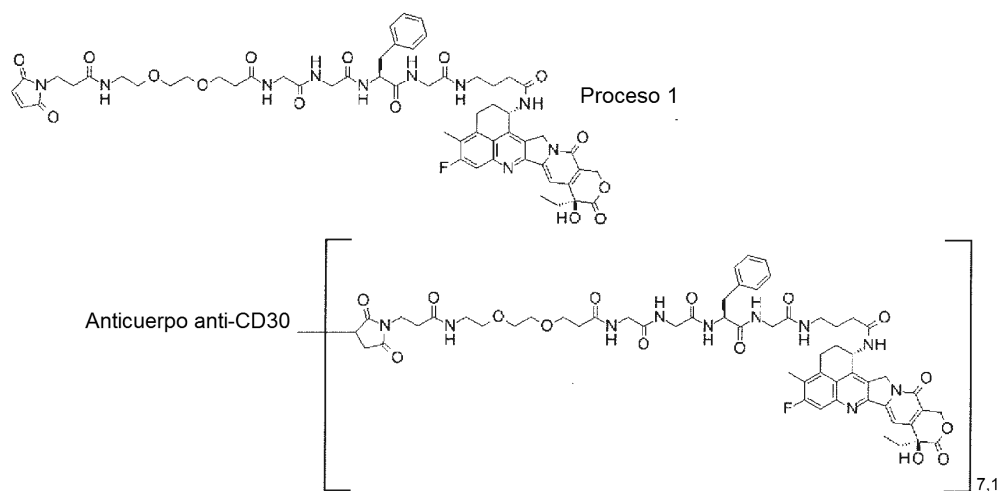
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 270400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 0,86 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 2,2 mg (54%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 2,5.

Ejemplo 24 Conjugado de anticuerpo - fármaco (23)

[Fórmula 93]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (23)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD30 producido en el Ejemplo de Referencia 3 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,75 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,35 ml, 3,5 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0113 ml; 5 equivalentes por molécula de anticuerpo). El enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14 (0,0204 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (Kanto Chemical Co., Inc., 0,18 ml) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0031 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

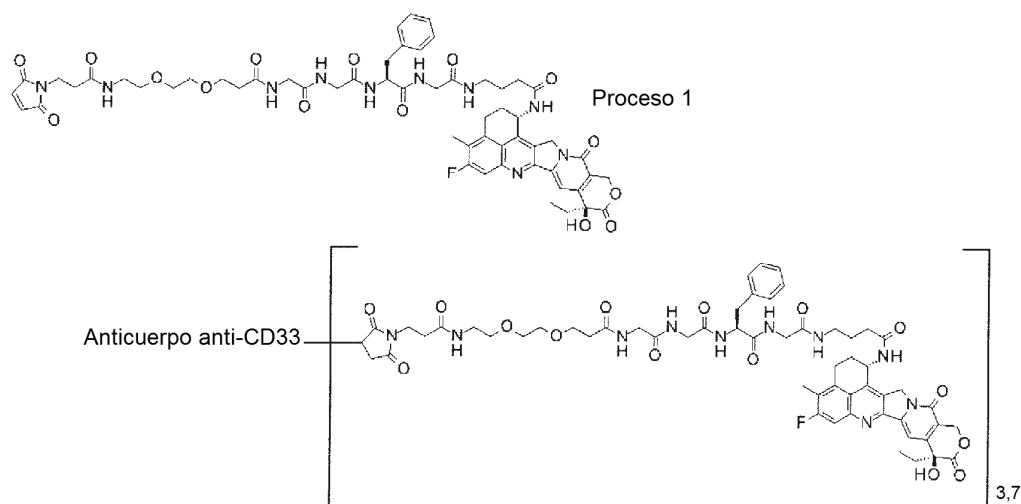
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 270400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 0,41 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 1,0 mg (29%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 7,1.

Ejemplo 25 Conjugado de anticuerpo - fármaco (24)

[Fórmula 94]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (24)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD33 producido en el Ejemplo de Referencia 4 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,66 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0065 ml; 2,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0058 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (0,0101 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14 (0,0116 ml; 4,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0017 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

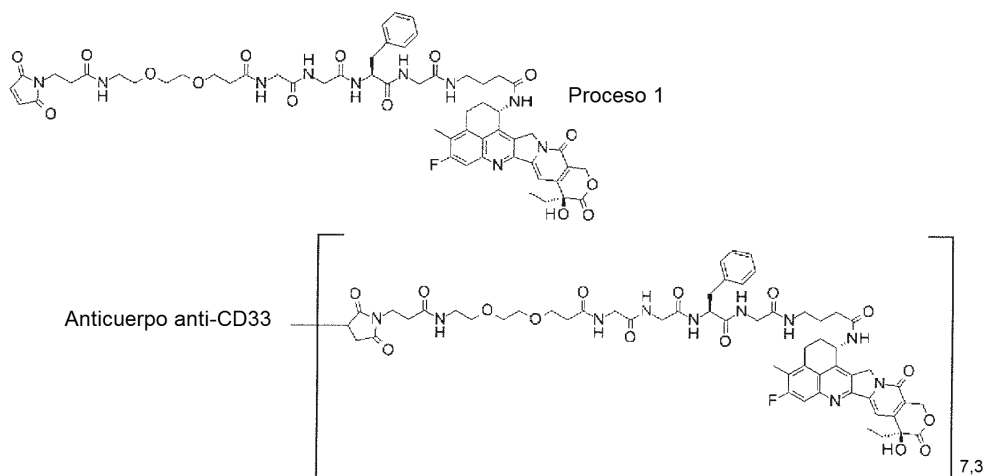
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 256400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,25 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 3,1 mg (78%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,7.

Ejemplo 26 Conjugado de anticuerpo - fármaco (25)

[Fórmula 95]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (25)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD33 producido en el Ejemplo de Referencia 4 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,66 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0129 ml; 5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,006 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14 (0,0233 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0035 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

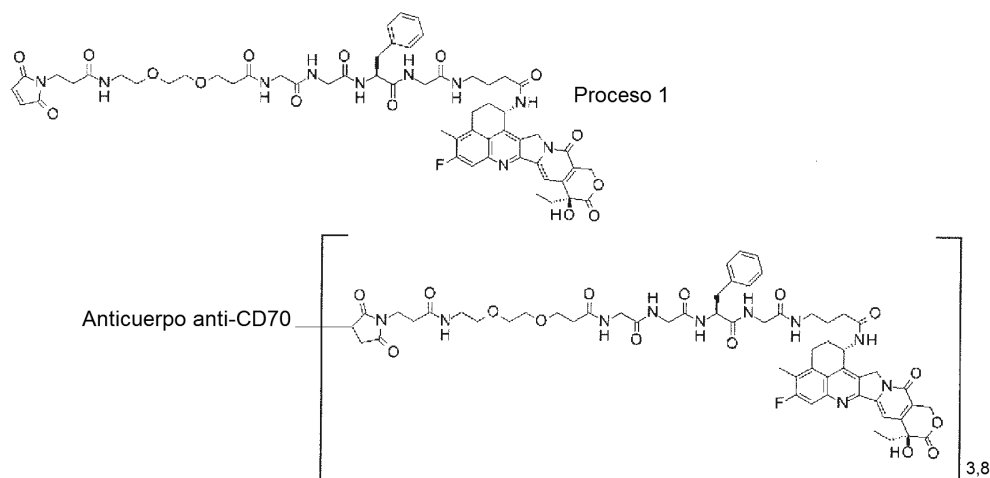
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 256400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,17 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 2,9 mg (73%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 7,3.

Ejemplo 27 Conjugado de anticuerpo - fármaco (26)

[Fórmula 96]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (26)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD70 producido en el Ejemplo de Referencia 5 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,69 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0065 ml; 2,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0058 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (0,0101 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14 (0,0116 ml; 4,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0017 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

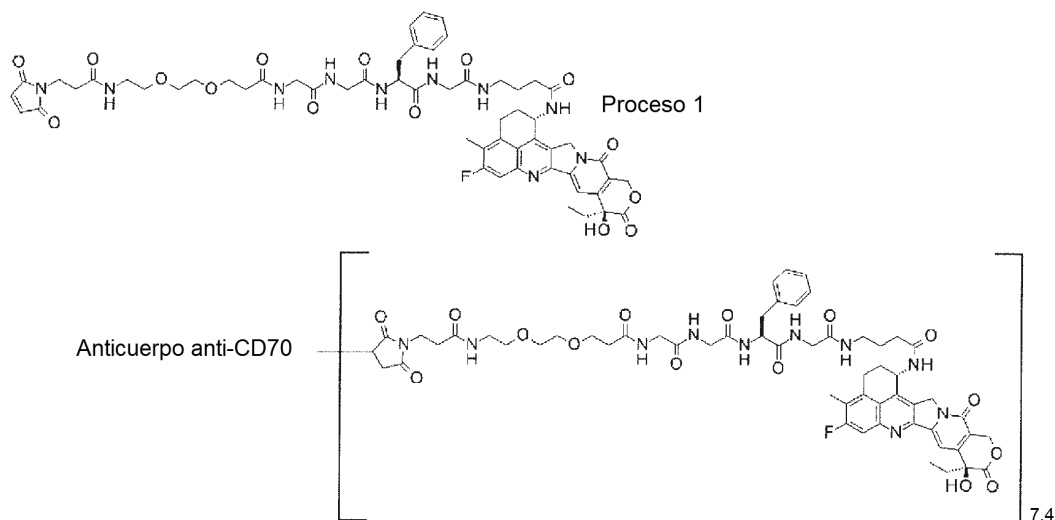
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 262400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,14 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 2,9 mg (71%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,8.

Ejemplo 28 Conjugado de anticuerpo - fármaco (27)

[Fórmula 97]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (27)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD70 producido en el Ejemplo de Referencia 5 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,69 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0129 ml; 5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,006 6 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido (0,0233 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 14 a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0035 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

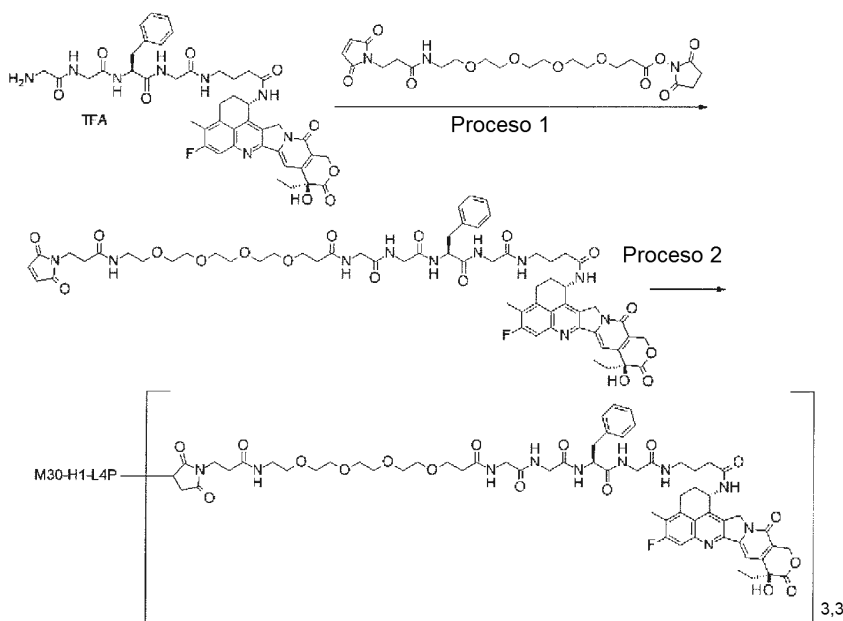
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 262400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,13 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 2,8 mg (71%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 7,4.

Ejemplo 29 Conjugado de anticuerpo - fármaco (28)

[Fórmula 98]



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

- 5 El compuesto (90 mg, 0,107 mmol) obtenido en el proceso 2 del Ejemplo 2 se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 3 del Ejemplo 2 usando diisopropiletilamina (18,7 μ l, 0,107 mmol) en lugar de trietilamina y 1-maleinimida-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecan-19-oato de N-succinimidilo (55,1 mg, 0,107 mmol) en lugar de hexanoato de N-succinimidilo 6-maleimida para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (50 mg, 37 %).
- 10 RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,85 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,64-1,74 (2H, m), 1,77-1,90 (2H, m), 2,06-2,19 (4H, m), 2,27-2,32 (2H, m), 2,33-2,37 (2H, m), 2,38 (3H, s), 2,72-2,80 (3H, m), 2,96-3,19 (6H, m), 3,39-3,48 (10H, m), 3,52-3,75 (10H, m), 4,39-4,48 (1H, m), 5,14 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,38 (1H, d, J = 17,0 Hz), 5,42 (1H, d, J = 17,0 Hz), 5,52-5,58 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,98 (1H, s), 7,13-7,24 (5H, m), 7,29 (1H, s), 7,69 (1H, t, J = 5,5 Hz), 7,78 (1H, d, J = 10,9 Hz), 7,98-8,03 (2H, m), 8,10 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,16 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,23 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,44 (1H, d, J = 8,6 Hz).
- 15 EM (APCI) m/z: 1237 (M+H) $^+$

Proceso 2: Conjugado de anticuerpo - fármaco (28)

- Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,61 $\text{mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml) se puso en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,025 ml; 3,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 $^\circ\text{C}$ durante 1 hora.
- 20
- 25

- Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,102 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 anterior (0,047 ml; 5,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,009 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) a la misma y se agitó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.
- 30

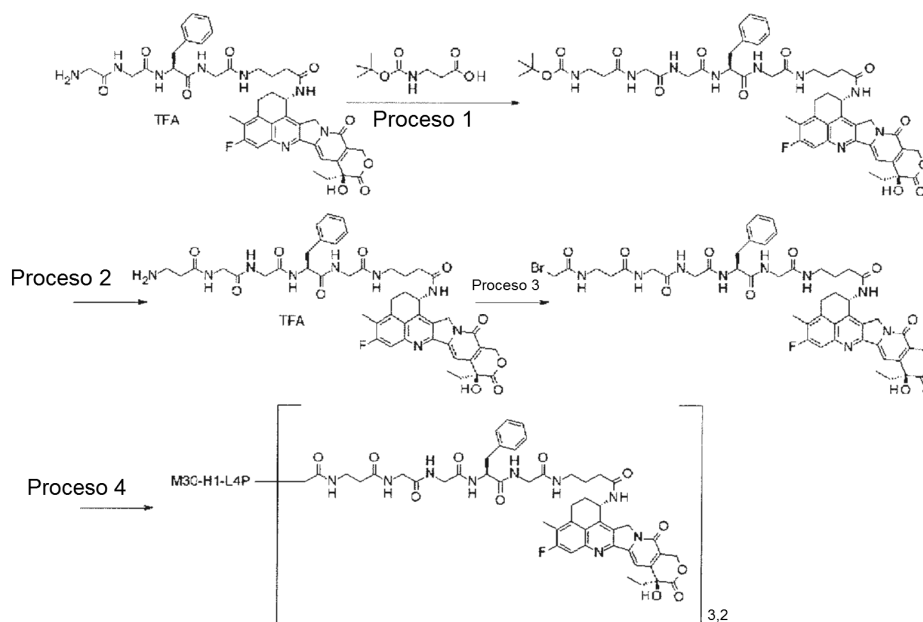
- Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento
- 35

común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 13,60 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 9,5 mg (76%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,3.

Ejemplo 30 Conjugado de anticuerpo - fármaco (29)

[Fórmula 99]



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

El compuesto (0,839 g, 1,00 mmol) obtenido en el proceso 2 del Ejemplo 2 se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 1 usando N-(terc-butoxicarbonil)-β-alanina en lugar de ácido 4-(terc-butoxicarbonilamino)butanoico. El producto en bruto obtenido se usó en el siguiente proceso sin purificación.

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

El producto en bruto obtenido en el proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 2 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,610 g, 67 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,67-1,77 (2H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,09-2,22 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,46-2,55 (2H, m), 2,82-2,73 (1H, m), 2,95-3,13 (5H, m), 3,14-3,21 (2H, m), 3,55-3,80 (6H, m), 4,44-4,52 (1H, m), 5,20 (2H, dd, J = 35,0, 19,0 Hz), 5,42 (2H, s), 5,53-5,60 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,14-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,67 (2H, s a), 7,72-7,78 (1H, m), 7,80 (1H, d, J = 11,0 Hz), 8,10-8,17 (2H, m), 8,29 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,42 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,47 (1H, d, J = 8,6 Hz).

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

A una solución de diclorometano (4,5 ml) de ácido 2-bromoacético (96,3 mg, 0,693 mmol), se añadieron N-hidroxisuccinimida (79,7 mg, 0,693 mmol) y 1,3-diisopropilcarbodiimida (0,107 ml, 0,693 mmol) y se agitó a temperatura ambiente. La solución de reacción se añadió a una solución de N,N-dimetilformamida (4,5 ml) del compuesto (473 mg, 0,462 mmol) obtenido en el proceso 2 anterior y trietilamina (0,154 ml, 1,11 mmol) a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice [disolvente de elución: cloroformo - cloroformo : metanol = 85 : 15 (v/v)]. El sólido obtenido se lavó con disolvente mixto de cloroformo : metanol : éter dietílico para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (191 mg, 40 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,67-1,77 (2H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,08-2,22 (4H, m),

2,33 (2H, t, J = 7,0 Hz), 2,40 (3H, s), 2,74-2,83 (1H, m), 2,99-3,12 (3H, m), 3,14-3,21 (2H, m), 3,24-3,30 (2H, m), 3,56-3,77 (6H, m), 3,82 (2H, s), 4,41-4,51 (1H, m), 5,20 (2H, c, J = 18,9 Hz), 5,42 (2H, s), 5,54-5,60 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,15-7,27 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,69-7,74 (1H, m), 7,80 (1H, d, J = 10,9 Hz), 8,06 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,13 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,21-8,34 (3H, m), 8,46 (1H, d, J = 8,6 Hz).

5 EM (IEN) m/z: 1030, 1032 (M+H)⁺

Proceso 4: Conjugado de anticuerpo - fármaco (29)

10 Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml) se puso en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,025 ml; 3,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

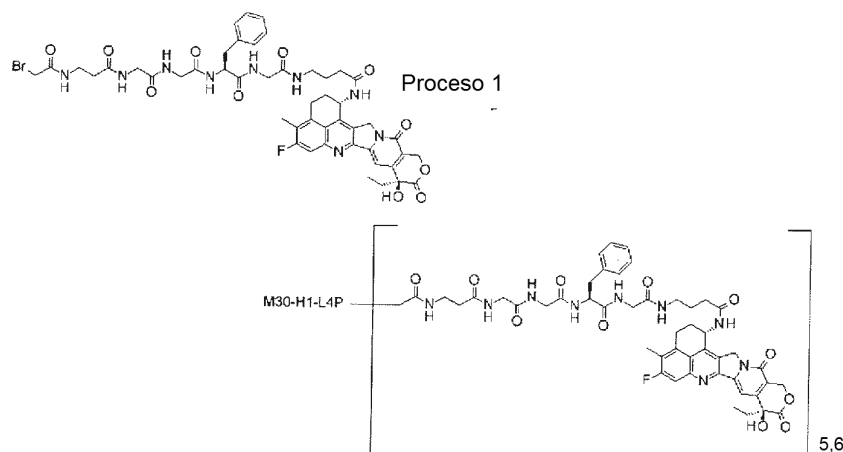
15 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,09 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 (0,059 ml; 7,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,009 ml) de
20 NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) a la misma y se agitó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

25 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 13,9 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 9,7 mg (78%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,2.

Ejemplo 31 Conjugado de anticuerpo - fármaco (30)

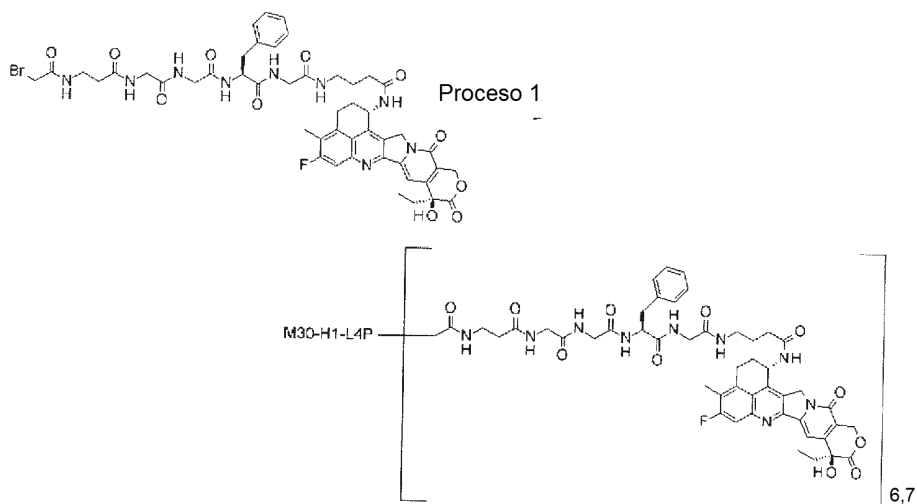
[Fórmula 100]



Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 30, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 4. Concentración de anticuerpo: 1,94 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 11,64 mg (93%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5.6.

Ejemplo 32 Conjugado de anticuerpo - fármaco (31)

[Fórmula 101]



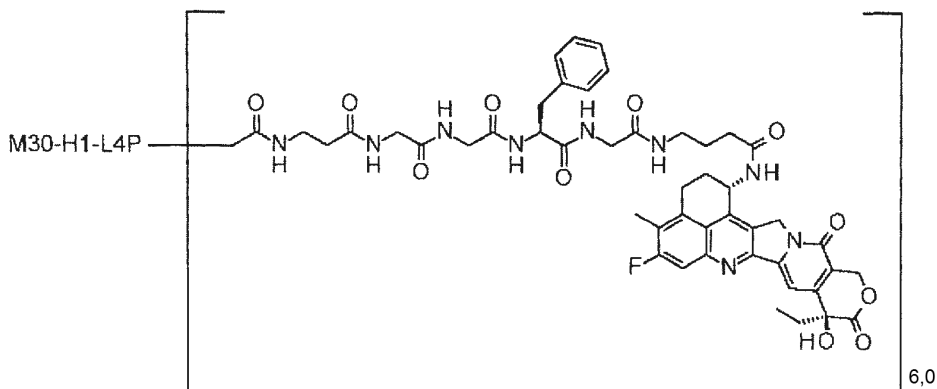
Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (31)

5 Ejemplo 5.

Concentración de anticuerpo: 1,90 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 11,40 mg (91%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,7.

Ejemplo 33 Conjugado de anticuerpo - fármaco (32)

[Fórmula 102]

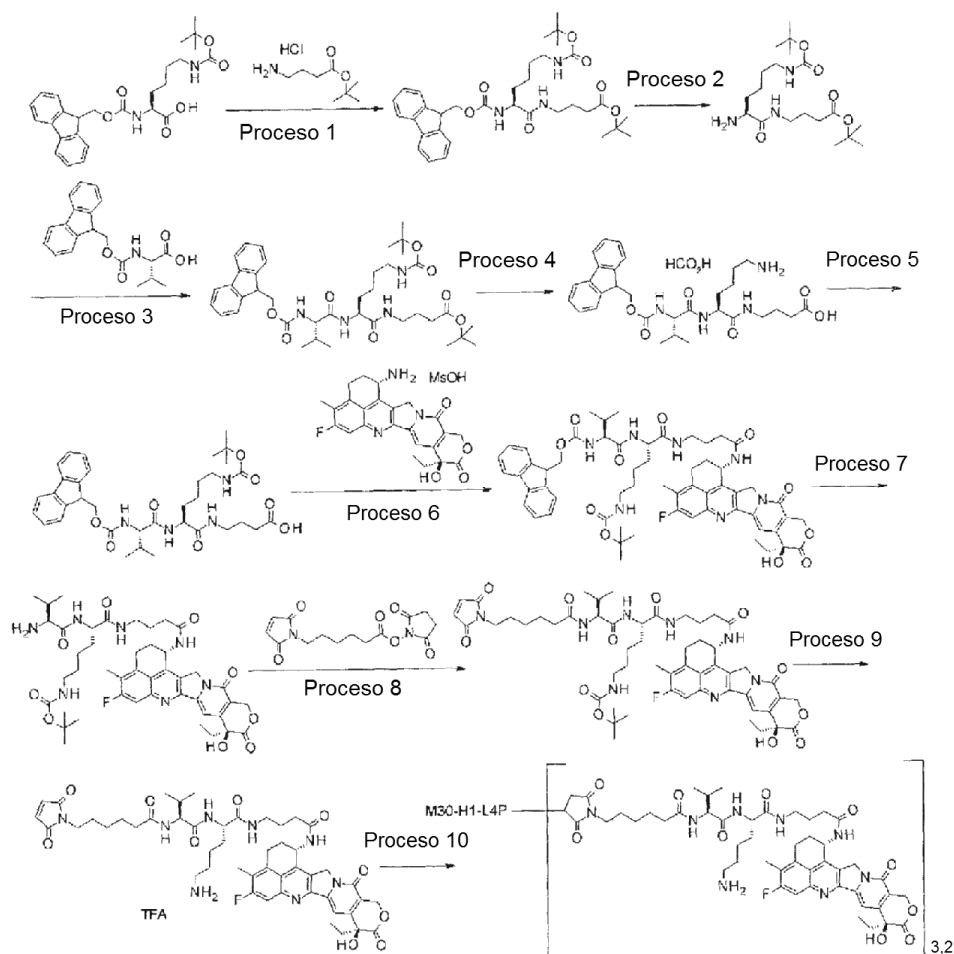


10 solución se concentró mediante el procedimiento común A para producir el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Concentración de anticuerpo: 10,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 21,06 mg, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,0.

Ejemplo 34 Conjugado de anticuerpo - fármaco (33)

[Fórmula 103]



Proceso 1: 4-({N⁶-(terc-butoxicarbonil)-N²-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-lisil}amino)butanoato de terc-butilo

A una solución de N,N-dimetilformamida (10,0 ml) de N⁶-(terc-butoxicarbonil)-N²-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-lisina (1,00 g, 2,14 mmol), N-hidroxisuccinimida (0,370 g, 3,20 mmol) y clorhidrato de éster de ácido terc-butil 4-aminobutanoico (0,830 g, 4,27 mmol), se añadieron clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,610 g, 3,20 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0,410 ml, 2,35 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa de ácido cítrico al 10 % y una solución saturada acuosa de hidrogenocarbonato sódico, y salmuera saturada, y entonces la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se retiró a presión reducida para producir el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (1,35 g, cuantitativo).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1,14-1,42 (4H, m), 1,36 (9H, s), 1,37 (9H, s), 1,48-1,67 (4H, m), 2,18 (2H, t, J = 7,6 Hz), 2,84-2,93 (2H, m), 2,99-3,11 (2H, m), 3,84-3,94 (1H, m), 4,18-4,30 (3H, m), 6,76 (1H, t, J = 5,4 Hz), 7,33 (2H, t, J = 7,3 Hz), 7,39-7,45 (3H, m), 7,73 (2H, dd, J = 7,3, 2,7 Hz), 7,85-7,92 (3H, m).

Proceso 2: 4-[[N⁶-(terc-butoxicarbonil)-L-lisil]amino]butanoato de terc-butilo

A una solución de N,N-dimetilformamida (8,00 ml) del compuesto (1,35 g, 2,22 mmol) obtenido en el proceso 1 anterior, se añadió piperidina (2,00 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El disolvente se retiró a presión reducida para producir una mezcla que contiene el compuesto del título. La mezcla se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

Proceso 3: N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N⁶-(terc-butoxicarbonil)-N-(4-terc-butoxi-4-oxobutil)-L-lisinamida

A una solución de N,N-dimetilformamida (30,0 ml) de la mezcla (2,22 mmol) obtenida en el proceso 2 anterior, se

añadieron N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valina (1,13 g, 3,32 mmol), N-hidroxisuccinimida (0,310 g, 2,66 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,550 g, 2,88 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución saturada acuosa de hidrogenocarbonato sódico y salmuera saturada, y entonces la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 9 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (0,363 g, 23 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,84 (6H, t, J = 6,0 Hz), 1,12-1,64 (8H, m), 1,34 (9H, s), 1,38 (9H, s), 1,90-2,04 (1H, m), 2,17 (2H, t, J = 7,3 Hz), 2,79-2,90 (2H, m), 2,99-3,09 (2H, m), 3,83-3,91 (1H, m), 4,08-4,44 (4H, m), 6,71 (1H, t, J = 5,4 Hz), 7,32 (2H, t, J = 7,3 Hz), 7,42 (3H, t, J = 7,3 Hz), 7,74 (2H, t, J = 7,0 Hz), 7,85-7,91 (4H, m).
EM (IEN) m/z: 709 (M+H)⁺

Proceso 4: Formiato de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N-(3-carboxipropil)-L-lisinamida

Al compuesto (0,363 mg, 0,512 mmol) obtenido en el proceso 3 anterior, se añadió ácido fórmico (10,0 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se retiró a presión reducida para producir el compuesto del título. El compuesto se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

Proceso 5: N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N⁶-(terc-butoxicarbonil)-N-(3-carboxipropil)-L-lisinamida

A una suspensión de 1,4-dioxano (5,00 ml) del compuesto (0,512 mmol) obtenido en el proceso 4 anterior, se añadieron una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico (20,0 ml) y dicarbonato de di-terc-butilo (0,178 ml, 0,769 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa de ácido cítrico al 10 % y salmuera saturada, y entonces la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se retiró a presión reducida para producir el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (0,295 g, 88 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,84 (6H, t, J = 6,7 Hz), 1,13-1,39 (4H, m), 1,35 (9H, s), 1,48-1,62 (4H, m), 1,91-2,04 (1H, m), 2,20 (2H, t, J = 7,3 Hz), 2,80-2,89 (2H, m), 2,99-3,11 (2H, m), 3,87 (1H, dd, J = 8,5, 6,7 Hz), 4,06-4,35 (4H, m), 6,71 (1H, t, J = 6,0 Hz), 7,32 (2H, t, J = 7,6 Hz), 7,39-7,46 (3H, m), 7,74 (2H, t, J = 7,6 Hz), 7,83-7,94 (4H, m).
EM (IEN) m/z: 653 (M+H)⁺

Proceso 6: N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N⁶-(terc-butoxicarbonil)-N-(4-[[[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino]-4-oxobutil)-L-lisinamida

Mesilato del compuesto (4) (0,240 g, 0,452 mmol) se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 1 usando el compuesto (0,295 g, 0,452 mmol) obtenido en el proceso 5 anterior en lugar de ácido 4-(terc-butoxicarbonilamino)butanoico para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color naranja pálido (0,208 g, 43 %).

EM (IEN) m/z: 1071 (M+H)⁺

Proceso 7: L-Valil-N⁶-(terc-butoxicarbonil)-N-(4-[[[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino]-4-oxobutil)-L-lisinamida

El compuesto (0,208 g, 0,194 mmol) obtenido en el proceso 6 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 2 para producir una mezcla que contiene el compuesto del título. La mezcla se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

Proceso 8: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N⁶-(terc-butoxicarbonil)-N-(4-[[[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino]-4-oxobutil)-L-lisinamida

La mezcla (0,194 mmol) obtenida en el proceso 7 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 3 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,133 g, 56 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,77 (6H, t, J = 5,7 Hz), 0,87 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,14-1,71 (10H, m), 1,35 (9H, s), 1,77-1,95 (3H, m), 2,02-2,23 (7H, m), 2,40 (3H, s), 2,84 (3H, c, J = 6,4 Hz), 3,05 (2H, d, J = 6,7 Hz), 3,17 (2H, s), 3,26-3,39 (3H, m), 4,01-4,16 (2H, m), 5,15 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,24 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,36-5,48 (2H, m), 5,51-5,60 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,72 (1H, t, J = 6,0 Hz), 6,99 (2H, s), 7,31 (1H, s), 7,71-7,85 (5H, m), 8,41 (1H, d, J = 9,1 Hz).

EM (IEN) m/z: 1041 (M+H)⁺

Proceso 9: Trifluoroacetato de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-(4-[[[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino]-4-oxobutil)-L-lisinamida

A una solución de diclorometano (10,0 ml) del compuesto (0,110 mg, 0,106 mmol) obtenido en el proceso 8 anterior, se añadió ácido trifluoroacético (4,00 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El disolvente se retiró a

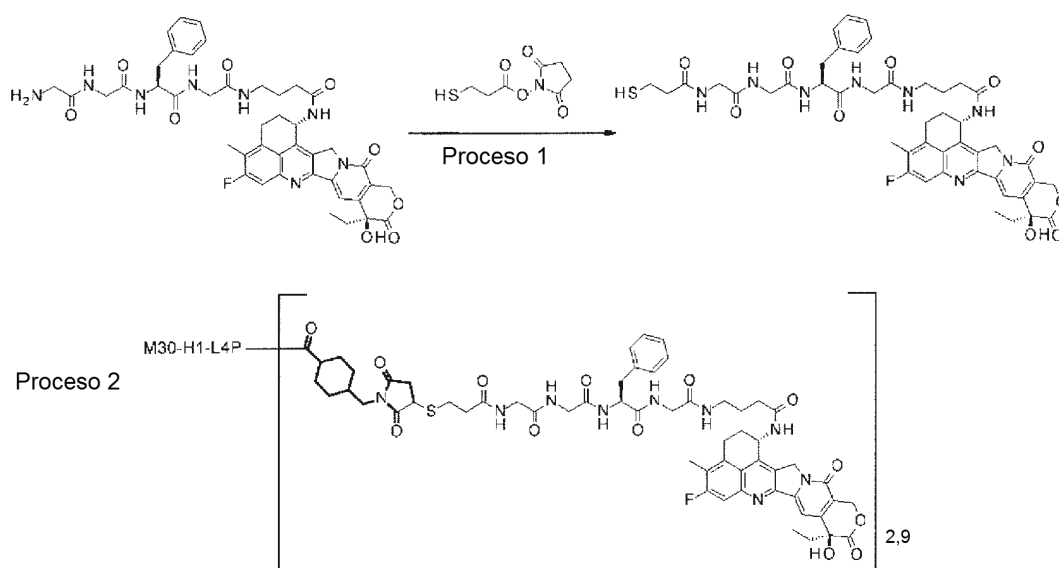
presión reducida para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (70,0 mg, 64 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,76-0,81 (6H, m), 0,87 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,12-1,31 (4H, m), 1,39-1,56 (8H, m), 1,57-1,74 (3H, m), 1,79-1,96 (3H, m), 2,06-2,18 (7H, m), 2,40 (3H, s), 2,70-2,80 (2H, m), 3,01-3,10 (2H, m), 3,13-3,22 (2H, m), 4,04 (1H, t, J = 7,6 Hz), 4,10-4,20 (1H, m), 5,15 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,24 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,36-5,47 (2H, m), 5,52-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,32 (1H, s), 7,61 (3H, s a), 7,75-7,88 (4H, m), 8,43 (1H, d, J = 8,5 Hz). EM (IEN) m/z: 941 (M+H)⁺

Proceso 10: Conjugado de anticuerpo - fármaco (33)

Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 9 anterior, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 2 del Ejemplo 29. Concentración de anticuerpo: 12,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 8,4 mg (67%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,2.

Ejemplo 35 Conjugado de anticuerpo - fármaco (34)

[Fórmula 104]



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

El compuesto (84,0 mg, 0,100 mmol) obtenido en el proceso 2 del Ejemplo 2 se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 3 del Ejemplo 2 usando N-succinimidil 3-mercaptopropionato en lugar de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (61,2 mg, 66 %).

RMN ¹H (DMSO-D₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,77-1,66 (2H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,07-2,24 (4H, m), 2,31-2,47 (3H, m), 2,40 (3H, s), 2,59-2,69 (2H, m), 2,78 (1H, dd, J = 13,7, 9,8 Hz), 2,98-3,13 (3H, m), 3,14-3,23 (2H, m), 3,54-3,79 (6H, m), 4,40-4,50 (1H, m), 5,20 (2H, dd, J = 36,8, 19,2 Hz), 5,36-5,47 (2H, m), 5,52-5,63 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,14-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,68-7,74 (1H, m), 7,80 (1H, d, J = 10,9 Hz), 8,03-8,09 (1H, m), 8,13 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,19-8,29 (2H, m), 8,46 (1H, d, J = 8,6 Hz). EM (IEN) m/z: 927 (M+H)⁺

Proceso 2: Conjugado de anticuerpo - fármaco (34)

Derivatización con SMCC de anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 20 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,5/EDTA usando el procedimiento común C-2 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,61 mlmg⁻¹cm⁻¹). La solución (0,25 ml) se puso en un tubo de 1,5 ml, se cargó con una solución de DMSO (0,0063 ml; que se corresponde con aproximadamente 2,55 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato 27,6 mM (SMCC, Thermo Fisher Scientific Inc.) a temperatura ambiente, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Esta solución de reacción se sometió a purificación usando el procedimiento común D-2 para producir 0,7 ml de una solución que contiene aproximadamente 5 mg del anticuerpo derivatizado con SMCC. Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir DMSO (0,045 ml) y una solución de DMSO que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 (0,015 ml; que se corresponde con aproximadamente 2,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a

temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 16 horas.

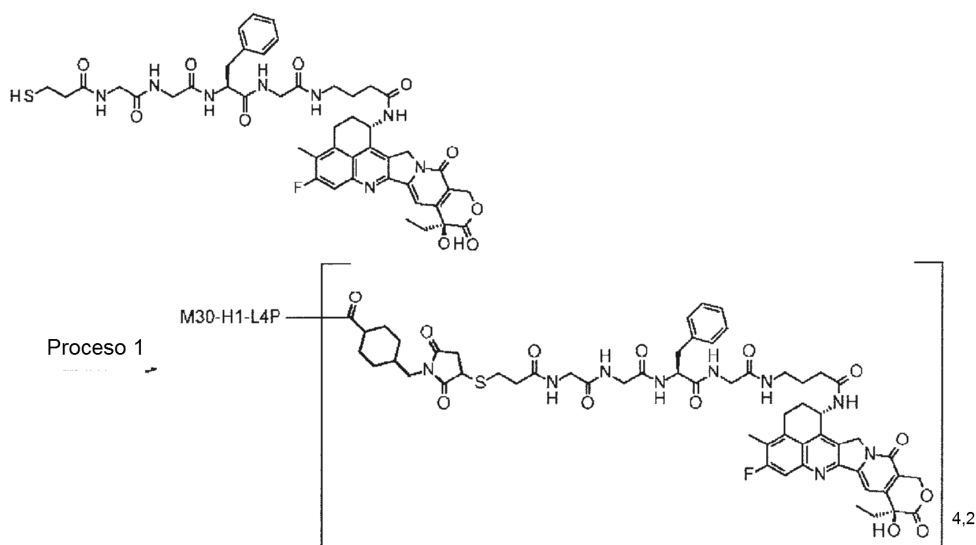
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) para producir 3,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 3,85 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 0,8 mg (16%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 2,9.

Ejemplo 36 Conjugado de anticuerpo - fármaco (35)

[Fórmula 105]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (35)

Derivatización con SMCC de anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 20 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,5/EDTA usando el procedimiento común C-2 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1} \text{cm}^{-1}$). La solución (0,25 ml) se puso en un tubo de 1,5 ml, se cargó con una solución de DMSO (0,0125 ml; que se corresponde con aproximadamente 5,1 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato 27,6 mM (SMCC, Thermo Fisher Scientific Inc.) a temperatura ambiente, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Esta solución de reacción se sometió a purificación usando el procedimiento común D-2 para producir 0,7 ml de una solución que contiene aproximadamente 5 mg del anticuerpo derivatizado con SMCC.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir DMSO (0,03 ml) y una solución de DMSO que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 35 (0,03 ml; que se corresponde con aproximadamente 4,8 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 16 horas.

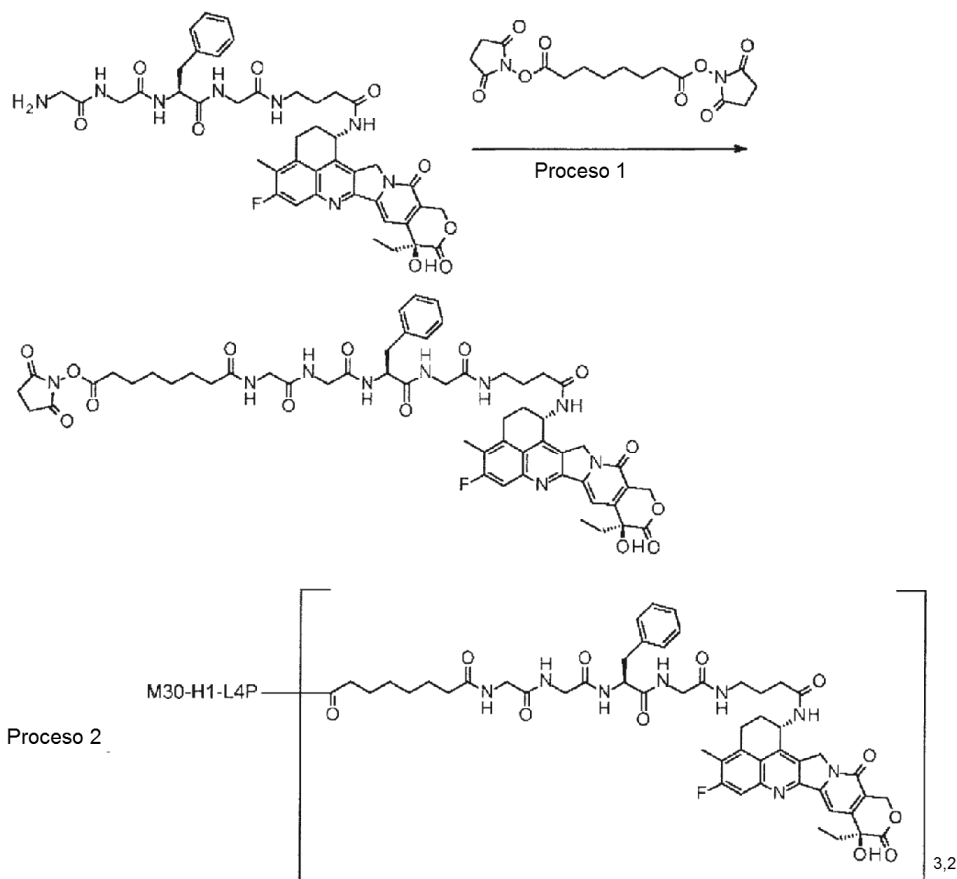
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) para producir 3,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 2,43 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 0,5 mg (10%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 4,2.

Ejemplo 37 Conjugado de anticuerpo - fármaco (36)

[Fórmula 106]



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

El compuesto (84,0 mg, 0,100 mmol) obtenido en el proceso 2 del Ejemplo 2 se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 3 del Ejemplo 2 usando suberato de di(N-succinimidilo) en lugar de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (77,1 mg, 71 %).

RMN ¹H (DMSO-D₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,21-1,38 (4H, m), 1,43-1,50 (2H, m), 1,55-1,63 (2H, m), 1,68-1,76 (2H, m), 1,80-1,91 (2H, m), 2,07-2,22 (6H, m), 2,40 (3H, s), 2,60-2,67 (2H, m), 2,76-2,84 (5H, m), 2,97-3,22 (5H, m), 3,56-3,76 (6H, m), 4,40-4,50 (1H, m), 5,20 (2H, c, J = 18,8 Hz), 5,37-5,48 (2H, m), 5,53-5,62 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,15-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,71 (1H, t, J = 5,5 Hz), 7,80 (1H, d, J = 10,9 Hz), 8,04 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,09 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,14 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,26 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,47 (1H, d, J = 8,6 Hz).

EM (IEN) m/z: 1092 (M+H)⁺

Proceso 2: Conjugado de anticuerpo - fármaco (36)

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 20 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,5/EDTA usando el procedimiento común C-2 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,61 mlmg⁻¹cm⁻¹). La solución (0,25 ml) se puso en un tubo de 1,5 ml, se cargó con una solución de DMSO que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 anterior (0,025 ml; que se corresponde con aproximadamente 3,7 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 16 horas. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación

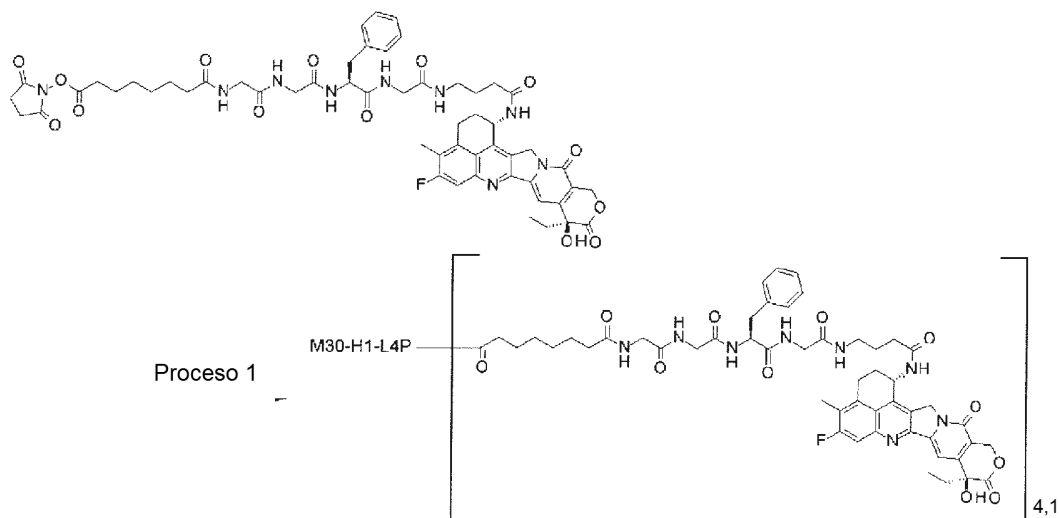
usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) para producir 3,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

- 5 Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 6,25 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 1,3 mg (26%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,2.

Ejemplo 38 Conjugado de anticuerpo - fármaco (37)

[Fórmula 107]



10 Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (37)

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 20 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,5/EDTA usando el procedimiento común C-2 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La solución (0,5 ml) se puso en un tubo de 1,5 ml, a continuación se cargó con una solución de DMSO que contiene DMSO (0,025 ml) y 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 37 (0,025 ml; que se corresponde con aproximadamente 7,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 16 horas.

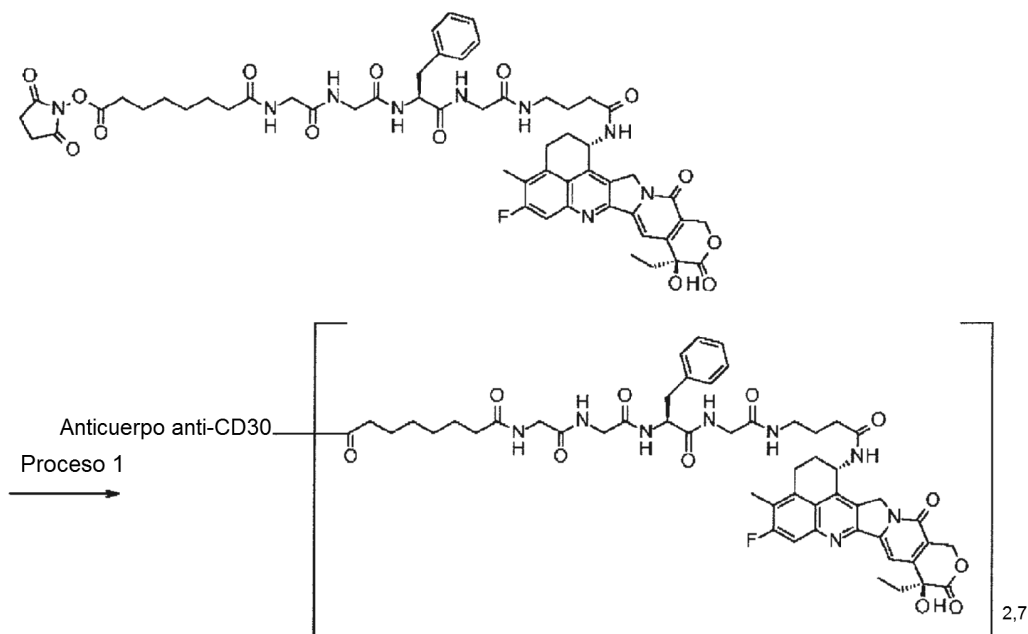
- 20 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) para producir 3,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

- 25 Concentración de anticuerpo: 4,36 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 0,9 mg (18%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 4,1.

Ejemplo 39 Conjugado de anticuerpo - fármaco (38)

[Fórmula 108]

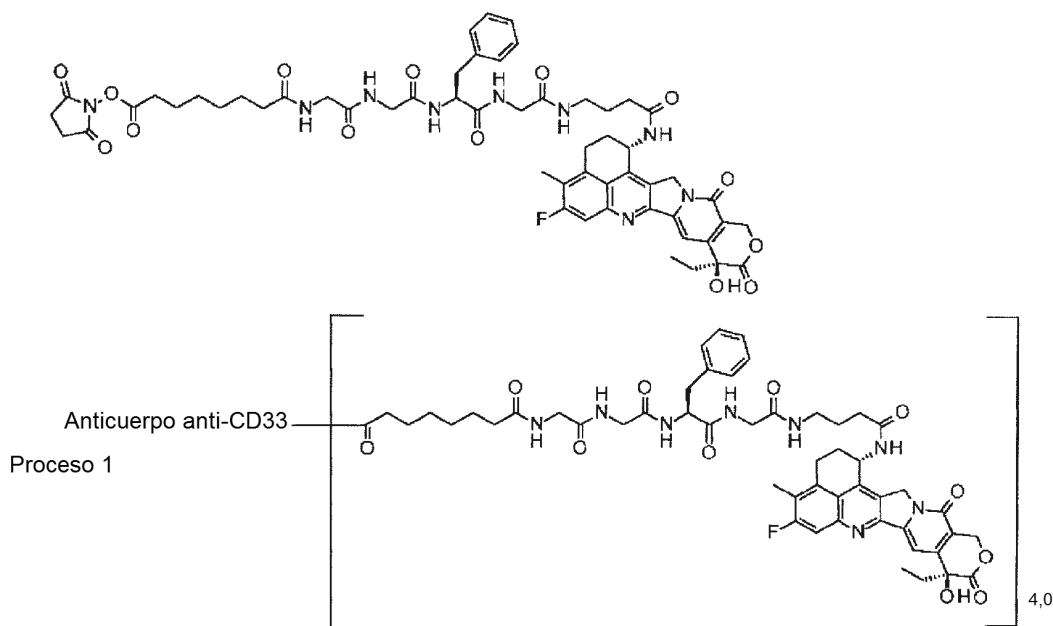
**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (38)**

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: El anticuerpo anti-CD30 producido en el Ejemplo de Referencia 3 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,5/EDTA usando el procedimiento común C-2 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,75 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml, a continuación se cargó con DMSO (0,017 ml) y una solución de DMSO que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 37 (0,023 ml; que se corresponde con 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 4 horas.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 270400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 2670$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 15820$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 0,55 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 1,4 mg (34%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 2,7.

Ejemplo 40 Conjugado de anticuerpo - fármaco (39)

[Fórmula 109]

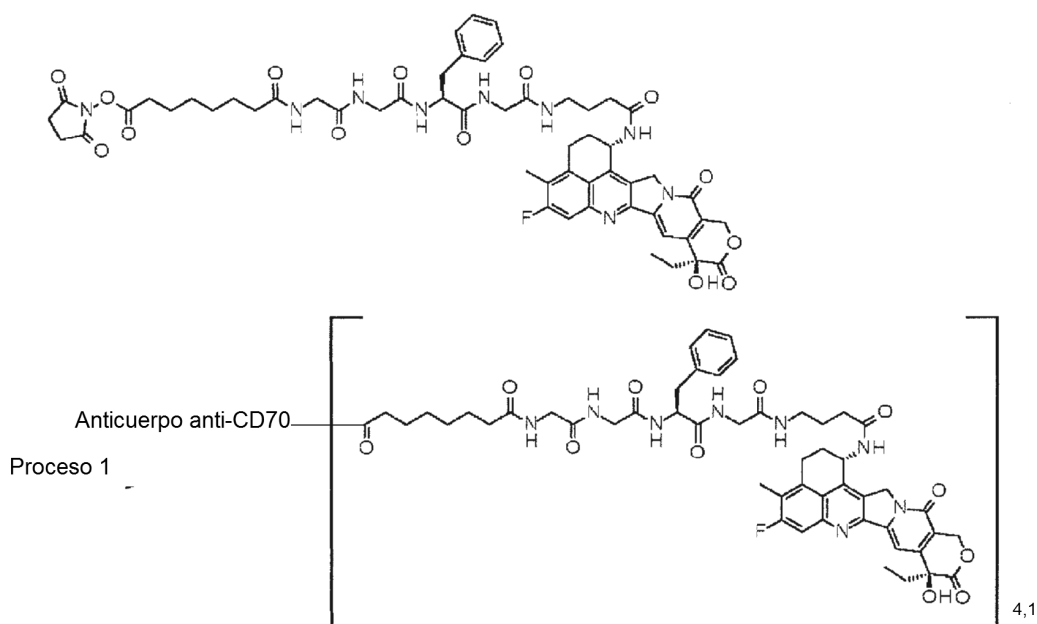
**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (39)**

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: El anticuerpo anti-CD33 producido en el Ejemplo de Referencia 4 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,5/EDTA usando el procedimiento común C-2 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,66 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml, a continuación se cargó con DMSO (0,017 ml) y una solución de DMSO que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 37 (0,023 ml; que se corresponde con 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 4 horas.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 256400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 2670$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 15820$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 0,93 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 2,3 mg (58 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 4,0.

Ejemplo 41 Conjugado de anticuerpo - fármaco (40)

[Fórmula 110]

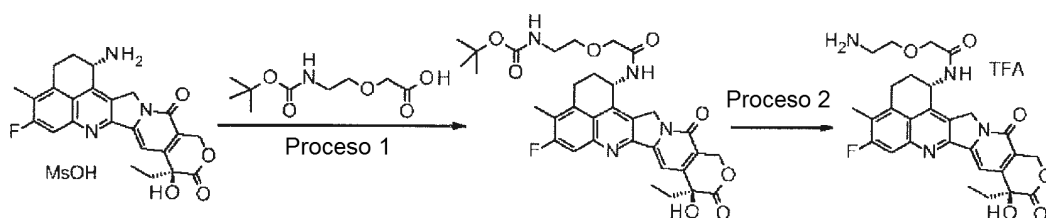
**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (40)**

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: El anticuerpo anti-CD70 producido en el Ejemplo de Referencia 5 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,5/EDTA usando el procedimiento común C-2 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,69 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml, a continuación se cargó con DMSO (0,017 ml) y una solución de DMSO que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 1 (0,023 ml; que se corresponde con 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) del Ejemplo 37 a temperatura ambiente, y se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 4 horas.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 262400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 2670$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 15820$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 1,04 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 2,6 mg (65%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 4,1.

Ejemplo 42 2-(2-Aminoetoxi)-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]acetamida

[Fórmula 111]



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

Mesilato del compuesto (4) (3,10 g, 5,47 mol) se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 1 usando ácido {2-[(terc-butoxicarbonil)amino]etoxi}acético (J. Med. Chem., 1992, vol. 35, págs. 2928) (1,55 g, 6,01 mmol) en lugar de ácido 4-(terc-butoxicarbonilamino)butanoico para producir el compuesto del título en forma de un

sólido de color amarillo pálido (2,56 g, 73 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,87 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,26 (9H, s), 1,81-1,91 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 3,08-3,26 (4H, m), 3,43-3,53 (2H, m), 4,00 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,05 (1H, d, J = 15,1 Hz), 5,14 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,22 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,40 (1H, d, J = 16,6 Hz), 5,44 (1H, d, J = 16,6 Hz), 5,59-5,66 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,86 (1H, t, J = 5,4 Hz), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d, J = 10,9 Hz), 8,49 (1H, d, J = 9,1 Hz).

EM (APCI) m/z : 637 ($M+H$)⁺

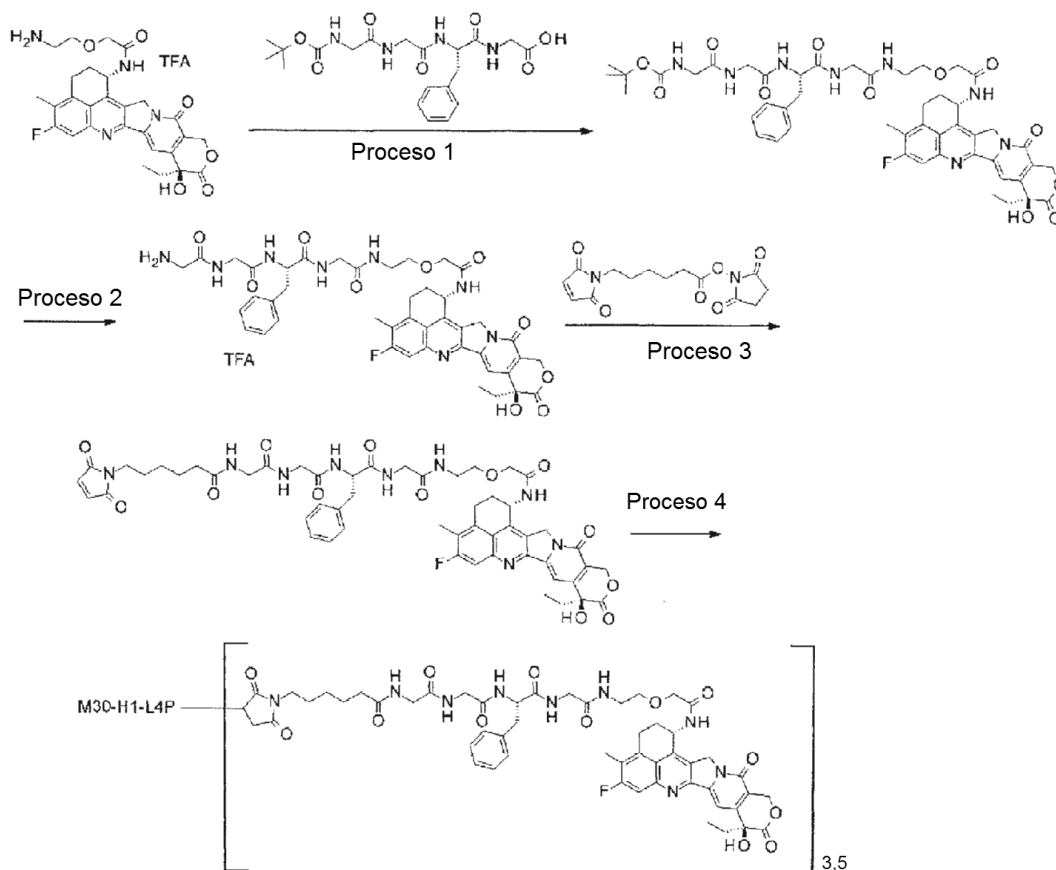
Proceso 2: 2-(2-Aminoetoxi)-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]acetamida

El compuesto (1,50 g, 2,36 mol) obtenido en el proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 2 del Ejemplo 1 para producir trifluoroclorhidrato del compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (1,50 g, cuantitativo). Este compuesto se confirmó en el tumor de un ratón portador de cáncer que recibió el conjugado de anticuerpo - fármaco (41). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,5 Hz), 1,81-1,92 (2H, m), 2,15-2,23 (2H, m), 2,41 (3H, s), 3,05 (2H, t, J = 5,1 Hz), 3,15-3,23 (2H, m), 3,71 (2H, t, J = 5,1 Hz), 4,10 (2H, s), 5,19 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,24 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,43 (2H, s), 5,58-5,66 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,33 (1H, s), 7,73-7,84 (4H, m), 8,55 (1H, d, J = 9,1 Hz).

EM (APCI) m/z : 537 ($M+H$)⁺

Ejemplo 43 Conjugado de anticuerpo - fármaco (41)

[Fórmula 112]



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

El compuesto (554 mg, 0,85 mmol) del Ejemplo 42 se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título (775 mg, 95 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,85 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,36 (9H, s), 1,78-1,89 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd, J = 13,4, 9,8 Hz), 2,95 (1H, dd, J = 13,4, 4,3 Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,23-3,32 (2H, m), 3,40-3,62 (8H, m), 3,73 (1H, dd, J = 16,5, 5,5 Hz), 4,03 (2H, s), 4,39-4,47 (1H, m), 5,17 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,41 (1H, d, J = 16,8 Hz), 5,45 (1H, d, J = 16,8 Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,54 (1H, s), 6,99 (1H, t, J = 5,8

Hz), 7,13-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,76-7,82 (2H, m), 7,90 (1H, t, J = 5,2 Hz), 8,13 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,27 (1H, t, J = 5,8 Hz), 8,49 (1H, d, J = 8,5 Hz). EM (APCI) m/z: 955 (M+H)⁺

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

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

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

EM (APCI) m/z: 855 (M+H)⁺

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

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

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

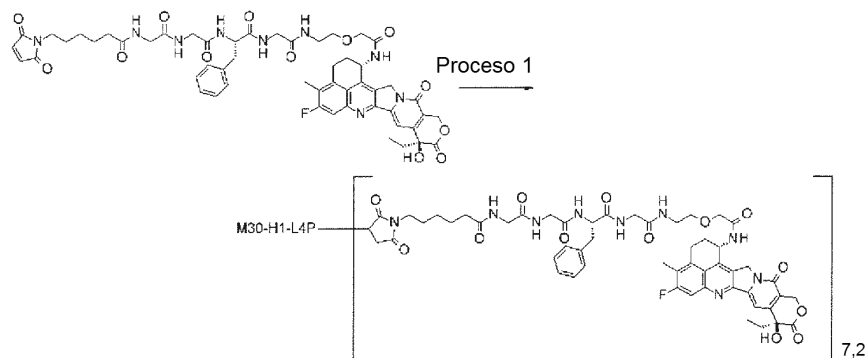
EM (APCI) m/z: 1048 (M+H)⁺

Proceso 4: Conjugado de anticuerpo - fármaco (41)

Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 3 anterior, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 2 del Ejemplo 29. Concentración de anticuerpo: 12,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 8,4 mg (67%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,5.

Ejemplo 44 Conjugado de anticuerpo - fármaco (42)

[Fórmula 113]



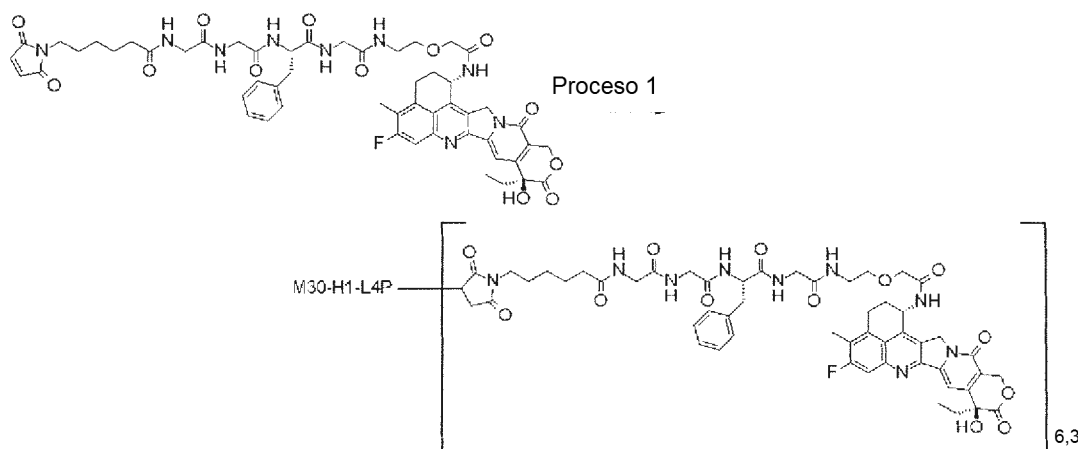
Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (42)

Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 43, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 5.

Concentración de anticuerpo: 0,83 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 4,98 mg (40%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 7,2.

Ejemplo 45 Conjugado de anticuerpo - fármaco (43)

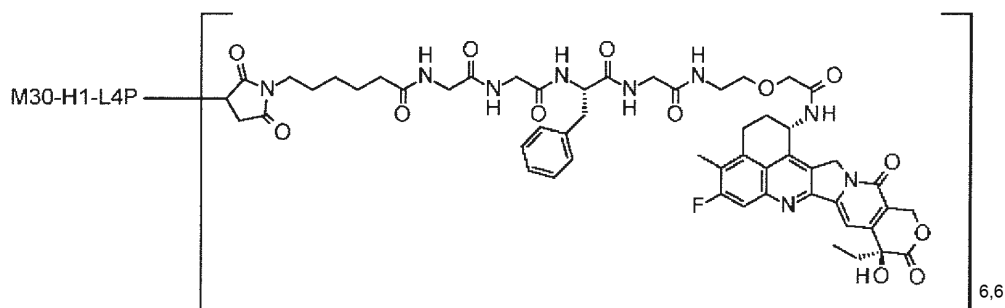
[Fórmula 114]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (43)**

Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 43, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 4. Concentración de anticuerpo: 1,06 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 6,36 mg (51%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,3.

Ejemplo 46 Conjugado de anticuerpo - fármaco (44)

[Fórmula 115]

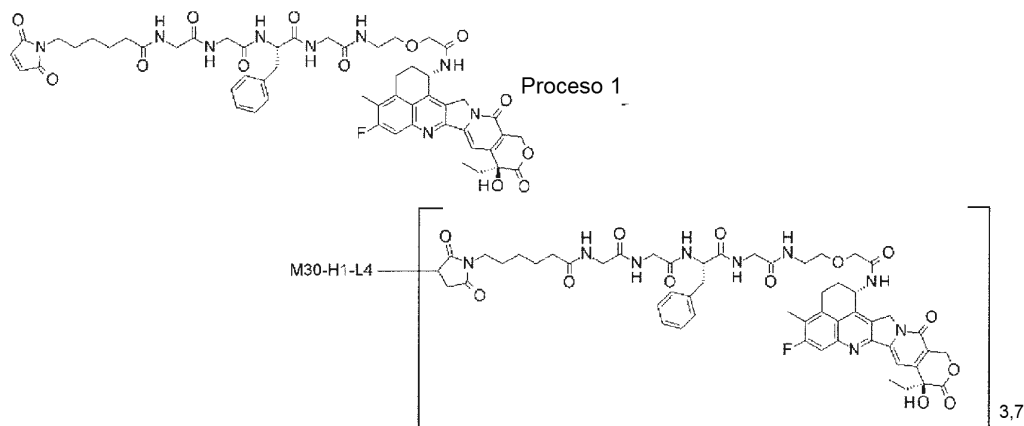


Casi la totalidad de las cantidades de los conjugados de anticuerpo - fármaco de Ejemplos 44 y 45 se mezclaron y la solución se concentró mediante el procedimiento común A para producir el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Concentración de anticuerpo: 10,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 10,21 mg, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,6.

Ejemplo 47 Conjugado de anticuerpo - fármaco (45)

[Fórmula 116]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (45)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4 producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml, 12,5 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0287 ml; 3,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (0,0267 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 43 (0,0439 ml; 5,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15°C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0066 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

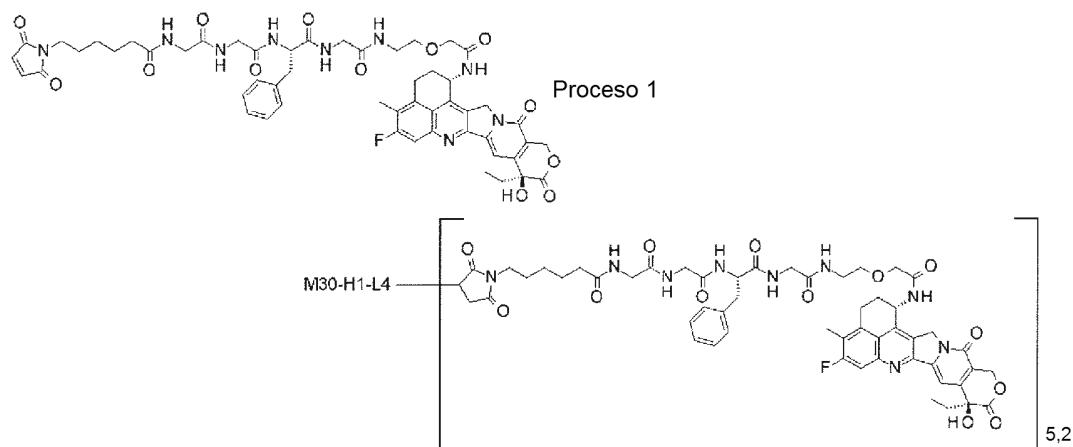
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5193$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20347$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 10,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 9,3 mg (74%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,7.

Ejemplo 48 Conjugado de anticuerpo - fármaco (46)

[Fórmula 117]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (46)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4 producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml, 12,5 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0439 ml; 5,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) (0,0287 ml; 3,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido (0,0726 ml; 8,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 3 del Ejemplo 43 a la solución anterior a temperatura ambiente, se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15°C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,011 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

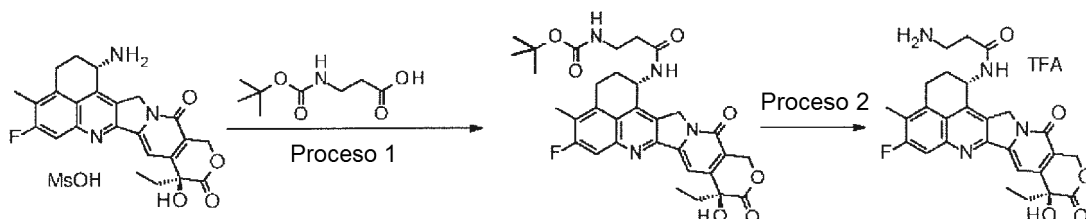
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5193$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20347$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 10,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 7,8 mg (62%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,2.

Ejemplo 49 N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-β-alaninamida

[Fórmula 118]



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

Mesilato del compuesto (4) (500 mg, 0,941 mmol) se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 1 usando N-(terc-butoxicarbonil)-β-alanina en lugar de ácido 4-(terc-butoxicarbonilamino)butanoico para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo parduzco (616 mg, cuantitativo).

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

EM (IEN) m/z: 607 (M+H)⁺

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

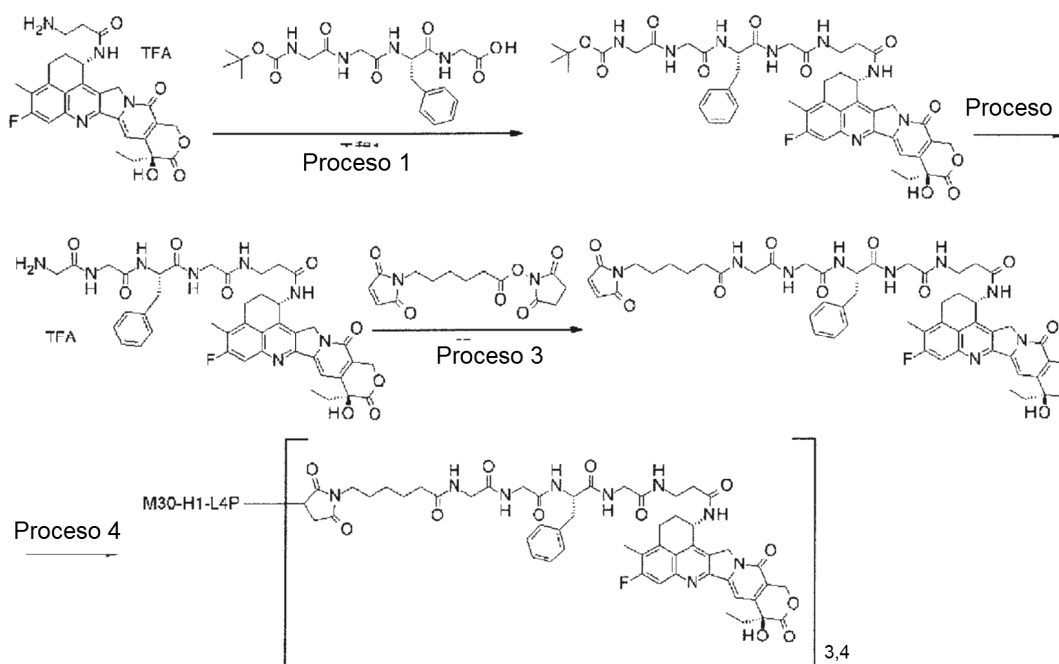
El compuesto obtenido en el proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 2 del Ejemplo 1 para producir trifluoroacetato del compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (499 mg, 86 %).

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

EM (IEN) m/z: 507 (M+H)⁺

Ejemplo 50 Conjugado de anticuerpo - fármaco (47)

[Fórmula 119]



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

El compuesto (484 mg, 0,780 mmol) del Ejemplo 49 se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (626 mg, 87 %).

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

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

El compuesto (624 mg, 0,675 mmol) obtenido en el proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 2 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (626 mg, 92 %).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,86 (2H, tt, J = 14,5, 7,2 Hz), 2,07-2,22 (2H, m), 2,36 (2H, t, J = 7,2 Hz), 2,40 (3H, s), 2,44-2,54 (2H, m), 2,75 (1H, dd, J = 13,7, 9,8 Hz), 3,04 (1H, dd, J = 13,7, 4,3 Hz), 3,12-3,22 (2H, m), 3,58 (2H, d, J = 4,7 Hz), 3,69 (3H, td, J = 11,2, 5,7 Hz), 3,87 (1H, dd, J = 17,0, 5,7 Hz), 4,54 (1H, m, J = 17,8, 4,5 Hz), 5,19 (1H, d, J = 19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,43 (2H, s), 5,51-5,60 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,14-7,29 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,81 (1H, d, J = 10,9 Hz), 7,88 (1H, t, J = 5,7 Hz), 7,97 (3H, s a), 8,29-8,38 (2H, m), 8,50 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,55 (1H, d, J = 8,6 Hz).

EM (IEN) m/z: 825 (M+H) $^+$

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

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

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,86 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,39-1,51 (4H, m), 1,79-1,91 (2H, m), 2,02-2,20 (2H, m), 2,07 (2H, t, J = 7,4 Hz), 2,30-2,42 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,78 (1H, dd, J = 14,1, 9,4 Hz), 3,02 (1H, dd, J = 14,7, 4,9 Hz), 3,12-3,21 (2H, m), 3,26-3,42 (2H, m), 3,50-3,80 (6H, m), 4,40-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J = 19,6 Hz), 5,26 (1H, d, J = 19,2 Hz), 5,42 (2H, s a), 5,51-5,62 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,84 (2H, m), 8,01 (1H, t, J = 5,3 Hz), 8,06 (1H, t, J = 5,77 Hz), 8,14 (1H, d, J = 8,2 Hz), 8,25 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,53 (1H, d, J = 8,6 Hz).

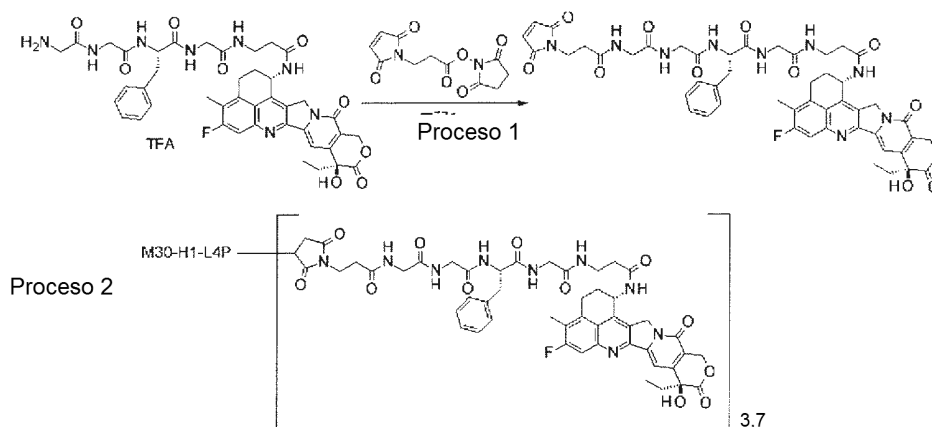
EM (IEN) m/z: 1018 (M+H) $^+$

Proceso 4: Conjugado de anticuerpo - fármaco (47)

Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 3 anterior, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 4 del Ejemplo 2. Concentración de anticuerpo: 12,27 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 8,6 mg (69%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,4.

Ejemplo 51 Conjugado de anticuerpo - fármaco (48)

[Fórmula 120]



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

El compuesto (60,0 mg, 0,0646 mmol) obtenido en el proceso 2 del Ejemplo 50 se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 3 del Ejemplo 2 usando propionato de N-succinimidil 3-maleimida en lugar de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (36,0 mg, 57 %).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,86 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,85 (2H, dt, J = 14,4, 7,5 Hz), 2,05-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,30-2,44 (5H, m), 2,73-2,84 (1H, m), 3,02 (1H, dd, J = 13,9, 4,5 Hz), 3,17 (3H, d, J = 5,1 Hz), 3,26-3,40 (2H, m), 3,41-3,81 (6H, m), 4,40-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J = 19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,42 (2H, s a), 5,52-5,61 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,80 (2H, d, J = 10,2 Hz), 8,03 (1H, t, J = 5,5 Hz), 8,12 (1H, d, J = 8,2 Hz), 8,20-8,31 (2H, m), 8,52 (1H, d, J = 8,6 Hz).

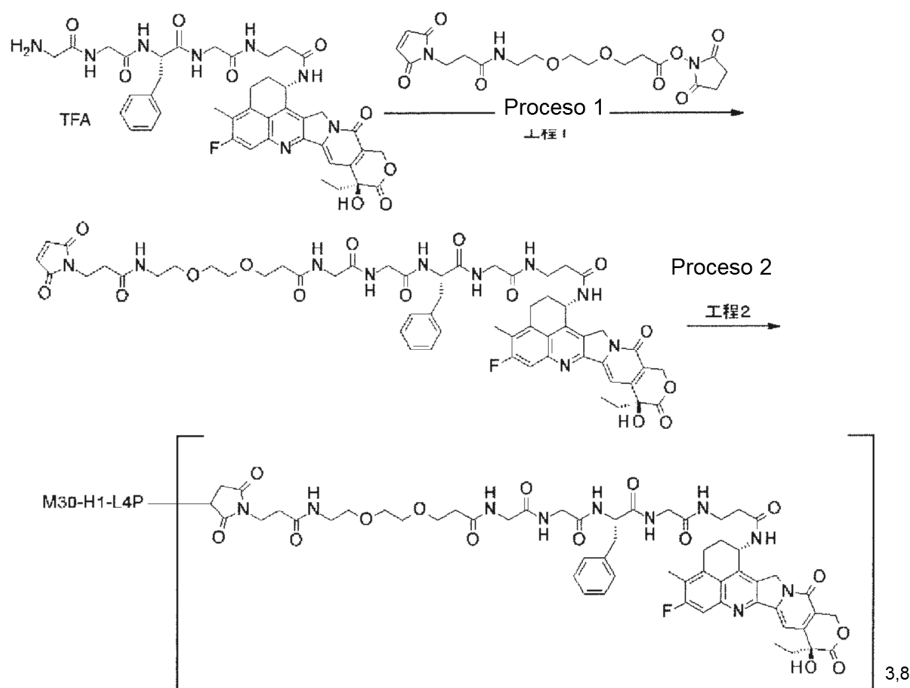
EM (IEN) m/z: 976 (M+H) $^+$

Proceso 2: Conjugado de anticuerpo - fármaco (48)

Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 1 anterior, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 4 del Ejemplo 2. Concentración de anticuerpo: 11,59 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 8,1 mg (65%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,7.

Ejemplo 52 Conjugado de anticuerpo - fármaco (49)

[Fórmula 121]



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

El compuesto (60,0 mg, 0,0646 mmol) obtenido en el proceso 2 del Ejemplo 50 se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 3 del Ejemplo 2 usando 3-(2-(2-(3-maleimidopropanamido)etoxi)etoxi)propanoato de N-succinimidilo en lugar de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para producir el compuesto del título en forma de un sólido (23,0 mg, 31 %).

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

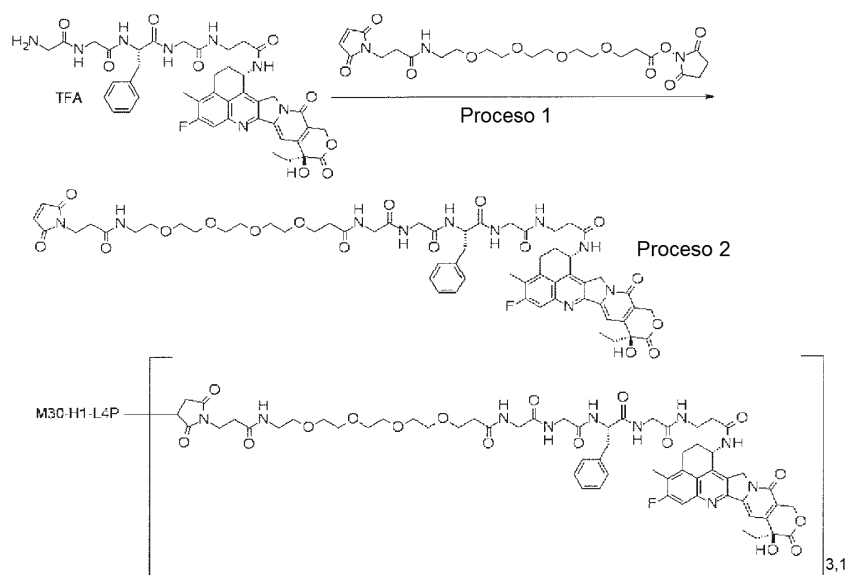
EM (IEN) m/z: 1135 (M+H)⁺

Proceso 2: Conjugado de anticuerpo - fármaco (49)

Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 1 anterior, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 2 del Ejemplo 29. Concentración de anticuerpo: 14,50 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 10,2 mg (82%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,8.

Ejemplo 53 Conjugado de anticuerpo - fármaco (50)

[Fórmula 122]



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

- 5 El compuesto (60,0 mg, 0,0646 mmol) obtenido en el proceso 2 del Ejemplo 50 se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 3 del Ejemplo 2 usando N-succinimidil 1-maleinimida-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azononadecanoato en lugar de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para producir el compuesto del título en forma de un sólido (23,0 mg, 29 %).

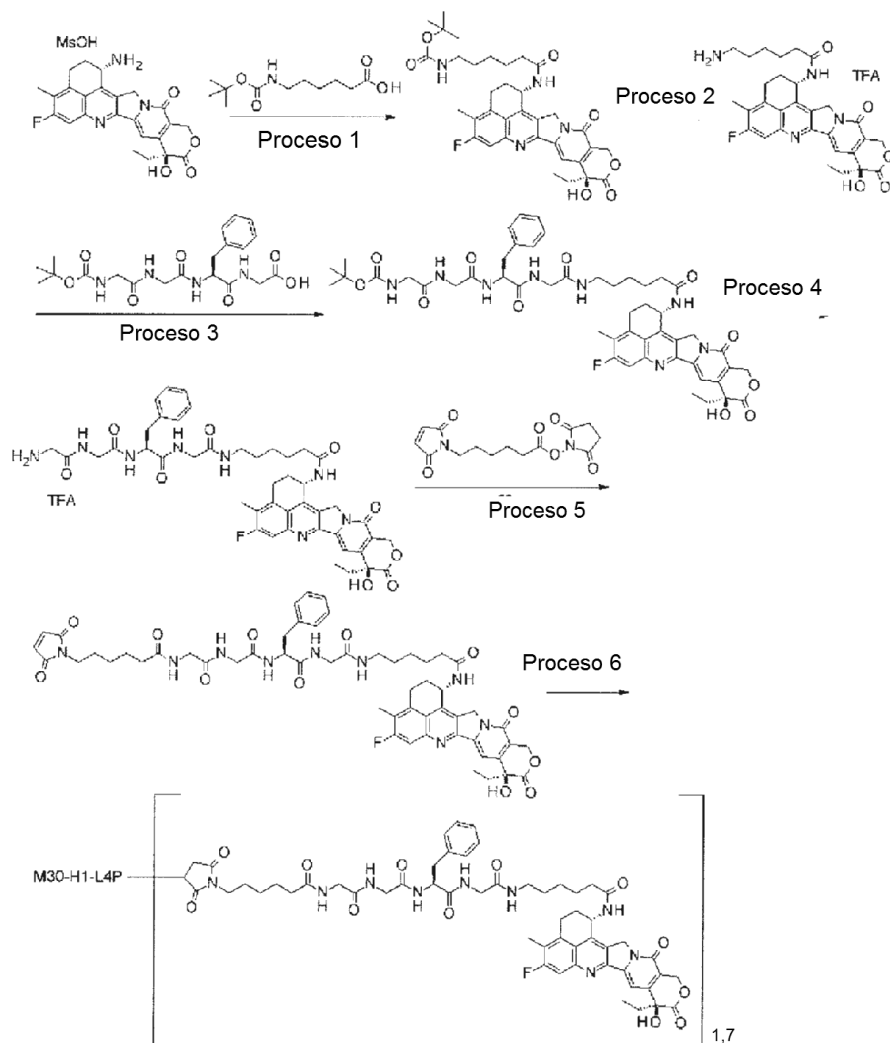
10 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J = 7,0 Hz), 1,85 (2H, tt, J = 14,6, 7,1 Hz), 2,06-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,28-2,43 (6H, m), 2,78 (1H, dd, J = 13,7, 9,4 Hz), 3,02 (1H, dd, J = 14,1, 3,9 Hz), 3,09-3,22 (4H, m), 3,27-3,41 (4H, m), 3,47 (12H, d, J = 8,6 Hz), 3,53-3,81 (10H, m), 4,41-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J = 19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,42 (2H, s a), 5,53-5,61 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,12-7,29 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,85 (2H, m), 8,03 (2H, d, J = 6, Hz), 8,11-8,21 (2H, m), 8,27 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,54 (1H, d, J = 8,6 Hz).
EM (IEN) m/z: 1224 (M+H)⁺

- 15 **Proceso 2:** Conjugado de anticuerpo - fármaco (50)

Usando el anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 y el compuesto obtenido en el proceso 1 anterior, el conjugado de anticuerpo - fármaco del título se obtuvo de la misma forma que en el proceso 4 del Ejemplo 2. Concentración de anticuerpo: 13,47 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 9,4 mg (75%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,1.

Ejemplo 54 Conjugado de anticuerpo - fármaco (51)

[Fórmula 123]



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

Mesilato del compuesto (4) (0,500 g, 0,882 mmol) se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 1 del Ejemplo 1 usando ácido 6-(terc-butoxicarbonilamino)hexanoico en lugar de ácido 4-(terc-butoxicarbonilamino)butanoico para producir el compuesto del título (0,620 g, cuantitativo).

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

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

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

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

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

hexil)glicinamida

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

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

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

El compuesto (0,105 g, 0,108 mmol) obtenido en el proceso 3 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 2 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título (0,068 mg, 65 %).

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 0,89 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,15-1,67 (6H, m), 1,79-1,97 (2H, m), 2,08-2,24 (4H, m), 2,42 (3H, s), 2,76-2,82 (1H, m), 3,00-3,10 (5H, m), 3,19 (1H, s), 3,50-3,63 (2H, m), 3,64-3,76 (3H, m), 3,84-3,92 (1H, m), 4,51-4,59 (1H, m), 5,17 (1H, d, J = 19,4 Hz), 5,24 (1H, d, J = 19,4 Hz), 5,44 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s a), 7,15-7,29 (5H, m), 7,33 (1H, s), 7,72-7,78 (1H, m), 7,82 (1H, d, J = 11,0 Hz), 7,96-8,08 (2H, m), 8,30-8,38 (2H, m), 8,46-8,56 (2H, m).

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

El compuesto (58 mg, 0,060 mmol) obtenido en el proceso 4 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el proceso 3 del Ejemplo 2 para producir el compuesto del título (39 mg, 62 %).

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,99 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,27 (2H, td, J = 11,6, 6,1 Hz), 1,38-1,44 (2H, m), 1,50-1,63 (6H, m), 1,65-1,80 (2H, m), 1,89-1,98 (2H, m), 2,17-2,25 (3H, m), 2,26-2,36 (3H, m), 2,40 (3H, s), 2,95 (1H, dd, J = 14,3, 9,2 Hz), 3,12 (1H, dd, J = 13,7, 5,7 Hz), 3,15-3,25 (4H, m), 3,44 (2H, t, J = 7,2 Hz), 3,65 (1H, d, J = 17,2 Hz), 3,76 (1H, d, J = 17,2 Hz), 3,79-3,86 (4H, m), 4,43 (1H, dd, J = 8,9, 6,0 Hz), 5,10 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,35 (1H, d, J = 16,6 Hz), 5,56 (1H, d, J = 16,0 Hz), 5,60-5,64 (1H, m), 6,76 (2H, s), 7,12-7,24 (6H, m), 7,58 (1H, s), 7,60 (1H, d, J = 10,9 Hz), 7,68 (1H, t, J = 5,7 Hz).

EM (IEN) m/z: 1060 (M+H)⁺

Proceso 6: Conjugado de anticuerpo - fármaco (51)

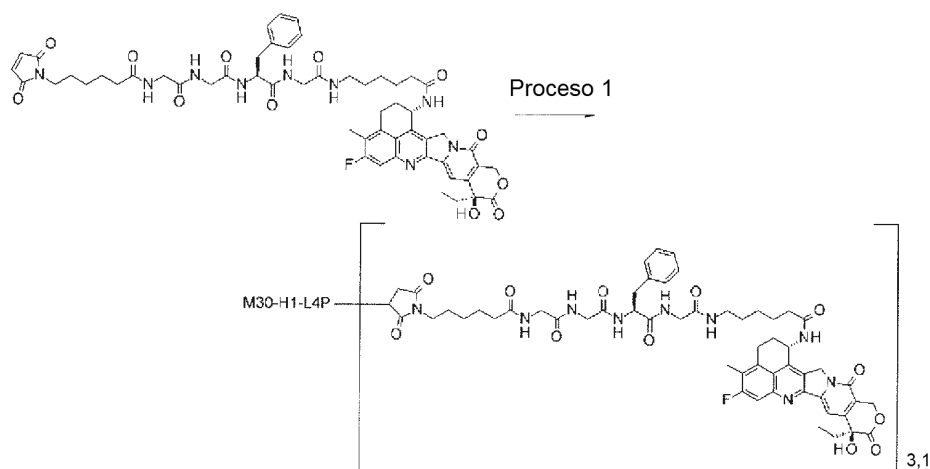
Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,61) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,0 ml) se recogió en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0147 ml; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora. Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de incubar la solución a 22 °C durante 10 minutos, una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 5 anterior (0,0295 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma y se incubó para conjugarse el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,00590 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a 22 °C durante otros 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó PBS7,4 como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron ε_{A,280} = 235300 (valor de cálculo estimado), ε_{A,370} = 0 (valor de cálculo estimado), ε_{D,280} = 5000 (valor promedio medido) y ε_{D,370} = 19000 (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 0,97 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 5,82 mg (58 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 1,7.

Ejemplo 55 Conjugado de anticuerpo - fármaco (52)

[Fórmula 124]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (52)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,61) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,0 ml) se recogió en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0295 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora. Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de incubar la solución anterior a 22 °C durante 10 minutos, una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 5 del Ejemplo 54 (0,0590 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,0118 ml; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a 22 °C durante otros 20 minutos.

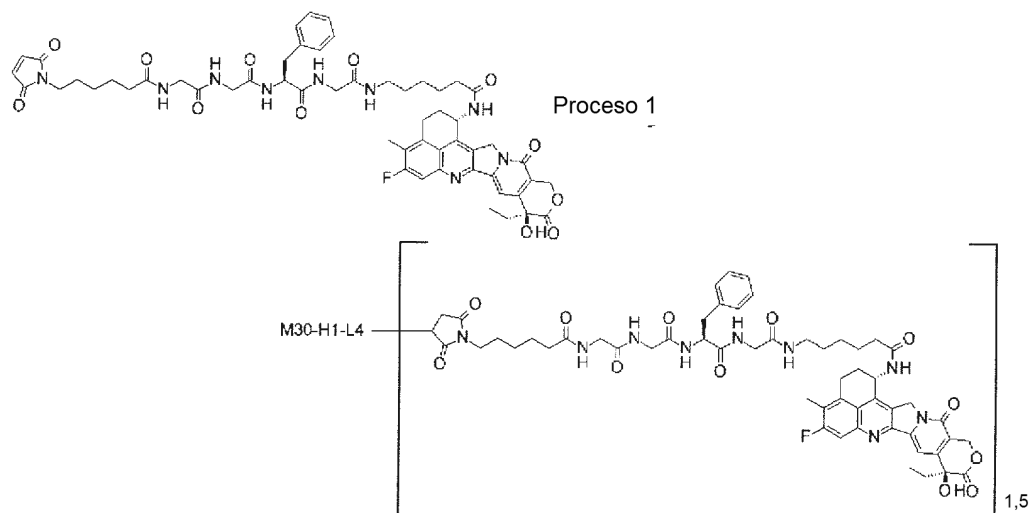
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó PBS7,4 como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 0,94 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 5,64 mg (56%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,1.

Ejemplo 56 Conjugado de anticuerpo - fármaco (53)

[Fórmula 125]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (53)**

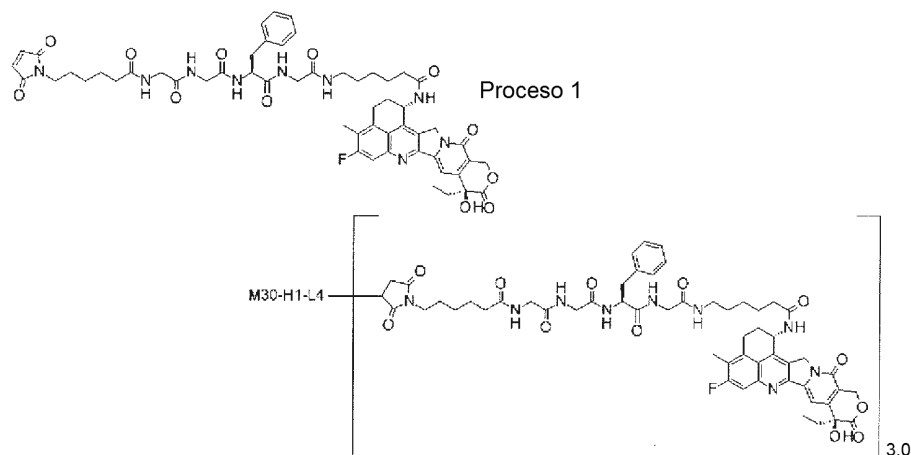
Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4 producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,61) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,0 ml) se recogió en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0147 ml; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora. Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de incubar la solución anterior a 22 °C durante 10 minutos, una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 5 del Ejemplo 54 (0,0295 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,00590 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a 22 °C durante otros 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó PBS7,4 como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 1,22 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 7,32 mg (73%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 1,5.

Ejemplo 57 Conjugado de anticuerpo - fármaco (54)

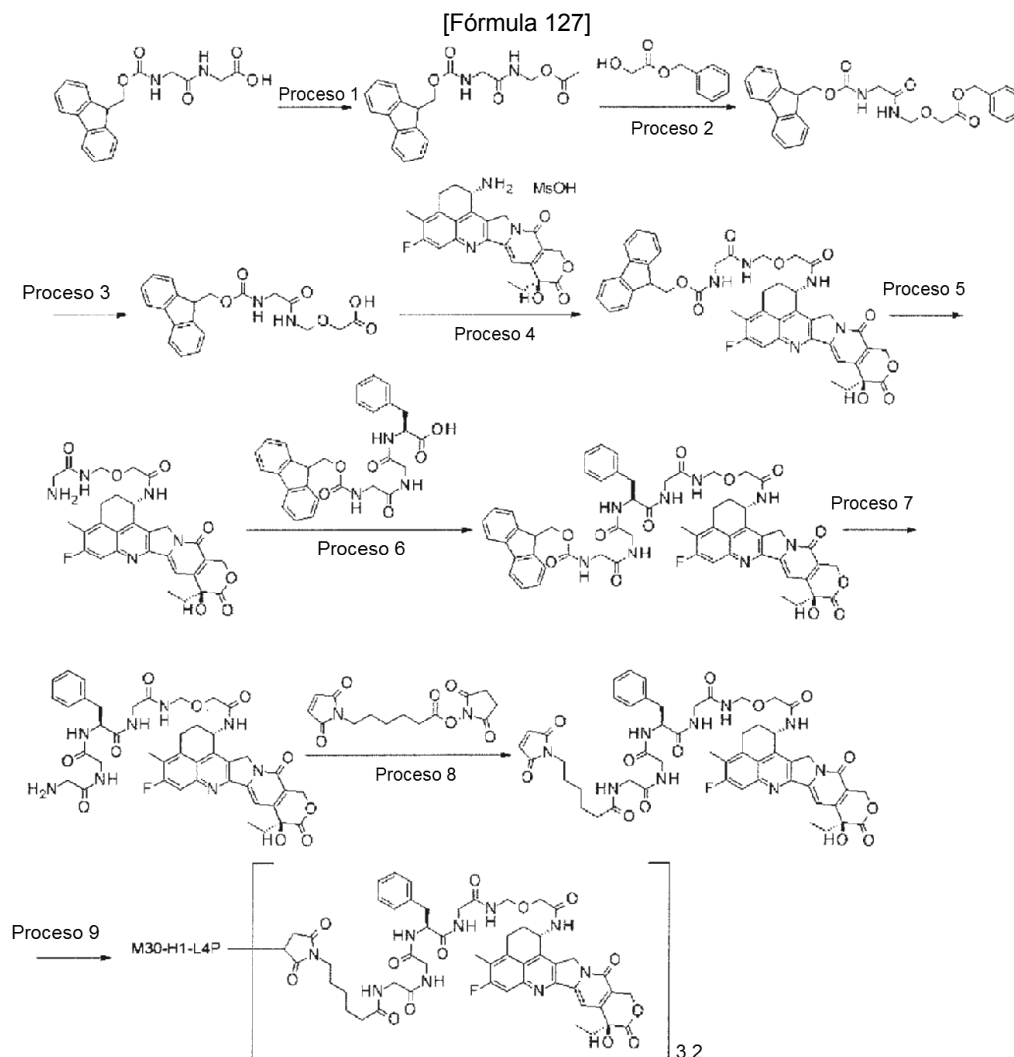
[Fórmula 126]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (54)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4 producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó 1,61) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,0 ml) se recogió en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0295 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora. Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de incubar la solución anterior a 22 °C durante 10 minutos, una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 5 del Ejemplo 54 (0,0590 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,0118 ml; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a 22 °C durante otros 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó PBS7,4 como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 1,06 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 6,36 mg (64%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,0.

Ejemplo 58 Conjugado de anticuerpo - fármaco (55)

Proceso 1: ({N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil}amino)acetato de metilo

- 5 A una mezcla que contiene N-9-fluorenilmetoxycarbonilglicilglicina (4,33 g, 12,2 mmol), tetrahidrofurano (120 ml) y tolueno (40,0 ml), se añadieron piridina (1,16 ml, 14,7 mmol) y tetraacetato de plomo (6,84 g, 14,7 mmol) y se calentó a reflujo durante 5 horas. Después de que la solución de reacción se enfriara a temperatura ambiente, los materiales insolubles se retiraron por filtración a través de Celite, y se concentraron a presión reducida. Los residuos obtenidos se disolvieron en acetato de etilo y se lavaron con agua y salmuera saturada, y entonces la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de que el disolvente se retirara a presión reducida, los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [hexano : acetato de etilo = 9 : 1 (v/v) - acetato de etilo] para producir el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (3,00 g, 67 %).
- 10 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 2,07 (3H, s), 3,90 (2H, d, J = 5,1 Hz), 4,23 (1H, t, J = 7,0 Hz), 4,46 (2H, d, J = 6,6 Hz), 5,26 (2H, d, J = 7,0 Hz), 5,32 (1H, s a), 6,96 (1H, s a), 7,32 (2H, t, J = 7,3 Hz), 7,41 (2H, t, J = 7,3 Hz), 7,59 (2H, d, J = 7,3 Hz), 7,77 (2H, d, J = 7,3 Hz).
- 15

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

- A una solución de tetrahidrofurano (40,0 ml) del compuesto (3,68 g, 10,0 mmol) obtenido en el proceso 1 anterior y glicolato de bencilo (4,99 g, 30,0 mmol), se añadió terc-butoxido potásico (2,24 g, 20,0 mmol) a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución de reacción se cargó con acetato de etilo y agua a 0 °C y se extrajo con acetato de etilo y cloroformo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida. Los residuos obtenidos se disolvieron en dioxano (40,0 ml) y agua (10,0 ml), se cargaron con hidrogenocarbonato sódico (1,01 g, 12,0 mmol) y clorofornio de 9-fluorenilmetilo (2,59 g, 10,0 mmol) y se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se cargó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [hexano :
- 20
- 25

acetato de etilo = 100 : 0 (v/v) - 0 : 100] para producir el compuesto del título en una sustancia oleosa incolora (1,88 g, 40 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 3,84 (2H, d, J = 5,5 Hz), 4,24 (3H, t, J = 6,5 Hz), 4,49 (2H, d, J = 6,7 Hz), 4,88 (2H, d, J = 6,7 Hz), 5,15-5,27 (1H, m), 5,19 (2H, s), 6,74 (1H, s a), 7,31-7,39 (7H, m), 7,43 (2H, t, J = 7,4 Hz), 7,61 (2H, d, J = 7,4 Hz), 7,79 (2H, d, J = 7,4 Hz).

Proceso 3: Ácido [(N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil)amino]metoxiacético

El compuesto (1,88 g, 3,96 mmol) obtenido en el proceso 2 anterior se disolvió en etanol (40,0 ml) y acetato de etilo (20,0 ml). Después de añadir catalizador de paladio-carbono (376 mg), se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 2 horas. Los materiales insolubles se retiraron por filtración a través de Celite, y el disolvente se retiró a presión reducida para producir el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (1,52 g, cuantitativo).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 3,62 (2H, d, J = 6,3 Hz), 3,97 (2H, s), 4,18-4,32 (3H, m), 4,60 (2H, d, J = 6,7 Hz), 7,29-7,46 (4H, m), 7,58 (1H, t, J = 5,9 Hz), 7,72 (2H, d, J = 7,4 Hz), 7,90 (2H, d, J = 7,4 Hz), 8,71 (1H, t, J = 6,5 Hz).

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

Con enfriamiento con hielo, a una solución de N,N-dimetilformamida (10,0 ml) de mesilato del compuesto (4) (0,283 g, 0,533 mmol), N-hidroxisuccinimida (61,4 mg, 0,533 mmol), y el compuesto (0,205 g, 0,533 mmol) obtenido en el proceso 3 anterior, se añadieron N,N-diisopropiletilamina (92,9 µl, 0,533 mmol) y N,N'-díciclohexilcarbodiimida (0,143 g, 0,693 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo pálido (0,352 g, 82 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,81 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,73-1,87 (2H, m), 2,06-2,20 (2H, m), 2,34 (3H, s), 3,01-3,23 (2H, m), 3,58 (2H, d, J = 6,7 Hz), 3,98 (2H, s), 4,13-4,25 (3H, m), 4,60 (2H, d, J = 6,7 Hz), 5,09-5,22 (2H, m), 5,32-5,42 (2H, m), 5,50-5,59 (1H, m), 6,49 (1H, s), 7,24-7,30 (3H, m), 7,36 (2H, t, J = 7,4 Hz), 7,53 (1H, t, J = 6,3 Hz), 7,66 (2H, d, J = 7,4 Hz), 7,75 (1H, d, J = 11,0 Hz), 7,84 (2H, d, J = 7,4 Hz), 8,47 (1H, d, J = 8,6 Hz), 8,77 (1H, t, J = 6,7 Hz).

EM (IEN) m/z: 802 (M+H)⁺

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

A una solución de N,N-dimetilformamida (11,0 ml) del compuesto (0,881 g, 1,10 mmol) obtenido en el proceso 4 anterior, se añadió piperidina (1,1 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se retiró a presión reducida para producir una mezcla que contiene el compuesto del título. La mezcla se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

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

Con enfriamiento con hielo, a una solución de N,N-dimetilformamida (50,0 ml) de la mezcla (0,439 mmol) obtenida en el proceso 5 anterior, N-hidroxisuccinimida (0,101 g, 0,878 mmol), y N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina (el compuesto descrito en la patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2002-60351) (0,440 g, 0,878 mmol), se añadió N,N'-díciclohexilcarbodiimida (0,181 g, 0,878 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 9 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color naranja pálido (0,269 g, 58 %).

EM (IEN) m/z: 1063 (M+H)⁺

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

A una solución de N,N-dimetilformamida (4,00 ml) del compuesto (0,269 g, 0,253 mmol) obtenido en el proceso 6 anterior, se añadió piperidina (0,251 ml, 2,53 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se retiró a presión reducida para producir una mezcla que contiene el compuesto del título. La mezcla se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

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

A una solución de N,N-dimetilformamida (10,0 ml) del compuesto (0,253 mmol) obtenido en el proceso 7 anterior, se añadió hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida (0,156 g, 0,506 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna

sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 9 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,100 g, 38 %).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,83 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,09-1,21 (2H, m), 1,33-1,47 (4H, m), 1,75-1,90 (2H, m), 2,00-2,23 (4H, m), 2,36 (3H, s), 2,69-2,81 (1H, m), 2,94-3,03 (1H, m), 3,06-3,22 (2H, m), 3,23-3,74 (8H, m), 3,98 (2H, s), 4,39-4,50 (1H, m), 4,60 (2H, d, J = 6,7 Hz), 5,17 (2H, s), 5,39 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,96 (2H, s), 7,11-7,24 (5H, m), 7,28 (1H, s), 7,75 (1H, d, J = 11,0 Hz), 7,97 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,03 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,09 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,27 (1H, t, J = 6,5 Hz), 8,48 (1H, d, J = 9,0 Hz), 8,60 (1H, t, J = 6,5 Hz).
EM (IEN) m/z: 1034 (M+H) $^+$

Proceso 9: Conjugado de anticuerpo - fármaco (55)

- 10 Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1} \text{cm}^{-1}$) descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml) se puso en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,025 ml; 3,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

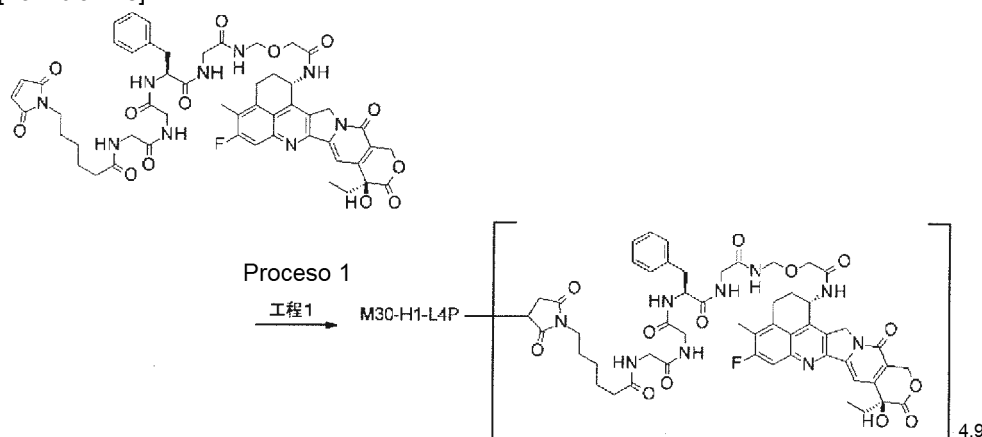
- 20 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,109 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 anterior (0,039 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, se añadió una solución acuosa (0,008 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) a la misma y se agitó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

- 25 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A descrito en el procedimiento de producción 1.

- 30 Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 12,57 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 8,8 mg (70%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,2.

Ejemplo 59 Conjugado de anticuerpo - fármaco (56)

[Fórmula 128]



- 35 Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (56)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1} \text{cm}^{-1}$) descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml) se puso en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se cargó

con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,051 ml; 6,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

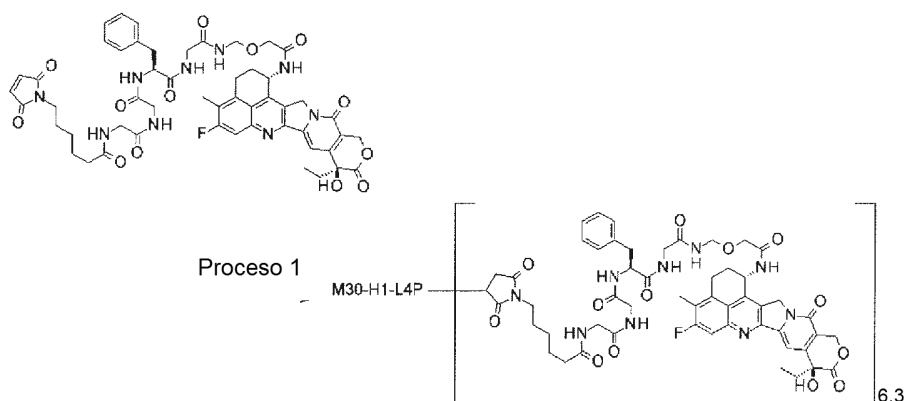
- 5 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,067 ml) una solución de dimetilsulfóxido que contiene y 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,085 ml; 10,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 60 minutos. A continuación, se añadió una solución
- 10 acuosa (0,013 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) a la misma y se agitó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

- 15 Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 1,33 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 7,98 mg (64%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 4,9.

20 **Ejemplo 60 Conjugado de anticuerpo - fármaco (57)**

[Fórmula 129]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (57)

- Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 2 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común C-1 y el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descrito
- 25 en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml) se puso en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,051 ml; 6,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

- 30 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,025 ml) y una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,127 ml; 15,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 60 minutos. A continuación, se añadió una solución
- 35 acuosa (0,019 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) a la misma y se agitó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

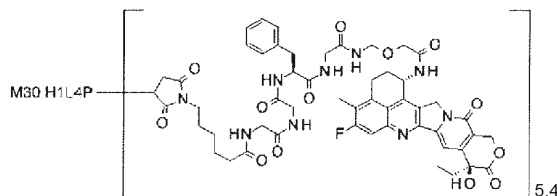
- Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A descrito en el procedimiento de producción 1.
- 40

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1

(como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 0,91 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 5,46 mg (44%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,3.

5 Ejemplo 61 Conjugado de anticuerpo - fármaco (58)

[Fórmula 130]

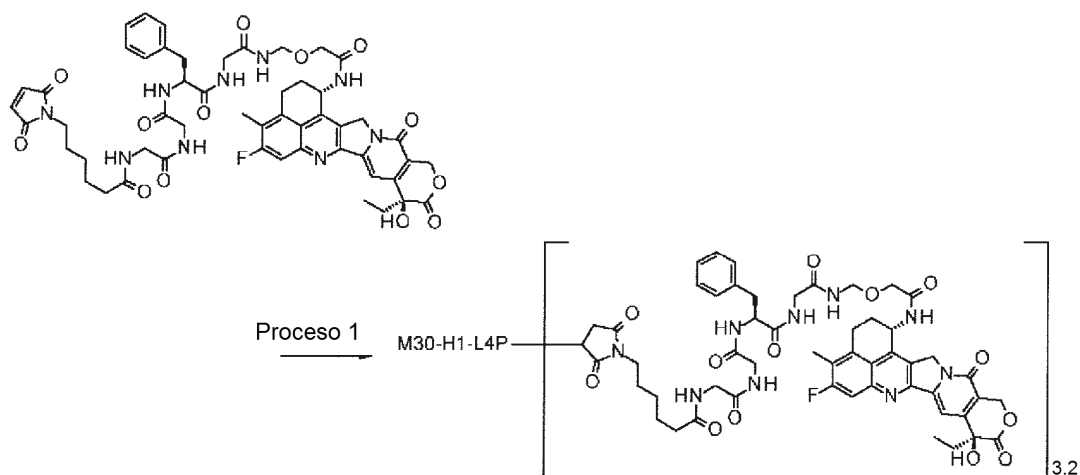


Casi la totalidad de las cantidades de los conjugados de anticuerpo - fármaco de Ejemplos 59 y 60 se mezclaron y la solución se concentró mediante el procedimiento común A descrito en el procedimiento de producción 1 para producir el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Concentración de anticuerpo: 10,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 12,30 mg, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,4.

Ejemplo 62 Conjugado de anticuerpo - fármaco (59)

[Fórmula 131]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (59)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (100 ml, 1 g del anticuerpo) se puso en un matraz de 250 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (2,43 ml; 3,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y adicionalmente con una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (5 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH cerca de 7,4 usando un pehachímetro, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (3,51 ml; 5,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) y dimetilsulfóxido (2,14 ml) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó con un agitador para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 130 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,547 ml) de NAC 100 mM se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación por ultrafiltración usando un aparato de ultrafiltración compuesto por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Casete Pellicon XL, Biomax 50 KDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, Bomba MasterFlex modelo 77521-40, Cabezal de Bomba modelo 7518-00), y un

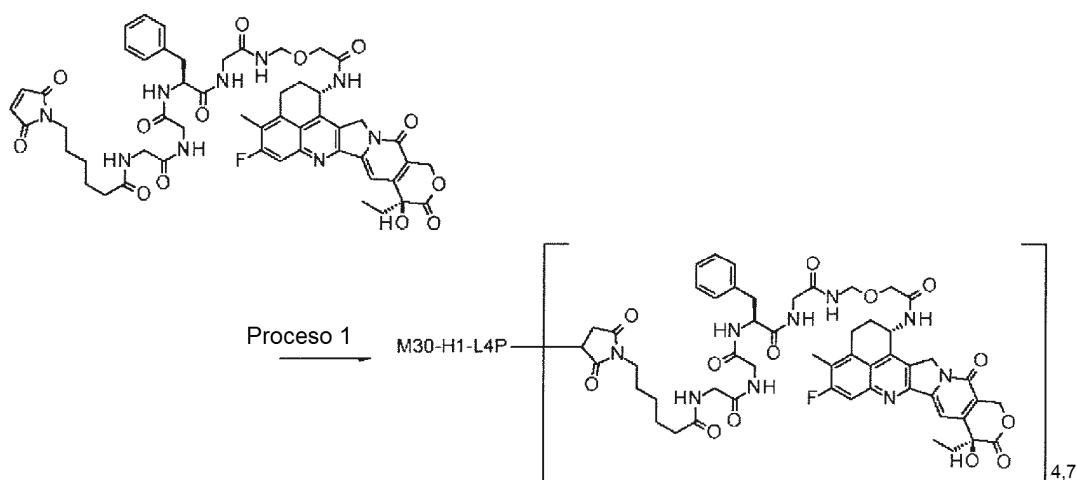
tubo (Cole-Parmer International, Tubo MasterFlex L/S16). Específicamente, al tiempo que se añadía ABS gota a gota (un total de 800 ml) como una solución tampón para la purificación a la solución de reacción, se realizó una purificación por ultrafiltración para retirar enlazadores de fármaco no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, sustituir también la solución tampón con ABS, y concentrar adicionalmente la solución, para producir

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 14,2 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 1,0 g (aproximadamente 100 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,2.

Ejemplo 63 Conjugado de anticuerpo - fármaco (60)

[Fórmula 132]



Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (60)

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (5 ml, 50 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 15 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,075 ml; 4 equivalentes por molécula de anticuerpo). Después de confirmar que la solución tenía un pH cerca de 7,0 usando un pehachímetro, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora.

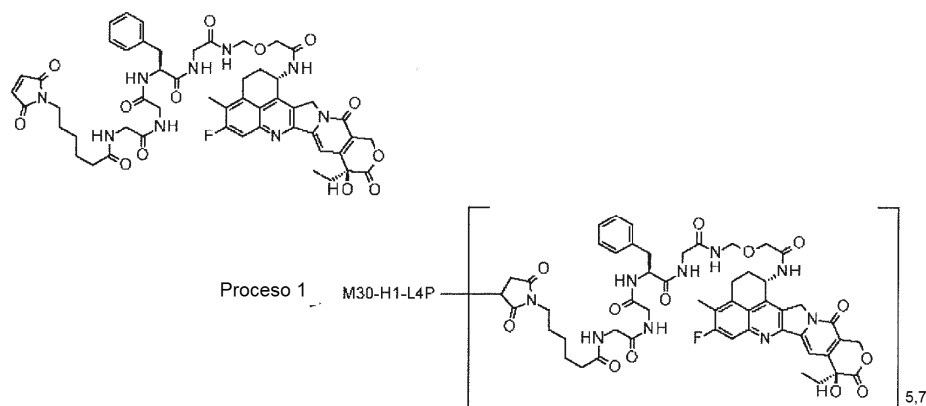
Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,219 ml; 6,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y dimetilsulfóxido (0,064 ml) a la solución anterior, se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 90 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,033 ml; 9,8 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 19 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 2,19 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 42 mg (83%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 4,7.

Ejemplo 64 Conjugado de anticuerpo - fármaco (61)

[Fórmula 133]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (61)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4P producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (4 ml, 40 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 15 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,14 ml; 5,2 equivalentes por molécula de anticuerpo). Después de confirmar que la solución tenía un pH cerca de 7,0 usando un pehachímetro, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37 °C durante 1 hora. Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,232 ml; 8,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior, se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 60 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,035 ml; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

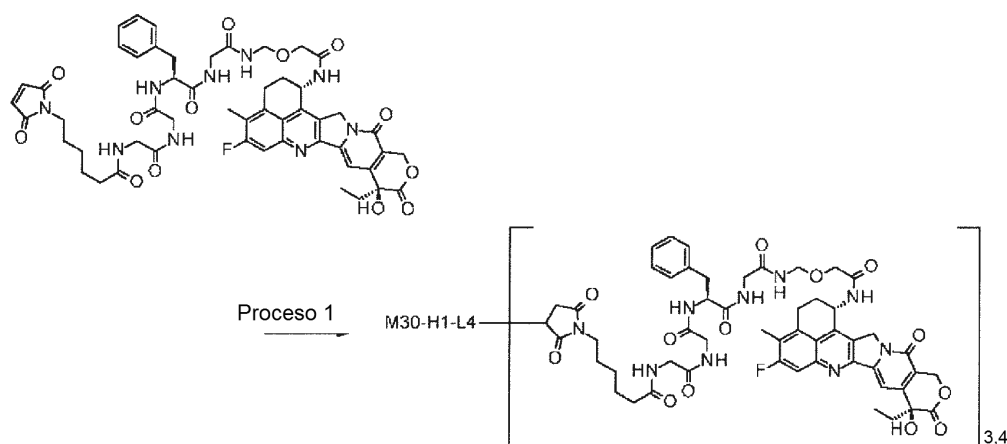
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 13 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 2,03 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 26 mg (66%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,7.

Ejemplo 65 Conjugado de anticuerpo - fármaco (62)

[Fórmula 134]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (62)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4 producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml, 12,5 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0287 ml; 3,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

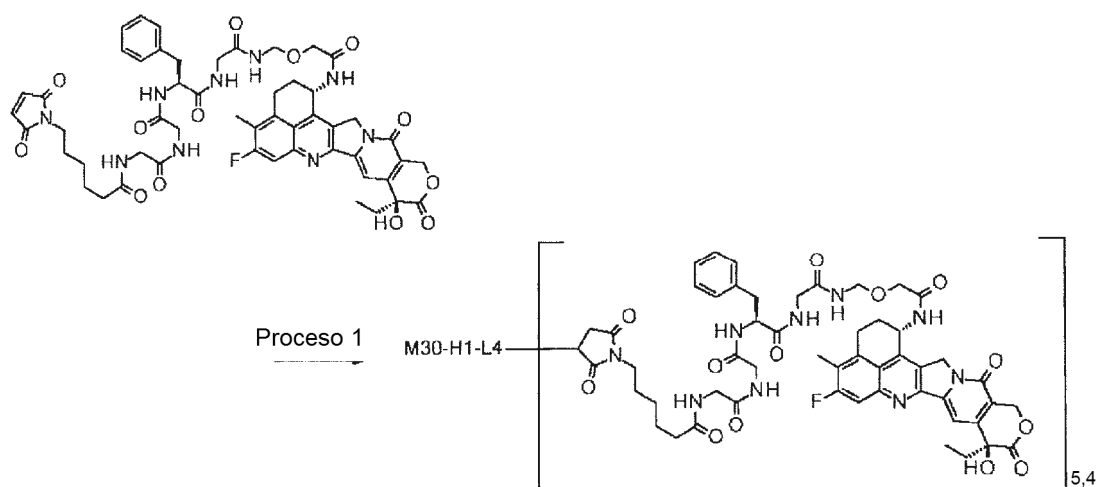
Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,0439 ml; 5,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) y dimetilsulfóxido (0,0267 ml) a la solución anterior a temperatura ambiente, se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15°C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0066 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 10,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 7,8 mg (62%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,4.

Ejemplo 66 Conjugado de anticuerpo - fármaco (63)

[Fórmula 135]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (63)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo M30-H1-L4 producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,61 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (1,25 ml, 12,5 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0439 ml; 5,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) (0,0287 ml; 3,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,0726 ml; 8,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15°C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,011 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

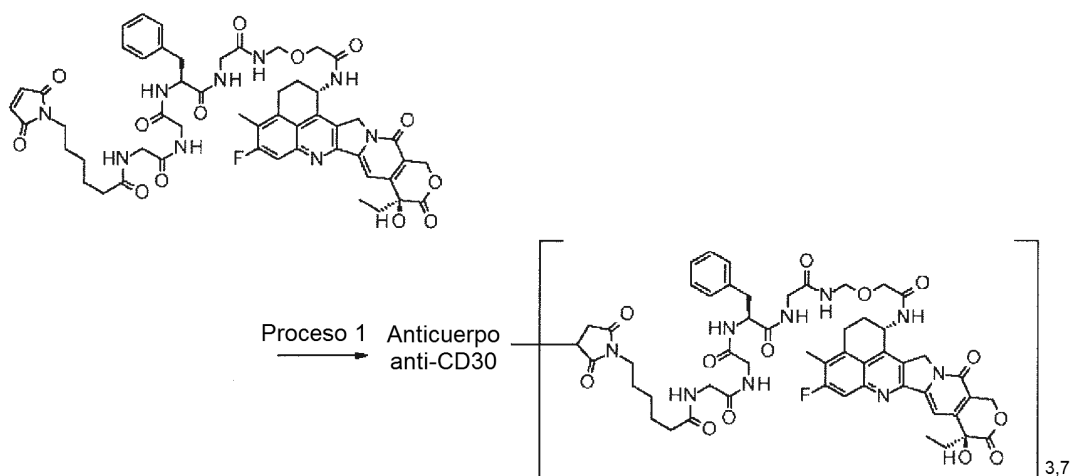
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 6 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título. Después de esto, la solución se concentró mediante el procedimiento común A.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 235300$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 10,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 7,3 mg (58 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,4.

Ejemplo 67 Conjugado de anticuerpo - fármaco (64)

[Fórmula 136]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (64)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD30 producido en el Ejemplo de Referencia 3 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,75 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0065 ml; 2,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0058 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,0116 ml; 4,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y dimetilsulfóxido (0,0101 ml) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0017 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

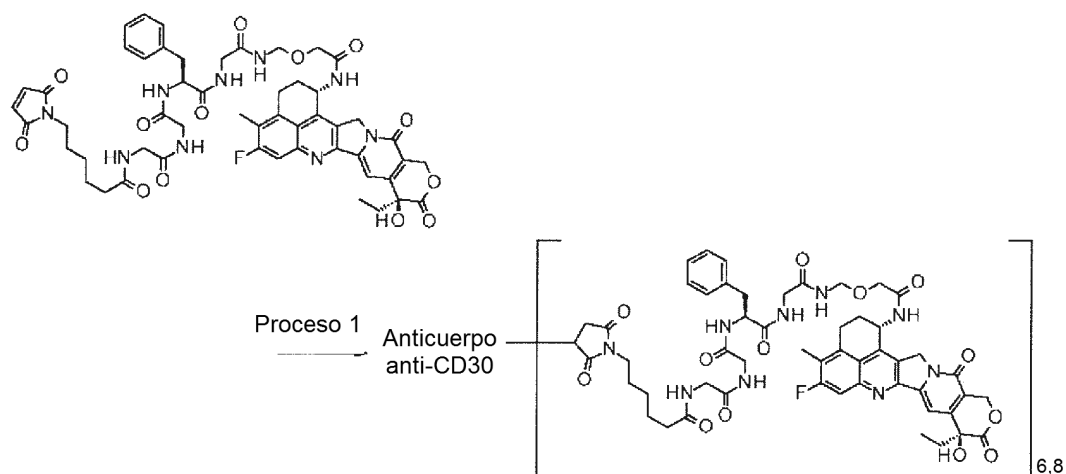
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 270400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 0,96 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 2,4 mg (60%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,7.

Ejemplo 68 Conjugado de anticuerpo - fármaco (65)

[Fórmula 137]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (65)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD30 producido en el Ejemplo de Referencia 3 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,75 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0129 ml; 5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,006 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,0233 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0035 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

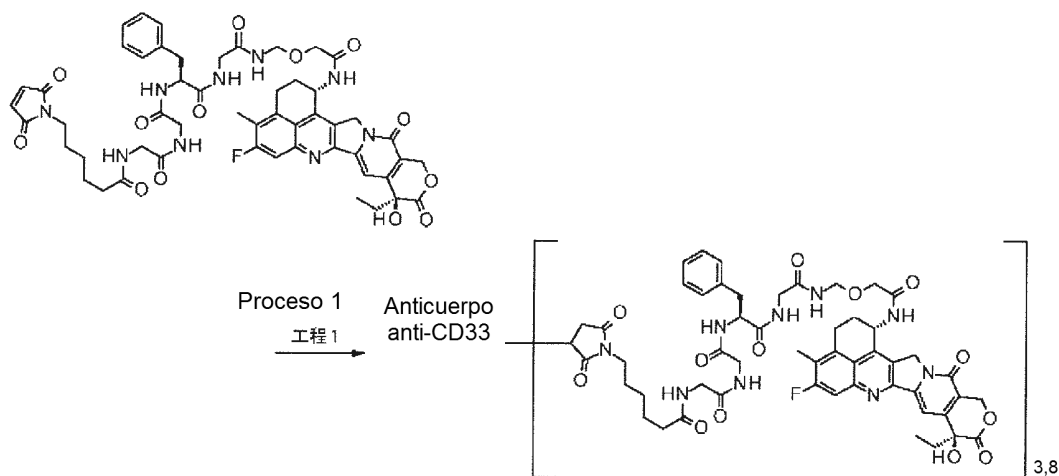
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 270400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 0,39 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 1,0 mg (24%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,8.

Ejemplo 69 Conjugado de anticuerpo - fármaco (66)

[Fórmula 138]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (66)**

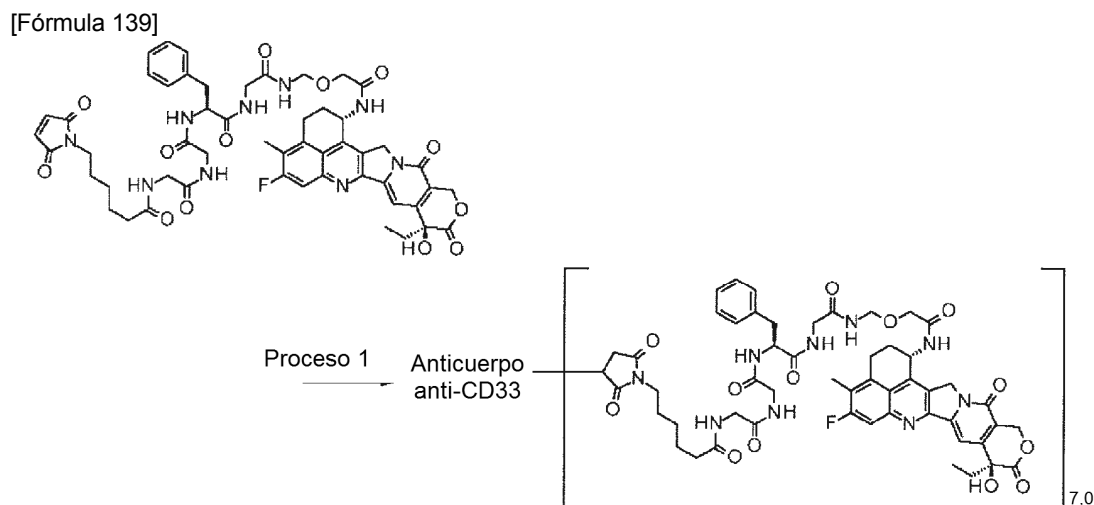
Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD33 producido en el Ejemplo de Referencia 4 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,66 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0065 ml; 2,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0058 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,0116 ml; 4,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y dimetilsulfóxido (0,0101 ml) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0017 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 256400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,19 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 3,0 mg (74%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,8.

Ejemplo 70 Conjugado de anticuerpo - fármaco (67)**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (67)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD33 producido en el Ejemplo de Referencia 4 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,66 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0129 ml; 5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,006 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,0233 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0035 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

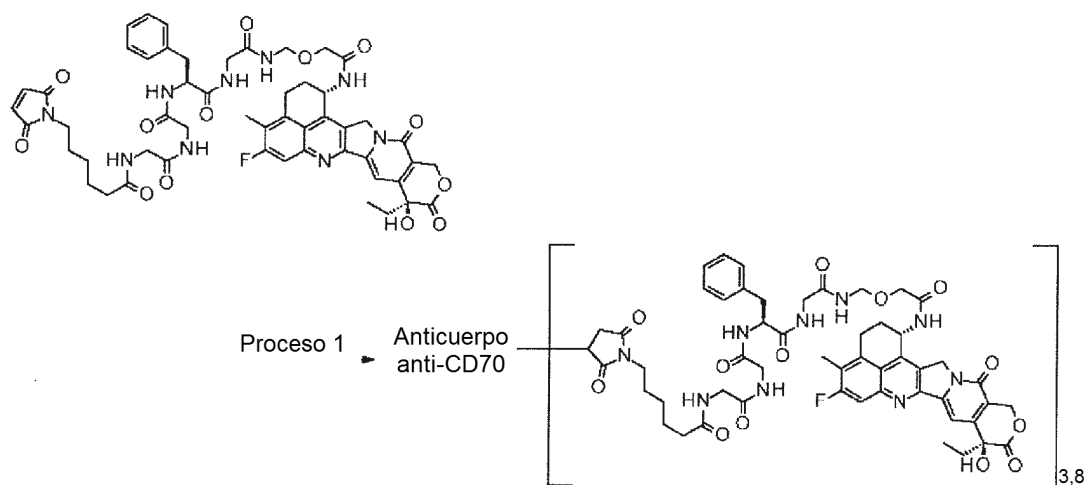
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 256400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,24 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 3,1 mg (78%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 7,0.

Ejemplo 71 Conjugado de anticuerpo - fármaco (68)

[Fórmula 140]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (68)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD70 producido en el Ejemplo de Referencia 5 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,69 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0065 ml; 2,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0058 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,0116 ml; 4,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y dimetilsulfóxido (0,0101 ml) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0017 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

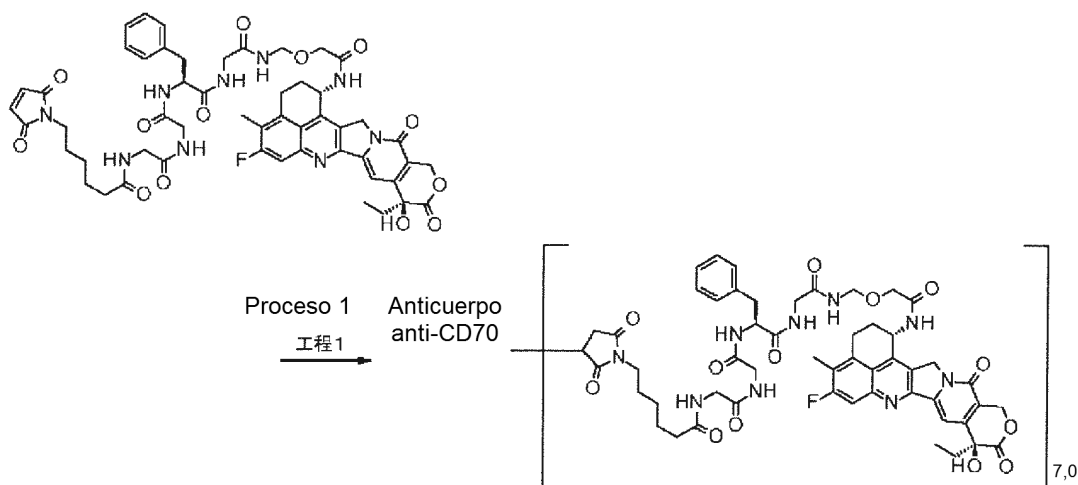
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 262400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,10 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 2,8 mg (69%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,8.

Ejemplo 72 Conjugado de anticuerpo - fármaco (69)

[Fórmula 141]

**Proceso 1: Conjugado de anticuerpo - fármaco (69)**

Reducción del anticuerpo: El anticuerpo anti-CD70 producido en el Ejemplo de Referencia 5 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA usando el procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se usó $1,69 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el procedimiento común C-1 descrito en el procedimiento de producción 1. La solución (0,4 ml, 4 mg del anticuerpo) se puso en un tubo de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0129 ml; 5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato de dipotasio 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,006 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, el enlace de disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo se redujo incubando a 37°C durante 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de dimetilsulfóxido que contiene 10 mM del compuesto obtenido en el proceso 8 del Ejemplo 58 (0,0233 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, esta se agitó usando un rotador de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0035 ml) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a la misma y se incubó adicionalmente para terminar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

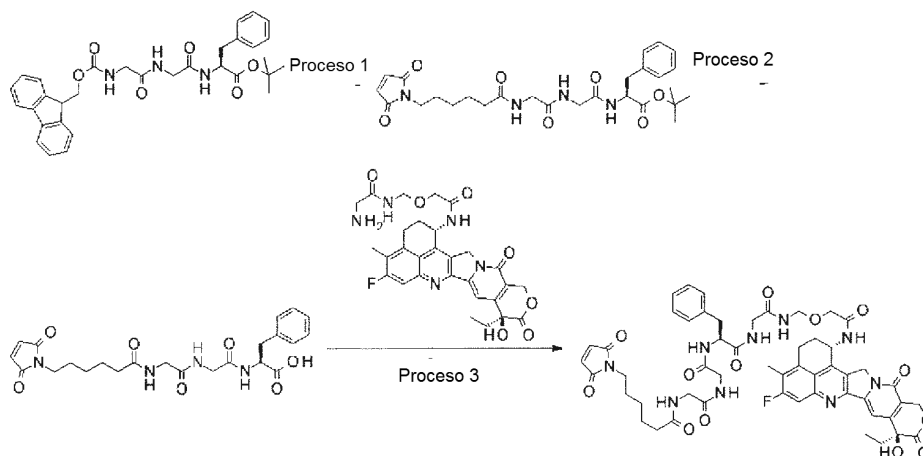
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D-1 (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para producir 2,5 ml de una solución que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Usando el procedimiento común E descrito en el procedimiento de producción 1 (como coeficiente de absorción molar, se usaron $\epsilon_{A,280} = 262400$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{A,370} = 0$ (valor de cálculo estimado), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido) y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,16 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 2,9 mg (73%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 7,0.

Ejemplo 73 (Otro procedimiento para sintetizar el compuesto del proceso 8 del Ejemplo 58)

[Fórmula 142]



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

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

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

EM (IEN) m/z: 529 (M+H)⁺

Proceso 2: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanina

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

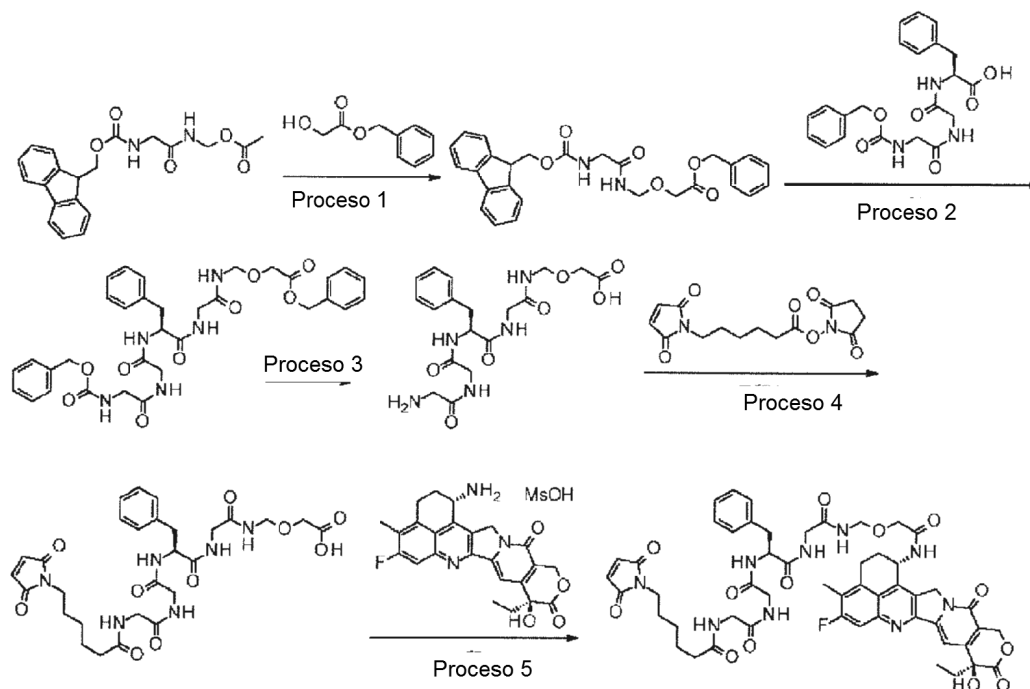
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1,15-1,23 (2H, m), 1,40-1,53 (4H, m), 2,10 (2H, t, J = 7,6 Hz), 2,88 (1H, dd, J = 13,7, 8,9 Hz), 3,04 (1H, dd, J = 13,7, 5,0 Hz), 3,35-3,43 (2H, m), 3,58-3,77 (4H, m), 4,41 (1H, td, J = 7,8, 5,0 Hz), 7,00 (2H, s), 7,16-7,31 (5H, m), 8,00 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,06 (1H, t,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

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

El compuesto (0,572 g, 1,21 mmol) obtenido en el proceso 2 anterior se disolvió en diclorometano (12,0 ml), se cargó con N-hidroxisuccinimida (0,152 g, 1,32 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,253 g, 1,32 mmol), y se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se añadió a una solución de N,N-dimetilformamida (22,0 ml) de la mezcla (1,10 mmol) obtenida en el proceso 5 del Ejemplo 58, y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de reacción se cargó con una solución acuosa de ácido cítrico al 10 % y se extrajo con cloroformo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,351 g, 31 %). Los datos instrumentales del compuesto fueron los mismos que los del compuesto del proceso 8 del Ejemplo 58.

Ejemplo 74 (Otro procedimiento para sintetizar el compuesto del proceso 8 del Ejemplo 58)

[Fórmula 143]

**Proceso 1: [(N-[(9H-fluoren-9-ylmetoxi)carbonyl]glicil)amino)metoxi]acetato de bencilo**

A una solución de tetrahidrofurano (200 ml) del compuesto (7,37 g, 20,0 mmol) obtenido en el proceso 1 del Ejemplo 58, se añadieron glicolato de bencilo (6,65 g, 40,0 mmol) y ácido p-tolueno sulfónico monohidrato (0,381 g, 2,00 mmol) a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y 30 minutos. La solución de reacción se cargó con una solución saturada acuosa de hidrogenocarbonato sódico y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [hexano : acetato de etilo = 100 : 0 (v/v) - 0 : 100] para producir el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (6,75 g, 71 %). Los datos instrumentales del compuesto fueron los mismos que los del compuesto del proceso 2 del Ejemplo 58.

Proceso 2: N-[(benciloxi)carbonyl]glicilglicil-L-fenilalanina-N-[(2-(benciloxi)-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

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

RMN ¹H (DMSO-D₆) δ: 2,78 (1H, dd, J = 13,9, 9,6 Hz), 3,05 (1H, dd, J = 13,9, 4,5 Hz), 3,56-3,80 (6H, m), 4,15 (2H, s), 4,47-4,55 (1H, m), 4,63 (2H, d, J = 6,6 Hz), 5,03 (2H, s), 5,15 (2H, s), 7,16-7,38 (15H, m), 7,52 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,03 (1H, t, J = 5,5 Hz), 8,17 (1H, d, J = 8,2 Hz), 8,36 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,61 (1H, t, J = 6,6 Hz).

Proceso 3: Glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(carboximatoxi)metil]glicinamida

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

RMN ¹H (DMSO-D₆) δ: 2,84 (1H, dd, J = 13,7, 9,8 Hz), 3,08 (1H, dd, J = 13,7, 4,7 Hz), 3,50-3,72 (4H, m), 3,77-3,86 (2H, m), 3,87 (2H, s), 4,52-4,43 (1H, m), 4,61 (2H, d, J = 6,6 Hz), 7,12-7,30 (5H, m), 8,43 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,54

(1H, d, J = 7,8 Hz), 8,70 (1H, t, J = 6,3 Hz), 8,79 (1H, t, J = 5,5 Hz).

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

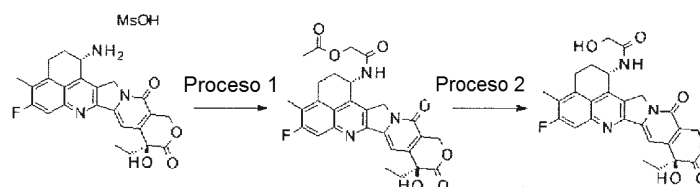
A una solución de N,N-dimetilformamida (85,0 ml) del compuesto (3,59 g, 8,48 mmol) obtenido en el proceso 3 anterior, se añadieron hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida (2,88 g, 9,33 mmol) y trietilamina (0,858 g, 8,48 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de reacción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

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

A una solución de N,N-dimetilformamida (40,0 ml) de mesilato del compuesto (4) (1,14 g, 2,00 mmol), trietilamina (0,202 g, 2,00 mmol), se añadieron a 0 °C el compuesto (1,48 g, 2,40 mmol) obtenido en el proceso 4 anterior, y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (0,993 g, 3,00 mmol) que contiene agua al 16,4 % y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (1,69 g, 82%). Los datos instrumentales del compuesto fueron los mismos que los del compuesto del proceso 8 del Ejemplo 58.

Ejemplo 75 N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-2-hidroxiacetamida

[Fórmula 144]



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

Con enfriamiento con hielo, a una suspensión de N,N-dimetilformamida (20,0 ml) de mesilato del compuesto (4) (0,500 g, 0,941 mmol), se añadieron N,N-diisopropiletilamina (0,492 ml, 2,82 mmol) y cloruro de acetoxiacetilo (0,121 ml, 1,13 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,505 g, cuantitativo).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,81-1,92 (2H, m), 2,08 (3H, s), 2,08-2,22 (2H, m), 2,41 (3H, s), 3,14-3,21 (2H, m), 4,51 (2H, dd, J = 19,4, 14,7 Hz), 5,22 (2H, dd, J = 40,1, 19,0 Hz), 5,43 (2H, s), 5,56-5,61 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,31 (1H, s), 7,81 (1H, d, J = 11,0 Hz), 8,67 (1H, d, J = 8,6 Hz). EM (IEN) m/z: 536 (M+H)⁺

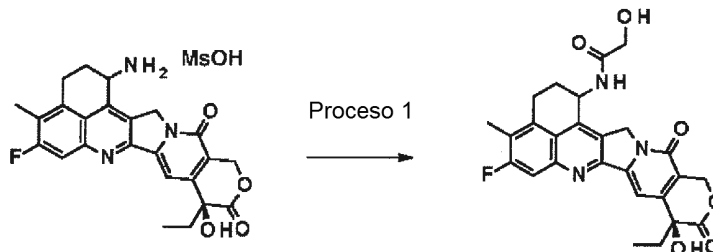
Proceso 2: N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-2-hidroxiacetamida

A una suspensión de metanol (50,0 ml) del compuesto (0,504 g, 0,941 mmol) obtenido en el proceso 1 anterior, se añadieron tetrahidrofurano (20,0 ml) y una solución acuosa de hidróxido sódico 1 N (4,00 ml, 4,00 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se terminó mediante la adición de ácido clorhídrico 1 N (5,00 ml, 5,00 mmol), y el disolvente se retiró a presión reducida. los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo-capo orgánica repartida de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,412 g, 89 %). Este compuesto se confirmó en el tumor de un ratón portador de cáncer que recibió el conjugado de anticuerpo - fármaco (55) o (56). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,78-1,95 (2H, m), 2,09-2,28 (2H, m), 2,39 (3H, s), 3,07-3,27 (2H, m), 3,96 (2H, d, J = 6,0 Hz), 5,11-5,26 (2H, m), 5,42 (2H, s), 5,46-5,54 (1H, m), 5,55-5,63 (1H, m), 6,52

(1H, s), 7,30 (1H, s), 7,78 (1H, d, J = 10,9 Hz), 8,41 (1H, d, J = 9,1 Hz). EM (IEN) m/z: 494 (M+H)⁺

Ejemplo 76 (Otro procedimiento para sintetizar el compuesto del Ejemplo 75)

[Fórmula 145]



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

- 5 Se disolvió ácido glicólico (0,0201 g, 0,27 mmol) en N,N-dimetilformamida (1,0 ml), se cargó con N-hidroxisuccinimida (0,0302 g, 0,27 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,0508 g, 0,27 mmol), y se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se añadió a una suspensión de N,N-dimetilformamida (1,0 ml) cargada con mesilato del compuesto (4) (0,1 g, 0,176 mmol) y trietilamina (0,025 ml, 0,18 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se retiró a presión reducida y los residuos obtenidos se
- 10 purificaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 10 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,080 g, 92%). Los datos instrumentales del compuesto fueron los mismos que los del compuesto obtenido en el proceso 2 del Ejemplo 75.

(Ejemplo de prueba 1) Producción de vector de expresión de variante 1 de B7-H3 humano de longitud completa

- ADNc que codifica la variante 1 de B7-H3 humano se amplificó mediante reacción de PCR usando ADNc sintetizado a partir del ARN total de una célula LNCaP (Colección Americana de Cultivos Tipo: ATCC) como un molde y el siguiente conjunto de cebadores:
- 15

cebador 1:

5'-ctataggagacccaagctggctagcatgctgcgtcgccggggcag-3' (SEQ ID NO: 22) y

cebador 2:

5' -

aacgggcccctctagactcgagcggccgctcaggctatttcttgtccatcatcttc

- 20 tttgctgtcag-3' (SEQ ID NO: 23).

- A continuación, el producto de PCR obtenido de este modo se purificó usando MagExtractor PCR & Gel cleanup (Toyobo Co., Ltd.). El producto purificado se digirió adicionalmente con enzimas de restricción (NheI/NotI) y a continuación se purificó usando MagExtractor PCR & Gel cleanup (Toyobo Co., Ltd.). pcDNA3.1 (+) ADN plasmídico (Life Technologies) se digirió con las mismas enzimas de restricción que anteriormente (NheI/NotI) y a continuación se purificó usando MagExtractor PCR & Gel cleanup (Toyobo Co., Ltd.).
- 25

Estas soluciones de ADN purificadas se mezclaron, se cargaron adicionalmente con Ligation high (Toyobo Co., Ltd.), y se incubaron para el ligamiento a 16 °C durante 8 horas.

Células DH5α de *Escherichia coli* competentes (Life Technologies) se transformaron mediante la adición del producto de reacción obtenido.

- 30 Las colonias así obtenidas se sometieron a PCR directa de colonias usando cebadores de PCR y cebador inverso de BGH para seleccionar clones candidatos.

Los clones candidatos obtenidos se cultivaron en un medio líquido (LB/Amp), y se extrajo un ADN plasmídico con MagExtractor-Plasmid- (Toyobo Co., Ltd.).

- 35 Cada clon obtenido se comparó con la secuencia CDS proporcionada mediante el análisis de secuenciación entre el cebador 3 (cebador promotor de CMV):

5'-cgcaaatggcgtaggcgtg-3' (SEQ ID NO: 24) y cebador 4 (cebador inverso de BGH):

5'-tagaaggcacagtcgagg-3' (SEQ ID NO: 25)

con el ADN plasmídico obtenido como molde.

Después de confirmar la secuencia, el clon obtenido se cultivó en 200 ml de medio LB/Amp, y se extrajo un ADN plasmídico usando el kit VioGene Plasmid Midi V-100.

La cepa se denominó como pcDNA3.1-B7-H3. La secuencia de un sitio de ORF del gen de la variante 1 de B7-H3 clonado en el vector se muestra en las posiciones de nucleótido 1 a 1602 en la SEQ ID NO: 26 (figura 16) en el listado de secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la variante 1 de B7-H3 se muestra en la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias.

(Ejemplo de prueba 2) Preparación de célula CCRF-CEM que expresa de forma estable el gen de la variante 1 de B7-H3

pcDNA3.1-B7-H3 producido en el ejemplo de prueba 1 se transfectó en células CCRF-CEM (ATCC) por electroporación usando Nucleofector II (fabricado por Lonza Group Ltd.). A continuación, las células se cultivaron adicionalmente durante dos noches en medio de RPMI1640 (Life Technologies) que contiene suero bovino fetal al 10 % (FBS) (al que se hace referencia posteriormente en el presente documento como FBS al 10 %-RPMI1640) en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %.

Después del cultivo de 2 días, el cultivo se inició en FBS al 10 %-RPMI1640 que contiene 750 µg/ml de G418 (Life Technologies) con el fin de seleccionar células CCRF-CEM en las que se integró de forma estable pcDNA3.1-B7-H3.

Después del cultivo de 1 mes, se realizó una clonación mediante el procedimiento de dilución limitante con el fin de producir un clon de una sola célula. Específicamente, las células que tienen resistencia a G418 se diluyeron a 10 células/ml, se inocularon en una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo, y se cultivaron, y las células que se dejaron proliferar se recuperaron de pocillos individuales.

Se usó citometría de flujo para confirmar la expresión de B7-H3 en cada clon recuperado. Específicamente, cada clon recuperado se lavó dos veces con PBS que contiene FBS al 5 %, a continuación se suspendió mediante la adición de PBS que contiene FBS al 5 % y 10 µg/ml de M30, y se dejó reposar a 4 °C durante 30 minutos. El clon se lavó dos veces con PBS que contiene FBS al 5 %, a continuación se suspendió mediante la adición de fracción de IgG de cabra conjugada con fluoresceína a IgG de ratón (molécula completa) (n.º 55493, fabricado por ICN Pharmaceuticals, Inc.) se diluyó 1000 veces con PBS que contiene FBS al 5 %, y se dejó reposar a 4 °C durante 30 minutos. El clon se lavó dos veces con PBS que contiene FBS al 5 %, a continuación se volvió a suspender en PBS que contiene FBS al 5 %, y se detectó usando un citómetro de flujo (FC500: Beckman Coulter, Inc.).

Las células CCRF-CEM que expresan de forma estable el gen de la variante 1 de B7-H3 obtenido de este modo mediante estos procedimientos se designaron como células CEM_V1_3.1_2. Las células CCRF-CEM de línea parental se usaron como una línea celular que carece de expresión de B7-H3.

(Ejemplo de prueba 3) Prueba de citotoxicidad (1) de conjugado de anticuerpo - fármaco

Las células CEM_V1_3.1_2 producidas en el ejemplo de prueba 2 o las células CCRF-CEM (ATCC) se cultivaron en RPMI1640 (GIBCO) que contiene suero bovino fetal al 10 % (MOREGATE) (al que se hace referencia posteriormente en el presente documento como medio). Las células CEM_V1_3.1_2 o las células CCRF-CEM se prepararon para tener una concentración de 8×10^4 células/ml usando un medio, se añadieron a una concentración de 25 µl/pocillo a una microplaca de 96 pocillos para cultivo celular cargada con 65 µl/pocillo de un medio, y se cultivaron durante una noche. Al día siguiente, el anticuerpo M30-H1-L4, anticuerpo M30-H1-L4P, y conjugado de anticuerpo - fármaco diluido cada uno en 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM y 0,064 nM usando un medio se añadieron a una concentración de 10 µl/pocillo a la microplaca. Un medio se añadió a una concentración de 10 µl/pocillo a pocillos no suplementados con sustancia de prueba. Las células se cultivaron bajo CO₂ al 5 % a 37 °C durante 3 días. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad igual de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) y se agitó. Después de que la microplaca se dejara reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la cantidad de emisión de luz se midió usando un lector de placas (PerkinElmer). El valor de CI₅₀ se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CI_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Concentración a de la sustancia de prueba

b: Concentración b de la sustancia de prueba

c: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración a

d: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración b

Las concentraciones a y b establecen la relación $a > b$ que corta una relación de un 50 % de células vivas.

La tasa de supervivencia de las células a cada concentración se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de supervivencia de las células (\%)} = a / b \times 100$$

a: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos suplementados con sustancia de prueba (n = 2)

b: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos no suplementados con sustancia de prueba (n = 10)

Los conjugados de anticuerpo - fármaco (5), (16), (21), (32), (44), (45), (46), (52) y (54) mostraron una actividad citotóxica de $CI_{50} < 0,1$ (nM) contra las células CEM_V1_3.1_2. Los conjugados de anticuerpo - fármaco (1), (12), (13), (20), (28), (29), (35), (36), (37), (41), (49) y (53) mostraron una actividad citotóxica de $0,1 < CI_{50} < 1$ (nM) contra las células. Los conjugados de anticuerpo - fármaco (33), (34), (47), (48), (50) y (51) mostraron una actividad citotóxica de $1 < CI_{50} < 100$ (nM) contra las células. Por otra parte, ninguno de estos conjugados de anticuerpo - fármaco mostró una actividad citotóxica contra las células CCRF-CEM (> 100 (nM)). Ni el anticuerpo M30-H1-L4 ni el anticuerpo M30-H1-L4P mostraron una actividad citotóxica contra ambas de las células (> 100 (nM)).

(Ejemplo de prueba 4) Prueba de citotoxicidad (2) de conjugado de anticuerpo - fármaco

Células positivas para antígeno células SR (ATCC) o células negativas para antígeno células Daudi (ATCC) se cultivaron en RPMI1640 (GIBCO) que contiene suero bovino fetal al 10 % (MOREGATE) (al que se hace referencia posteriormente en el presente documento como medio). Las células SR o células Daudi se prepararon para tener una concentración de $2,8 \times 10^4$ células/ml usando un medio y se añadieron a una concentración de 90 µl/pocillo a una microplaca de 96 pocillos para cultivo celular. Dos horas después, el anticuerpo anti-CD30 y conjugados de anticuerpo - fármaco (6) y (7) diluido cada uno en 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 320 pM, 64 pM, 12,8 pM y 2,6 pM usando un medio se añadieron a una concentración de 10 µl/pocillo a la microplaca. Un medio se añadió a una concentración de 10 µl/pocillo a pocillos no suplementados con sustancia de prueba. Las células se cultivaron bajo CO_2 al 5 % a 37 °C durante 3 días. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad igual de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) y se agitó. Después de que la microplaca se dejara reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la cantidad de emisión de luz se midió usando un lector de placas (PerkinElmer). El valor de CI_{50} se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CI_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Concentración a de la sustancia de prueba

b: Concentración b de la sustancia de prueba

c: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración a

d: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración b

Las concentraciones a y b establecen la relación $a > b$ que corta una relación de un 50 % de células vivas.

La tasa de supervivencia de las células a cada concentración se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de supervivencia de las células (\%)} = a / b \times 100$$

a: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos suplementados con sustancia de prueba (n = 2)

b: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos no suplementados con sustancia de prueba (n = 12)

Los conjugados de anticuerpo - fármaco (6) y (7) mostraron una actividad citotóxica de $CI_{50} < 0,01$ (nM) contra las células SR. Por otra parte, los conjugados de anticuerpo - fármaco (6) y (7) no mostraron actividad citotóxica alguna contra las células Daudi ($> 4,0$ (nM)). El anticuerpo anti-CD30 no mostró actividad citotóxica alguna contra ambas de las células ($> 4,0$ (nM)).

(Ejemplo de prueba 5) Prueba de citotoxicidad (3) de conjugado de anticuerpo - fármaco

Células positivas para antígeno células SR (ATCC) se cultivaron en RPMI1640 (GIBCO) que contiene suero bovino fetal al 10 % (MOREGATE) (al que se hace referencia posteriormente en el presente documento como medio). Las células SR se prepararon para tener una concentración de $2,8 \times 10^4$ células/ml usando un medio y se añadieron a una concentración de 90 µl/pocillo a una microplaca de 96 pocillos para cultivo celular. Dos horas después, el anticuerpo anti-CD30 y conjugados de anticuerpo - fármaco (22), (23), (38), (64) y (65) diluido cada uno en 1000 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM y 1 pM usando un medio se añadieron a una concentración de 10 µl/pocillo a la microplaca. Un medio se añadió a una concentración de 10 µl/pocillo a pocillos no suplementados con sustancia de prueba. Las células se cultivaron bajo CO_2 al 5 % a 37 °C durante 6 días. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad igual de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) y se agitó. Después de que la microplaca se dejara reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la cantidad de emisión de luz se midió usando un lector de placas (PerkinElmer). El valor de CI_{50} se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CI_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Concentración a de la sustancia de prueba

b: Concentración b de la sustancia de prueba

c: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración a

d: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración b

Las concentraciones a y b establecen la relación $a > b$ que corta una relación de un 50 % de células vivas.

La tasa de supervivencia de las células a cada concentración se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de supervivencia de las células (\%)} = a / b \times 100$$

a: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos suplementados con sustancia de prueba (n = 2)

b: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos no suplementados con sustancia de prueba (n = 12)

Los conjugados de anticuerpo - fármaco (23), (38), (64) y (65) mostraron una actividad citotóxica de $CI_{50} < 0,01$ (nM) contra las células SR. El conjugado de anticuerpo - fármaco (22) mostró una actividad citotóxica de $CI_{50} < 0,1$ (nM) contra las células SR. El anticuerpo anti-CD30 no mostró actividad citotóxica alguna contra las células SR ($> 4,0$ (nM)).

(Ejemplo de prueba 6) Prueba de citotoxicidad (4) de conjugado de anticuerpo - fármaco

Células positivas para antígeno células HL-60 (ATCC) o células negativas para antígeno células Raji (ATCC) se cultivaron en RPMI1640 (GIBCO) que contiene suero bovino fetal al 10 % (MOREGATE) (al que se hace referencia posteriormente en el presente documento como medio). Las células HL-60 o células Raji se prepararon para tener una concentración de 8×10^4 células/ml usando un medio y se añadieron a una concentración de 25 μ l/pocillo a una microplaca de 96 pocillos para cultivo celular cargada con 65 μ l/pocillo de un medio. El anticuerpo anti-CD33 y conjugados de anticuerpo - fármaco (8) y (9) diluido cada uno en 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM y 0,064 nM usando un medio se añadieron a una concentración de 10 μ l/pocillo a la microplaca. Un medio se añadió a una concentración de 10 μ l/pocillo a pocillos no suplementados con sustancia de prueba. Las células se cultivaron bajo CO_2 al 5 % a 37 °C durante 3 días. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad igual de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) y se agitó. Después de que la microplaca se dejara reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la cantidad de emisión de luz se midió usando un lector de placas (PerkinElmer). El valor de CI_{50} se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CI_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Concentración a de la sustancia de prueba

b: Concentración b de la sustancia de prueba

c: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración a

d: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración b

Las concentraciones a y b establecen la relación $a > b$ que corta una relación de un 50 % de células vivas.

La tasa de supervivencia de las células a cada concentración se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de supervivencia de las células (\%)} = a / b \times 100$$

a: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos suplementados con sustancia de prueba (n = 2)

b: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos no suplementados con sustancia de prueba (n = 5)

Los conjugados de anticuerpo - fármaco (8) y (9) mostraron una actividad citotóxica de $CI_{50} < 0,1$ (nM) contra las células HL-60. Por otra parte, los conjugados de anticuerpo - fármaco (8) y (9) no mostraron actividad citotóxica alguna contra las células Raji (> 100 (nM)). El anticuerpo anti-CD33 no mostró actividad citotóxica alguna contra ambas de las células (> 100 (nM)).

(Ejemplo de prueba 7) Prueba de citotoxicidad (5) de conjugado de anticuerpo - fármaco

Células positivas para antígeno células NOMO-1 (HSRRB) se cultivaron en RPMI1640 (GIBCO) que contiene suero bovino fetal al 10 % (MOREGATE) (al que se hace referencia posteriormente en el presente documento como medio). Las células NOMO-1 se prepararon para tener una concentración de $2,8 \times 10^4$ células/ml usando un medio y se añadieron a una concentración de 90 μ l/pocillo a una microplaca de 96 pocillos para cultivo celular. Dos horas después, el anticuerpo anti-CD33 y conjugados de anticuerpo - fármaco (24), (25) y (67) diluido cada uno en 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM y 0,064 nM usando un medio se añadieron a una concentración de 10 μ l/pocillo a la microplaca. Un medio se añadió a una concentración de 10 μ l/pocillo a pocillos no suplementados con sustancia de prueba. Las células se cultivaron bajo CO_2 al 5 % a 37 °C durante 6 días. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de

cultivo se cargó con una cantidad igual de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) y se agitó. Después de que la microplaca se dejara reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la cantidad de emisión de luz se midió usando un lector de placas (PerkinElmer). El valor de CI_{50} se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CI_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Concentración a de la sustancia de prueba

b: Concentración b de la sustancia de prueba

c: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración a

d: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración b

10 Las concentraciones a y b establecen la relación $a > b$ que corta una relación de un 50 % de células vivas.

La tasa de supervivencia de las células a cada concentración se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de supervivencia de las células (\%)} = a / b \times 100$$

a: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos suplementados con sustancia de prueba (n = 2)

b: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos no suplementados con sustancia de prueba (n = 5)

15 El conjugado de anticuerpo - fármaco (25) mostró una actividad citotóxica de $CI_{50} < 0,1$ (nM) contra las células NOMO-1. Los conjugados de anticuerpo - fármaco (24) y (67) mostraron una actividad citotóxica de $1 < CI_{50} < 100$ (nM) contra las células. El anticuerpo anti-CD33 no mostró actividad citotóxica alguna contra las células NOMO-1 (> 100 (nM)).

(Ejemplo de prueba 8) Prueba de citotoxicidad (6) de conjugado de anticuerpo - fármaco

20 Células positivas para antígeno células U251 (ATCC) o células negativas para antígeno células MCF-7 (ATCC) se cultivaron en RPMI1640 (GIBCO) que contiene suero bovino fetal al 10 % (MOREGATE) (al que se hace referencia posteriormente en el presente documento como medio). Las células U251 o células MCF-7 se prepararon para tener una concentración de $2,8 \times 10^4$ células/ml usando un medio, se añadieron a una concentración de 90 μ l/pocillo a una microplaca de 96 pocillos para cultivo celular, y se cultivaron durante una noche. Al día siguiente, el anticuerpo anti-CD70 y conjugados de anticuerpo - fármaco (10) y (11) diluido cada uno en 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM y 0,064 nM usando un medio se añadieron a una concentración de 10 μ l/pocillo a la microplaca. Un medio se añadió a una concentración de 10 μ l/pocillo a pocillos no suplementados con sustancia de prueba. Las células se cultivaron bajo CO_2 al 5 % a 37 °C durante 6 días. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad igual de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) y se agitó. Después de que la microplaca se dejara reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la cantidad de emisión de luz se midió usando un lector de placas (PerkinElmer). El valor de CI_{50} se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CI_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Concentración a de la sustancia de prueba

b: Concentración b de la sustancia de prueba

c: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración a

d: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración b

Las concentraciones a y b establecen la relación $a > b$ que corta una relación de un 50 % de células vivas.

La tasa de supervivencia de las células a cada concentración se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de supervivencia de las células (\%)} = a / b \times 100$$

a: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos suplementados con sustancia de prueba (n = 2)

b: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos no suplementados con sustancia de prueba (n = 12)

45 Los conjugados de anticuerpo - fármaco (10) y (11) mostraron una actividad citotóxica de $CI_{50} < 1$ (nM) contra las células U251. Por otra parte, los conjugados de anticuerpo - fármaco (10) y (11) no mostraron actividad citotóxica alguna contra las células MCF-7 (≥ 90 (nM)). El anticuerpo anti-CD70 no mostró actividad citotóxica alguna contra ambas de las células (> 100 (nM)).

(Ejemplo de prueba 9) Prueba de citotoxicidad (7) de conjugado de anticuerpo - fármaco

50 Células positivas para antígeno células U251 (ATCC) se cultivaron en RPMI1640 (GIBCO) que contiene suero bovino fetal al 10 % (MOREGATE) (al que se hace referencia posteriormente en el presente documento como medio). Las células U251 se prepararon para tener una concentración de $2,8 \times 10^4$ células/ml usando un medio y se añadieron a una concentración de 90 μ l/pocillo a una microplaca de 96 pocillos para cultivo celular. Dos horas

después, el anticuerpo anti-CD70 y conjugados de anticuerpo - fármaco (26), (27), (40), (68) y (69) diluido cada uno en 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM y 0,064 nM usando un medio se añadieron a una concentración de 10 µl/pocillo a la microplaca. Un medio se añadió a una concentración de 10 µl/pocillo a pocillos no suplementados con sustancia de prueba. Las células se cultivaron bajo CO₂ al 5 % a 37 °C durante 6 días. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad igual de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) y se agitó. Después de que la microplaca se dejara reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la cantidad de emisión de luz se midió usando un lector de placas (PerkinElmer). El valor de CI₅₀ se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CI_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Concentración a de la sustancia de prueba

b: Concentración b de la sustancia de prueba

c: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración a

d: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración b

Las concentraciones a y b establecen la relación $a > b$ que corta una relación de un 50 % de células vivas.

La tasa de supervivencia de las células a cada concentración se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de supervivencia de las células (\%)} = a / b \times 100$$

a: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos suplementados con sustancia de prueba (n = 2)

b: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos no suplementados con sustancia de prueba (n = 12)

Los conjugados de anticuerpo - fármaco (26), (27), (40) y (69) mostraron una actividad citotóxica de $1 < CI_{50} < 10$ (nM) contra las células U251. El conjugado de anticuerpo - fármaco (68) mostró una actividad citotóxica de $10 < CI_{50} < 100$ (nM) contra las células. El anticuerpo anti-CD70 no mostró actividad citotóxica alguna contra las células U251 (> 100 (nM)).

(Ejemplo de prueba 10) Prueba de citotoxicidad (8) de fármaco liberado

Células A375 (ATCC) se cultivaron en DMEM (GIBCO) que contiene suero bovino fetal al 10 % (MOREGATE) (al que se hace referencia posteriormente en el presente documento como medio). Las células A375 se prepararon para tener una concentración de 4×10^4 células/ml usando un medio, se añadieron a una concentración de 25 µl/pocillo a una microplaca de 96 pocillos para cultivo celular (CORNING) cargada con 65 µl/pocillo de un medio, y se cultivaron durante una noche. Al día siguiente, cada sustancia de prueba diluida en 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM y 0,064 nM usando DMSO se añadió a una concentración de 0,5 µl/pocillo a la microplaca. Se añadió DMSO a una concentración de 0,5 µl/pocillo a pocillos no suplementados con sustancia de prueba. El volumen del medio en cada pocillo se ajustó a 100 µl mediante la adición de 10 µl/pocillo de un medio, y las células se cultivaron bajo CO₂ al 5 % a 37 °C durante 6 días. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad igual de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) y se agitó. Después de que la microplaca se dejara reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la cantidad de emisión de luz se midió usando un lector de placas. El valor de CI₅₀ se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CI_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Concentración a de la sustancia de prueba

b: Concentración b de la sustancia de prueba

c: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración a

d: Relación de células vivas suplementadas con la sustancia de prueba que tiene la concentración b

Las concentraciones a y b establecen la relación $a > b$ que corta una relación de un 50 % de células vivas.

La tasa de supervivencia de las células se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de supervivencia de las células (\%)} = a / b \times 100$$

a: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos suplementados con sustancia de prueba (n = 2)

b: Cantidad promedio de emisión de luz a partir de los pocillos no suplementados con sustancia de prueba (n = 10)

El compuesto del Ejemplo (75) y exatecán mostró una actividad citotóxica de $0,1 < CI_{50} < 1$ (nM) contra las células A375. El compuesto del Ejemplo (42) mostró una actividad citotóxica contra $1 < CI_{50} < 10$ (nM) contra las células. El compuesto del Ejemplo (1) mostró una actividad citotóxica contra $10 < CI_{50} < 100$ (nM) contra las células.

(Ejemplo de prueba 11) Prueba antitumoral (1)

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

- 5 Ensayo y expresión de cálculo: En todos los estudios, el eje mayor y el eje menor del tumor se midieron dos veces a la semana usando un calibrador electrónico digital (CD-15C, Mitutoyo Corp.), y se calculó el volumen tumoral (mm^3). La expresión de cálculo es como se muestra posteriormente.

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{Eje mayor (mm)} \times [\text{Eje menor (mm)}]^2$$

- 10 La totalidad de los conjugados de anticuerpo - fármaco se diluyeron con solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) y se usaron a un volumen de 10 ml/kg para su administración intravenosa a la cola de cada ratón. Se adquirieron células de la línea de melanoma humano A375 de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo). 8×10^6 células suspendidas en solución salina fisiológica se transplantaron subcutáneamente al lado derecho del abdomen de cada ratón desnudo hembra (día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el día 11. El anticuerpo M30-H1-L4P y conjugado de anticuerpo - fármaco (2) se administraron, cada uno, por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg a la cola de cada ratón los días 11, 18 y 25.

Los resultados se muestran en la Figura 17. En el dibujo, la línea con rombos abiertos muestra los resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con triángulos abiertos muestra el efecto del anticuerpo M30-H1-L4P y la línea con círculos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2).

- 20 Como se observa de estos resultados, la administración del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) disminuyó notablemente el volumen tumoral, y no se observó crecimiento tumoral alguno después de la administración final. Por el contrario, la administración del anticuerpo M30-H1-L4P dio como resultado el avance del crecimiento tumoral.

Además, los ratones que recibieron el conjugado de anticuerpo - fármaco (2) no presentaron signos notables tales como pérdida de peso, lo que sugiere que el conjugado de anticuerpo - fármaco (2) es de baja toxicidad y sumamente seguro.

- 25 (Ejemplo de prueba 12) Prueba antitumoral (2)

- Se adquirieron células de la línea de melanoma humano A375 de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo). 6×10^6 células suspendidas en solución salina fisiológica se transplantaron subcutáneamente al lado derecho del abdomen de cada ratón desnudo hembra (día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el día 18. El conjugado de anticuerpo - fármaco (2) se administró por vía intravenosa a cada dosis (0,1, 0,3, y 1,3 mg/kg) a la cola de cada ratón los días 18, 25 y 32 en un programa de cs $\times$ 3.

- Los resultados se muestran en la Figura 18. En el dibujo, la línea con rombos abiertos muestra los resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con cuadrados sólidos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) administrado a 0,1 mg/kg, la línea con marcas X muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) administrado a 0,3 mg/kg, la línea con triángulos sólidos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) administrado a 1 mg/kg y la línea con círculos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) administrado a 3 mg/kg. El conjugado de anticuerpo - fármaco (2) fue eficaz para contraer el tumor de una forma dependiente de la dosis.

(Ejemplo de prueba 13) Prueba antitumoral (3)

- 40 Las células Calu-6 de línea de cáncer de pulmón no de células pequeñas humano se adquirieron de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo). 5×10^6 células suspendidas en solución salina fisiológica se transplantaron subcutáneamente al lado derecho del abdomen de cada ratón desnudo hembra (día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el día 11. El anticuerpo M30-H1-L4P y conjugado de anticuerpo - fármaco (2) se administraron, cada uno, por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg a la cola de cada ratón los días 11, 18, y 25 en un programa de cs $\times$ 3.

- 45 Los resultados se muestran en la Figura 19. En el dibujo, la línea con rombos abiertos muestra los resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con triángulos abiertos muestra el efecto del anticuerpo M30-H1-L4P y la línea con círculos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (2). La administración del conjugado de anticuerpo - fármaco (2) disminuyó notablemente el volumen tumoral, y no se observó crecimiento tumoral alguno después de la administración final. Por el contrario, la administración del anticuerpo M30-H1-L4P dio como resultado el avance del crecimiento tumoral.

Además, los ratones que recibieron el conjugado de anticuerpo - fármaco (2) no presentaron signos notables tales como pérdida de peso, lo que sugiere que el conjugado de anticuerpo - fármaco (2) es de baja toxicidad y sumamente seguro.

(Ejemplo de prueba 14) Prueba antitumoral (4)

Se adquirieron células de la línea de melanoma humano A375 de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo). 8×10^6 células suspendidas en solución salina fisiológica se transplantaron subcutáneamente al lado derecho del abdomen de cada ratón desnudo hembra (día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el día 21. Los conjugados de anticuerpo - fármaco (1), (13), (41) y (55) se administraron, cada uno, por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg a la cola de cada ratón el día 21.

Los resultados se muestran en la Figura 20. En el dibujo, la línea con rombos abiertos muestra los resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con círculos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco administrado (1), la línea con triángulos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco administrado (13), la línea con marcas X muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco administrado (41) y la línea con cuadrados abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco administrado (55). La administración del conjugado de anticuerpo - fármaco (1), (13), (41) o (55) disminuyó notablemente el volumen tumoral, y la totalidad de estos conjugados de anticuerpo - fármaco ejercieron un efecto inhibitor del crecimiento tumoral.

Además, los ratones que recibieron el conjugado de anticuerpo - fármaco (1), (13), (41) o (55) no presentaron signos notables tales como pérdida de peso, lo que sugiere que los conjugados de anticuerpo - fármaco (1), (13), (41) y (55) son de baja toxicidad y sumamente seguros.

(Ejemplo de prueba 15) Prueba antitumoral (5)

Las células Calu-6 de línea de cáncer de pulmón no de células pequeñas humano se adquirieron de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo). 5×10^6 células suspendidas en solución salina fisiológica se transplantaron subcutáneamente al lado derecho del abdomen de cada ratón desnudo hembra (día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el día 12. Los conjugados de anticuerpo - fármaco (13), (41) y (55) se administraron, cada uno, por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg a la cola de cada ratón el día 12. Como control comparativo, se administró DE-310 por vía intravenosa a una dosis de 0,1 mg/kg a la cola de cada ratón el día 12. En este caso, la dosis anteriormente mencionada del conjugado de anticuerpo - fármaco estaba basada en la cantidad del anticuerpo en el conjugado y la dosis anteriormente mencionada de DE-310 estaba basada en la cantidad del fármaco contenido en el mismo. A este respecto, las cantidades de los fármacos respectivamente contenidos en el conjugado de anticuerpo - fármaco y DE-310 eran de aproximadamente 1 : 100. Esto significa que las dosis del conjugado de anticuerpo - fármaco y DE-310 eran iguales en términos de las cantidades de los fármacos contenidos en el mismo.

Los resultados se muestran en la Figura 21. En el dibujo, la línea con rombos abiertos muestra los resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con círculos abiertos muestra el efecto de DE-310, la línea con triángulos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (13), la línea con marcas X muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (41) y la línea con cuadrados abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco (55). La administración del conjugado de anticuerpo - fármaco (13), (41) o (55) disminuyó notablemente el volumen tumoral, mientras que la administración de DE-310 no mostró reducción alguna en el volumen tumoral.

Además, los ratones que recibieron el conjugado de anticuerpo - fármaco (13), (41) o (55) no presentaron signos notables tales como pérdida de peso, lo que sugiere que estos conjugados de anticuerpo - fármaco son de baja toxicidad y sumamente seguros.

(Ejemplo de prueba 16) Prueba antitumoral (6)

Se adquirieron células de la línea de melanoma humano A375 de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo). 1×10^7 células suspendidas en solución salina fisiológica se transplantaron subcutáneamente al lado derecho del abdomen de cada ratón desnudo hembra (día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el día 11. Los conjugados de anticuerpo - fármaco (17), (18), (19), (59), (60) y (61) se administraron, cada uno, por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg a la cola de cada ratón los días 11 y 18 en un programa de $cs \times 2$.

Los resultados se muestran en la Figura 22. En el dibujo, la línea con rombos sólidos muestra los resultados acerca de un tumor sin tratar, la línea con cuadrados sólidos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco administrado (17), la línea con triángulos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco administrado (18), la línea con círculos abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco administrado (19), la línea con triángulos sólidos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco administrado (59), la línea con cuadrados abiertos muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco administrado (60) y la línea con marcas X muestra el efecto del conjugado de anticuerpo - fármaco administrado (61).

La administración del conjugado de anticuerpo - fármaco (17), (18), (19), (59), (60) o (61) disminuyó notablemente el volumen tumoral, y la totalidad de estos conjugados de anticuerpo - fármaco ejercieron un efecto inhibitor del crecimiento tumoral.

Además, los ratones que recibieron el conjugado de anticuerpo - fármaco (17), (18), (19), (59), (60) o (61) no

presentaron signos notables tales como pérdida de peso, lo que sugiere que estos conjugados de anticuerpo - fármaco son de baja toxicidad y sumamente seguros.

Texto libre del Listado de secuencias

- 5 SEQ ID NO: 1 - secuencia de aminoácidos de la variante 1 de B7-H3
 SEQ ID NO: 2 - secuencia de aminoácidos de la variante 2 de B7-H3
 SEQ ID NO: 3 - Secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo M30
 SEQ ID NO: 4 - Secuencia de aminoácidos de CDRH2 del anticuerpo M30
 SEQ ID NO: 5 - Secuencia de aminoácidos de CDRH3 del anticuerpo M30
 SEQ ID NO: 6 - Secuencia de aminoácidos de CDRL1 del anticuerpo M30
 10 SEQ ID NO: 7 - Secuencia de aminoácidos de CDRL2 del anticuerpo M30
 SEQ ID NO: 8 - Secuencia de aminoácidos de CDRL3 del anticuerpo M30
 SEQ ID NO: 9 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H1
 SEQ ID NO: 10 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H2
 SEQ ID NO: 11 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H3
 15 SEQ ID NO: 12 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H4
 SEQ ID NO: 13 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L1
 SEQ ID NO: 14 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L2
 SEQ ID NO: 15 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L3
 SEQ ID NO: 16 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L4
 20 SEQ ID NO: 17 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L5
 SEQ ID NO: 18 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L6
 SEQ ID NO: 19 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L7
 SEQ ID NO: 20 - Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada del anticuerpo M30
 SEQ ID NO: 21 - Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera del anticuerpo M30
 25 SEQ ID NO: 22 - Cebador de PCR 1
 SEQ ID NO: 23 - Cebador de PCR 2
 SEQ ID NO: 24 - Cebador promotor de CMV: cebador 3
 SEQ ID NO: 25 - Cebador inverso de BGH: cebador 4
 SEQ ID NO: 26 - Secuencia de nucleótidos de la variante 1 de B7-H3
 30 SEQ ID NO: 27 - Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada del anticuerpo anti-CD30
 SEQ ID NO: 28 - Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera del anticuerpo anti-CD30
 SEQ ID NO: 29 - Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada del anticuerpo anti-CD33
 SEQ ID NO: 30 - Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera del anticuerpo anti-CD33
 SEQ ID NO: 31 - Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada del anticuerpo anti-CD70
 35 SEQ ID NO: 32 - Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera del anticuerpo anti-CD70

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
 <120> CONJUGADO DE ANTICUERPO - FÁRMACO
 <130> PD20-9003WO
 40 <150> JP2012-225887
 <151> 11/10/2012
 <160> 32
 <170> PatentIn versión 3.5
 45 <210> 1
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

ES 2 671 644 T3

Met	Leu	Arg	Arg	Arg	Gly	Ser	Pro	Gly	Met	Gly	Val	His	Val	Gly	Ala	1	5	10	15
Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Trp	Phe	Cys	Leu	Thr	Gly	Ala	Leu	Glu	Val	Gln	20	25	30	
Val	Pro	Glu	Asp	Pro	Val	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Thr	Asp	Ala	Thr	Leu	35	40	45	
Cys	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	Glu	Pro	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Gln	Leu	Asn	50	55	60	
Leu	Ile	Trp	Gln	Leu	Thr	Asp	Thr	Lys	Gln	Leu	Val	His	Ser	Phe	Ala	65	70	75	80
Glu	Gly	Gln	Asp	Gln	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ala	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Phe	85	90	95	
Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Gln	Arg	Val	100	105	110	
Arg	Val	Ala	Asp	Glu	Gly	Ser	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Ile	Arg	Asp	115	120	125	
Phe	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ser	Lys	130	135	140	
Pro	Ser	Met	Thr	Leu	Glu	Pro	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Thr	145	150	155	160
Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	Val				

ES 2 671 644 T3

165								170					175			
Phe	Trp	Gln	Asp 180	Gly	Gln	Gly	Val	Pro 185	Leu	Thr	Gly	Asn	Val 190	Thr	Thr	
Ser	Gln	Met 195	Ala	Asn	Glu	Gln	Gly 200	Leu	Phe	Asp	Val	His 205	Ser	Ile	Leu	
Arg	Val 210	Val	Leu	Gly	Ala	Asn 215	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys 220	Leu	Val	Arg	Asn	
Pro 225	Val	Leu	Gln	Gln	Asp 230	Ala	His	Ser	Ser	Val 235	Thr	Ile	Thr	Pro	Gln 240	
Arg	Ser	Pro	Thr	Gly 245	Ala	Val	Glu	Val	Gln 250	Val	Pro	Glu	Asp	Pro 255	Val	
Val	Ala	Leu	Val 260	Gly	Thr	Asp	Ala	Thr 265	Leu	Arg	Cys	Ser	Phe 270	Ser	Pro	
Glu	Pro	Gly 275	Phe	Ser	Leu	Ala	Gln 280	Leu	Asn	Leu	Ile	Trp 285	Gln	Leu	Thr	
Asp	Thr 290	Lys	Gln	Leu	Val	His 295	Ser	Phe	Thr	Glu	Gly 300	Arg	Asp	Gln	Gly	
Ser 305	Ala	Tyr	Ala	Asn	Arg 310	Thr	Ala	Leu	Phe	Pro 315	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln 320	
Gly	Asn	Ala	Ser	Leu 325	Arg	Leu	Gln	Arg	Val 330	Arg	Val	Ala	Asp	Glu 335	Gly	
Ser	Phe	Thr	Cys 340	Phe	Val	Ser	Ile	Arg 345	Asp	Phe	Gly	Ser	Ala 350	Ala	Val	
Ser	Leu	Gln 355	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr 360	Ser	Lys	Pro	Ser	Met 365	Thr	Leu	Glu	
Pro	Asn 370	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro 375	Gly	Asp	Thr	Val	Thr 380	Ile	Thr	Cys	Ser	
Ser 385	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Pro 390	Glu	Ala	Glu	Val	Phe 395	Trp	Gln	Asp	Gly	Gln 400	
Gly	Val	Pro	Leu	Thr 405	Gly	Asn	Val	Thr	Thr	Ser	Gln	Met	Ala	Asn 415	Glu	

ES 2 671 644 T3

Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
420 425 430

Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
435 440 445

Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
450 455 460

Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
465 470 475 480

Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
485 490 495

Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
500 505 510

Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
515 520 525

Asp Gly Gln Glu Ile Ala
530

<210> 2
<211> 316
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 2

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65 70 75 80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
85 90 95

ES 2 671 644 T3

Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Gln	Arg	Val			
			100					105					110					
Arg	Val	Ala	Asp	Glu	Gly	Ser	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Ile	Arg	Asp			
		115					120					125						
Phe	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ser	Lys			
	130					135					140							
Pro	Ser	Met	Thr	Leu	Glu	Pro	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Thr			
145					150					155					160			
Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	Val			
				165					170					175				
Phe	Trp	Gln	Asp	Gly	Gln	Gly	Val	Pro	Leu	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Thr			
			180					185					190					
Ser	Gln	Met	Ala	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	His	Ser	Val	Leu			
		195					200					205						
Arg	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Leu	Val	Arg	Asn			
	210					215					220							
Pro	Val	Leu	Gln	Gln	Asp	Ala	His	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Thr	Gly	Gln			
225					230					235					240			
Pro	Met	Thr	Phe	Pro	Pro	Glu	Ala	Leu	Trp	Val	Thr	Val	Gly	Leu	Ser			
				245					250					255				
Val	Cys	Leu	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Phe	Val	Cys	Trp	Arg			
			260					265					270					
Lys	Ile	Lys	Gln	Ser	Cys	Glu	Glu	Glu	Asn	Ala	Gly	Ala	Glu	Asp	Gln			
		275					280					285						
Asp	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Ser	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Leu	Lys	His			
	290					295					300							
Ser	Asp	Ser	Lys	Glu	Asp	Asp	Gly	Gln	Glu	Ile	Ala							
305					310					315								

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3

ES 2 671 644 T3

Asn Tyr Val Met His
 1 5

5 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

10 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 5

Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

15 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 6

Arg Ala Ser Ser Arg Leu Ile Tyr Met His
 1 5 10

20 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 7

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <400> 8

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
 1 5

35 <210> 9
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada humanizada de M30
 <400> 9

ES 2 671 644 T3

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			
Thr	Asn	Tyr	Val	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Met	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Lys	Tyr	Asn
65					70					75					80
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Phe
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
	130					135					140				
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
145					150					155					160
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
				165					170					175	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
			180					185					190		
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys

ES 2 671 644 T3

210		215		220													
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu																	
225					230				235							240	
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro																	
				245					250							255	
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys																	
			260					265						270			
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val																	
		275					280					285					
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp																	
	290					295					300						
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr																	
305					310					315						320	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp																	
				325					330						335		
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu																	
			340					345						350			
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg																	
		355					360					365					
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys																	
	370					375					380						
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp																	
385					390				395							400	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys																	
				405					410						415		
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser																	
			420					425						430			
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser																	
		435					440					445					
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser																	
	450					455					460						

ES 2 671 644 T3

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 10
<211> 471
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Cadena pesada humanizada de M30
<400> 10

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			
Thr	Asn	Tyr	Val	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Lys	Tyr	Asn
65					70					75					80
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Phe
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
	130					135					140				
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
145					150					155					160
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
				165					170					175	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
			180					185					190		
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser

ES 2 671 644 T3

195					200					205					
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
210						215				220					
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu
225						230				235				240	
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
				245						250				255	
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
		260						265						270	
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
		275						280				285			
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
290						295						300			
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
305						310				315				320	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				325						330				335	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
		340						345						350	
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
		355						360				365			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
370						375						380			
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
385						390				395				400	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
		405						410						415	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
		420						425						430	
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
		435						440				445			

ES 2 671 644 T3

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 11

<211> 471

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada humanizada de M30

<400> 11

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

ES 2 671 644 T3

			180				185				190					
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
		195				200						205				
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
		210				215						220				
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	
		225				230						235				
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
					245										255	
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
									265						270	
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
				275				280						285		
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
				290				295				300				
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
				305						315						320
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
					325				330						335	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
					340				345						350	
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
				355				360						365		
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
				370				375				380				
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
				385				390				395				400
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
					405				410						415	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
					420				425						430	

ES 2 671 644 T3

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 12

<211> 471

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Cadena pesada humanizada de M30

<400> 12

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

ES 2 671 644 T3

165								170					175				
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His		
			180				185						190				
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser		
			195				200						205				
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys		
			210				215						220				
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu		
			225	230						235			240				
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
			245				250						255				
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
			260				265						270				
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
			275				280						285				
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
			290	295						300							
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		
			305	310						315			320				
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
			325				330						335				
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		
			340				345						350				
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
			355				360						365				
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
			370	375						380							
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
			385	390						395			400				
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
			405				410						415				

ES 2 671 644 T3

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 13

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 13

ES 2 671 644 T3

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	1	5	10	15
Gly	Ala	Tyr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	20	25	30	
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Arg	35	40	45	
Leu	Ile	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	50	55	60	
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	65	70	75	80
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	85	90	95	
Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Asn	Ser	100	105	110	
Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	115	120	125	
Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	130	135	140	
Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	145	150	155	160
Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	165	170	175	
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	180	185	190	
Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	195	200	205	
Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	210	215	220	
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	225	230									

<210> 14

ES 2 671 644 T3

<211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 14

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	1	5	10	15
Gly	Ala	Tyr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	20	25	30	
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Arg	35	40	45	
Leu	Ile	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	50	55	60	
Leu	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	65	70	75	80
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	85	90	95	
Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Asn	Ser	100	105	110	
Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	115	120	125	

ES 2 671 644 T3

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 15

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 15

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys
50 55 60

Leu Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

5

ES 2 671 644 T3

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 16

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 16

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

5

ES 2 671 644 T3

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 17

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera humanizada de M30

<400> 17

ES 2 671 644 T3

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	1	5	10	15
Gly	Ala	Tyr	Gly	Gln	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	20	25	30	
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Arg	35	40	45	
Leu	Ile	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ala	Pro	Lys	50	55	60	
Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	65	70	75	80
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	85	90	95	
Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Asn	Ser	100	105	110	
Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	115	120	125	
Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	130	135	140	
Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	145	150	155	160
Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	165	170	175	
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	180	185	190	
Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	195	200	205	
Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	210	215	220	
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	225	230									

<210> 18
<211> 233

ES 2 671 644 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera humanizada de M30

5 <400> 18

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser
1				5					10					15	

ES 2 671 644 T3

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 50 55 60
 Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95
 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
 100 105 110
 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 19

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera humanizada de M30

ES 2 671 644 T3

<400> 19

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	1	5	10	15
Gly	Ala	Tyr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	20	25	30	
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Arg	35	40	45	
Leu	Ile	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	50	55	60	
Pro	Leu	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	65	70	75	80
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	85	90	95	
Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Asn	Ser	100	105	110	
Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	115	120	125	
Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	130	135	140	
Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	145	150	155	160
Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	165	170	175	
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	180	185	190	
Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	195	200	205	
Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	210	215	220	
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	225	230									

<210> 20

ES 2 671 644 T3

<211> 471
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 20

Met	Glu	Trp	Ser	Trp	Ile	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	
1				5					10					15		
Val	His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	
			20				25						30			
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	
		35					40					45				
Thr	Asn	Tyr	Val	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	
	50					55					60					
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Lys	Tyr	Asn	
65					70				75						80	
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Gln	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	
				85					90					95		
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	
			100					105					110			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Phe	
		115					120					125				
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	
	130					135					140					
Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Cys	Gly	Asp	Thr	Thr	
145					150					155					160	
Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	
				165					170					175		
Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	
			180					185					190			
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	
		195					200					205				
Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn	
	210					215					220					

ES 2 671 644 T3

Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro	225	230	235	240
Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	245	250	255	
Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	260	265	270	
Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	275	280	285	
Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	290	295	300	
Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	305	310	315	320
Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	325	330	335	
Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	340	345	350	
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	355	360	365	
Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	370	375	380	
Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	385	390	395	400
Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	405	410	415	
Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	420	425	430	
Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	435	440	445	
Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	450	455	460	
Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys										465	470		

ES 2 671 644 T3

<210> 21
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 21

```

Met Asp Phe Leu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1          5          10          15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile
 20          25          30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35          40          45

Ser Arg Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50          55          60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65          70          75          80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85          90          95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100          105          110

Asn Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115          120          125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130          135          140

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
145          150          155          160

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
165          170          175

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180          185          190

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
195          200          205

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
210          215          220

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225          230          235
  
```

<210> 22

<211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> cebador de PCR
 <400> 22
 ctataggagg acccaagctg gctagcatgc tgcgtcggcg gggcag 46
 <210> 23
 10 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador de PCR
 <400> 23
 aacggggccct ctagactcga gcggccgctc aggctatttc ttgtccatca ttttctttgc 60
 15 tgtcag 66
 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> cebador de PCR
 <400> 24
 cgcaaatggg cggtaggcgt g 21
 25 <210> 25
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador de PCR
 30 <400> 25
 tagaaggcac agtcgagg 18
 <210> 26
 35 <211> 1815
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

ES 2 671 644 T3

atgctgctgc	ggcggggcag	ccctggcatg	ggtgtgcatg	tgggtgcagc	cctgggagca	
ctgtgggttct	gcctcacagg	agccctggag	gtccagggtcc	ctgaagaccc	agtgggtggca	1
ctgggtgggca	ccgatgccac	cctgtgctgc	tcctttctccc	ctgagccctgg	cttcagccctg	1
gcacagctca	acctcatctg	gcagctgaca	gataccaaac	agctgggtgca	cagcttttgc	2
gagggccagg	accagggcag	cgcctatgcc	aaccgcacgg	ccctcttccc	ggacctgctg	3
gcacaggggca	acgcatccct	gaggctgcag	cgcgtgctg	tggcggacga	gggcagcttc	3
acctgcttcg	tgagcatccg	ggatttcggc	agcgtgccc	tcagcctgca	ggtggccgct	4
ccctactcga	agcccagcat	gaccctggag	cccaacaagg	acctgcggcc	aggggacacg	4
gtgaccatca	cgtgctccag	ctaccagggc	taccctgagg	ctgaggtgtt	ctggcaggat	5
gggcaggggtg	tgcccctgac	tggcaacgtg	accacgtcgc	agatggccaa	cgagcagggc	6
ttgtttgatg	tgcacagcat	cctgcgggtg	gtgctgggtg	caaattggcac	ctacagctgc	6
ctgggtgcga	accccgctg	gcagcaggat	gcgcacagct	ctgtcaccat	cacacccag	7
agaagcccca	caggagccgt	ggaggtccag	gtccctgagg	acccgggtgg	ggccctagt	7
ggcaccgatg	ccaccctgcg	ctgctccttc	tccccgagc	ctggcttcag	cctggcacag	8
ctcaacctca	tctggcagct	gacagacacc	aaacagctgg	tgcacagttt	caccgaaggc	9
cgggaccagg	gcagcgccta	tgccaaaccgc	acggccctct	tcccggacct	gctggcacaa	9
ggcaatgcat	ccctgaggct	gcagcgcgtg	cgtgtggcgg	acgagggcag	cttcacctgc	10
ttcgtgagca	tccgggattt	cggcagcgt	gccgtcagcc	tgcaggtggc	cgctccctac	10
tcgaagccca	gcatgaccct	ggagcccaac	aaggacctgc	ggccagggga	cacggtgacc	11
atcacgtgct	ccagctaccg	gggctaccct	gaggctgagg	tgttctggca	ggatgggcag	12
ggtgtgcccc	tgactggcaa	cgtgaccacg	tcgcagatgg	ccaacgagca	gggcttgttt	12
gatgtgcaca	gcgtcctgcg	ggtgggtgctg	ggtgcgaatg	gcacctacag	ctgcctggtg	13
cgcaaccccg	tgctgcagca	ggatgcgcac	ggctctgtca	ccatcacagg	gcagcctatg	13
acattccccc	cagaggccct	gtgggtgacc	gtggggctgt	ctgtctgtct	cattgcactg	14
ctgggtggccc	tggctttcgt	gtgctggaga	aagatcaaac	agagctgtga	ggaggagaat	15
gcaggagctg	aggaccagga	tggggaggga	gaaggctcca	agacagccct	gcagcctctg	15
aaacactctg	acagcaaaga	agatgatgga	caagaaatag	cctgagcggc	cgccactgtg	16
ctggatatct	gcagaattcc	accacactgg	actagtggat	ccgagctcgg	taccaagctt	16
aagtttaaac	cgctgatcag	cctcgactgt	gccttctagt	tgccagccat	ctgttgtttg	17
cccctcccc	gtgccttcct	tgaccctgga	aggtgccact	cccactgtcc	tttcctaata	18
aaatgaggaa	attgc					18

ES 2 671 644 T3

<211> 466
<212> PRT
<213>

5 <220>
<223>

<400> 27

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	1	5	10	15
Val	Leu	Ser	Gln	Ile	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Val	Val	Lys	20	25	30	
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	35	40	45	
Thr	Asp	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	50	55	60	
Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	65	70	75	80
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	85	90	95	
Thr	Ala	Phe	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	100	105	110	
Tyr	Phe	Cys	Ala	Asn	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	115	120	125	
Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	130	135	140	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	145	150	155	160
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	165	170	175	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	180	185	190	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	195	200	205	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys				

ES 2 671 644 T3

210	215	220
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
225	230	235
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
	245	250
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
	260	265
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
	275	280
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
	290	295
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
305	310	315
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
	325	330
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	340	345
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
	355	360
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
	370	375
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
385	390	395
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
	405	410
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	420	425
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
	435	440
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	450	455
		Gly Lys
		465

<210> 28
 <211> 238
 <212> PRT

ES 2 671 644 T3

<213>

<220>

<223>

<400> 28

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala

195

200

205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 29

ES 2 671 644 T3

<211> 465
<212> PRT
<213>

<220>
<223>

5

<400> 29

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	
Val	Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Ile
		35					40					45			
Thr	Asp	Ser	Asn	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Asp	Tyr	Asn
65					70					75					80
Gln	Lys	Phe	Lys	Asn	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Asn	Pro	Thr	Asn
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Phe
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Val	Asn	Gly	Asn	Pro	Trp	Leu	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
		115					120					125			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	130					135					140				
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
145					150					155					160
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
				165					170					175	

ES 2 671 644 T3

Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	180	185	190	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	195	200	205	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	210	215	220	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	225	230	235	240
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	245	250	255	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	260	265	270	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	275	280	285	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	290	295	300	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	305	310	315	320
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	325	330	335	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	340	345	350	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	355	360	365	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	370	375	380	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	385	390	395	400
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	405	410	415	
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys				

ES 2 671 644 T3

420

425

430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 30
<211> 238
<212> PRT
<213>

5

<220>
<223>

<400> 30

ES 2 671 644 T3

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	1	5	10	15
Gly	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	20	25	30	
Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	35	40	45	
Leu	Asp	Asn	Tyr	Gly	Ile	Arg	Phe	Leu	Thr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	50	55	60	
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Met	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	65	70	75	80
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	85	90	95	
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	100	105	110	
Gln	Gln	Thr	Lys	Glu	Val	Pro	Trp	Ser	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	115	120	125	
Glu	Val	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	130	135	140	
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	145	150	155	160
Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	165	170	175	
Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	180	185	190	
Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	195	200	205	
Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	210	215	220	
Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys			225	230	235	

<210> 31
 <211> 467
 <212> PRT

ES 2 671 644 T3

<213>

<220>

<223>

<400> 31

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ala Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

ES 2 671 644 T3

Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	130	135	140	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	145	150	155	160
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	165	170	175	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	180	185	190	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	195	200	205	
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	210	215	220	
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	225	230	235	240
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	245	250	255	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	260	265	270	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	275	280	285	
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	290	295	300	
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	305	310	315	320
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	325	330	335	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	340	345	350	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	355	360	365	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	370	375	380	

ES 2 671 644 T3

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 32

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>

<400> 32

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser
35 40 45

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

ES 2 671 644 T3

Gln His Ser Arg Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

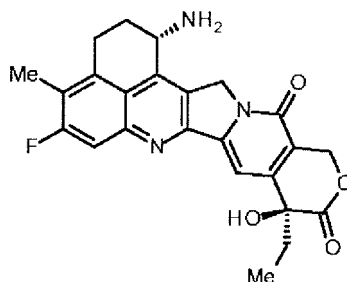
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

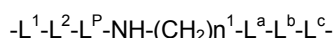
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

REIVINDICACIONES

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



está conjugado con un anticuerpo por medio de un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



en el que el anticuerpo está conectado al extremo terminal de L^1 , el compuesto antitumoral está conectado al extremo terminal de L^c con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como la posición de conexión, en el que

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

L^1 representa -(Succinimid-3-il-N)-(CH₂) n^2 -C(=O)-,

-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂) n^3 -C(=O)-,

-C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH₂-(N-li-3-diminiccuS)-, o

-C(=O)-(CH₂) n^4 -C(=O)-,

en el que n^2 representa un número entero de 2 a 8, n^3 representa un número entero de 1 a 8, n^4 representa un número entero de 1 a 8,

L^2 representa -NH-(CH₂-CH₂-O) n^5 -CH₂-CH₂-C(=O)-,

-S-(CH₂) n^6 -C(=O)-, o un enlace sencillo,

en el que n^5 representa un número entero de 1 a 6, n^6 representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa un residuo de tetrapéptido de GGFG,

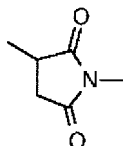
L^a representa -O- o un enlace sencillo,

L^b representa -CR²(-R³)- o un enlace sencillo,

en el que R² y R³ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno,

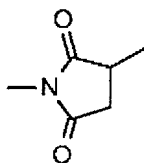
L^c representa -C(=O)-,

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



que está conectado al anticuerpo en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura de enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

-(N-li-3-diminiccuS)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



que está conectado a L^2 en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura de enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

cic.Hex(1,4) representa un grupo 1,4-ciclohexileno y, cuando L^2 es -S-(CH₂) n^6 -C(=O)-, L^1 es -C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH₂-(N-li-3-diminiccuS)-.

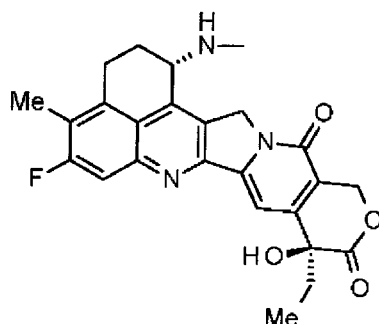
2. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la estructura del enlazador es una estructura seleccionada de entre el siguiente grupo:

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

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

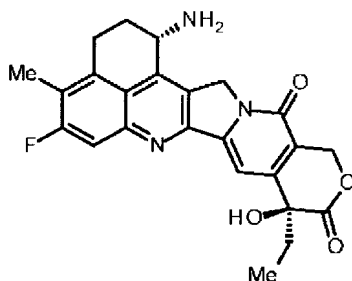
-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 5 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 10 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 -C(=O)-cic.Hex(1,4)-CH₂-(N-li-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 15 en el que -(NH-DX) representa un grupo representado por la siguiente fórmula:

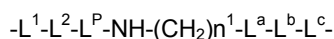


en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición de conexión, y -GGFG- representa un residuo de péptido de -Gly-Gly-Phe-Gly-.

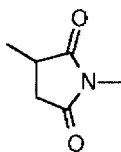
3. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:



está conjugado con un anticuerpo por medio de un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



- 25 en el que el anticuerpo está conectado al extremo terminal de L¹, el compuesto antitumoral está conectado al extremo terminal de L^c con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como la posición de conexión, en el que
 n¹ representa un número entero de 0 a 6,
 L¹ representa -(Succinimid-3-il-N)-(CH₂)_{n²}-C(=O)-, en el que n² representa un número entero de 2 a 5,
 30 L² representa -NH-(CH₂-CH₂-O)_{n⁵}-CH₂-CH₂-C(=O)- o un enlace sencillo, en el que n⁵ representa un número entero de 2 o 4,
 L^P representa un residuo de tetrapéptido de GGFG,
 L^a representa -O- o un enlace sencillo,
 L^b representa -CR²(-R³)- o un enlace sencillo,
 35 en el que R² y R³ representan cada uno un átomo de hidrógeno,
 L^c representa -C(=O)-, y
 -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



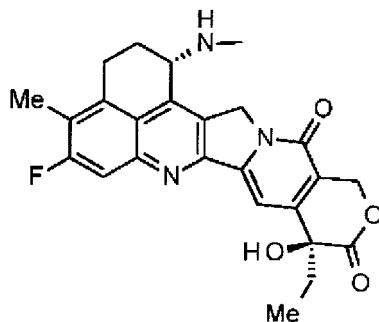
que está conectado al anticuerpo en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura de enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1.

- 5 4. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con la reivindicación 3, en el que $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-L}^c\text{-}$ es $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(=O)-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$, o $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$.

5. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con la reivindicación 4, en el que $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-L}^c\text{-}$ es $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$.

- 10 6. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la estructura del enlazador es una estructura seleccionada de entre el siguiente grupo:

15 $\text{-(Succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 $\text{-(Succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 $\text{-(Succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$
 en el que -(NH-DX) representa un grupo representado por la siguiente fórmula:



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

- 20 7. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la estructura del enlazador es:
 $\text{-(Succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$.

8. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que un número promedio de unidades de la estructura de fármaco - enlazador seleccionada conjugada por anticuerpo está en un intervalo de 2 a 8.

- 25 9. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que un número promedio de unidades de la estructura de fármaco - enlazador seleccionada conjugada por anticuerpo está en un intervalo de 3 a 8.

10. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que una célula que es seleccionada como diana por el conjugado de anticuerpo - fármaco es una célula tumoral.

- 30 11. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-A33, un anticuerpo anti-B7-H3, un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-G250, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo anti-integrina, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo anti-tenascin-C, un anticuerpo anti-SLC44A4 o un anticuerpo anti-mesotelina.

- 35 12. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-B7-H3, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33 o un anticuerpo anti-CD70.

13. El conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-B7-H3.

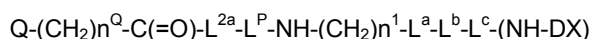
14. Un fármaco que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal del mismo.

15. Un fármaco antitumoral y/o fármaco anticancerígeno que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal del mismo.

5 16. Un fármaco antitumoral y/o fármaco anticancerígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso contra cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago o cáncer de esófago.

10 17. Una composición farmacéutica que contiene el conjugado de anticuerpo - fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal del mismo como un componente activo, y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.

18. Un compuesto intermedio de fármaco - enlazador representado por la siguiente fórmula:



en el que Q representa (maleimid-N-il)-

n^Q representa un número entero de 2 a 8,

L^{2a} representa $-NH-(CH_2-CH_2-O)_{n^5}-CH_2-CH_2-C(=O)-$ o un enlace sencillo,

en el que n^5 representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa un residuo de tetrapéptido de GGFG

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

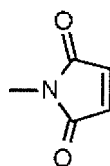
L^a representa $-O-$ o un enlace sencillo,

L^b representa $-CR^2(-R^3)-$ o un enlace sencillo,

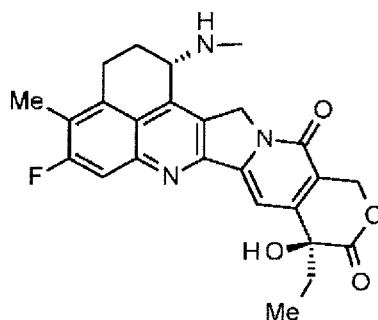
en el que R^2 y R^3 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno,

L^c representa $-C(=O)-$,

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



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



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

19. El compuesto intermedio de fármaco - enlazador de acuerdo con la reivindicación 18, en el que n^5 es un número entero de 2 o 4,

$-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-L^b-$ es

$-NH-CH_2CH_2CH_2-$,

$-NH-CH_2-O-CH_2-$, o

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$.

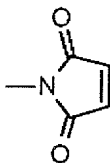
20. Un compuesto de los siguientes:

(maleimid-N-il)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

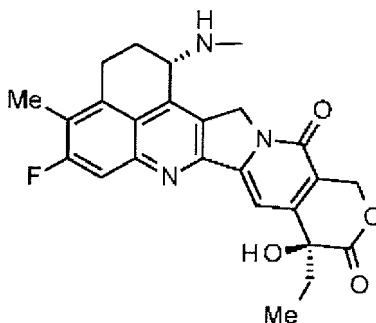
(maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ o

(maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

en el que (maleimid-N-il)- es un grupo representado por la siguiente fórmula:



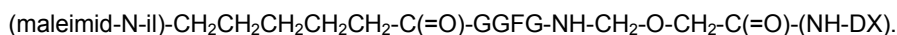
en la que el átomo de nitrógeno es una posición de conexión, y -(NH-DX) es un grupo representado por la siguiente fórmula:



5

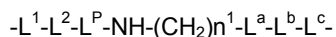
en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es una posición de conexión.

21. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 20, que es:



22. Un enlazador representado por la siguiente fórmula:

10



para obtener un conjugado de anticuerpo - fármaco en el que un fármaco está conjugado con un anticuerpo por medio del enlazador,

en el que L^1 es una posición de conexión para el anticuerpo, L^c es una posición de conexión para un compuesto antitumoral,

15

en el que

n^1 representa un número entero de 0 a 6, L^1 representa $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$,

en el que n^2 representa un número entero de 2 a 8,

L^2 representa $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})^{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ o un enlace sencillo,

en el que n^5 representa un número entero de 1 a 6,

20

L^P representa un residuo de tetrapéptido de GGFG,

L^a representa $-\text{O}-$ o un enlace sencillo,

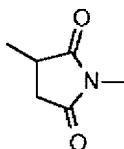
L^b representa $-\text{CR}^2(-\text{R}^3)-$, o un enlace sencillo,

en el que R^2 y R^3 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno,

L^c representa $-\text{C}(=\text{O})-$,

25

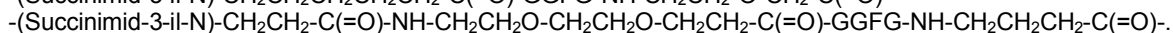
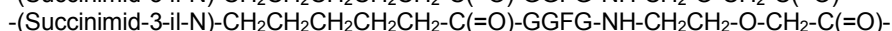
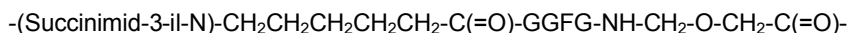
$-(\text{Succinimid-3-il-N})-$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



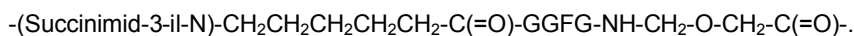
que está conectado al anticuerpo en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura de enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1.

30

23. El enlazador de acuerdo con la reivindicación 22, que se selecciona de entre el siguiente grupo, con la condición de que el extremo terminal izquierdo sea una posición de conexión con el anticuerpo y el extremo terminal derecho sea una posición de conexión con el compuesto antitumoral:

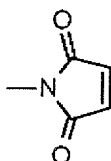


24. El enlazador de acuerdo con la reivindicación 23, que, con la condición de que el extremo terminal izquierdo sea una posición de conexión con el anticuerpo y el extremo terminal derecho sea una posición de conexión con el compuesto antitumoral, es:

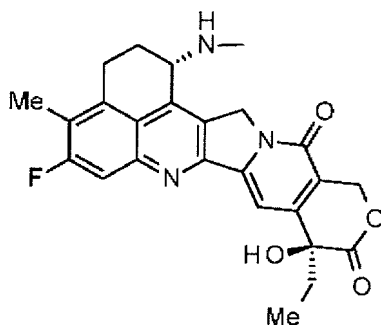


5 25. Un procedimiento para preparar un conjugado de anticuerpo - fármaco, en el que el anticuerpo se trata en una condición reductora y a continuación se hace reaccionar con un compuesto seleccionado de entre el grupo de compuestos mostrado posteriormente:

10 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NHCH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), o
(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
en lo anterior, (maleimid-N-il)- es un grupo representado por la siguiente fórmula:

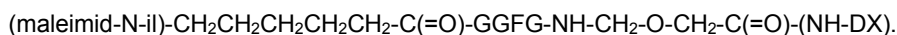


en la que el átomo de nitrógeno es una posición de conexión, y -(NH-DX) es un grupo representado por la siguiente fórmula:

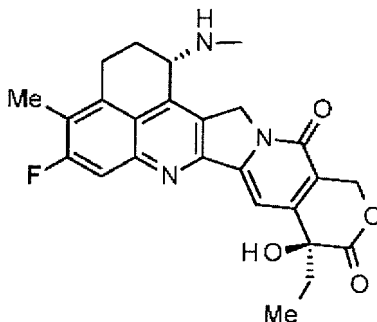


15 en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es una posición de conexión.

26. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que el anticuerpo se trata en una condición reductora y a continuación se hace reaccionar con el compuesto mostrado posteriormente:



20 27. Un compuesto seleccionado de entre un grupo de
NH₂-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
NH₂-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), o
HO-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
en el que -(NH-DX) es un grupo representado por la siguiente fórmula:



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

28. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 27, que es HO-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Fig. 1

Secuencia de aminoácidos de la variante 1 de B7-H3 (SEQ ID NO: 1)

```

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTD
ATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQD
GQGVPLTGNTTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNP
VLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSF
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFP
DLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVSLQVAAPY
SKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLT
GNTTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAH
GSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIKQS
CEEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA
    
```

Fig. 2

Secuencia de aminoácidos de la variante 2 de B7-H3 (SEQ ID NO: 2)

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTD
 ATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
 NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVS
 LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQD
 GQGVPLTGNAVTT SQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNP
 VLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVC
 WRKIKQSCEEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQE I
 A

Fig. 3

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H1 (SEQ ID NO: 9)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASG
 YTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTIT
 ADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYGSPLYYFDYWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESGGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 4

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H2 (SEQ ID NO: 10)

MKHLWFFLLLVAA PRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASG
 YTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTIT
 ADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTP E VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESGGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 5

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H3 (SEQ ID NO: 11)

MKHLWFFLLLVAA PRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASG
YTFTNYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATIT
ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 6

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo M30-H4 (SEQ ID NO: 12)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQT
SDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNIKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 7

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L1 (SEQ ID NO: 13)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 8

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L2 (SEQ ID NO: 14)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRLWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 9

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L3 (SEQ ID NO: 15)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRA
 SSRLIYMHYQQKPGSAPKLWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTSY
 TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGEC

Fig. 10

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L4 (SEQ ID NO: 16)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISSLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 11

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L5 (SEQ ID NO: 17)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRA
SSRLIYMHWYQQKPGSAPKPKWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTSY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 12

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L6 (SEQ ID NO: 18)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 13

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo M30-L7 (SEQ ID NO: 19)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 14

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 20)

MEWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASG
YTFTNYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQT
SDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYYGSPLYFDFYWGQGT
TLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL
TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNV
AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPK
IKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQT
HREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTI
SKPKGSVRAPQVYVLP PPEEEMTKKQVTLT CMVTDFMPEDIYVEW
TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERN SYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Fig. 15

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo M30 (SEQ ID NO: 21)

MDFLVQIFSFLISASVIMSRGQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTC
RASSRLIYMHYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGT
SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGTGTKLELKRADAAPT
VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGV
LNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSP
IVKSFNRNEC

Fig. 16

Secuencia de nucleótidos de la variante 1 de B7-H3 (SEQ ID NO: 26)

```

a t g c t g c g t c g g c g g g g c a g c c c t g g c a t g g g t g t g c a t g t g g g t
g c a g c c c t g g g a g c a c t g t g g t t c t g c c t c a c a g g a g c c c t g g a g
g t c c a g g t c c c t g a a g a c c c a g t g g t g g c a c t g g t g g g c a c c g a t
g c c a c c c t g t g c t g c t c c t t c t c c c c t g a g c c t g g c t t c a g c c t g
g c a c a g c t c a a c c t c a t c t g g c a g c t g a c a g a t a c c a a a c a g c t g
g t g c a c a g c t t t g c t g a g g g c c a g g a c c a g g g c a g c g c c t a t g c c
a a c c g c a c g g c c c t c t t c c c g g a c c t g c t g g c a c a g g g c a a c g c a
t c c c t g a g g c t g c a g c g c g t g c g t g t g g c g g a c g a g g g c a g c t t c
a c c t g c t t c g t g a g c a t c c g g g a t t t c g g c a g c g c t g c c g t c a g c
c t g c a g g t g g c c g c t c c c t a c t c g a a g c c c a g c a t g a c c c t g g a g
c c c a a c a a g g a c c t g c g g c c a g g g g a c a c g g t g a c c a t c a c g t g c
t c c a g c t a c c a g g g c t a c c c t g a g g c t g a g g t g t t c t g g c a g g a t
g g g c a g g g t g t g c c c c t g a c t g g c a a c g t g a c c a c g t c g c a g a t g
g c c a a c g a g c a g g g c t t g t t t g a t g t g c a c a g c a t c c t g c g g g t g
g t g c t g g g t g c a a a t g g c a c c t a c a g c t g c c t g g t g c g c a a c c c c
g t g c t g c a g c a g g a t g c g c a c a g c t c t g t c a c c a t c a c a c c c c a g
a g a a g c c c c a c a g g a g c c g t g g a g g t c c a g g t c c c t g a g g a c c c g
g t g g t g g c c c t a g t g g g c a c c g a t g c c a c c c t g c g c t g c t c c t t c
t c c c c c g a g c c t g g c t t c a g c c t g g c a c a g c t c a a c c t c a t c t g g
c a g c t g a c a g a c a c c a a a c a g c t g g t g c a c a g t t t c a c c g a a g g c
c g g g a c c a g g g c a g c g c c t a t g c c a a c c g c a c g g c c c t c t t c c c g
g a c c t g c t g g c a c a a g g c a a t g c a t c c c t g a g g c t g c a g c g c g t g
c g t g t g g c g g a c g a g g g c a g c t t c a c c t g c t t c g t g a g c a t c c g g
g a t t t c g g c a g c g c t g c c g t c a g c c t g c a g g t g g c c g c t c c c t a c
t c g a a g c c c a g c a t g a c c c t g g a g c c c a a c a a g g a c c t g c g g c c a
g g g g a c a c g g t g a c c a t c a c g t g c t c c a g c t a c c g g g g c t a c c c t
g a g g c t g a g g t g t t c t g g c a g g a t g g g c a g g g t g t g c c c c t g a c t
g g c a a c g t g a c c a c g t c g c a g a t g g c c a a c g a g c a g g g c t t g t t t
g a t g t g c a c a g c g t c c t g c g g g t g g t g c t g g g t g c g a a t g g c a c c
t a c a g c t g c c t g g t g c g c a a c c c c g t g c t g c a g c a g g a t g c g c a c
g g c t c t g t c a c c a t c a c a g g g c a g c c t a t g a c a t t c c c c c a g a g
g c c c t g t g g g t g a c c g t g g g g c t g t c t g t c t g t c t c a t t g c a c t g
c t g g t g g c c c t g g c t t t c g t g t g c t g g a g a a a g a t c a a a c a g a g c
t g t g a g g a g g a g a a t g c a g g a g c t g a g g a c c a g g a t g g g g a g g g a
g a a g g c t c c a a g a c a g c c c t g c a g c c t c t g a a a c a c t c t g a c a g c
a a a g a a g a t g a t g g a c a a g a a a t a g c c t g a g c g g c c g c c a c t g t g
c t g g a t a t c t g c a g a a t t c c a c c a c a c t g g a c t a g t g g a t c c g a g
c t c g g t a c c a a g c t t a a g t t t a a a c c g c t g a t c a g c c t c g a c t g t
t t c c t t g a c c c t g g a a g g t g c c a c t c c c a c t g t c c t t t c c t a a t a
a a a t g a g g a a a t t g c

```

Fig. 17

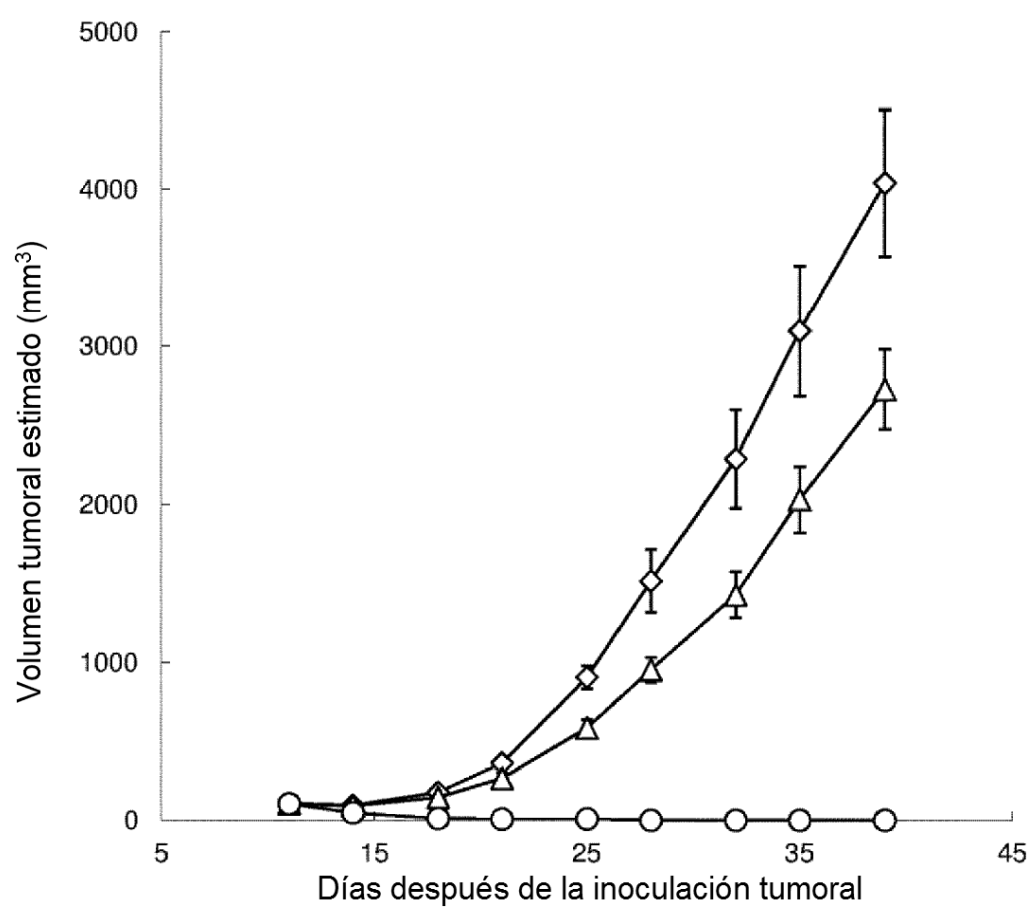


Fig. 18

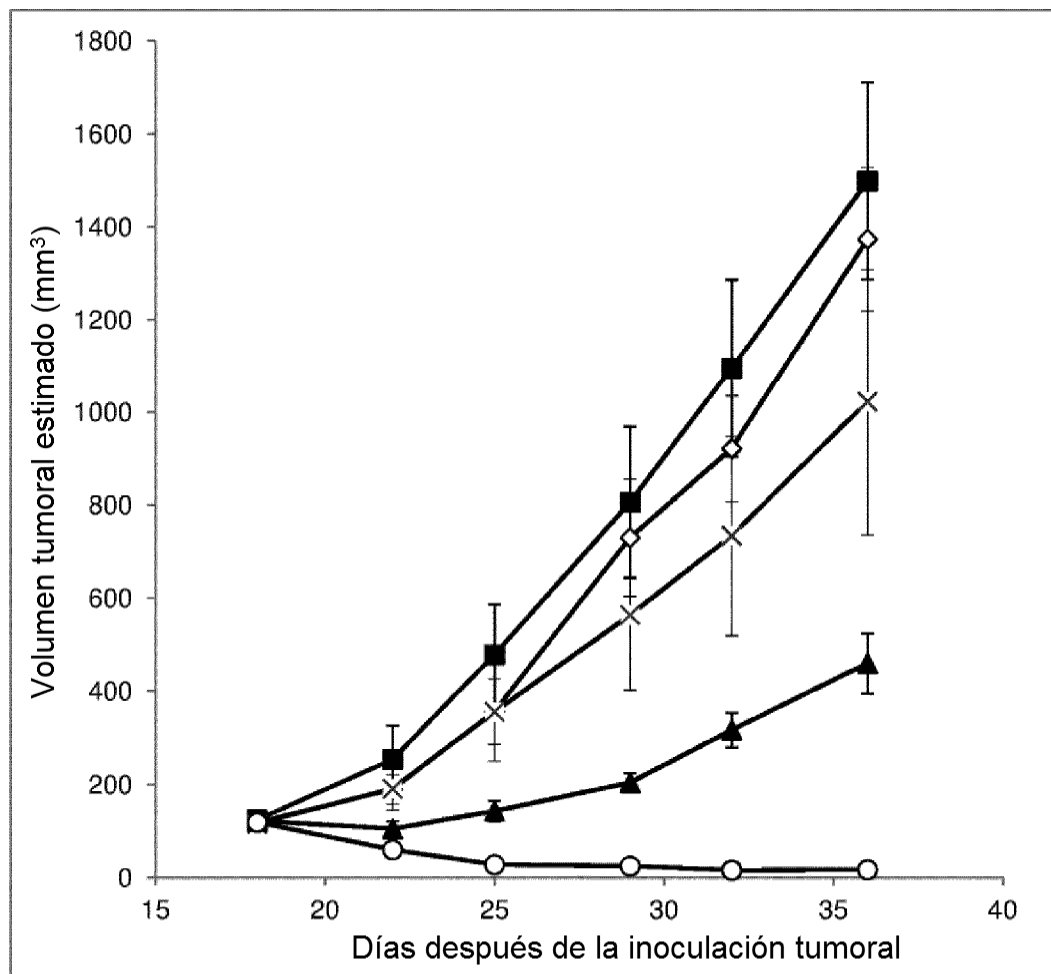


Fig. 19

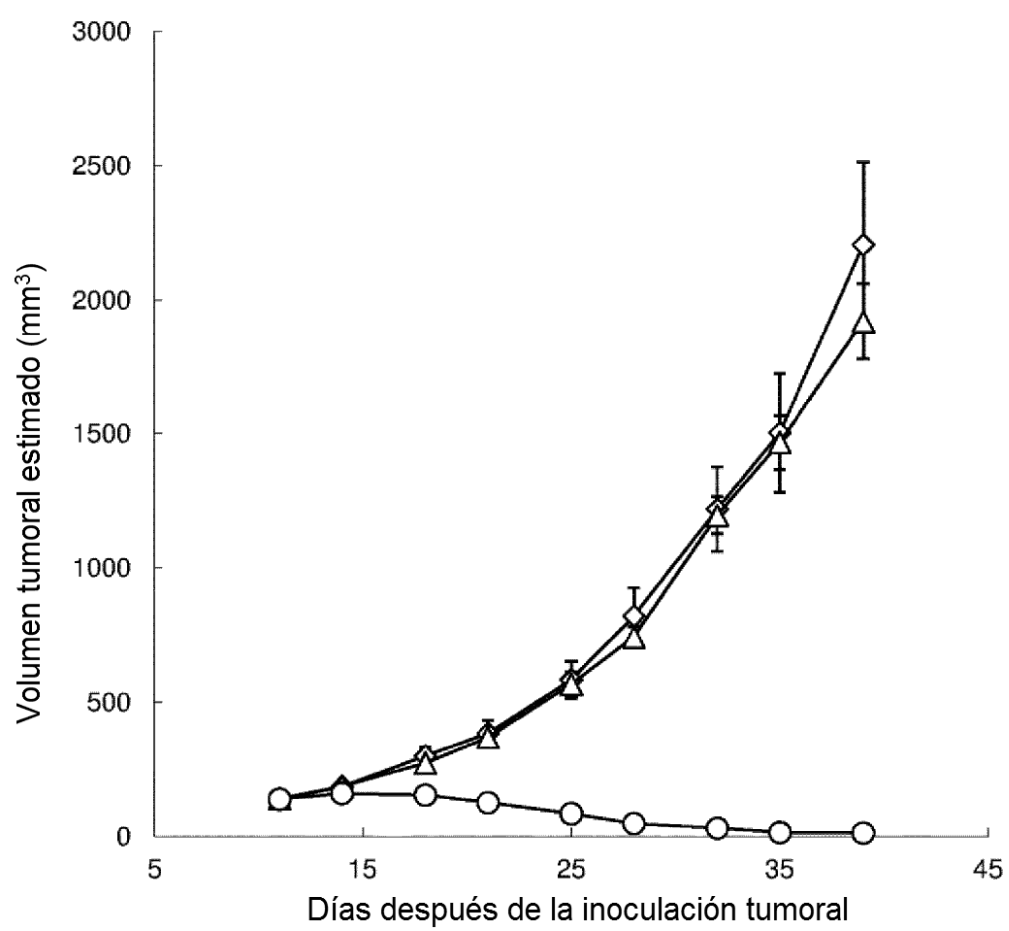


Fig. 20

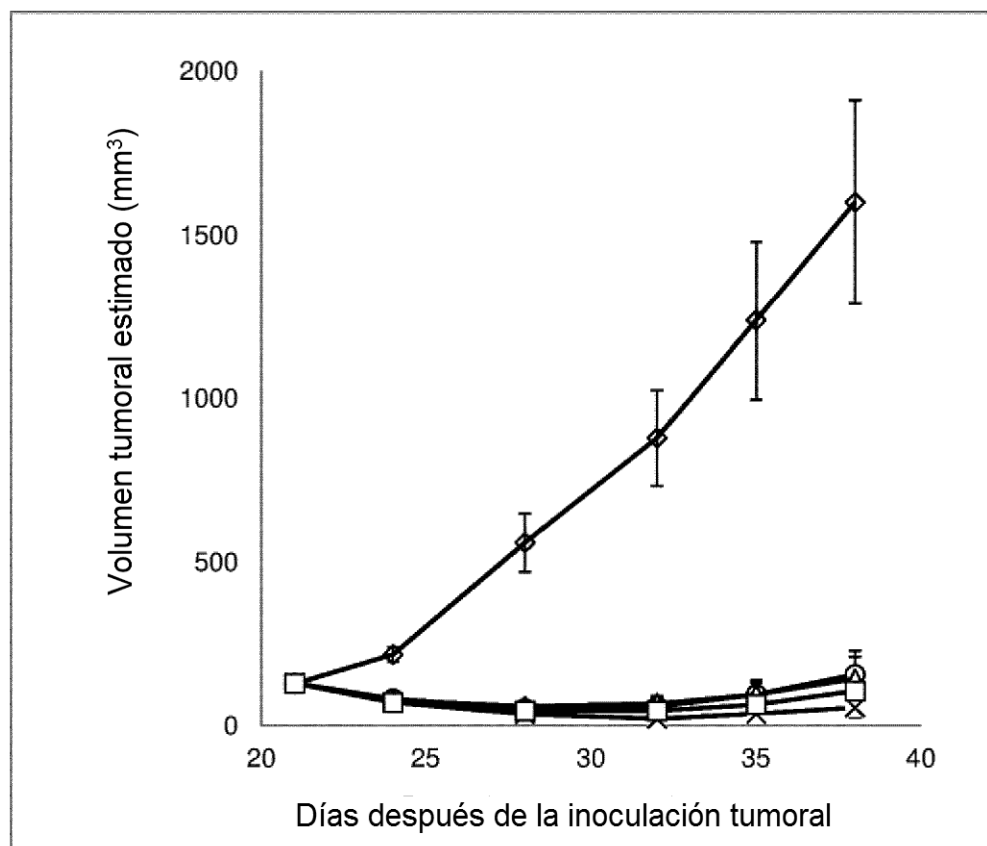


Fig. 21

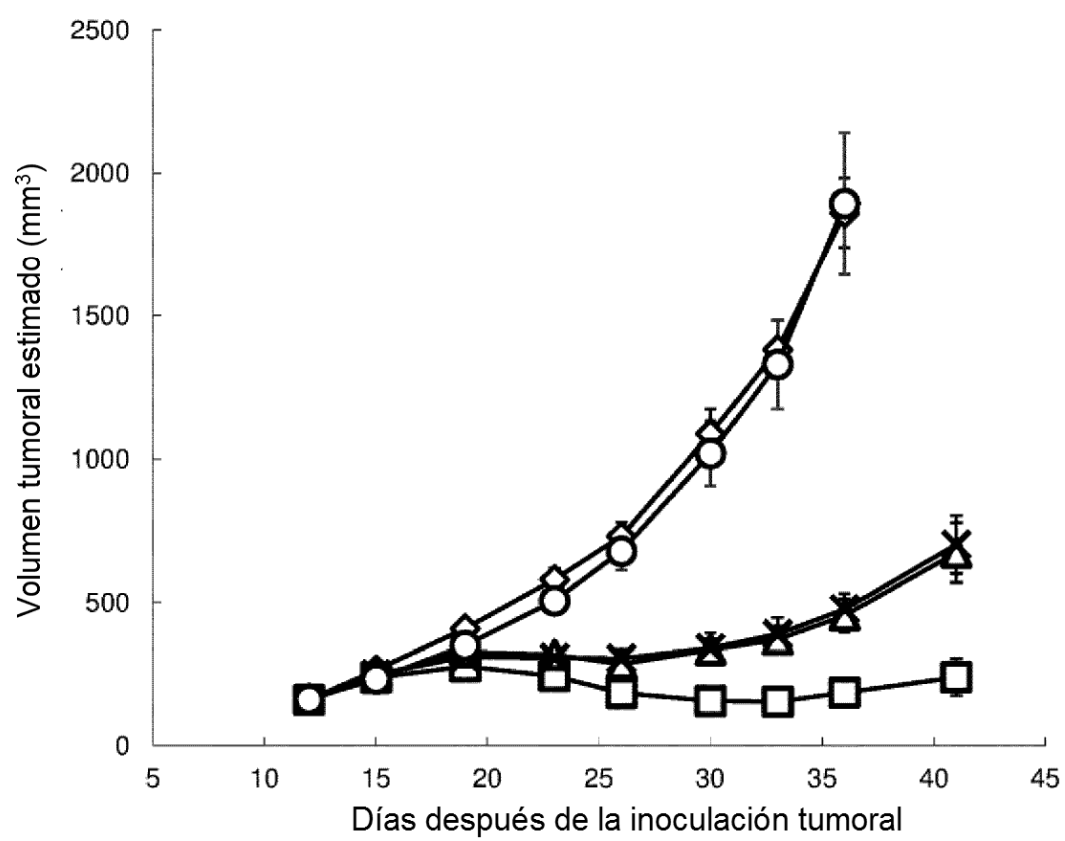


Fig. 22

