

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 351**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 491/052 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2015 PCT/JP2015/000355**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15115091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2015 E 15743738 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 3101032**

54 Título: **Conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2**

30 Prioridad:

31.01.2014 JP 2014017777

22.08.2014 JP 2014168944

10.11.2014 JP 2014227886

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

15.10.2019

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)

3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku

Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es:

NAITO, HIROYUKI;

OGITANI, YUSUKE;

MASUDA, TAKESHI;

NAKADA, TAKASHI;

YOSHIDA, MASAO;

ASHIDA, SHINJI;

MORITA, KOJI;

MIYAZAKI, HIDEKI;

KASUYA, YUJI;

HAYAKAWA, ICHIRO y

ABE, YUKI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 727 351 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 fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2

Campo técnico

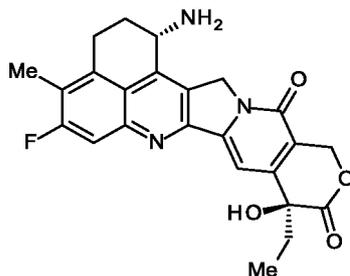
5 La presente invención se refiere a un conjugado de fármaco-anticuerpo que tiene un fármaco antitumoral conjugado con un anticuerpo dirigido contra HER2 mediante un resto de la estructura del enlazador, siendo el conjugado útil como un fármaco antitumoral.

Antecedentes de la técnica

10 Un conjugado de fármaco-anticuerpo (ADC) que tiene un fármaco con citotoxicidad conjugado con un anticuerpo, cuyo antígeno se expresa sobre la superficie de las células cancerosas y que también se une a un antígeno capaz de la internalización celular, y por tanto puede administrar el fármaco selectivamente a células cancerosas, se espera por tanto producir la acumulación del fármaco en las células cancerosas y destruir las células cancerosas (véase, referencias no de patente 1 a 3). Como un ADC, Mylotarg (marca registrada; Gemtuzumab ozogamicina) en el que la caliqueamicina se conjuga con un anticuerpo dirigido contra CD33, está homologado como un agente terapéutico para la leucemia mieloide aguda. Además, Adcetris (marca comercial registrada; Brentuximab vedotina), en el que auristatina E se conjuga con un anticuerpo dirigido contra CD30, se ha homologado recientemente como un agente terapéutico para el linfoma de Hodgkin y la leucemia anaplásica de células grandes (véase, referencia no de patente 15 4). Los fármacos contenidos en los ADC que se han homologado hasta ahora se dirigen al ADN o a la tubulina.

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

[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 (Referencias de patente 1 y 2). A diferencia de irinotecán, actualmente usado en escenarios clínicos, este compuesto no requiere la activación por una enzima para ejercer su efecto antitumoral. Además, se observó que 25 su actividad inhibitoria sobre la topoisomerasa era mayor que SN-38 que es la sustancia farmacéuticamente activa principal de irinotecán y topotecán utilizada también en escenarios clínicos y se confirmó que se obtenía mayor actividad citocida *in vitro* contra diversas células cancerosas. En particular, se confirmó que tenía efecto contra células cancerosas que tienen resistencia a SN-38 o similar debido a la expresión de la glicoproteína P. Además, en un modelo de ratón trasplantado por vía subcutánea de tumor humano, se confirmó que presentaba un potente efecto antitumoral, y por tanto, ha experimentado estudios clínicos, pero no se ha introducido en el mercado todavía (véanse, Referencias 30 no de patente 5 a 10). Sigue estando poco claro si exatecán actúa o no eficazmente como un ADC.

DE-310 es un complejo en el que exatecán está conjugado a un polímero polialcohólico de carboximetildextrano biodegradable mediante un separador peptídico GGFG (Referencia de patente 3). Convirtiendo exatecán en una forma de profármaco polimérico, se puede mantener una propiedad de alta retención en sangre y también una propiedad de 35 alta direccionabilidad a un área tumoral de forma pasiva aumentada utilizando la permeabilidad aumentada de recipientes sanguíneos formados recientemente en tumores y la propiedad de retención en tejidos tumorales. Con DE-310, mediante la escisión del separador peptídico por una enzima, exatecán y exatecán con glicina vinculado un grupo amino se liberan continuamente como una sustancia activa principal a, y como resultado, se mejoran las farmacocinéticas. Se encontró que DE-310 tenía una mayor eficacia que exatecán administrado solo, incluso aunque la cantidad total de exatecán contenida en D310 sea menor en el caso de administración de exatecán solo de acuerdo 40 con los diversos modelos de evaluación de tumores en estudios no clínicos. Se llevó a cabo un estudio clínico para DE-310 y también se confirmaron casos eficaces, incluyendo un informe que sugiere que la sustancia activa principal se acumula en un tumor en vez de estar presente en tejidos normales. Sin embargo, existe un informe indicando 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 tanto no se observa direccionamiento pasivo en seres humanos (véanse, 45 Referencias no de patente 11 a 14). Como resultado, DE-310 no se comercializó también, y sigue estando poco claro

si exatecán actúa eficazmente o no como un fármaco dirigido a dicha diana.

Como un compuesto que se refiere a DE-310, se conoce también un complejo en el que un resto estructural representado por $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$ se inserta entre el separador -GGFG- y exatecán para formar $\text{-GGFG-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$ utilizado como una estructura separadora (Referencia de patente 4). Sin embargo, el efecto antitumoral de dicho complejo no se conoce en absoluto.

HER2 es uno de los productos de un receptor de un factor de crecimiento típico de tipo oncogén identificado como un receptor 2 del factor de crecimiento de células epidérmicas humano que tiene un peso molecular de 185 kDa y que tiene un dominio de la tirosina quinasa (referencia no de patente 15). La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de HER2 están disponibles en una base de datos pública y pueden referirse al, por ejemplo, n.º de registro M11730 (GenBank), NP_004439.2 (NCBI), o similar.

HER2 (neu, ErbB-2) es uno de los miembros de la familia EFGR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) y se activa mediante autofosforilación en los restos de la tirosina intracelular por su formación homodimérica o formación heterodimérica con otro receptor HER1 de EGFR (EGFR, ErbB-1), HER3 (ErbB-3), o HER4 (ErbB-4) (Referencias no de patente 16 a 18), jugando por tanto un importante papel en el crecimiento celular, la diferenciación, y supervivencia en células normales y células cancerosas (referencias no de patente 19 y 20). HER2 se expresa en exceso en diversos tipos de cánceres tales como cáncer de mama, cáncer gástrico, y cáncer de ovario (Referencias no de patente 21 a 26) y se ha notificado que es un factor de pronóstico negativo del cáncer de mama (Referencias no de patente 27 y 28).

Trastuzumab es un anticuerpo humanizado de un anticuerpo 4D5 de ratón dirigido contra HER2 (Referencia no de patente 29 y Referencia de patente 5), denominado como anticuerpo monoclonal humanizado recombinante dirigido contra HER2 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Herceptina (R)) (Referencia de patente 6). Trastuzumab se une específicamente al dominio IV extracelular de HER2 e induce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o ejerce un efecto anticanceroso mediante la inhibición de la transducción de la señal de HER2 (Referencias no de patente 30 y 31). Trastuzumab es muy eficaz para tumores que expresan en exceso HER2 (referencia no de patente 32) y como tales, se lanzó en 1999 en los Estados Unidos y en 2001 en Japón como un agente terapéutico para los pacientes con cáncer de mama metastásico que expresa en exceso HER2.

Aunque el efecto terapéutico de trastuzumab en cáncer de mama se ha demostrado de forma adecuada (Referencia no de patente 33) presuntamente el 15 % de pacientes con cáncer de mama que expresan en exceso HER2 que han recibido una amplia gama de terapias anticancerosas convencionales son los que responden a trastuzumab. Aproximadamente el 85 % de los pacientes de esta población o tienen sencillamente una respuesta débil al tratamiento con trastuzumab.

Por tanto, se ha reconocido la necesidad de un agente terapéutico que se dirija a las enfermedades relacionadas con la expresión de HER2 para pacientes afectados por tumores que expresan en exceso HER2 con o sin respuesta débil a trastuzumab o trastornos relacionados con HER2. T-DM1 (trastuzumab emtansina, Kadcyla (R); Referencia no de patente 34) que tiene un fármaco antitumoral conjugado a trastuzumab mediante una estructura de enlazador, y pertuzumab (Perjeta(R); Referencia no de patente 35 y Referencia de patente 7) diseñado para dirigirse al dominio extracelular II de HER2 e inhibe la formación del heterodímero que se ha desarrollado. Sin embargo, su sensibilidad, resistencia a la actividad, e indicaciones aceptadas son todavía insuficientes, y existen necesidades insatisfechas necesarias para dirigirse a HER2.

La Referencia de patente 8 desvela el tratamiento del cáncer positivo para HER2 con un anticuerpo dirigido contra HER2 tal como trastuzumab y pertuzumab, en combinación con un conjugado de polietilenglicol de 7-etil-10-hidroxycamptotecina.

La referencia no de patente 36 desvela ADC en los que los análogos de camptotecina se unen a anticuerpos monoclonales (BR96, AC10, 1F6) mediante enlazadores basados en glucurónido o basados en el dipéptido Val-Cit.

[Lista de citas]

[Referencias de patente]

[Referencia de patente 1] Patente japonesa abierta a consulta n.º 5-59061

[Referencia de patente 2] Patente japonesa abierta a consulta n.º 8-337584

[Referencia de patente 3] Publicación internacional n.º WO 1997/46260

[Referencia de patente 4] Publicación internacional n.º WO 2000/25825

[Referencia de patente 5] Patente de Estados Unidos n.º 5677171

[Referencia de patente 6] Patente de Estados Unidos n.º 5821337

[Referencia de patente 7] Publicación internacional n.º WO 01/00244

[Referencia de patente 8] Publicación internacional n.º WO2011/011474

[Referencias no de patente]

- [Referencia no de patente 1], L., y col., Bioconjugate Chem. (2010) 21,5-13.
 [Referencia no de patente 2] Alley, S. C., y col., Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.
 [Referencia no de patente 3] Damle N.K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.
 [Referencia no de patente 4] Senter P. D., y col., Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.
 5 [Referencia no de patente 5] Kumazawa, E., Tohgo, A., Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632.
 [Referencia no de patente 6] Mitsui, I., y col., Jpn J. Cancer Res. (1995) 86, 776-782.
 [Referencia no de patente 7] Takiguchi, S., y col., Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 760-769.
 [Referencia no de patente 8] Joto, N. y col. Int J Cancer (1997) 72, 680-686.
 [Referencia no de patente 9] Kumazawa, E. y col., Cancer Chemother. Pharmacol. (1998) 42, 210-220.
 10 [Referencia no de patente 10] De Jager, R., y col., Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260-273.
 [Referencia no de patente 11] Inoue, K. y col., Polymer Drugs in the Clinical Stage, Editado por Maeda y col. (2003) 145 -153.
 [Referencia no de patente 12] Kumazawa, E. y col., Cancer Sci (2004) 95, 168-175.
 [Referencia no de patente 13] Soepenber, O. y col., Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703-711.
 15 [Referencia no de patente 14] Wentz M. N. y col., Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347.
 [Referencia no de patente 15], y col., Science. 1985;230(4730):1132-1139.
 [Referencia no de patente 16] Graus-Porta G, y col., EMBO J. 1997;16:1647-1655.
 [Referencia no de patente 17] Karnagaran D, y col., EMBO J. 1996;15:254-264.
 [Referencia no de patente 18] Sliwkowski MX, y col., J. Biol. Chem. 1994;269:14661-14665.
 20 [Referencia no de patente 19] Di Fore PP, y col., Science. 1987;237:178-182.
 [Referencia no de patente 20] Hudziak RM, y col., Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:7159-7163.
 [Referencia no de patente 21] Hardwick R, y col., Eur. J Surg Oncol. 1997 (23):30-35.
 [Referencia no de patente 22] Korkaya H, y col., Oncogene. 2008;27(47):6120-6130.
 [Referencia no de patente 23] Yano T, y col., Oncol Rep. 2006;15 (1): 65-71.
 25 [Referencia no de patente 24] Slamon DJ, y col., Science. 1987;235:177-182.
 [Referencia no de patente 25] Gravalos C, y col., Ann Oncol 19: 1523-1529, 2008.
 [Referencia no de patente 26] Fukushima S y col., J Cell Biol 6: 955-958, 1986.
 [Referencia no de patente 27] Slamon DJ, y col. Science. 1989;244:707-712.
 [Referencia no de patente 28] Kaptain S y col., Diagn Mol Pathol 10:139-152, 2001.
 30 [Referencia no de patente 29] Fendly. y col., Cancer Research 1990 (50):1550-1558.
 [Referencia no de patente 30] Sliwkowski MX, y col., Semin Oncol. 1999;26(4,Suppl 12):60-70.
 [Referencia no de patente 31] Hudis CA, y col., N Engl J Med. 357: 39-51,2007.
 [Referencia no de patente 32] Vogel CL, y col., J Clin Oncol. 2002;20(3):719-726.
 [Referencia no de patente 33] Baselga y col., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996).
 35 [Referencia no de patente 34] Howard A. y col., J Clin Oncol 2011;29:398-405.
 [Referencia no de patente 35] Adams CW, y col., Cancer Immunol Immunother. 2006;6:717-727.
 [Referencia no de patente 36] Burke PJ, y col., Bioconjugate Chem. (2009) 20(6), 1242-1250.

[Sumario de la invención]

[Problema técnico]

- 40 Con respecto al tratamiento de tumores por anticuerpos, se puede observar un efecto antitumoral insuficiente incluso cuando el anticuerpo reconoce un antígeno que se une a las células tumorales, y existe casos en el que se necesita un anticuerpo antitumoral más eficaz. Además, muchos compuestos antitumorales de peso molecular bajo tienen problemas en la seguridad similares a efectos secundarios y la toxicidad incluso cuando los compuestos tienen un excelente efecto antitumoral. Sigue siendo un objeto conseguir un efecto terapéutico superior potencial además la
 45 seguridad. Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un fármaco antitumoral que tenga un excelente efecto terapéutico, que sea excelente en términos de efecto antitumoral y seguridad.

[Solución al problema]

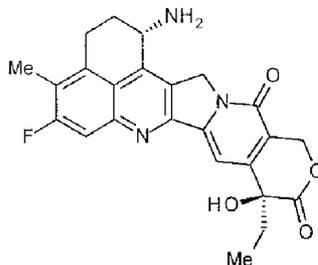
- Los inventores consideran que un anticuerpo dirigido contra HER2 es un anticuerpo que capaz de dirigirse a células tumorales, es decir, es decir, que tiene la propiedad capaz de reconocer células tumorales, una propiedad de unión a
 50 células tumorales, una propiedad de internalizarse en las células tumorales, una actividad citotóxica contra células tumorales, una actividad citocida contra las células tumorales, o similar; por lo tanto, cuando el compuesto antitumoral exatecán se convierte en conjugado de fármaco-anticuerpo, mediante un resto de la estructura del enlazador, mediante conjugación con este anticuerpo, el compuesto antitumoral puede administrarse de forma más segura a las células tumorales para presentar específicamente el efecto antitumoral del compuesto en las células tumorales, y por tanto,
 55 el efecto antitumoral puede presentarse de forma segura, y puede esperarse el efecto citocida del anticuerpo anti-HER2, y la dosis del compuesto antitumoral se puede reducir en comparación con el caso de administración del compuesto solo, y por tanto, se puede evitar una influencia del compuesto antitumoral en las células normales de tal manera que se puede conseguir una mayor seguridad.

- A este respecto, los inventores crearon un enlazador con una estructura específica y tuvieron éxito en obtener un conjugado de fármaco-anticuerpo en el que el anticuerpo dirigido contra HER2 y exatecán se conjugan entre sí
 60 mediante el enlazador, y confirmaron un excelente efecto antitumoral presentado por el conjugado para completar por

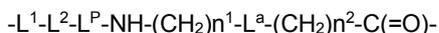
tanto la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente.

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



5 se conjuga con un anticuerpo anti-HER2 a través de un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



mediante un enlace tioéter que se forma en un resto de enlace disulfuro presente en la parte de la bisagra del anticuerpo anti-HER2,

10 en la que

el anticuerpo dirigido contra HER2 se une al extremo de L^1 , el compuesto antitumoral se une al grupo carbonilo del resto $-(CH_2)n^2-C(=O)-$ con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como la posición de unión,

15 en la que

n^1 representa un entero de 0 a 6,

n^2 representa un entero de 0 a 5,

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

en la que n^3 representa un entero de 2 a 8,

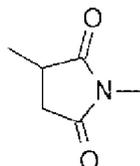
L^2 representa $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ o un enlace simple,

20 en la que n^4 representa un entero de 1 a 6,

L^P representa un resto de tetrapéptido de $-GGFG-$,

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

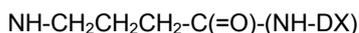
$-(\text{Succinimid-3-il-N})-$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



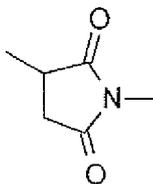
25 que se une al anticuerpo anti-HER2 en la posición 3 del mismo y se une a un grupo metileno en la estructura del enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1.

[2] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con [1], en el que el resto de la estructura enlazador-fármaco que tiene un fármaco unido a $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ es una estructura de enlazador-fármaco seleccionada entre el siguiente grupo:

- 30
- (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)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- 35
- (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)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
 - (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
- 40
- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
 - (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
 - (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-$

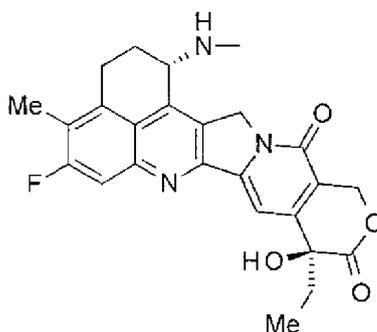


en el que -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



5 que se une al anticuerpo anti-HER2 en la posición 3 del mismo y se une a un grupo metileno en la estructura del enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

- (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 unión y -GGFG- representa el resto del tetrapéptido -Gly-Gly-Phe-Gly-.

10 [3] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con [2], en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco es una estructura de enlazador fármaco seleccionada entre el siguiente grupo:

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

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

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

[4] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con [3], en el que el resto de la estructura de enlazador fármaco es -(Succinimid-3-il- N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

[5] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con [3], en el que resto de la estructura de enlazador-fármaco es -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

20 [6] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con [3], en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco es -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

[7] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], en el que el anticuerpo anti-HER2 comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 449 de la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

[8] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], en el que el anticuerpo anti-HER2 comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

30 [9] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8], en el que el número promedio de unidades de la estructura de enlazador-fármaco seleccionada conjugada por molécula de anticuerpo está en el intervalo de entre 2 a 8.

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

[11] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [10], una sal del mismo, o un hidrato del mismo, para su uso como un medicamento.

[12] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [10], una sal del mismo, o un hidrato del mismo, para su uso como un fármaco antitumoral y/o un fármaco anticanceroso.

40 [13] El fármaco antitumoral y/o el fármaco anticanceroso de acuerdo con [12], para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas,

cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de cuello de útero, cáncer de esófago, carcinoma de escamocelular, cáncer peritoneal, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de útero, cáncer de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, cáncer de pene, leucemia, linfoma maligno, plasmacitoma, mieloma o sarcoma.

[14] Una composición farmacéutica que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [10], una sal del mismo, o un hidrato del mismo como un componente activo, y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.

[15] La composición farmacéutica de acuerdo con [14], para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de cuello de útero, cáncer de esófago, carcinoma de escamocelular, cáncer peritoneal, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de útero, cáncer de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, cáncer de pene, leucemia, linfoma maligno, plasmacitoma, mieloma o sarcoma.

Efectos ventajosos de la invención

Con un conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 que tiene el compuesto antitumoral exatecán conjugado mediante un enlazador con una estructura específica, se puede conseguir un excelente efecto y seguridad antitumorales.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra HER-2 (SEQ ID NO: 1).

La Figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra HER2 (SEQ ID NO: 2).

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

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

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

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

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

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

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

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

La Figura 11 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado de fármaco-anticuerpo (50), trastuzumab o trastuzumab emtansina sobre un ratón alotímico con células CTG-0860 de cáncer de pulmón no microcítico humano trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa gráficamente el número de días tras la inoculación del tumor, y la ordenada representa gráficamente el volumen tumoral.

La Figura 12 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado de fármaco-anticuerpo (50), trastuzumab o trastuzumab emtansina sobre un ratón alotímico con células CTG-0927 de cáncer del conducto biliar humano trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa gráficamente el número de días tras la inoculación del tumor, y la ordenada representa gráficamente el volumen tumoral.

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

5 La Figura 14 es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de un conjugado de fármaco-anticuerpo (50), o trastuzumab o trastuzumab emtansina sobre un ratón alotímico con una línea de células SK-OV-3 de cáncer de ovarios humano trasplantadas por vía subcutánea. En el dibujo, la abscisa representa gráficamente el número de días tras la inoculación del tumor, y la ordenada representa gráficamente el volumen tumoral.

Descripción de las realizaciones

10 A partir de ahora en el presente documento, se describirán los modos preferidos de llevar a cabo la presente invención con referencia a los dibujos. Las realizaciones descritas a continuación se proporcionan únicamente para ilustrar un ejemplo típico de la realización de la presente invención y no se pretende que limiten el ámbito de la presente invención.

El conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención es un fármaco antitumoral en el que un anticuerpo dirigido contra HER2 se conjuga con un compuesto antitumoral mediante un resto de la estructura del enlazador y se explica en detalle a continuación en el presente documento.

15

[Anticuerpo]

El anticuerpo dirigido contra HER2 utilizado en el conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención puede derivarse de cualquier especie, y los ejemplos preferidos de especies pueden incluir seres humanos, ratas, ratones, y conejos. en el caso cuando se derivan de especies diferentes a la humana, resulta de preferencia quimerizarlos o humanizarlos 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.

20

El anticuerpo dirigido contra HER2 es el anticuerpo, que es capaz de dirigirse a células tumorales, es decir, que posee una propiedad capaz de reconocer células tumorales, una propiedad de unirse a células tumorales, una propiedad de internalizarse en una célula tumoral, actividad citocida contra células tumorales, o similar, y puede conjugarse con un fármaco que tiene actividad antitumoral mediante un enlazador para formar un conjugado de fármaco-anticuerpo.

25

La actividad de unión del anticuerpo contra las células tumorales puede confirmarse usando citometría de flujo. La internalización del anticuerpo en células tumorales pueden confirmarse usando (1) un ensayo para visualizar un anticuerpo incorporado en células con un microscopio de fluorescencia utilizando la unión de un anticuerpo secundario (marcado fluorescentemente) al anticuerpo terapéutico (Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761), (2) un ensayo para medir la intensidad de la fluorescencia incorporada a las células utilizando la unión de un anticuerpo secundario (marcado fluorescentemente) al anticuerpo terapéutico (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, diciembre de 2004), o (3) un ensayo Mab-ZAP que utiliza la unión de una inmunotoxina al anticuerpo terapéutico en el que se libera la toxina tras la incorporación en células para inhibir el crecimiento celular (Bio Techniques 28: 162-165, Enero de 2000). Como la inmunotoxina, se puede usar una proteína compleja recombinante de un dominio catalítico de la toxina de la difteria y la proteína G.

30

Se puede confirmar la actividad antitumoral del anticuerpo *in vitro* determinando la actividad inhibidora contra el crecimiento celular. Por ejemplo, se cultiva una línea de células cancerosas que expresan en exceso una proteína diana del anticuerpo, y se añade el anticuerpo a concentraciones variables en el sistema de cultivo para determinar una actividad inhibidora contra la formación del foco, la formación de colonias y el crecimiento de tipo esferoide. se puede confirmar la actividad antitumoral *in vivo*, por ejemplo, administrando el anticuerpo a un ratón alotímico con una línea de células tumorales trasplantada que expresa mucho la proteína diana, y determinar el cambio en la célula cancerosa.

40

Debido a que el compuesto conjugado en el conjugado de fármaco-anticuerpo ejerce un efecto antitumoral, se prefiere, pero no es esencial que el propio anticuerpo deba tener un efecto antitumoral. A fines de ejercer específica y selectivamente la actividad citotóxica del compuesto antitumoral contra las células tumorales, es importante, y se prefiere también que el anticuerpo deba tener la propiedad de internalizarse para migrar en las células tumorales.

45

El anticuerpo dirigido contra HER2 puede obtenerse mediante un procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo de la presente invención se puede obtener usando un procedimiento llevado a cabo usualmente en la técnica, que implica inmunizar animales con un polipéptido antigénico y recoger y purificar los anticuerpos producidos *in vivo*. El origen del antígeno no está limitado a los seres humanos, y se pueden inmunizar los animales con un antígeno derivado de un animal no humano tal como un ratón, una rata y similares. En este caso, la reactividad cruzada de la unión de los anticuerpos al antígeno heterólogo obtenido con antígenos humanos puede ensayarse para cribar un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

50

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

55

El antígeno puede obtenerse mediante células hospedadoras diseñadas mediante ingeniería genética para producir un gen que codifica la proteína antigénica. Específicamente, se preparan vectores que permiten la expresión del antígeno y se transfieren a células hospedadoras de tal manera que se exprese el gen. El antígeno preparado de esta manera se puede purificar. Se puede obtener también el anticuerpo utilizando un procedimiento de inmunizar animales con las células que expresan el antígeno diseñadas mediante ingeniería genética descritas anteriormente o una línea de células que expresa el antígeno.

Los anticuerpos dirigidos contra HER2 que se pueden usar en la presente invención no están particularmente limitados y son preferentemente, por ejemplo, aquellos que tienen propiedades como se describen a continuación.

(1) Un anticuerpo dirigido contra HER2 que tiene las siguientes propiedades:

- (a) unirse específicamente a HER2, y
(b) tener una actividad de internalizarse en células que expresan HER2 mediante la unión a HER2.

(2) El anticuerpo de acuerdo con (1) anterior, en el que el anticuerpo se une al dominio extracelular de HER2.

(3) El anticuerpo de acuerdo con (1) o (2) anterior, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

(4) El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3) anterior, en el que el anticuerpo tiene una actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y/o una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

(5) El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) anterior, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de ratón, un anticuerpo monoclonal quimérico, o un anticuerpo monoclonal humanizado.

(6) El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (5) anterior, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

(7) El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (6) anterior, en el que el anticuerpo carece de un resto de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada.

(8) El anticuerpo de acuerdo con (7) anterior, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 449 de la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácido 1 a 214 en la SEQ ID NO: 2.

(9) Un anticuerpo obtenido mediante un procedimiento para producir el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (8), anterior, 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.

A partir de ahora en el presente documento, se describe el anticuerpo dirigido contra HER2 utilizado en la invención.

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

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

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

Los términos "polipéptido", "proteína" y "proteína" como se usa en el presente documento se usan sin distinción.

El término "célula" como se usa en el presente documento incluyen también células de un individuo animal y células cultivadas.

El término "HER2" como se usa en el presente documento se utiliza con el mismo significado que la proteína HER2.

Los ejemplos del anticuerpo dirigido contra HER2 como se usan en el presente documento pueden incluir, aunque no de forma particularmente limitada, pertuzumab (publicación de patente internacional n.º WO 01/00245) y trastuzumab (patente de Estados Unidos 5821337). Se prefiere trastuzumab. Sin embargo, el anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención no está limitado a lo anterior siempre que se una a un anticuerpo dirigido contra HER2 que se une específicamente a HER2, y que tenga más preferentemente una actividad de internalización en células que expresan HER2 mediante la unión a HER2.

El término "trastuzumab" como se usa en el presente documento se denomina también HERCEPTINA(R), huMAb4D5-8, o rhuMAb4D5-8 y es un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 449 de la SEQ ID NO: 1 (Figura 1) y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 214 de la SEQ ID NO: 2) (Figura 2).

La expresión "que se une específicamente" tal como se usa en el presente documento significa que no tiene una

adsorción no específica. Los ejemplos del criterio para determinar si la unión es específica o no pueden incluir la constante de disociación (denominada a partir de ahora en el presente documento "KD"). El valor KD del anticuerpo para la proteína HER2 es preferentemente 1×10^{-5} M o más pequeño, 5×10^{-6} M o más pequeño, 2×10^{-6} M o más pequeño, o 1×10^{-6} M o más pequeño, más preferentemente 5×10^{-7} M o más pequeño, 2×10^{-7} M o más pequeño, o 1×10^{-7} M o más pequeño, preferentemente además 5×10^{-8} M o más pequeño, 2×10^{-8} M o más pequeño, o 1×10^{-8} M o más pequeño, y lo más preferente 5×10^{-9} M o más pequeño, 2×10^{-9} M o más pequeño, o 1×10^{-9} M o más pequeño. La unión entre la proteína HER2 y el anticuerpo puede medirse utilizando un procedimiento conocido en la técnica, tal como la resonancia de plasmón superficial, ELISA, o RIA.

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

La frase "la hibridación se lleva a cabo en condiciones restrictivas" como se usa en el presente documento se refiere a un proceso en el que se lleva a cabo en condiciones bajo las cuales se puede conseguir la identificación llevando a cabo la hibridación a 68 °C en una solución de hibridación comercialmente disponible, ExpressHyb Hybridization Solution (fabricada por Clontech, Inc.) o llevando a cabo la hibridación a 68 °C en presencia de 0,7 a 1,0 M de NaCl utilizando un filtro que tiene un ADN inmovilizado en el mismo, seguido por llevar a cabo el lavado a 68 °C usando una solución de 0,1 a 2 x SSC (1 x SSC está compuesta por NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM) o en condiciones equivalentes a las anteriores.

1. HER2

HER2 es uno de los productos de oncogenes de un receptor de un factor de crecimiento típico de tipo oncogén identificado como un oncogén relacionado con el receptor 2 del factor de crecimiento de células epidérmicas humano que tiene un peso molecular de 185 kDa y que tiene un dominio de la tirosina quinasa. HER2 es un miembro de la familia EGFR que consiste HER1 (EGFR, ErbB-1), HER2 (neu, ErbB-2), HER3 (ErbB-3), y HER4 (ErbB-4) y se sabe que autofosforila en los restos de tirosina intracelular por su formación homodimérica o heterodimérica con otro receptor HER1 de EGFR, HER3, o HER4 y se activa por sí mismo de esta manera, jugando por tanto un importante papel en el crecimiento celular, la diferenciación, y la supervivencia en células normales y las células tumorales.

Como para la proteína HER2 que se va a usar en la presente invención, la proteína HER2 puede purificarse directamente a partir de células que expresan HER2 de un mamífero humano o un mamífero no humano (tal como una rata o un ratón) y utilizarse, o se puede preparar y usar una fracción de membrana celular de las células anteriormente descritas. Además, se puede obtener HER2 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 HER2 se integra en un vector capaz de expresar ADNc de HER2, la proteína HER2 puede obtenerse sintetizando está en una solución que contiene una enzima, un sustrato y una sustancia energética requerida para la transcripción y la traducción, o expresando HER2 en otra célula hospedadora transformada procarionota o eucariota. Como alternativa, las células que expresan HER2 diseñadas mediante ingeniería genética descritas anteriormente o una línea de células que expresan HER2 se puede usar como la proteína HER2.

La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de HER2 están disponibles en una base de datos pública y pueden referirse al, por ejemplo, n.º de registro M11730 (GenBank), NP_004439.2 (NCBI), o similar.

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 de HER2 y también tienen una actividad biológica equivalente a la de la proteína se incluyen también en HER2.

La proteína HER2 humana está constituida por una secuencia de señalización que consiste en 22 restos de aminoácidos en el extremo N, un dominio extracelular que consiste en 630 restos de aminoácidos, un dominio transmembrana que consiste en 23 restos de aminoácidos y un dominio intracelular que consiste en 580 restos de aminoácidos.

2. Producción de anticuerpo dirigido contra HER2

El anticuerpo contra HERR2 de la presente invención puede obtenerse de acuerdo con, por ejemplo, un procedimiento llevado a cabo usualmente en la técnica, que implica inmunizar animales con HER2 o un polipéptido arbitrario seleccionado entre la secuencia de aminoácidos de HER2 y recoger y purificar los anticuerpos producidos *in vivo*. La especie biológica de HER2 que se va a utilizar como un antígeno no está limitada al ser humano, y se puede inmunizar

un animal con HER2 derivada de un animal diferente de los seres humanos tal como un ratón o una rata o con p185neu de rata. En este caso, examinando la reactividad cruzada entre la unión de un anticuerpo a HER2 heteróloga obtenido y HER2 humana, se puede seleccionar un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

5 Además, se puede obtener un anticuerpo monoclonal a partir de un hibridoma establecido fusionando las células productoras de anticuerpos que producen un anticuerpo contra HER2 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)).

Se puede obtener HER2 que se va a utilizar como un antígeno expresando el gen HER2 en una célula hospedadora utilizando ingeniería genética.

10 Específicamente, se produce un vector capaz de expresar el gen HER2, y el vector resultante se transfecta en una célula hospedadora para expresar el gen, y a continuación, el HER2 expresado se purifica.

15 Como alternativa, las células que expresan HER2 diseñadas mediante ingeniería genética descritas anteriormente o una línea de células que expresan HER2 se puede usar como la proteína HER2. El anticuerpo dirigido contra HER2 puede obtenerse mediante un procedimiento conocido en la técnica. A partir de ahora en el presente documento, se describe específicamente un procedimiento para obtener un anticuerpo contra HER2.

(1) Preparación del antígeno

20 Los ejemplos del antígeno que se va a usar para producir el anticuerpo dirigido contra HER2 incluyen HER2, o un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos parcial que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de HER2, o un derivado obtenido añadiendo una secuencia de aminoácidos dada o un transportador de la misma.

HER2 se puede purificar directamente a partir de tejidos tumorales o células tumorales humanas y utilizarse. Además, se puede obtener HER2 sintetizando esta *in vitro* o produciendo está en una célula hospedadora mediante ingeniería genética.

25 Con respecto a la ingeniería genética, específicamente, después de que el ADNc de HER2 se integra en un vector capaz de expresar ADNc de HER2, se puede obtener HER2 sintetizando este en una solución que contiene una enzima, un sustrato y una sustancia energética requerida para la transcripción y la traducción, o expresando HER2 en otra célula hospedadora transformada procariota o eucariota.

30 Además, se puede obtener también el antígeno como una proteína secretora expresando una proteína de fusión obtenida ligando el dominio extracelular de HER2, que es una proteína de membrana, a la región constante de un anticuerpo en un sistema de vector hospedador adecuado.

Se puede obtener el ADNc de HER2 mediante, por ejemplo, un procedimiento de la PCR así denominado en el que se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa utilizando una biblioteca de ADNc que expresa el ADNc de HER2 como un molde y cebadores que amplifican el ADNc de HER2 (PCR; Saiki, R. K., y col., Science, (1988) 239, págs. 487-489).

35 Como la síntesis *in vitro* del polipéptido, se puede ilustrar, por ejemplo, Rapid Translation System (RTS) fabricado por Roche Diagnostics, Inc., pero no se limita al anterior, pero no se limita a los mismos.

40 Los ejemplos de células hospedadoras procariotas incluyen Escherichia coli y Bacillus subtilis. A fin de transformar las células hospedadoras con un gen diana, las células hospedadoras se transforman mediante un vector plásmido 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 sobre la célula transformada.

45 Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas incluyen células de vertebrados, células de insectos y células de levaduras. como las células de vertebrados, por ejemplo, células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, págs. 175-182, ATCC CRL-1650; ATCC: American Type Culture Collection), fibroblastos NIH3T3 de murino (ATCC n.º CRL-1658), y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, págs. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61); y se utilizan a menudo las similares, sin embargo, las células no se limitan las anteriores.

50 El transformante obtenido de esta manera puede cultivarse de acuerdo con un procedimiento llevado a cabo usualmente en la técnica, y cultivando el transformante, se produce un polipéptido diana intracelular o extracelularmente.

Se puede seleccionar un medio adecuado que se va a utilizar para el cultivo por los expertos en la materia a partir de diversos medios de cultivo utilizados comúnmente dependiendo de las células hospedadoras empleadas. Si se emplea Escherichia coli, por ejemplo, se puede usar un medio LB suplementado con un antibiótico tal como ampicilina o IPMG según sea necesario.

Se puede separar una proteína recombinante producida intracelular o extracelularmente por el transformante a través de dicho cultivo y purificarse mediante cualquiera de los diversos procedimientos de separación conocidos utilizando la propiedad física o química de la proteína.

5 Los ejemplos específicos de los procedimientos incluyen el 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.

10 Además, uniendo una etiqueta de seis restos de histidina a la proteína recombinante que se va a expresar, la proteína puede purificarse eficazmente con una columna de afinidad de níquel. Como alternativa, uniendo la región Fc de IgG a la proteína recombinante que se va a expresar, la proteína puede purificarse eficazmente con una columna de proteína A.

Combinando los procedimientos anteriormente descritos, se puede producir fácilmente una gran cantidad de polipéptido diana con alto rendimiento y pureza elevada.

15 El propio transformante anteriormente descrito se puede usar también como el antígeno. Se puede usar también una línea de células que expresa HER2 como el antígeno. Los ejemplos de dicha línea de células pueden incluir las líneas SK-BR-3, BT-474, KPL-4 y JIMT-1 de cáncer de pulmón humano, una línea NCI-N87 de cáncer gástrico humano y una línea SK-OV-3 de cáncer de ovarios humano. La línea de células de la presente invención no está limitada a estas líneas de células siempre que exprese HER2.

(2) Producción de anticuerpo monoclonal dirigido contra HER2

20 Los ejemplos del anticuerpo que se une específicamente a HER2 incluyen un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a HER2, y un procedimiento para obtener dicho anticuerpo es como se describe a continuación.

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

- (a) purificar un biopolímero que se va a usar como un antígeno, o preparar las células que expresan el antígeno;
- 25 (b) preparar las células productoras de anticuerpos inmunizando un animal mediante la inyección del antígeno, recoger la sangre, evaluar su título de anticuerpos para determinar cuándo se extirpa el bazo;
- (c) Preparación de células de mieloma (en lo sucesivo denominadas "mieloma");
- (d) fusionar las células productoras de anticuerpos con el mieloma;
- (e) cribar un grupo de hibridomas produciendo un anticuerpo deseado;
- 30 (f) dividir los hibridomas en clones de células individuales (clonación);
- (g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar un animal al que se ha implantado el hibridoma para producir una gran cantidad de anticuerpos monoclonales;
- (h) examinar el anticuerpo monoclonal producido de esta manera para la actividad biológica y la especificidad de unión, o evaluar el mismo para las propiedades como un reactivo marcado; y similares.

35 A partir de ahora en el presente documento, el procedimiento de producir un anticuerpo monoclonal se describirá en detalle tras las anteriores etapas, sin embargo, el procedimiento no está limitado a lo anterior, y, por ejemplo, se pueden usar células productoras de anticuerpos diferentes de las células de bazo y mieloma.

(a) Purificación del antígeno

Como antígeno, se puede usar HER2 preparado mediante el procedimiento que se describe anteriormente o un péptido parcial del mismo.

40 Además, una fracción de membrana preparada a partir de células recombinantes que expresan HER2 o las propias células recombinantes que expresan HER2, y también un péptido parcial de la proteína de la invención sintetizado químicamente mediante un procedimiento conocido por los expertos en la materia se puede usar también como el antígeno.

Además, se puede utilizar también una línea de células que expresa HER2 como el antígeno.

45 (b) Preparación de las células productoras de anticuerpos

50 El antígeno obtenido en la etapa (a) se mezcla con un adyuvante tal como adyuvante completo o incompleto de Freund o un agente auxiliar tal como sulfato de aluminio potasio y la mezcla resultante se usó como un inmunógeno para inmunizar un animal experimental. Otro procedimiento implica inmunizar un animal experimental con células que expresan un antígeno tal como un inmunógeno. Como animal experimental, se puede usar sin impedimentos cualquier animal utilizado en un procedimiento de producción de hibridoma conocido. Específicamente, por ejemplo, un ratón, una rata, una cabra, ovejas, ganado bovino, un caballo, o similares. Sin embargo, desde el punto de vista de la facilidad de disponibilidad de las células de mieloma que se van a fusionar con las células productoras de anticuerpos extraídas, se usa preferentemente un ratón o una rata como el animal que se va a inmunizar.

Además, la cepa de ratón o rata que se va a utilizar no está particularmente limitada, y en el caso de un ratón, por ejemplo, se pueden usar varias 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, se pueden usar, por ejemplo las variedades, Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer y similares.

- 5 Estos ratones y ratas se pueden obtener de criadores/distribuidores de animales experimentales, por ejemplo, CLEA Japan, Inc. y Charles River Laboratories Japan, Inc.

Como el animal que se va a inmunizar, Teniendo en cuenta la compatibilidad para la fusión con las células de mieloma descritas a continuación, en el caso de un ratón, la variedad BALB/c, y en el caso de una rata, las variedades Wistar y Low se prefieren particularmente.

- 10 Además, teniendo en cuenta la homología antigénica entre seres humanos y ratones, se prefiere usar un ratón que tenga la función biológica disminuida 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.

- 15 A fin de inmunizar un animal con HER2 o un recombinante del mismo, se puede utilizar, por ejemplo, un procedimiento conocido escrito 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 similar.

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

Es decir, en primer lugar, una fracción de proteína de membrana que sirve como el antígeno o las células producidas para expresar el antígeno se administra(n) intradérmica o intraperitonealmente a un animal. Sin embargo, se prefiere la combinación de ambas rutas de administración para aumentar la eficacia de la inmunización, y cuando se lleva a cabo la administración intradérmica en la primera mitad y se lleva a cabo la administración intraperitoneal en la última mitad o solo en la última dosificación, puede aumentarse particularmente la eficacia de la inmunización.

- 25 El calendario de administración del antígeno varía dependiendo del tipo de animal que se va a inmunizar, las diferencias individuales o similares. Sin embargo, en general, se prefiere un calendario de administración en el que la frecuencia de administración del antígeno sea de 3 a 6 veces y el intervalo de dosificación sea de 2 a 6 semanas, y se prefiere más un calendario de administración en el que la frecuencia de administración del antígeno sea de 3 a 4 veces y el intervalo de dosificación sea de 2 a 4 semanas.

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

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

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

- 40 Los esplenocitos o linfocitos que incluyen las células productoras de anticuerpos se eliminan asépticamente del animal inmunizado después de 1 a 10 días, preferentemente de 2 a 5 días, más preferentemente de 2 a 3 días desde la inmunización de refuerzo. En este momento, se mide el título de anticuerpos, y si un animal que tiene un título de anticuerpos suficientemente aumentado se usa como una fuente de suministro de las células productoras de anticuerpos, el procedimiento posterior se puede llevar a cabo más eficazmente.

- 45 Los ejemplos de procedimientos de medición del título de anticuerpos que se van a usar aquí incluyen un procedimiento RIA y un procedimiento ELISA, pero el procedimiento no se limita a lo anterior. Por ejemplo, si se emplea un procedimiento ELISA, la medición del título de anticuerpos en la invención se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación.

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

Además, como anticuerpo secundario, se añade un anticuerpo marcado con una enzima contra un anticuerpo de ratón

y se deja que se una al anticuerpo de ratón. 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 se calcula el título de anticuerpos basándose en la medición.

5 La separación de las células productoras de anticuerpos de los esplenocitos o linfocitos del animal inmunizado se puede llevar 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; Millstein y col., *Nature* (1977), 266, pág. 550; Walsh, *Nature* (1977), 266, pág. 495). Por ejemplo, en el caso de los esplenocitos, se puede emplear un procedimiento general en el que se separan las células productoras de anticuerpos homogeneizando el bazo para obtener las células mediante filtración con una malla de acero inoxidable y suspendiendo las células en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM).

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

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

15 Más específicamente, 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) derivadas 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 ATCC o similares.

20 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 feto de ternera (en lo sucesivo denominado "FBS")], 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 contiene FCS al 10 % para asegurar no menos de 2×10^7 células en el día de la fusión celular.

(d) Fusión celular

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

35 Como 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 usa estimulación eléctrica, o similar. Entre estos procedimientos, un ejemplo específico del procedimiento químico es tal como se describe a continuación.

40 Es decir, en el caso donde se utiliza polietilenglicol en la solución que contiene un polímero a una 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 2000 a 4000 a una temperatura de entre 30 a 40 °C, preferentemente de 35 a 38 °C durante 1 a 10 minutos, preferentemente 5 a 8 minutos.

(e) Selección de un grupo de hibridomas

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

45 Este procedimiento es eficaz cuando se obtienen hibridomas utilizando las células de mieloma de una cepa deficiente en HGPRT que no puede sobrevivir en presencia de aminopterina. Es decir, cultivando células e hibridomas sin fusionar en un medio HAT, solo los hibridomas resistentes a aminopterina se dejan sobrevivir y proliferar selectivamente.

(f) División en clones de células individuales (clonación)

50 Como procedimientos de clonación para los hibridomas, un procedimiento conocido tal como un procedimiento de metilcelulosa, un procedimiento de agarosa blanda, 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 mediante fusión celular

- se suspenden en un medio de metilcelulosa tal como el Medio D de Selección ClonaCell-HY (fabricado por StemCell Technologies, Inc., n.º 03804) y se cultivan. Después, se recogen las colonias de hibridomas formados, por lo cual se pueden obtener hibridomas monoclonales. Las colonias de hibridomas respectivas recogidas se cultivan, y se selecciona un hibridoma que se ha confirmado que tiene un título de anticuerpos estable en un sobrenadante de cultivo de hibridomas obtenido como una cepa de hibridoma productora de anticuerpos monoclonales contra HER2.
- 5
- (g) Preparación de anticuerpo monoclonal mediante cultivo de hibridoma
- Cultivando el hibridoma seleccionado de esta manera, se puede obtener eficazmente un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, antes del cultivo, se prefiere llevar a cabo el cultivo de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal diana.
- 10 En dicho cribado, se puede emplear un procedimiento conocido.
- La medición del título de anticuerpos en la invención se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, un procedimiento ELISA explicado en el artículo (b) descrito anteriormente.
- El hibridoma obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente se puede almacenar en un estado congelado en nitrógeno líquido o en un congelador a -80 °C o por debajo.
- 15 Tras la finalización de la clonación, se cambia el medio de un medio HT a un medio normal, y se cultiva el hibridoma.
- Se lleva a cabo un cultivo a gran escala mediante cultivo en rotación utilizando un matraz de cultivo grande o mediante un cultivo con agitador. A partir del sobrenadante obtenido mediante el cultivo a gran escala, se puede obtener un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína de la invención mediante purificación utilizando un procedimiento conocido por el experto en la materia tal como filtración en gel.
- 20 Además, el hibridoma se inyecta en la cavidad abdominal de un ratón de la misma variedad que el del hibridoma (por ejemplo, el ratón BALB/c anteriormente descrito) o un ratón Nu/Nu para hacer proliferar el hibridoma, por lo cual se puede obtener el fluido ascítico que contiene una gran cantidad del anticuerpo monoclonal de la invención.
- En el caso cuando se administra el hibridoma en la cavidad abdominal, si se administra un aceite mineral tal como 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (pristano) 3 a 7 días antes del anterior, se puede obtener una gran cantidad de fluido ascítico.
- 25
- Por ejemplo, se inyectó previamente un inmunosupresor en la cavidad abdominal de un ratón de la misma variedad que la del hibridoma para inactivar los linfocitos T. 20 días después, se suspendieron 10^6 a 10^7 células de clones de hibridoma en un medio exento de suero (0,5 ml), y la suspensión se administró en la cavidad abdominal del ratón. En general, cuando el abdomen se expandió y se rellenó con el fluido ascítico, el fluido ascítico se recogió a partir del ratón. Mediante este procedimiento, se puede obtener el anticuerpo monoclonal a una concentración que es aproximadamente 100 veces o mucho más que la solución en el cultivo.
- 30
- El anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento anteriormente descrito se puede purificar mediante un procedimiento descrito en, por ejemplo, Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).
- 35 El anticuerpo monoclonal obtenido de esta manera tiene una alta especificidad antigénica por HER2. Los ejemplos del anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención pueden incluir, aunque no de forma particularmente limitada, un anticuerpo monoclonal de ratón 4D5 (ATCC CRL 10463).
- (h) Ensayo de anticuerpo monoclonal
- El isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal obtenido de esta manera se puede determinar como sigue.
- 40 En primer lugar, los ejemplos del procedimiento de identificación incluyen un procedimiento Ouchterlony, un procedimiento ELISA, y un procedimiento RIA.
- Un procedimiento Ouchterlony es sencillo, pero cuando la concentración del anticuerpo monoclonal es baja, se requiere una operación de condensación.
- 45 Por otra parte, cuando se usa un procedimiento ELISA o un procedimiento RIA, haciendo reaccionar directamente el sobrenadante del cultivo con un antígeno adsorbido en fase sólida y utilizando anticuerpos que corresponden a diversos isotipos y subclases de inmunoglobulinas como anticuerpos secundarios, se pueden identificar el isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal.
- Además, como un procedimiento más sencillo, un kit de identificación comercialmente disponible (por ejemplo, Mouse Typer Kit fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) o similares se puede usar también.
- 50 Además, se puede llevar a cabo la determinación cuantitativa de una proteína mediante el procedimiento de Folin

Lowry y un procedimiento de cálculo basado en la absorbancia a 280 nm (1,4 (DO 280) = 1 mg/ml de Inmunoglobulina).

Además, incluso cuando el anticuerpo monoclonal se obtiene por separado e independientemente llevando a cabo de nuevo las etapas de (a) a (h) en (2), es posible obtener un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo contra HER2 obtenido en la etapa de (g). Como ejemplo de dicho anticuerpo, se puede ilustrar un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo contra HER2. Si un anticuerpo monoclonal producido recientemente se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la cual se une el anticuerpo contra HER2, se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo dirigido contra HER2. Además, confirmando que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo dirigido contra HER2 para la unión a HER2 (es decir, el anticuerpo monoclonal inhibe la unión entre el anticuerpo dirigido contra HER2 y HER2), se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo dirigido contra HER2 incluso si no se ha determinado la secuencia o la estructura específica del epítipo. Cuando se confirma que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo dirigido contra HER2, se espera firmemente que el anticuerpo monoclonal tenga la afinidad de unión a antígeno o una actividad biológica equivalente a la del anticuerpo dirigido contra HER2.

(3) Otros anticuerpos

El anticuerpo de la invención incluye no solo el anticuerpo monoclonal anteriormente descrito contra HER2 sino también un anticuerpo recombinante obtenido mediante modificación artificial a fin de disminuir la antigenicidad heteróloga en seres humanos tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos se pueden producir utilizando un procedimiento conocido.

Como el anticuerpo quimérico, un anticuerpo en el que el anticuerpo variable y las regiones constantes se derivan de diferentes especies, por ejemplo, se puede ilustrar un anticuerpo quimérico en que la región variable de un anticuerpo derivado de ratón o rata se une a una región constante de un anticuerpo derivado de ser humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81,6851-6855, (1984)). Los ejemplos del anticuerpo quimérico de acuerdo con la presente invención pueden incluir, aunque no de forma particularmente limitada, un anticuerpo quimérico 4D5 que comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG1 o IgG2 humana.

Como el anticuerpo humanizado, un anticuerpo obtenido integrando solo una región determinante de la complementariedad (CDR) en un anticuerpo derivado de ser humano (véase Nature (1986) 321, págs. 522-525), y se puede ilustrar un anticuerpo obtenido injertando una parte de los restos de aminoácidos del marco, así como la secuencia CDR de un anticuerpo humano mediante un procedimiento de injerto a la CDR (documento n.º WO 90/07861), y un anticuerpo humanizado que utiliza una estrategia de mutagénesis de conversión génica (patente de Estados Unidos n.º 5821337).

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

Como la sustitución de aminoácidos en esta memoria descriptiva, se prefiere una sustitución de aminoácidos conservativa. La sustitución de aminoácidos conservativa se refiere a una sustitución que se produce en un grupo de aminoácidos relacionados con las cadenas secundarias de aminoácidos. Los grupos de aminoácidos preferidos son de la siguiente forma: 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 sin cargar (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, y tirosina). Los grupos aminoácidos más preferidos son de la siguiente forma: 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 aminoácidos se lleva a cabo preferentemente con un intervalo que no deteriora las propiedades de una sustancia que tiene la secuencia de aminoácidos original.

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

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

- Además, el anticuerpo de la invención incluye un anticuerpo humano que se une a HER2. Un anticuerpo humano dirigido contra HER2 se refiere a un anticuerpo humano que tiene solo una secuencia de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano. El anticuerpo humano dirigido contra HER2 se puede obtener mediante un procedimiento que utiliza un ratón productor de anticuerpos humanos que tiene un fragmento de cromosoma humano que comprende genes de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo humano (veánse 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. USA* (2000) 97, págs. 722-727, etc.).
- Dicho ratón productor de anticuerpos humanos puede crearse específicamente de la siguiente forma. Un animal modificado genéticamente en el que se han interrumpido los loci endógenos génicos de la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina, y a su vez, los loci génicos de la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina humana se han introducido mediante un vector de un cromosoma artificial de levadura (YAC) o similar que se crea produciendo un animal inactivado genéticamente y un animal transgénico y apareando estos animales.
- Además, de acuerdo con una técnica de ADN recombinante, utilizando los ADNc que codifican cada una de dichas una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo humano, y preferentemente un vector que comprende dichos ADNc, las células eucariotas se transforman y se cultiva una célula transformante que produce un anticuerpo monoclonal humano recombinante, por lo cual, el anticuerpo se puede obtener también a partir del sobrenadante del cultivo.
- Aquí, como hospedadores, se pueden usar, por ejemplo, células eucariotas, preferentemente células de mamíferos tales como células CHO, linfocitos o células de mieloma.
- Además, un procedimiento para obtener un anticuerpo humano derivado de la expresión en fagos seleccionado de una biblioteca de anticuerpo 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.) como es también conocido.
- Por ejemplo, se selecciona un procedimiento de expresión en fago en el que una región variable de un anticuerpo humano se expresa sobre la superficie del fago como un anticuerpo monocatenario (scFv), y se puede usar 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, se puede determinar una secuencia de ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humano que se une a un antígeno.
- Si se determina la secuencia de ADN de scFv que se une a un antígeno, se puede obtener un anticuerpo humano preparando un vector de expresión que comprende la secuencia e introduciendo el vector en un hospedador adecuado para expresar este (documentos números WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388; *Annu. Rev. Immunol.* (1994) 12, págs. 433-455, *Nature Biotechnology* (2005) 23 (9), págs. 1105-1116).
- Como ejemplo de otro índice para su uso en la comparación de las propiedades de los anticuerpos, se puede ilustrar la estabilidad de los anticuerpos. La calorimetría de barrido diferencial (DSC) es un dispositivo capaz de medir rápidamente y con precisión una temperatura intermedia de desnaturalización térmica (T_m) que se va a usar como un índice favorable de estabilidad conformacional relativa de las proteínas. Midiendo los valores de la T_m utilizando DSC y comparando los valores, se puede comparar una diferencia en la estabilidad térmica. Se sabe que la estabilidad en almacenamiento de los anticuerpos muestra alguna correlación con la estabilidad térmica de los anticuerpos (Lori Burton, y col., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, págs. 265-273), y se puede seleccionar un anticuerpo preferido utilizando la estabilidad térmica como un índice. Los ejemplos de otros índices para seleccionar anticuerpos incluyen las siguientes características: el rendimiento en una célula hospedadora adecuada 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 elevada, y por tanto, es necesario seleccionar un anticuerpo más adecuado para la administración a seres humanos realizando una evaluación comprehensiva basándose en los índices anteriormente descritos.
- En la presente invención, se incluye también una variante modificada del anticuerpo. La variante modificada se refiere a una variante obtenida sometiendo el anticuerpo de la presente invención a modificación química o biológica. Los ejemplos de la variante modificada químicamente incluyen variantes modificadas químicamente uniendo un resto químico a un esqueleto de aminoácido, las variantes modificadas químicamente con una cadena de hidrato de carbono unida a N o unida a O, etc. Los ejemplos de variantes modificadas biológicamente incluyen variantes obtenidas mediante modificación posterior a la traducción (tales como glicosilación unida a N o glicosilación unida a O, procesamiento del extremo N o el extremo C, desamidación, isomerización de ácido aspártico, u oxidación de metionina), y variantes en las que se ha añadido un resto de metionina al extremo N que se expresa en una célula hospedadora procarionta. Además, un anticuerpo marcado de forma que permita la detección o el aislamiento del anticuerpo o un antígeno de la invención, por ejemplo, se incluyen también en el significado de la variante modificada, un anticuerpo marcado con una enzima, un anticuerpo marcado con fluorescencia, y un anticuerpo marcado por

afinidad. Dicha variante modificada del anticuerpo de la invención es útil para mejorar la estabilidad y la retención en sangre del anticuerpo, reduciendo su antigenicidad, detectando o aislando un anticuerpo o un antígeno, y así sucesivamente.

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

10 En el caso donde se produce un anticuerpo aislando en primer lugar un gen de anticuerpo e introduciendo a continuación el gen en un hospedador adecuado, se puede usar una combinación de un hospedador adecuado y un vector de expresión adecuado. Los ejemplos específicos del gen del anticuerpo incluyen una combinación de un gen que codifica una secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en esta memoria descriptiva y un gen que codifica una secuencia de la cadena ligera del mismo. Cuando se transforma una célula hospedadora, es posible insertar el gen de la secuencia de la cadena pesada y el gen de la secuencia de la cadena ligera en el mismo vector de expresión, y también en diferentes vectores de expresión por separado.

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

En el caso donde se usan células procariotas, se pueden ilustrar, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

25 Introduciendo un gen de anticuerpo deseado en estas células mediante transformación, y cultivando las células transformadas de esta manera *in vitro*, se puede obtener el anticuerpo. En el procedimiento de cultivo anteriormente descrito, el rendimiento puede variar algunas veces dependiendo de la secuencia del anticuerpo, y por tanto, es posible seleccionar un anticuerpo que se produce fácilmente como un compuesto farmacéutico utilizando el rendimiento como un índice entre los anticuerpos que tienen una actividad de unión equivalente. Por lo tanto, en el anticuerpo de la presente invención, se incluye también un anticuerpo obtenido mediante un procedimiento para producir 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.

30 Se sabe que se elimina un resto de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en la célula de mamífero cultivada (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), y se sabe también que se eliminan dos restos de aminoácidos (glicina y lisina) en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada y se amida un resto de prolina localizado recientemente en el extremo carboxilo (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, dicha deleción y modificación de la secuencia de la cadena pesada no afecta la afinidad de unión al antígeno y la función efectora (la activación de un complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, etc.) del anticuerpo. Por lo tanto, en el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, se incluyen también un anticuerpo sometido a dicha modificación y un fragmento funcional del anticuerpo, y una variante de deleción en la que uno o dos aminoácidos se han eliminado en el extremo carboxilo de la cadena pesada, están abarcadas también una variante obtenida mediante amidación de la variante de deleción (por ejemplo, una cadena pesada en la que se ha amidado el resto de prolina en el extremo carboxilo), y similares. El tipo de variante de deleción que tiene una deleción en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la invención no está limitado a las variantes anteriores siempre que la afinidad de unión a antígeno y la función efectora se conserven. 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 deleción anteriormente descrita, o pueden ser de dos tipos combinados seleccionados de los anteriores. La relación de la cantidad de cada variante de deleción puede ser alterada por el tipo de células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la invención y las condiciones de cultivo, sin embargo, puede ilustrarse un caso donde se ha eliminado un resto de aminoácido en el extremo carboxilo en ambas dos cadenas pesadas contenidas como componentes principales en el anticuerpo de acuerdo con la invención.

50 Como isotipo del anticuerpo de la invención, por ejemplo, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), e IgG1 o IgG2 pueden ilustrarse preferentemente.

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

internalización celular.

El anticuerpo obtenido puede purificarse hasta homogeneidad. La separación y la purificación del anticuerpo puede llevarse a cabo empleando un procedimiento de separación y purificación de proteínas adicional. Por ejemplo, el anticuerpo se puede separar y purificar seleccionando y combinando adecuadamente la cromatografía en columna, filtración mediante filtro, ultrafiltración, precipitación con sal, diálisis, electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, electroforesis mediante electrofocalización isoelectrica, 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 se limita a lo anterior.

- 5
10 Los ejemplos de dicha cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase inversa y cromatografía de adsorción.

Dicha cromatografía puede llevarse a cabo empleando cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC.

- 15 Como una columna que se va a usar en la cromatografía de afinidad, se puede ilustrar una columna de Proteína A y una columna de Proteína G. Por ejemplo, como una columna que utiliza una columna de Proteína A, se puede ilustrar Hyper D, POROS, Sefarosa FF (Pharmacia Corporation) y similares.

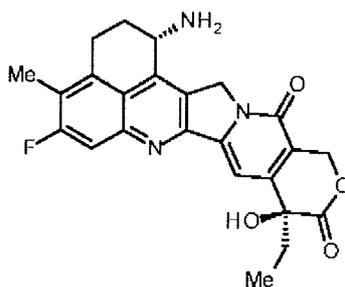
Además, utilizando un transportador que tiene un antígeno inmovilizado en el anterior, el anticuerpo se puede purificar también utilizando la propiedad de unión del anticuerpo al antígeno.

[Compuesto antitumoral]

- 20 Se explica el compuesto antitumoral que se va a conjugar con el conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención. El compuesto antitumoral utilizado en la presente invención no está particularmente limitado si es un compuesto que tiene un efecto antitumoral y un grupo sustituyente o una estructura parcial que permite la conexión a una estructura del enlazador. Cuando una parte o el enlazador completo se escinde en células tumorales, el resto de compuesto antitumoral se libera para presentar el efecto antitumoral del compuesto antitumoral.
- 25 A medida que el enlazador se escinde en una posición de unión al fármaco, el compuesto antitumoral se libera en una estructura sin modificar para presentar su efecto antitumoral intrínseco.

Como el compuesto antitumoral usado en la presente invención, exatecán (((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; que se muestra en la siguiente fórmula), uno de los derivados de camptotecina, se puede usar preferentemente.

[Fórmula 14]



- 30 Aunque teniendo un excelente efecto antitumoral, 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 utilizarse preferentemente como una posición de unión a la estructura del enlazador. Además, aunque exatecán puede también liberarse en células tumorales aunque parte del enlazador está unido todavía al anterior, es un excelente compuesto que presenta un excelente efecto antitumoral incluso en dicha estructura.
- 35 Debido a que exatecán tiene la 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 más o menos) pero se desplaza a una estructura con un anillo de lactona abierto (anillo abierto) en un medio básico acuoso (por ejemplo, pH 10 más o menos). Un conjugado de fármaco que se introduce con un resto de exatecán que corresponde a la estructura de anillo cerrado y la estructura de anillo abierto se espera también que tenga el mismo efecto antitumoral y es necesario decir que cualquiera de estos estados esté comprendido en el ámbito de la presente invención.
- 40

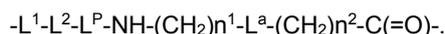
Otros ejemplos del compuesto antitumoral pueden incluir doxorubicina, daunorrubicina, mitomicina C, bleomicina, ciclocitidina, vincristina, vinblastina, metotrexato, agente antitumoral basado en platino (cisplatino o sus derivados), taxol o sus derivados, y camptotecina o sus derivados (agente antitumoral descrito en la patente japonesa abierta a consulta n.º 6-87746).

Con respecto al conjugado de fármaco-anticuerpo, el número de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo es un factor clave que tiene una influencia sobre la eficacia y la seguridad. Se llevó a cabo la producción del conjugado de fármaco-anticuerpo definiendo las condiciones de reacción que incluyen las cantidades de materias primas y reactivos utilizadas para la reacción con el fin de tener un número constante de moléculas de fármacos conjugadas. Se obtiene generalmente una mezcla conteniendo cantidades diferentes de moléculas de fármacos conjugadas obtenidas de forma diferente a la reacción química de un compuesto de bajo peso molecular. La cantidad 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. Salvo que se describa específicamente lo contrario como un principio, el número de moléculas de fármaco conjugadas significa un valor promedio excepto en el caso en el que representa un conjugado de fármaco-anticuerpo que tiene un número específico de moléculas de fármaco conjugadas que está incluido en una mezcla de un conjugado de fármaco-anticuerpo que tiene diferente número de moléculas de fármaco conjugadas.

El número de moléculas de exatecán conjugadas a una molécula de anticuerpo es controlable, y como el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por anticuerpo, se pueden unir aproximadamente 1 a 10 exatecanos. Preferentemente, es 2 a 8 y más preferentemente 3 a 8. Mientras tanto, una persona experta 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 conjugado de fármaco-anticuerpo con un número controlado de moléculas de exatecán.

[Estructura del enlazador]

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



El anticuerpo se une al extremo de L^1 (extremo opuesto a la unión con L^2), y el compuesto antitumoral se une al grupo carbonilo del resto $-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$.

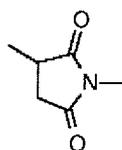
n^1 representa un entero de 0 a 6 y es preferentemente un entero de 1 a 5, y más preferentemente 1 a 3.

1. L^1

L^1 se representa por la siguiente estructura: $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)n^3-C(O)-$.

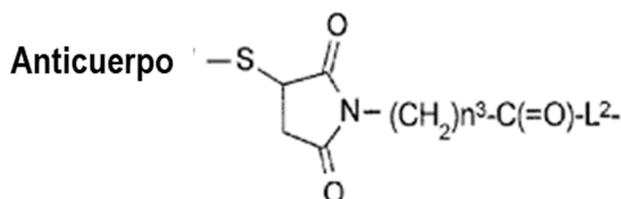
En lo anterior, n^3 es un entero de 2 a 8, $-(\text{Succinimid-3-il-N})-$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 15]



La posición 3 de la estructura parcial anterior es una posición de unión al anticuerpo dirigido contra HER2. La unión con el anticuerpo en la posición 3 se caracteriza por la unión con la formación tioéter. El átomo de nitrógeno en la posición 1 del resto de la estructura se une al átomo de carbono del metileno que está presente en el enlazador incluyendo la estructura. Específicamente, $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)n^3-C(=O)-L^2-$ es una estructura representada por la siguiente fórmula (en el presente documento, "anticuerpo-S-" se origina a partir de un anticuerpo).

[Fórmula 16]

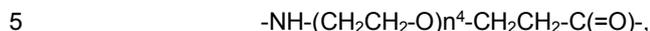


En la fórmula, n^3 es un entero de 2 a 8, y preferentemente 2 a 5.

Los ejemplos específicos de L^1 pueden incluir $-(\text{Succinimid-3-il-N})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $-(\text{Succinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $-(\text{Succinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, y $-(\text{Succinimid-3-il-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$.

2. L^2

L^2 se representa por la siguiente estructura:



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

Los ejemplos específicos de L^2 pueden incluir $-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$.

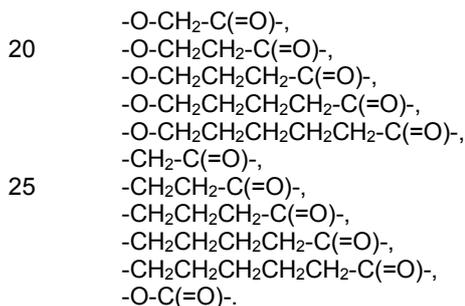
3. L^P

L^P es el resto tetrapéptido $-\text{GGFG-}$ (en el que G = glicina (Gly); F = fenilalanina (Phe)). L^P se une a L^2 en su extremo N y se une al grupo amino del resto $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2)^{n^2}\text{-C(=O)-}$ del enlazador en su extremo.

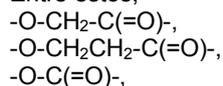
15 4. $L^a\text{-(CH}_2)^{n^2}\text{-C(=O)-}$

L^a in $L^a\text{-(CH}_2)^{n^2}\text{-C(=O)-}$ es una estructura de $-\text{O-}$ o un enlace simple. n^2 es un entero de 0 a 5, preferentemente 0 a 3, y más preferentemente 0 o 1.

Los ejemplos de $L^a\text{-(CH}_2)^{n^2}\text{-C(=O)-}$ pueden incluir las siguientes estructuras:

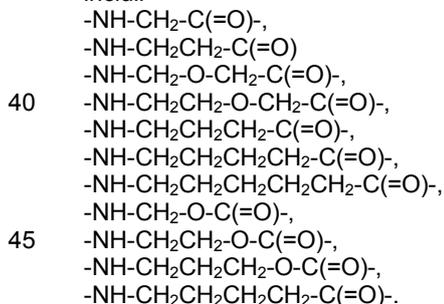


30 Entre estos,

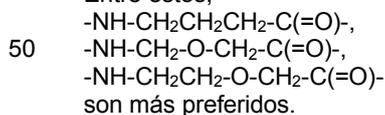


o se prefiere un caso en el que L^a es un enlace simple, y n^2 es 0.

35 Los ejemplos específicos de la estructura representada por $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2)^{n^2}\text{-C(=O)-}$ del enlazador pueden incluir



Entre estos,



En el enlazador, La longitud de la cadena de $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2)^{n^2}\text{-C(=O)-}$ es preferentemente una longitud de cadena de 4 a 7 átomos, y más preferentemente una longitud de cadena de 5 o 6 átomos.

5 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{-(Succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{-(Succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{-(Succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{-(Succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$.

Los particularmente preferidos incluyen los siguientes. $\text{-(Succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{-(Succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{-(Succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$.

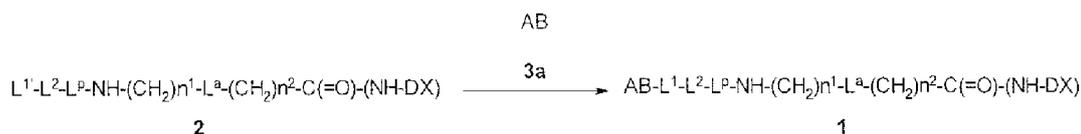
[Procedimiento de producción]

10 A continuación, se proporcionan explicaciones del procedimiento representativo para producir el conjugado de fármaco-anticuerpo de la presente invención o una producción intermedia del mismo. Mientras tanto, Los compuestos se describen a partir de ahora en el presente documento con el número de compuesto que se muestra en cada fórmula de reacción. Específicamente, se denominan "compuesto de fórmula (1)", un "compuesto (1)", o similares. Los compuestos con números diferentes de aquellos se describen también de forma similar.

15 1. procedimiento de producción 1

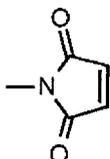
El conjugado de fármaco-anticuerpo representado por la fórmula (1) en la que al anticuerpo se une a la estructura de enlazador-fármaco mediante un tioéter se puede producir mediante el siguiente procedimiento, por ejemplo.

[Fórmula 17]



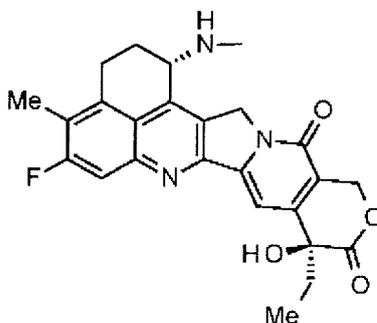
20 [En la fórmula, AB representa un anticuerpo que tiene un grupo sulfhidrilo, y L¹ representa la estructura del enlazador L¹ en la que el extremo del enlazador es un grupo maleimidilo (fórmula que se muestra a continuación)

[Fórmula 18]



(en la fórmula, el átomo de nitrógeno está en la posición de unión) y representa específicamente un grupo en el que el resto $\text{-(Succinimid-3-il-N)-}$ en $\text{-(Succinimid-3-il-N)-(CH}_2\text{)}_{n^3}\text{-C(=O)-}$ de L¹ es un grupo maleimidilo. Además, el -(NH-DX) representa una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 19]



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

Además, el compuesto de fórmula (1) en la anterior fórmula de reacción puede interpretarse como una estructura en la que un resto de estructura que corresponde al fármaco del extremo del enlazador se une a un anticuerpo. Sin embargo, solo se proporciona la descripción dada por razones de conveniencia, y existen realmente muchos casos

en los que una pluralidad de restos de estructura están unidos a una molécula de anticuerpo. Lo mismo se aplica a la explicación del procedimiento de producción descrito a continuación.

Se puede producir el conjugado de fármaco-anticuerpo (1) haciendo reaccionar el compuesto (2), que es obtenible mediante el procedimiento descrito a continuación, con el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo.

- 5 Se puede obtener el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo 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: se hace reaccionar el reactivo de Traut con el grupo amino del anticuerpo; se hacen reaccionar los N-succinimidil S-acetiltoalcanoatos con el grupo amino del anticuerpo seguido por reacción con hidroxilamina; tras reaccionar con 3-(piridilditio)propionato, el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor; el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor tal como ditioneitol, 2-mercaptoetanol, y clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para reducir el enlace disulfuro en la parte bisagra en el anticuerpo para formar un grupo sulfhidrilo, pero no se limita a los mismos.

- 15 Específicamente, utilizando 0,3 a 3 equivalentes molares de TCEP como un agente reductor por disulfuro en la parte bisagra en el anticuerpo y hacerlo reaccionar con el anticuerpo en una solución tampón que contiene un agente quelante, se puede obtener el anticuerpo con el disulfuro parcial o completamente reducido en la parte bisagra del anticuerpo. Los ejemplos del agente quelante incluyen ácido etilendiamina tetraacético (EDTA) y ácido dietilentriamina pentaacético (DTPA). Este se puede usar a una concentración de 1 mM a 20 mM. Los ejemplos de solución tampón que se pueden usar incluyen una solución de fosfato de sodio, borato de sodio, o acetato de sodio. Específicamente, haciendo reaccionar el anticuerpo con TCEP de 4 °C a 37 °C durante 1 a 4 horas, se puede obtener el anticuerpo (3a) que tiene parcial o completamente reducido el grupo sulfhidrilo.

Mientras tanto, llevando a cabo la reacción añadiendo un grupo sulfhidrilo a un resto de enlazador-fármaco, el resto de enlazador-fármaco se puede conjugar mediante un enlace tioéter.

- 25 Usando 2 a 20 equivalentes molares del compuesto (2) por anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo, se puede producir el conjugado de fármaco-anticuerpo (1) en el que se conjugan 2 a 8 moléculas de fármaco por molécula de anticuerpo. Específicamente, es suficiente que la solución que contiene el compuesto (2) disuelto en la anterior se añada a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo para la reacción. En el presente documento, los ejemplos de la solución tampón que se pueden usar incluyen solución de acetato de sodio, fosfato de sodio, y borato de sodio. El pH de la reacción es de 5 a 9, y más preferentemente, la reacción se lleva a cabo próxima a pH 7. Los ejemplos del disolvente para disolver el compuesto (2) incluyen un disolvente orgánico tal como dimetil sulfoxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetil acetamida (DMA), y N-metil-2-piridona (NMP).

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

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

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

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

Procedimiento general B: Medición de la concentración de anticuerpo

- 50 Utilizando un detector UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), se llevó a cabo la medición de la concentración del anticuerpo de acuerdo con el procedimiento definido por el fabricante. En ese momento, se usó un coeficiente de absorción a 280 nm diferente para cada anticuerpo (1,3 mlmg⁻¹ cm⁻¹ a 1,8 mlmg⁻¹ cm⁻¹).

Procedimiento general C-1: Intercambio de tampón para el anticuerpo

- 55 columna NAP-25 (n.º de Catálogo 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) utilizando Sephadex G-25 se equilibró el transportador con tampón fosfato (10 mM, pH 6.0; se denomina PBS6.0/EDTA en la memoria descriptiva) conteniendo cloruro de sodio (137 mM) y ácido etilendiamina tetraacético (EDTA, 5 mM) de acuerdo con el procedimiento definido por el fabricante. Se aplicó una solución acuosa del anticuerpo en una cantidad de 2,5 ml a

una única columna NAP-25, y a continuación se recogió la fracción (3,5 ml) eluida con 3,5 ml de PBS6.0/EDTA. La fracción resultante se concentró mediante el Procedimiento general A. Tras medir la concentración del anticuerpo utilizando el Procedimiento general B, se ajustó la concentración de anticuerpo a 10 mg/ml utilizando PBS6.0/EDTA.

Procedimiento general C-2: Intercambio de tampón para el anticuerpo

- 5 Columna NAP-25 (n.º de Catálogo 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) utilizando Sephadex G-25 se equilibró el transportador con tampón fosfato (50 mM, pH 6.5; se denomina PBS6.5/EDTA en la memoria descriptiva) conteniendo cloruro de sodio (50 mM) y EDTA (2 mM) de acuerdo con el procedimiento definido por el fabricante. Se aplicó una solución acuosa del anticuerpo en una cantidad de 2,5 ml a una única columna NAP-25, y a continuación se recogió la fracción (3,5 ml) eluida con 3,5 ml de PBS6.5/EDTA. La fracción resultante se concentró mediante el
10 Procedimiento general A. Tras medir la concentración del anticuerpo utilizando el Procedimiento general B, se ajustó la concentración de anticuerpo a 20 mg/ml utilizando PBS6.5/EDTA.

Procedimiento general D: Purificación de conjugado de fármaco-anticuerpo

- 15 Se equilibró la columna NAP-25 con cualquier tampón seleccionado entre tampón fosfato comercialmente disponible (PBS7.4, n.º de cat. 10010-023, Invitrogen), tampón fosfato de sodio (10 mM, pH 6,0; se denomina PBS6.0) que contiene cloruro de sodio (137 mM), y tampón acetato que contiene sorbitol (5 %) (10 mM, pH 5,5; se denomina ABS en la memoria descriptiva). Se aplicó una solución acuosa de la reacción del conjugado de fármaco-anticuerpo en una cantidad de aproximadamente 1,5 ml a la columna NAP-25, y a continuación se eluyó en una cantidad definida por el fabricante para recoger la fracción de anticuerpo. Se aplicó de nuevo la fracción recogida a la columna NAP-25 y, repitiendo 2 a 3 veces en total el proceso de purificación mediante filtración en gel para eludir con tampón, se obtuvo
20 el conjugado de fármaco-anticuerpo excluyendo el enlazador del fármaco no conjugado y un compuesto de bajo peso molecular de clorhidrato de (tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), N-acetil-L-cisteína (NAC), y dimetil sulfóxido).

Procedimiento general E: Medición de la concentración de anticuerpo en el conjugado de fármaco-anticuerpo y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo (1).

- 25 Se puede calcular la concentración de fármaco conjugada en el conjugado de fármaco-anticuerpo midiendo la absorbancia UV de una solución acuosa del conjugado de fármaco-anticuerpo a las dos longitudes de onda de 280 nm y 370 nm, seguido por llevar a cabo el cálculo que se muestra a continuación.

- 30 Debido a que la absorbancia total a cualquier longitud de onda es igual a la suma de la absorbancia de cada especie química absorbente de luz que está presente en el sistema (aditividad de la absorbancia), cuando los coeficientes de absorción molar del anticuerpo y el fármaco siguen siendo los mismos 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 fármaco-anticuerpo se expresan con las siguientes ecuaciones.

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

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

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

- 40 Como para $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,370}$, $\epsilon_{D,280}$, y $\epsilon_{D,370}$ en el anterior, se utilizaron los valores anteriormente preparados (valor estimado basado en el cálculo o la medición del valor obtenido mediante mediciones UV de los compuestos. Por ejemplo, se puede estimar $\epsilon_{A,280}$ a partir de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo utilizando un procedimiento de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). $\epsilon_{A,370}$ es generalmente cero. En los Ejemplos, como para el coeficiente de absorción molar de trastuzumab, se utilizaron $\epsilon_{A,280} = 215400$ (valor estimado basado en el cálculo) y $\epsilon_{A,370} = 0$. $\epsilon_{D,280}$ y $\epsilon_{D,370}$ pueden obtenerse basándose en la ley de Lambert-Beer (Absorbancia = concentración molar x coeficiente de absorción molar x longitud de la trayectoria celular) midiendo la absorbancia de una solución en la que el precursor conjugado que se va a usar se disuelve a una determinada concentración molar. Como para el coeficiente de absorción molar de un enlazador de fármaco en los Ejemplos, se utilizaron $\epsilon_{D,280} = 5000$ (valor promedio medido) y $\epsilon_{D,370} = 19000$ (valor promedio medido), a menos que se especifique lo contrario. Midiendo A_{280} y A_{370} de una solución acuosa del conjugado de fármaco-anticuerpo y resolviendo las ecuaciones simultáneas (I) y (II) utilizando los valores, se pueden obtener C_A y C_D . Además, dividiendo C_D por C_A , se puede obtener la cantidad promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo.
55

Procedimiento general F: Medición (2) del número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de

anticuerpo en un conjugado de fármaco-anticuerpo.

Se puede determinar también el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo en el conjugado de fármaco-anticuerpo mediante el análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) utilizando el siguiente procedimiento además del procedimiento general E anteriormente mencionado.

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

Una solución de conjugado de fármaco-anticuerpo (aproximadamente 1 mg/ml, 60 µl) se mezcló con una solución acuosa de ditioneitol (DTT) (100 mM, 15 µl). Se usó una muestra en la que el enlace disulfuro entre la cadena L y la cadena H del conjugado de fármaco-anticuerpo se ha escindido incubando la mezcla durante 30 minutos a 37 °C en un análisis de HPLC.

10 [F-2. análisis de HPLC]

Se llevó a cabo el análisis de HPLC en las siguientes condiciones de medición:

Sistema HPLC: Sistema HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Inc.)

Detector: espectrómetro de absorción ultravioleta (medición de la longitud de onda: 280 nm)

Columna: PLRP-S (2,1× 50 mm, 8 µm, 1000 angstroms; Agilent Technologies, Inc., P/N PL1912-1802)

15 Temperatura de la columna: 80 °C

Fase móvil A: solución acuosa conteniendo ácido trifluoroacético al 0,04 % (TFA)

Fase móvil B: solución de acetonitrilo que contiene TFA al 0,04 %

Programa de gradiente: 29 %-36 % (0-12,5 min), 36 %-42 % (12,5-15 min), 42 %-29 % (15-15,1 min), y 29 %-29 % (15,1-25 min)

20 Volumen de inyección de la muestra: 15 µl

[F-3. Análisis de datos]

[F-3-1] En comparación con las cadenas L (L₀) y H (H₀) del anticuerpo no conjugado, las cadenas L (cadena L unida a una molécula de fármaco: L₁) y H (cadena H unida a una molécula de fármaco: H₁, cadena H unida a dos moléculas de fármaco: H₂, cadena H unida a tres moléculas de fármaco: H₃) conjugadas a fármaco presentan mayor hidrofobicidad en proporción al número de moléculas de fármaco conjugadas y tienen por tanto un tiempo de retención mayor. Estas cadenas se eluyeron por tanto en el orden de L₀ y L₁ o H₀, H₁, H₂, y H₃. se puede asignar la detección de picos a cualquiera de L₀, L₁, H₀, H₁, H₂, y H₃ comparando los tiempos de retención con L₀ y H₀.

[F-3-2] Debido a que el enlazador del fármaco tiene absorción UV, los valores del área de los picos se corrigieron en respuesta al número de moléculas de enlazador-fármaco conjugadas de acuerdo con la siguiente expresión usando los coeficientes de absorción molar de la cadena L o la cadena H y del enlazador del fármaco.

[Expresión 1]

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

$$\times \frac{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena L}}{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena L} + \text{El número de moléculas de fármaco conjugadas} \times \text{Coeficiente de extinción molar del enlazador del fármaco}}$$

[Expresión 2]

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

$$\times \frac{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena H}}{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena H} + \text{El número de moléculas de fármaco conjugadas} \times \text{el coeficiente de extinción molar del enlazador del fármaco}}$$

Aquí, como para el coeficiente de extinción molar (280 nm) de la cadena L o la cadena H de cada anticuerpo, se puede usar un valor estimado de la secuencia de aminoácidos de la cadena L o la cadena H de cada anticuerpo mediante un procedimiento de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). En el caso de trastuzumab, se utilizaron un coeficiente de extinción molar de 26150 y un coeficiente de extinción molar de 81290 como valores estimados para la cadena L y la cadena H, respectivamente, de acuerdo con su secuencia de aminoácidos. Como para el coeficiente de extinción molar (280 nm) del enlazador del fármaco, se usó el coeficiente de extinción molar medido (280 nm) de un compuesto en el que el grupo maleimida se convirtió en succinimida tioéter mediante la reacción de cada enlazador de fármaco con mercaptoetanol o N-acetilcisteína.

[F-3-3] Se calculó la relación del área del pico (%) de cada cadena para el total de los valores corregidos de las áreas

de los picos de acuerdo con la siguiente expresión.

[Expresión 3]

$$\text{Relación del área del pico de la cadena L} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$\text{Relación del área del pico de la cadena H} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

5 Valores corregidos de las áreas de los picos respectivas A_{Li} , A_{Hi} ; L_i , H_i

[F-3-4] Se calculó el número promedio de las moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo en el conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con la siguiente expresión.

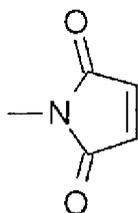
10 Número promedio de moléculas de fármaco conjugadas = (relación del área del pico $L_0 \times 0$ + relación del área del pico $L_0 \times 1$ + relación del área del pico $H_0 \times 0$ + relación del área del pico $H_1 \times 1$ + relación del área del pico $H_2 \times 2$ + relación del área del pico $H_3 \times 3$) / 100 x 2

Se describe a continuación la producción del compuesto intermedio utilizado en el procedimiento de producción 1. El compuesto representado por la fórmula (2) en el procedimiento de producción 1 es un compuesto representado por la siguiente fórmula: (maleimid-N-il)-(CH₂)^{n³}-C(=O)-L²-L^P-NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)-(NH-DX).

En la fórmula,

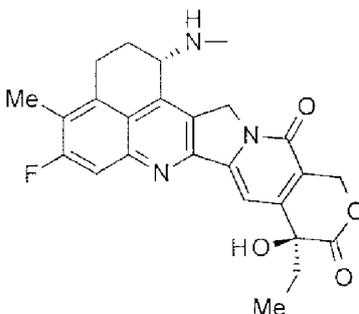
15 n^3 representa un entero de 2 a 8,
 L^2 representa -NH-(CH₂CH₂-O)^{n⁴}-CH₂CH₂-C(=O)- o un enlace simple,
 en la que n^4 representa un entero de 1 a 6,
 L^P representa un resto de tetrapéptido de -GGFG-,
 n^1 representa un entero de 0 a 6,
 20 n^2 representa un entero de 0 a 5,
 L^a representa -O- o un enlace simple, (maleimid-N-il)- es un grupo maleimidilo (grupo 2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-ilo) representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 20]



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

[Fórmula 21]



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

30 Cuando L^2 es un enlace simple o -NH-(CH₂CH₂-O)^{n⁴}-CH₂CH₂-C(=O)-, se prefiere como intermedio de producción que n^4 debe ser un entero de 2 a 4.

Además, como para el -NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}-, un compuesto que tiene -NH-CH₂CH₂-, -NH-CH₂CH₂CH₂-, -NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-, -NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -NH-CH₂-O-CH₂-, o -NH-CH₂CH₂-O-CH₂- es preferido como un

intermedio de producción. un compuesto que tiene $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$, o $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ es más preferido.

Un compuesto representado por la fórmula (2) en el que n^3 es un entero de 2 a 5, L^2 es un enlace simple, y $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}_{n^2}\text{-}$ 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 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ es preferido como un intermedio de producción. Un compuesto en el que $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}_{n^2}\text{-}$ 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. Se prefiere además un compuesto en el que n^3 es un entero de 2 o 5.

Un compuesto representado por la fórmula (2) en el que n^3 es un entero de 2 a 5, L^2 es $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{-O)}_{n^4}\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, n^4 es un entero de 2 a 4, y $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}_{n^2}\text{-}$ 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 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ es preferido como un intermedio de producción. Es más preferido un compuesto en el que n^4 es un entero de 2 o 4. Un compuesto en el que $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}_{n^2}\text{-}$ es $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$, o $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ es además preferido.

Los ejemplos preferidos de un intermedio útil en la producción de dicho compuesto de la presente invención pueden incluir los siguiente. (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 15 (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)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 20 (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)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 25 (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)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 30 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 35 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 40 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$.

El conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención se puede producir haciendo reaccionar un compuesto de enlazador fármaco seleccionado entre el grupo anteriormente descrito de los compuestos intermedios de producción con un anticuerpo dirigido contra HER2 o uno de sus derivados reactivos para formar por tanto un enlace tioéter en un sitio de enlace a disulfuro presente en la parte bisagra del anticuerpo dirigido contra HER2. En este caso, el derivado reactivo del anticuerpo dirigido contra HERR2 se usa preferentemente, y se prefiere particularmente un derivado reactivo obtenido reduciendo el anticuerpo dirigido contra HER2.

Los siguientes son compuestos más preferidos como intermedios de producción.
 50 (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)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 55 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (maleimid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,
 (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)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$.

Entre el grupo de compuestos intermedios anteriormente mencionados, un compuesto representado por la siguiente fórmula:

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), o
 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

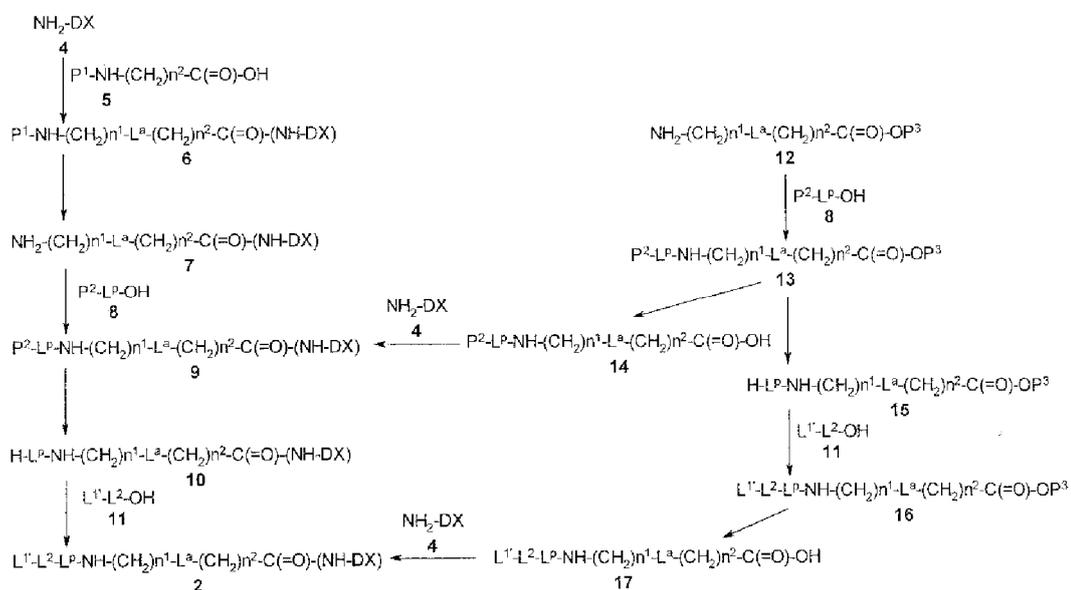
5 es un compuesto más preferido.

A fin de asegurar la cantidad del conjugado, se puede 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, Las cantidades promedio de fármacos se encuentran entre las cantidades promedio de los fármacos en los conjugados antes de la mezcla.

10 2. procedimiento de producción 2

Se puede producir el compuesto representado por la fórmula (2) como un intermedio utilizado en el procedimiento de producción anterior y una de sus sales farmacológicamente aceptables mediante el siguiente procedimiento, por ejemplo.

[Fórmula 22]



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

El compuesto (6) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico (5) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con NH₂-DX (4) o una de sus sales farmacológicamente aceptables. NH₂-DX (4) 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]quinolina-10,13(9H,15H)-diona).

Se pueden emplear para la reacción reactivos de reacción y condiciones que se usan comúnmente para la síntesis de péptidos. Existen diversos tipos de ésteres activos. Por ejemplo, se pueden producir haciendo reaccionar fenoles tales como p-nitrofenol, N-hidroxi benzotriazol, N-hidroxi succinimida, o similares, con el ácido carboxílico (5) utilizando un agente de condensación tal como clorhidrato de N,N'-diciclohexilcarbodiimida o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Además, puede producirse también el éster activo mediante reacción del ácido carboxílico (5) con trifluoroacetato de pentafluorofenilo o similar; una reacción del ácido carboxílico (5) con hexafluorofosfito de 1-benzotriazolil oxitripirrolidinofosfonio; una reacción del ácido carboxílico (5) con cianofosfonato de dietilo (procedimiento de salado); 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 se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, un procedimiento de haluro de ácido por el cual el ácido carboxílico (5) se trata con un haluro ácido tal como cloruro de tionilo y cloruro de oxalilo en presencia de una base.

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

Los ejemplos específicos de la base utilizada para cada etapa descrita anteriormente incluyen un carbonato, alcóxido, hidróxido, o hidruro de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo tal como carbonato de sodio, carbonato potásico, etóxido de sodio, butóxido de potasio, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidruro sódico, e hidruro potásico; una base organometálica representada por un alquil litio como n-butil litio, o dialquilamino litio tal como diisopropilamida de litio; una base organometálica de bissililamina que incluye litio bis(trimetilsilil)amida; y una base orgánica que incluye una amina terciaria o un compuesto heterocíclico que contiene nitrógeno tal como piridina, 2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, N-metil morfolina, 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 éter tal como tetrahidrofurano, 1,2-dimetoxietano, y dioxano; un disolvente de un hidrocarburo aromático, tal como benceno y tolueno; y un disolvente amida tal como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, y N-metilpirrolidin-2-ona. además de estos, un disolvente de sulfóxido tal como dimetil sulfóxido y sulfolano; y un disolvente de cetona tal como acetona y metil etil cetona y se puede usar un disolvente alcohólico tal como metanol y etanol en algunos casos. Además, se puede usar también un disolvente mixto del mismo.

Como para el grupo protector P¹ para el grupo del extremo amino del compuesto (6), un grupo protector para un grupo amino que se usa generalmente para la síntesis peptídica, se pueden usar, por ejemplo, un grupo *tert*-butiloxi carbonilo, un grupo 9-fluorenil-metiloxi carbonilo, o un grupo benciloxi carbonilo. Los ejemplos de otros grupos protectores para un grupo amino incluyen un grupo alcanilo tal como un grupo acetilo; un grupo alcocarbonilo tal como un grupo metoxicarbonilo y un grupo etoxicarbonilo; un grupo arilmetoxi carbonilo tal como un grupo parametoxibenciloxi carbonilo, y un grupo para (u orto)nitrobenciloxi carbonilo; un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo y un grupo trifenil metilo; un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo; y un grupo aril sulfonilo tal como un grupo 2,4-dinitrobenceno sulfonilo y un grupo ortonitrobenceno sulfonilo. El grupo protector P¹ se puede seleccionar dependiendo de, por ejemplo, las propiedades del compuesto que tiene un grupo amino que se va a proteger.

Desprotegiendo el grupo protector P¹ para el grupo del extremo amino del compuesto (6) obtenido, se puede producir el compuesto (7). En la desprotección, se pueden seleccionar los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

El compuesto (9) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico peptídico (8) que tiene el extremo N protegido con P² en un éster activo, mezclado con un anhídrido de ácido y haciendo reaccionar este con el compuesto (7) obtenido. Las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (8) y el compuesto (7) se pueden seleccionar de forma adecuada y utilizarse a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P² se puede seleccionar de forma adecuada y utilizarse a partir de aquellos 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. Como se usa generalmente para la síntesis peptídica, repitiendo secuencialmente la reacción y la desprotección del aminoácido o péptido que constituye el ácido carboxílico peptídico (8) para el alargamiento, se puede producir también el compuesto (9).

Desprotegiendo el grupo protector P² para el extremo amino del compuesto (9) obtenido, se puede producir el compuesto (10). En la desprotección, se pueden seleccionar los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

Es posible producir el compuesto (2) derivatizando el ácido carboxílico (11) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con el compuesto (10) obtenido. Las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico (11) y el compuesto (10) se pueden seleccionar de forma adecuada a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

Se puede producir también el compuesto (9) mediante el siguiente procedimiento, por ejemplo.

El compuesto (13) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico peptídico (8) que tiene el extremo N protegido con P² en un éster activo, anhídrido de ácido mezclado, o similares y haciendo reaccionar este en presencia de una base con el compuesto de amina (12) que tiene el grupo carboxi protegido con P³. Las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (8) y el compuesto (12) se pueden seleccionar de forma adecuada y utilizarse a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P² para el grupo amino del compuesto (13) no está particularmente limitado siempre que este sea un grupo protector generalmente utilizado.

Específicamente, los ejemplos del grupo protector para un grupo hidroxilo incluyen un grupo alcóximetilo tal como un grupo metoximetilo; un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo, un grupo 4-metoxibencilo, y un grupo trifenilmetilo; un grupo alcanilo tal como un grupo acetilo; un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo; y un grupo sililo tal como un grupo *tert*-butil difenilsililo. Se puede proteger un grupo carboxi, por ejemplo, como un éster con un grupo alquilo tal como un grupo metilo, un grupo etilo, y un grupo *tert*-butilo, un grupo alilo, o un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo. Los ejemplos del grupo protector para un grupo amino incluyen: un grupo alquilo carbonilo tal como un grupo

5 *tert*-butiloxi carbonilo, un grupo metoxicarbonilo, y un grupo etoxicarbonilo; un grupo aliloxicarbonilo, o un grupo arilmetoxi carbonilo tal como un grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo, un grupo benciloxi carbonilo, un grupo parametoxibenciloxi carbonilo y un grupo para (u orto)nitrobenciloxi carbonilo; un grupo alcanóilo tal como un grupo acetilo; un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo y un grupo trifenil metilo; un grupo aroilo tal como un grupo benzoílo; y un grupo aril sulfonilo tal como un grupo 2,4-dinitrobenceno sulfonilo o un grupo ortonitrobenceno sulfonilo.

10 Como para el grupo protector P³ para un grupo carboxi, un grupo protector comúnmente utilizado como un grupo protector para un grupo carboxi en química sintética orgánica, en particular, se puede usar la síntesis peptídica. Específicamente, se puede seleccionar de forma adecuada entre los grupos protectores descritos anteriormente, por ejemplo, ésteres con un grupo como un éster con un grupo alquilo tal como un grupo metilo, un grupo etilo, o un *tert*-butilo, ésteres de alilo, y ésteres de bencil.

15 En tales casos, el grupo protector para un grupo amino y el grupo protector para un grupo carboxi puedan ser aquellos que se retiran preferentemente mediante un procedimiento diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P² es un grupo *tert*-butiloxi carbonilo y P³ es un grupo bencilo. Los grupos protectores pueden seleccionarse a partir de los anteriormente mencionados dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de los compuestos que tienen el grupo amino y el grupo carboxi que se va a proteger. Para la eliminación de los grupos protectores, se pueden seleccionar los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

Desprotegiendo el grupo protector P³ para el grupo carboxi del compuesto (13) obtenido, se puede producir el compuesto (14). En la desprotección, se seleccionan los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

20 El compuesto (9) puede producirse derivatizando el compuesto (14) obtenido en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, se pueden usar también reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos, y se pueden seleccionar adecuadamente las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para la reacción a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

Se puede producir también el compuesto (2) mediante el siguiente procedimiento, por ejemplo.

25 Desprotegiendo el grupo protector P² para el grupo amino del compuesto (13), se puede producir el compuesto (15). En la desprotección, se pueden seleccionar los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

30 El compuesto (16) puede producirse derivatizando el derivado de ácido carboxílico (11) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con el compuesto (15) obtenido. Las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (11) y el compuesto (15) se pueden seleccionar de forma adecuada y utilizarse a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

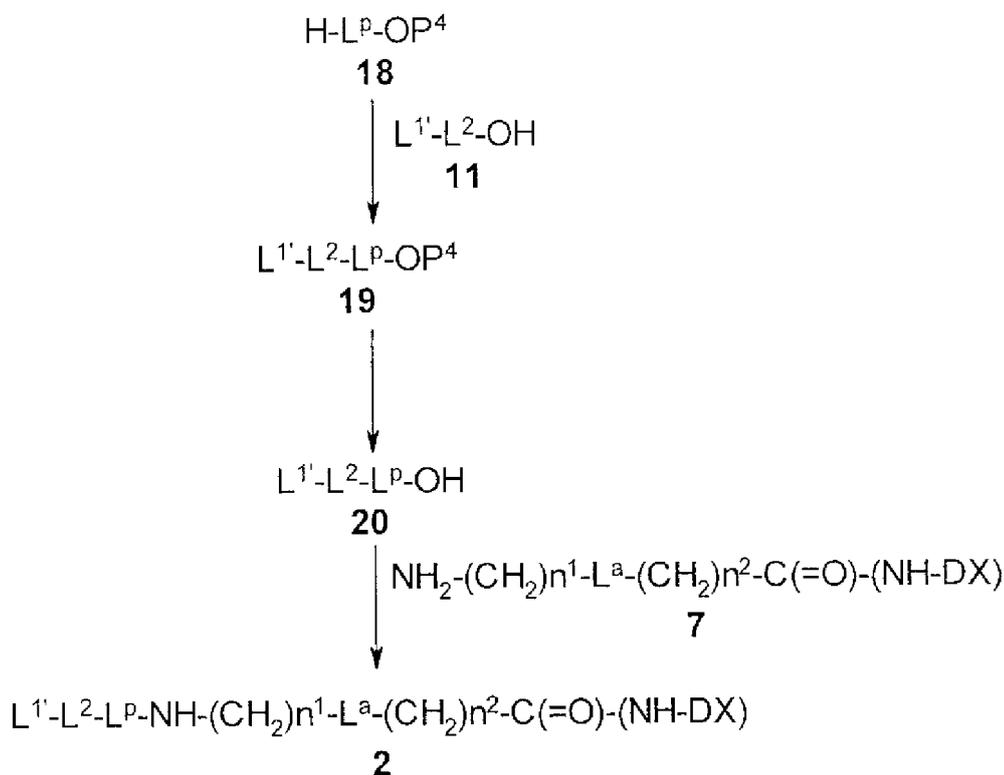
Desprotegiendo el grupo protector para el grupo carboxi del compuesto (16) obtenido, se puede producir el compuesto (17). Esta desprotección se puede llevar a cabo de forma similar a la desprotección en el grupo carboxi para producir el compuesto (14).

35 El compuesto (2) puede producirse derivatizando el compuesto (17) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, se pueden usar también reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos, y se pueden seleccionar adecuadamente las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para la reacción a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

40 3. procedimiento de producción 3

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

[Fórmula 23]



En la fórmula, L^{1'} corresponde a L¹ que tiene una estructura en la que el extremo se convierte en un grupo maleimidilo, y P⁴ representa un grupo protector.

5 El compuesto (19) puede producirse derivatizando el compuesto (11) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, o similares y haciendo reaccionar este en presencia de una base con el ácido carboxílico peptídico (18) que tiene el extremo C protegido con P⁴. Las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (18) y el compuesto (11) se pueden seleccionar de forma adecuada y utilizarse a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P⁴ para el grupo carboxi del compuesto (18) se puede seleccionar adecuadamente a partir de los grupos protectores descritos anteriormente.

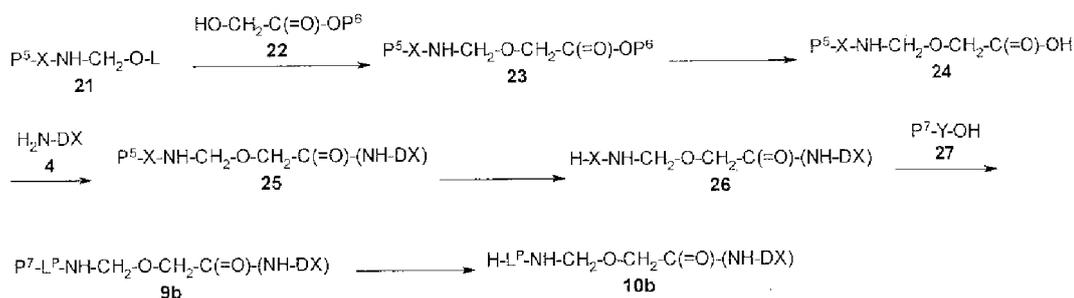
10 Desprotegiendo el grupo protector para el grupo carboxi del compuesto (19) obtenido, se puede producir el compuesto (20). La desprotección se puede llevar a cabo de forma similar a la desprotección en el grupo carboxi para producir el compuesto (14).

15 El compuesto (2) puede producirse derivatizando el compuesto (20) obtenido en un éster activo, mezclado con un anhídrido de ácido y haciendo reaccionar este con el compuesto (7). Para la reacción, se pueden usar también reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos, y se pueden seleccionar adecuadamente las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para la reacción a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

4. procedimiento de producción 4

20 A continuación, en el presente documento, el procedimiento para producir el compuesto (10b) que tiene n¹ = 1, se describe en detalle L^a = 0 en el intermedio de producción (10) descrito en el procedimiento de producción 2. El compuesto representado por la fórmula (10b), una de sus sales o solvatos se puede producir de acuerdo con el siguiente procedimiento, por ejemplo.

[Fórmula 24]



En la fórmula, L^P es como se ha definido anteriormente, L representa un grupo acilo que es un grupo alcanóilo tal como un grupo acetilo o un grupo aloilo tal como un grupo benzoilo, o un átomo de hidrógeno, 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.

Se puede producir un compuesto representado por la fórmula (21) utilizando o aplicando el procedimiento descrito en la patente japonesa abierta a consulta n.º. 2002-60351 o en la referencia (J. Org. Chem., Vol. 51, página 3196, 1986), y llevando a cabo la eliminación de los grupos protectores o la modificación de los grupos funcionales, si es necesario. Además, se puede obtener también tratando un aminoácido con un grupo protegido en el extremo amino o una amida ácida de un oligopéptido con un grupo amino protegido con un aldehído o una cetona.

Haciendo reaccionar (21) con el compuesto (22) que tiene un grupo hidroxilo a una temperatura que varía desde las condiciones de temperatura por debajo de la temperatura de enfriamiento a la temperatura ambiente en un disolvente inerte en presencia de un ácido o una base, se puede producir el compuesto (23).

Aquí, Los ejemplos del ácido que se puede usar aquí pueden incluir 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 paratoluenosulfónico, y ácido metanosulfónico; y un ácido de Lewis tal como tetrafluoroborato, cloruro de zinc, cloruro de estaño, cloruro de aluminio, y cloruro de hierro. Entre estos, un ácido sulfónico, en particular, es preferible un ácido paratolueno sulfónico. Como para la base, se puede seleccionar de forma adecuada y utilizarse una cualquiera de las bases anteriormente mencionadas. Sus ejemplos preferidos incluyen un alcóxido de metal alcalino tal como *tert*-butóxido de potasio, un hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido sódico e hidróxido potásico; un hidruro de metal alcalino o hidruro de metal alcalinotérreo tal como hidruro sódico e hidruro potásico; una base organometálica representada por dialquilamino litio tal como diisopropilamida litio; y una base organometálica de bissililamina tal como litio bis(trimetilsilil)amida.

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 un hidrocarburo aromático, tal como benceno y tolueno. Aquellos disolventes se pueden preparar como una mezcla con agua.

Además, el grupo protector para un grupo amino, como se ilustra por P⁵ no está particularmente limitado si es un grupo comúnmente utilizado 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 2. Sin embargo, En la presente reacción, puede existir un caso en el que se elimine por escisión el grupo protector para un grupo amino, como se ilustra por P⁵. En tales casos, Puede introducirse de nuevo un grupo protector llevando a cabo de forma adecuada una reacción con un reactivo adecuado para proteger un grupo amino según pueda requerirse.

Se puede producir el compuesto (24) eliminando el grupo protector P⁶ del compuesto (23). En el presente documento, los ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxi, como se ilustra por P⁶ se describen en el procedimiento de producción 2, y se puede seleccionar uno adecuado entre estos. En el compuesto (23), 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 se puedan eliminar 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 se pueden seleccionar 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 eliminación de los grupos protectores, se seleccionan los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

El compuesto (26) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico (24) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con el compuesto (4) o una de sus sales farmacológicamente aceptables para producir el compuesto (25) seguido por la eliminación del grupo protector P⁵ del compuesto (25) obtenido. Para la reacción entre el compuesto (4) y el ácido carboxílico (24) y la reacción para eliminar el grupo protector P⁶, se pueden usar los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el procedimiento de producción 2.

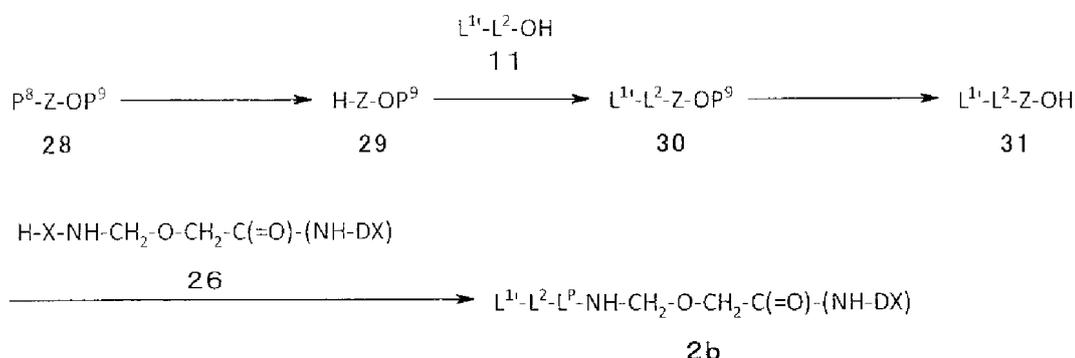
Se puede producir el compuesto (10b) haciendo reaccionar el compuesto (26) con un aminoácido que tiene el grupo

del extremo amino protegido o el oligopéptido (27) con un grupo amino protegido para producir el compuesto (9b) y eliminar el grupo protector P⁷ del compuesto (9b) obtenido. El grupo protector para un grupo amino, como se representa por P⁷ no está particularmente limitado con la condición de que sea un grupo generalmente utilizado para la protección de un grupo amino. Sus ejemplos representativos incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describen en el procedimiento de producción 2. Para eliminar el grupo protector, se seleccionan los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector. Para la reacción entre el compuesto (26) y el compuesto (27), se pueden emplear los reactivos y condiciones de reacción que se usan comúnmente para la síntesis de péptidos. El compuesto (10b) producido por el procedimiento anteriormente mencionado se puede derivatizar en el compuesto (1) de la presente invención de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

5. procedimiento de producción 5

A continuación, en el presente documento, el procedimiento para producir el compuesto (2) que tiene n¹ = 1, n² = 1, se describe en detalle L^a = 0 en el intermedio de producción (2) descrito en el procedimiento de producción 2. El compuesto representado por la fórmula (2), una de sus sales o solvatos se puede producir de acuerdo con el siguiente procedimiento, por ejemplo.

[Fórmula 25]



En la fórmula, L¹, L², L^p son como se ha definido anteriormente, Z representa un oligopéptido que consiste en 1 a 3 aminoácidos, P⁸ representa un grupo protector de un grupo amino, y P⁹ representa un grupo protector de un grupo carboxi.

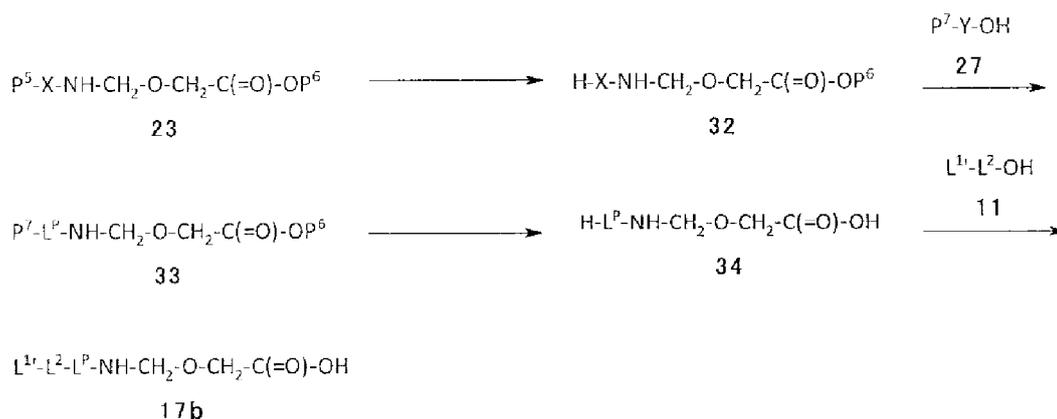
El compuesto (30) puede producirse eliminando el grupo protector P⁸ del aminoácido o el oligopéptido (28) con el grupo del extremo amino protegido y el grupo carboxi para producir el compuesto (29) y hacer reaccionar la forma de amina (29) obtenida con el compuesto (11). el grupo protector para un grupo amino, como se representa por P⁸ no está particularmente limitado si es un grupo comúnmente utilizado 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 2. Además, para eliminar el grupo protector P⁸, se pueden seleccionar los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector. Para la reacción entre el compuesto (29) y el ácido carboxílico (11), se pueden usar los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el procedimiento de producción 2.

El intermedio de producción (2b) puede producirse eliminando el grupo protector P⁹ del compuesto (30) para producir el compuesto (31) y hacer reaccionar el ácido carboxílico obtenido (31) con el compuesto (26). los ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxi, como se representa por P⁸ se describen en el procedimiento de producción 2. Para la reacción de desprotección del mismo, se pueden usar los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el procedimiento de producción 2. Para la reacción entre el compuesto (26) y el compuesto (31), se pueden emplear los reactivos y condiciones de reacción que se usan comúnmente para la síntesis de péptidos. El compuesto (2b) producido por el procedimiento anteriormente mencionado se puede derivatizar en el compuesto (1) de la presente invención de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

6. procedimiento de producción 6

A continuación, en el presente documento, se describe en detalle un procedimiento para producir el compuesto (17b) que tiene n¹ = 1, n² = 1, L^a = 0 en el intermedio de producción (17) descrito en el procedimiento de producción 2. El compuesto representado por la fórmula (17b), una de sus sales o solvatos se puede producir también de acuerdo con el siguiente procedimiento, por ejemplo.

[Fórmula 26]



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

Se puede producir el compuesto (33) desprotegiendo el grupo protector P⁵ para el grupo amino del compuesto (23) que tiene el grupo del extremo amino protegido y el grupo carboxi para producir el compuesto (32) y hacer reaccionar el derivado de amina obtenido (32) con el oligopéptido (27) que tiene un grupo del extremo amino protegido o un grupo amino protegido. el grupo protector para un grupo amino, como se representa por P⁵ no está particularmente limitado si es un grupo comúnmente utilizado 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 2. Además, para eliminar el grupo protector P⁵, se pueden seleccionar los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector. En el presente documento, aunque los ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxi como el representado por P⁶ y el grupo protector para un grupo amino como el representado por P⁷ incluyen los grupos protectores para un grupo carboxi y un grupo amino que se describen en el procedimiento de producción 2. Es deseable que en el compuesto (33), el grupo protector P⁶ para un grupo carboxi y el grupo protector P⁷ para un grupo amino sean los grupos protectores que se puedan eliminar mediante el mismo procedimiento o las mismas condiciones. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P⁶ es un grupo de éster bencílico y P⁷ es un grupo benciloxicarbonilo.

Se puede producir el compuesto (34) eliminando el grupo protector P⁶ para el grupo carboxi del compuesto (33) y el grupo protector P⁷ para el grupo amino del compuesto (33). Se puede producir también el compuesto (37) eliminando secuencialmente el grupo protector P⁶ para el grupo carboxi y el grupo protector P⁷ para el grupo amino, y además, se puede producir el compuesto (34) de forma sencilla eliminando de una vez ambos grupos protectores P⁶ y P⁷ que se pueden eliminar mediante el mismo procedimiento o las mismas condiciones.

Se puede producir el compuesto (17b) haciendo reaccionar el compuesto (34) obtenido con el compuesto (11). Para la reacción entre el compuesto (34) y el compuesto (11), se pueden emplear los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el procedimiento de producción 2.

El conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención, cuando se deja al aire o se recristaliza o purifica, puede absorber humedad o tener adsorción del agua o la vez en un hidrato, y dichos compuesto o sales que contienen agua se incluyen también en la presente invención.

Se incluyen también compuestos marcados con diversos isótopos radioactivos o no radioactivos en la presente invención. Uno o más átomos que constituyen el conjugado de fármaco-anticuerpo de la presente invención pueden contener un isótopo atómico en una relación no natural. Los ejemplos de los isótopos atómicos incluyen deuterio (²H), tritio (³H), yodo-125 (¹²⁵I) y carbono-14 (¹⁴C). Además, el compuesto de la presente invención puede marcarse de forma radioactiva con un isótopo radioactivo tal como tritio (³H), yodo-125 (¹²⁵I), carbono-14 (¹⁴C), cobre-64 (⁶⁴Cu), circonio-89 (⁸⁹Zr), yodo-124 (¹²⁴I), flúor-18 (¹⁸F), indio-111 (¹¹¹I), carbono-11 (¹¹C) y yodo-131 (¹³¹I). El compuesto marcado con un isótopo radioactivo es útil como un agente terapéutico o profiláctico, un reactivo para la investigación tal como un reactivo de ensayo y un agente para el diagnóstico tal como un agente de diagnóstico por imágenes *in vivo*. Sin estar relacionado con la radioactividad, cualquier tipo variante de isótopo del conjugado de fármaco-anticuerpo de la presente invención está comprendido en el alcance de la presente invención.

[Fármacos]

El conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención presenta una actividad citotóxica contra células cancerosas, y por tanto, se puede usar como un fármaco, particularmente como un agente terapéutico y/o un agente profiláctico para el cáncer.

Es decir, el conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención se puede usar selectivamente como un fármaco para la quimioterapia, que es un procedimiento principal para tratar el cáncer, y como resultado, puede retrasar el desarrollo de las células cancerosas, inhibir su crecimiento, y destruir además las células

cancerosas. Esto puede permitir a los pacientes con cáncer estar libres de los síntomas producidos por el cáncer conseguir la mejora de la QOL de los pacientes con cáncer y logra un efecto terapéutico manteniendo las vidas de los pacientes con cáncer. Incluso si el conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención no lleva a cabo la destrucción de las células cancerosas, puede conseguir una QOL mayor de los pacientes con cáncer consiguiendo a la vez su supervivencia a largo plazo, inhibiendo o controlando el crecimiento de las células cancerosas.

En dicho tratamiento farmacológico, se puede usar como un fármaco solo y en adición, se puede usar como un fármaco en combinación con un tratamiento adicional en una terapia auxiliar y se puede combinar con una operación quirúrgica, radioterapia, tratamiento hormonal, o similar. Además, se puede usar también como fármaco para un tratamiento farmacológico en una terapia neoadyuvante.

Además del uso terapéutico como se ha descrito anteriormente, se puede esperar también un efecto de suprimir el crecimiento de las células de cáncer microcítico y destruirlas adicionalmente. Particularmente, cuando se confirma la expresión HER2 se confirma en células primarias cancerosas, se puede esperar la inhibición de la metástasis cancerosa o un efecto profiláctico administrando el conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención. Por ejemplo, un efecto de inhibir y destruir células cancerosas en un fluido corporal en el curso de la metástasis o un efecto de, por ejemplo, se puede esperar inhibir y destruir células de cáncer microcítico inmediatamente después del implante en cualquier tejido. En consecuencia, se puede esperar la inhibición de la metástasis del cáncer o un efecto profiláctico, particularmente, tras la eliminación quirúrgica del cáncer.

El conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención puede esperarse que ejerza un efecto terapéutico mediante la administración como una terapia sistémica a pacientes, y adicionalmente, mediante la administración local a tejidos cancerosos.

Los ejemplos del tipo de cáncer contra el cual puede utilizarse el conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención pueden incluir el cáncer de pulmón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de cuello de útero, cáncer de esófago, carcinoma de escamocelular, cáncer peritoneal, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de útero, cáncer de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, o cáncer de pene. El sujeto de tratamiento del conjugado de fármaco-anticuerpo anti-HER2 de la presente invención es una célula cancerosa que expresa, en una célula cancerosa como sujeto del tratamiento, una proteína HER2 que el anticuerpo en el conjugado de fármaco-anticuerpo puede reconocer. La expresión "proteína HER2 que expresa cáncer" como se usa en la presente memoria descriptiva es un cáncer que contiene células que tienen la proteína HER2 sobre su superficie celular. La proteína HER2 se expresa en exceso en diversos tumores humanos y se puede evaluar usando un procedimiento llevado a cabo generalmente en la técnica, tal como un procedimiento de tinción inmunohistoquímico (IHC) para evaluar la expresión en exceso de la proteína HER2, o procedimientos de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) para evaluar la amplificación del gen HER2.

Además, El conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención presenta un efecto antitumoral reconociendo, a través de su anticuerpo dirigido contra HER2, la proteína HER2 expresada sobre la superficie de las células cancerosa e internalizándola en las células cancerosas. Por tanto, El sujeto de tratamiento del conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención no se limita al "cáncer que expresa la proteína HER2" y puede ser también, por ejemplo, leucemia, linfoma maligno, plasmacitoma, mieloma o sarcoma.

El conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención se puede administrar preferentemente a un mamífero, pero se administra más preferentemente a un ser humano.

Las sustancias utilizadas en una composición farmacéutica que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención se puede seleccionar de forma adecuada y aplicarse a partir de los aditivos e formulación o similares que se usan generalmente en la técnica, a la vista de la concentración de la dosificación o la administración.

El conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención se puede administrar como una composición farmacéutica que contiene al menos un ingrediente farmacéuticamente adecuado. Por ejemplo, la composición farmacéutica anterior contiene normalmente al menos un transportador farmacéutico (por ejemplo, líquido esterilizado). En el presente documento, el líquido incluye, 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, el aceite de soja, aceite mineral, o aceite de sésamo. El agua es el transportador más típico cuando la composición farmacéutica anterior se administra por vía intravenosa. Se puede usar también solución salina, una solución acuosa de dextrosa, y una solución acuosa de glicerol como un transportador líquido, en particular, para una solución de inyección. Se puede seleccionar un vehículo farmacéutico adecuado entre unos conocidos en la técnica. Si se desea, la composición anterior puede contener también una cantidad traza de un agente hidratante, un agente emulsionante, o un agente tamponante del pH. Los ejemplos de transportadores farmacéuticos adecuados se desvelan en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Las formulaciones corresponden a un modo de administración.

Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar el conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención. Los ejemplos de la ruta de administración pueden incluir las rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, y subcutánea, aunque no limitarse a las anteriores. La administración puede realizarse mediante inyección o inyección en bolo, por ejemplo. De acuerdo con una realización específica preferida, la administración del conjugado de fármaco-anticuerpo se lleva a cabo mediante inyección. La administración parenteral es una ruta de administración preferida.

De acuerdo con una realización representativa, se prescribe la composición farmacéutica, 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 normalmente una solución en una solución acuosa tamponada estéril e isotónica. En caso necesario, el fármaco puede contener un agente solubilizante y anestésicos locales para aliviar el dolor en el sitio de inyección (por ejemplo, lignocaina). En general, el ingrediente anterior se proporciona individualmente como uno cualquiera de un polvo liofilizado o como un concentrado anhidro contenido en un recipiente que se obtiene precintando una ampolla o una bolsita que tiene una cantidad del principio activo o como una mezcla en una forma en dosis unitaria. Cuando el fármaco es para administrarse mediante inyección, se puede administrar a partir de una botella de inyección que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando el fármaco se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o solución salina para inyección de tal manera que los ingredientes anteriormente mencionados se premezclan entre sí antes de la administración.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que contiene solo el conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención o una composición farmacéutica que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 y al menos un agente de tratamiento del cáncer diferente que el del conjugado. El conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 de la presente invención se puede administrar con otros agentes de tratamiento del cáncer. El efecto anticanceroso puede potenciarse de acuerdo con ello. Otros agentes anticancerosos utilizados para dicho fin pueden administrarse a un individuo simultáneamente con, por separado de, o posteriormente al conjugado de fármaco-anticuerpo, y se puede administrar aunque variando el intervalo de administración para cada uno. Los ejemplos de agentes de tratamiento del cáncer incluyen 5-FU, pertuzumab, paclitaxel, carboplatino, cisplatino, gemcitabina, capecitabina, irinotecan (CPT-11), paclitaxel, docetaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastina, vinorelbina, everolimus, tanespimicina, bevacizumab, oxaliplatino, lapatinib, adotrastuzumab emtansina (T-DM1), o los fármacos descritos en la publicación internacional n.º WO 2003/038043, análogos de LH-RH (leuprorelina, goserelina, o similares), fosfato de estramustina, antagonistas del estrógeno (tamoxifeno, raloxifeno, o similares), e inhibidores de la aromatasas (anastrozol, letrozol, exemestano, o similares), aunque no de forma limitativa siempre que sean fármacos que tengan una actividad antitumoral.

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

La composición y concentración de la composición farmacéutica puede variar dependiendo del procedimiento de administración. Sin embargo, el conjugado de fármaco-anticuerpo dirigido contra HER2 contenido en la composición farmacéutica de la presente invención puede presentar un efecto farmacéutico incluso a una pequeña dosificación cuando el conjugado de fármaco-anticuerpo tiene mayor afinidad por un antígeno, es decir, mayor afinidad (= menor valor de Kd) en términos de la constante de disociación (es decir, el valor Kd) para el antígeno. Por tanto, para determinar la dosificación del conjugado de fármaco-anticuerpo, la dosificación puede determinarse a la vista de una situación que se refiere a la afinidad entre el conjugado de fármaco-anticuerpo y el antígeno. Cuando el conjugado de fármaco-anticuerpo de la presente invención se administra a un ser humano, por ejemplo, aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg se puede administrar una vez o administrarse varias veces con un intervalo de 1 a 180 días. en una vez con un intervalo de 1 a 180 días

Ejemplos

La presente invención se describe específicamente a la vista de los ejemplos que se muestran a continuación. Sin embargo, la presente invención no se limita a los mismos. Además, esto no debe interpretarse de ninguna manera limitada. Además, a menos que se describa específicamente lo contrario, el reactivo, el disolvente, y el material de partida descrito en la memoria descriptiva puede obtenerse fácilmente a partir de un suministrador comercial.

Ejemplo de referencia 1 Preparación de trastuzumab

Catorce viales de 440 mg/vial de Herceptina (Genentech, Inc.) se disolvieron en 2 l de tampón A de cromatografía de intercambio catiónico (tampón citrato 25 mM, NaCl 30 mM, a pH 5,0 y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm (Millipore Corp.: Stericup 0,22 µm, Membrana GVPVDF). Se aplicaron las muestras a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (columna Sepharose HP 240 ml, XK50) seguido por elución en un gradiente lineal de concentración de NaCl de 30 mM a 500 mM usando tampón B de cromatografía de intercambio catiónico (tampón

citrato 25 mM, NaCl 500 mM, pH 5,0 para separar las fracciones monoméricas de IgG. Las muestras monoméricas que tienen una pureza mayor de aproximadamente un 98 % mediante al análisis de cromatografía de exclusión por tamaño se combinaron y se concentraron con UF30K (Millipore Corp.: Filtro PELLICON XL, BIOMAX 30K, PXB030A50), y el tampón se sustituyó con tampón CBS (citrate 10 mM/NaCl 140 mM, a pH 6,0). Las muestras sustituidas con tampón CBS se filtraron a través de un filtro de 0,2 μm (Sartorius AG: Minisart-Plus 0,2 μm , 17823K).

Ejemplo de referencia 2 Producción de trastuzumab emtansina T-DM1

Derivatización del anticuerpo con SMCC: Utilizando el Procedimiento general C-2(se usó PBS6.5/EDTA como una solución tampón), Procedimiento general A, y Procedimiento general B (como coeficiente de extinción a 280 nm, se utilizaron 1,37 $\text{mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descritos en el procedimiento de producción 1, se llevó a cabo la sustitución del tampón con PBS6.5/EDTA en el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 para preparar una solución que contiene trastuzumab (160,0 mg) disuelta en PBS6.5/EDTA (7,60 ml) en un tubo de polipropileno de 15 ml. Posteriormente, SMCC (1,84 mg) solución de DMSO (0,40 ml; que corresponde a aproximadamente 5,1 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se ajustó para tener una concentración de anticuerpo de 20 mg/ml, y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando un rotor de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) durante 2 horas. Esta solución de reacción se sometió a purificación de acuerdo con el Procedimiento general D-2 (se usó PBS6.5/EDTA como una solución tampón) para proporcionar 12 ml de una solución que contenía 154.9 mg del anticuerpo derivatizado con SMCC. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Añadiendo PBS6.5/EDTA (2,56 ml) y N²-desacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (4,67 mg; DM1, Journal of Medicinal Chemistry, 2006, Vol. 49, n. 14, pág. 4392) solución de DMA (dimetilacetamida) (0,93 ml; que corresponde a aproximadamente 5,8 equivalentes por molécula de anticuerpo derivatizado con SMCC) a la solución obtenida anteriormente en el tubo de polipropileno de 50 ml a temperatura ambiente, se ajustó la solución de reacción a una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml, y se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente usando un rotor de tubos durante 16,5 horas.

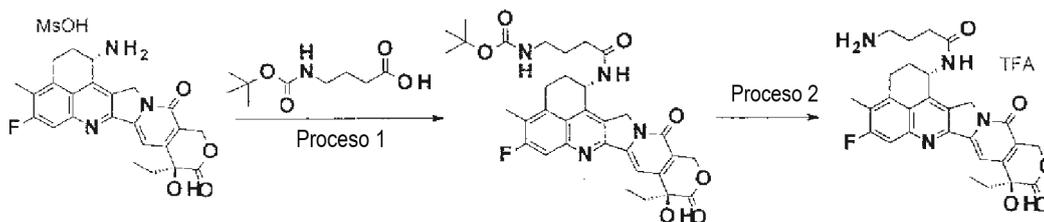
Procedimiento de purificación: La anterior solución se sometió a purificación usando el procedimiento general D-1 que utiliza una solución de tampón fosfato de sodio (10 mM, pH 6,5) que contiene cloruro de sodio (137 mM) para proporcionar 35 ml de una solución que contiene el compuesto diana del Ejemplo de referencia.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando el procedimiento general E que utiliza la absorbancia UV a dos longitudes de onda de 252 nm y 280 nm, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 4,14 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 144,9 mg (91 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,0.

Ejemplos 1 Intermedio (1)

[Fórmula 27]



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]amino]-4-oxobutil]carbamato) *tert*-butilo

Ácido 4-(*tert*-butoxicarbonilamino)butanoico (0,237 g, 1,13 mmol) se disolvió 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 una sal de exatecano del ácido metanosulfónico (0,500 g, 0,94 mmol) y trietilamina (0,157 ml, 1,13 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 8 : 2 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título (0,595 g, cuantitativo).

RMN¹H (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 (CLEM) m/z: 621 (M+H)⁺

Proceso 2: Trifluoroacetato de 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]butanoamida

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 este se agitó durante 4 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de

5 cloroformo: metanol: agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para proporcionar el trifluoroacetato del compuesto del título (0,343 g, cuantitativo).

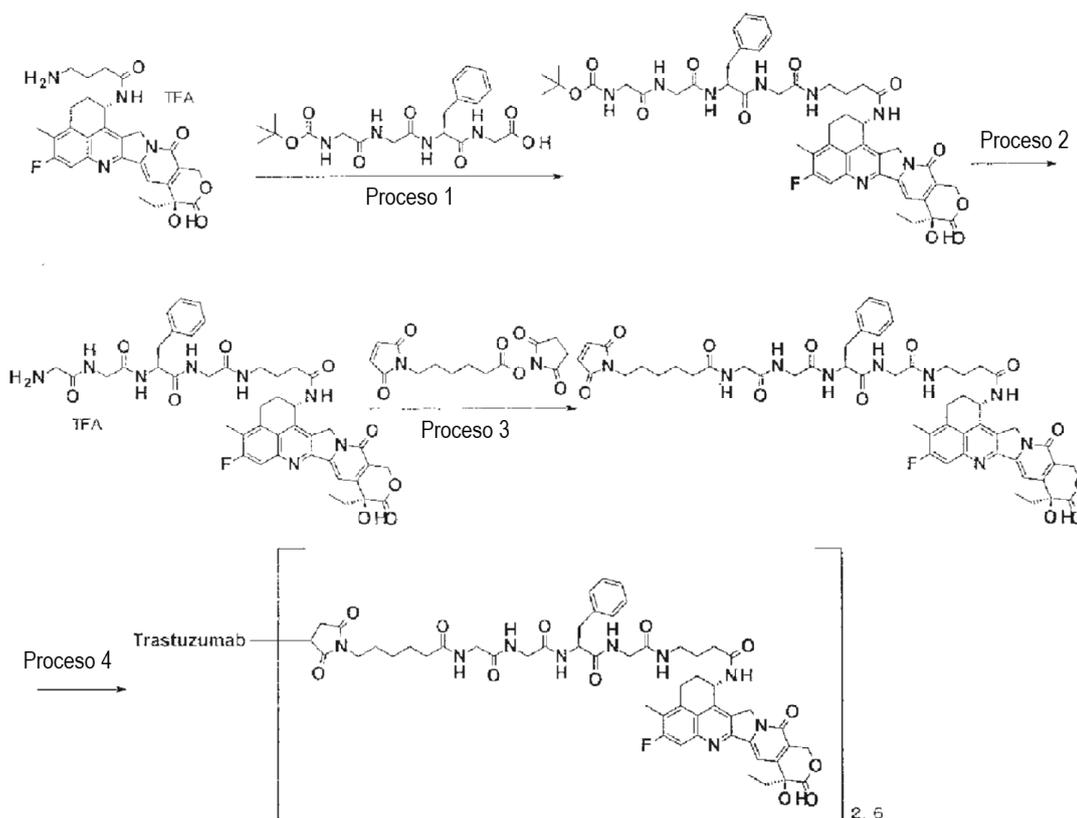
RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,79-1,92 (4H, m), 2,10-2,17 (2H, m), 2,27 (2H, t, J=7,0 Hz), 2,40 (3H, s), 2,80-2,86 (2H, m), 3,15-3,20 (2H, m), 5,15 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,54-

10 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 (CLEM) m/z: 521 (M+H)⁺

Ejemplo 2 Conjugado de fármaco-anticuerpo (2)

[Fórmula 28]



15 Proceso 1: N-(*tert*-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

N-(*tert*-Butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanilglicina (0,081 g, 0,19 mmol) se disolvió 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 a continuación se agitó durante 3,5 horas. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (1,5 ml) cargada con el compuesto (0,080 g, 0,15 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 1, y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 8

20 : 2 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título (0,106 g, 73 %).
 RMN¹H (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 (CLEM) m/z: 939 (M+H)⁺

30 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 el ácido trifluoroacético (7 ml), se agitó durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida, y los residuos se cargaron con tolueno para destilación azeotrópica. Los residuos obtenidos se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo: metanol: agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para

5 proporcionar el trifluoroacetato del compuesto del título (1,97 g, 99 %).
 RMN¹H (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).
 10 EM (CLEM) 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-oxobutoil]metil]glicinamida

15 A una solución en N,N-dimetilformamida (1,2 ml) del compuesto (337 mg, 0,353 mmol) obtenida en el Proceso 2 anterior, se añadieron trietilamina (44,3 ml, 0,318 mmol) y hexanoato de N-succinimidil-6-maleimida (119,7 mg, 0,388 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 5 : 1 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (278,0 mg, 76 %).
 20 RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,66-1,76 (2H, m), 1,80-1,91 (2H, m), 2,05-2,21 (6H, m), 2,39 (3H, s), 2,79 (1H, dd, J = 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).
 25 EM (CLEM) m/z: 1032 (M+H)⁺

Proceso 4: Conjugado fármaco-anticuerpo (2)

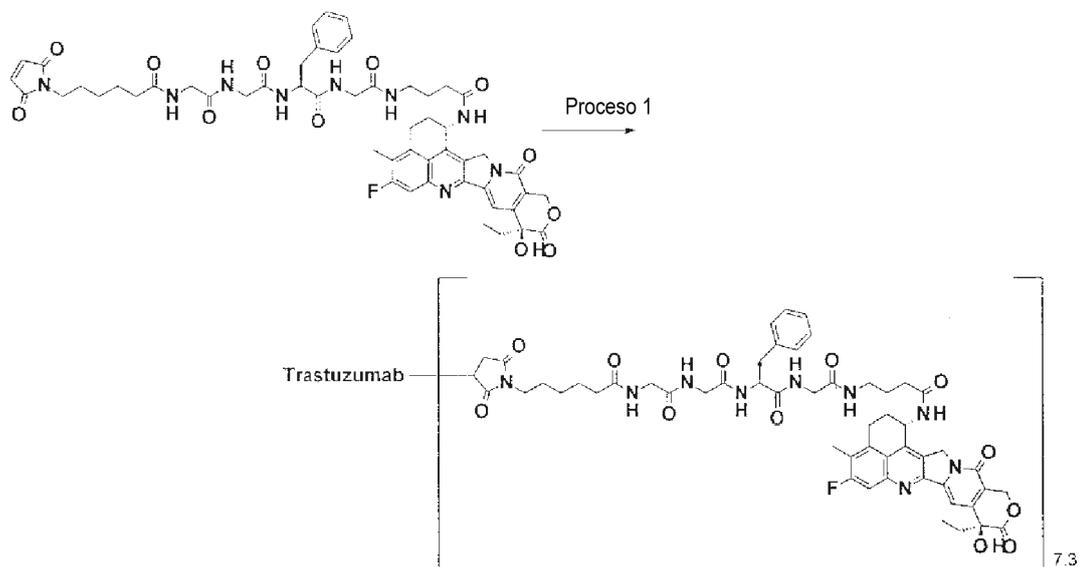
Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento general C-1 y el
 30 Procedimiento general B (se usó como coeficiente de extinción a 280 nm, 1,37 mlmg⁻¹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

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

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D-1 (PBS6.0 se usó como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para proporcionar 6 ml de una solución que contenía el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Después de eso, La solución se concentró mediante el Procedimiento general A. Caracterización fisicoquímica: Utilizando el Procedimiento general E descrito en el procedimiento de producción 1, se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 3,21 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 22,5 mg (75 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 2,6.

Ejemplo 3 Conjugado de fármaco-anticuerpo (3)

[Fórmula 29]

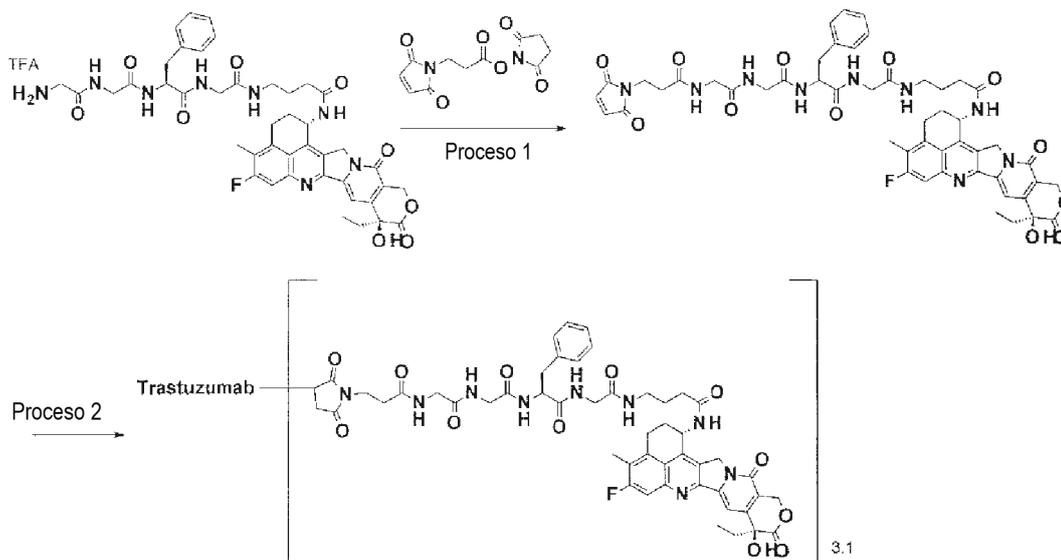
**Proceso 1: Conjugado fármaco-anticuerpo (3)**

- 5 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, $1,487 \text{ mlmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (1,25 ml) se colocó en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,039 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,0625 ml). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37°C durante 1 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Tras añadir DMSO (0,072 ml) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto en el Proceso 3 del Ejemplo 2 (0,078 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó esta utilizando un rotor de tubos para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,0155 ml; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a lo anterior y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante 20 minutos más. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para proporcionar 6 ml de una solución que contiene el compuesto de interés. La solución se concentró adicionalmente mediante el Procedimiento general A. Tras esto, utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.
- 10
- 15
- 20

Concentración de anticuerpo: 9,85 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 6,9 mg (55 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 7,3.

Ejemplo 4 Conjugado de fármaco-anticuerpo (4)

25 [Fórmula 30]



Proceso 1: N-[3-(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)metil]glicinamida

- 5 El compuesto (80 mg, 0,084 mmol) del ejemplo 1 se hizo reaccionar de la misma manera como en el proceso 3 del Ejemplo 2 utilizando propionato de N-succinimidil 3-maleimida (24,6 mg, 0,0924 mmol) en vez de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo pálido (60,0 mg, 73 %).
- 10 RMN¹H (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 (CLEM) m/z: 990 (M+H)⁺

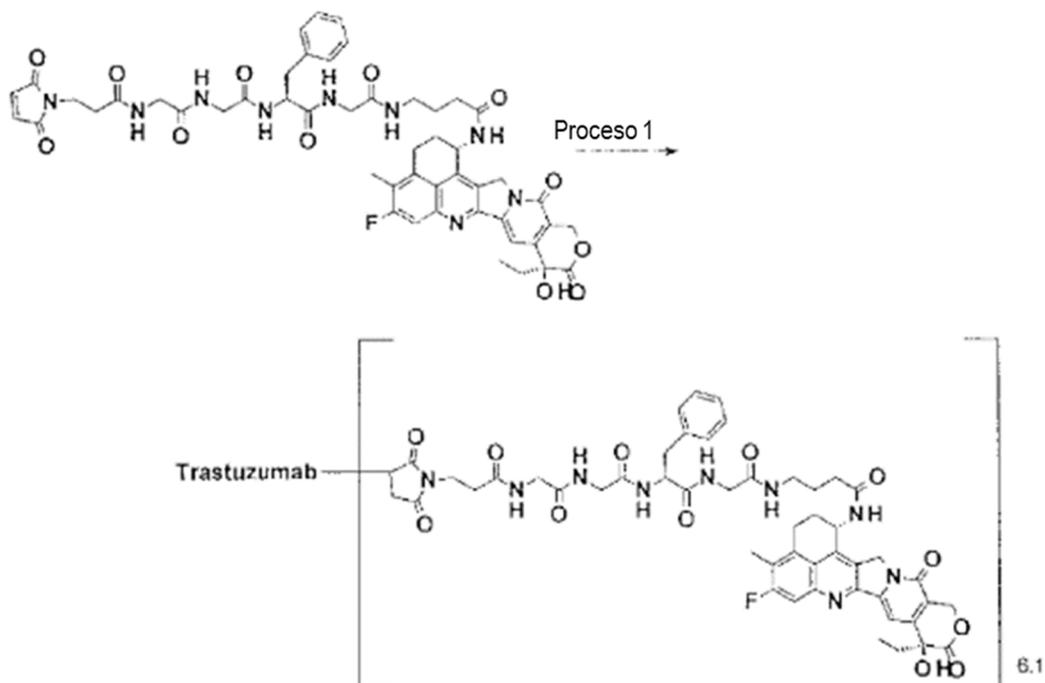
Proceso 2: Conjugado de fármaco-anticuerpo (4)

- Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, 1,48 mlmg⁻¹ cm⁻¹). La solución (1 ml) se colocó en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,0155 ml; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,050 ml). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Tras añadir DMSO (0,072 ml) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto en el Proceso 3 del Ejemplo 2 (0,031 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó esta utilizando un rotor de tubos para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,0078 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a lo anterior y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante 20 minutos más. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D (se usó ABS como solución tampón) para proporcionar 6 ml de una solución que contiene el compuesto de interés. Utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.
- 30

Concentración de anticuerpo: 1,32 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 7,9 mg (79 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,1.

Ejemplo 5 Conjugado de fármaco-anticuerpo (5)

[Fórmula 31]



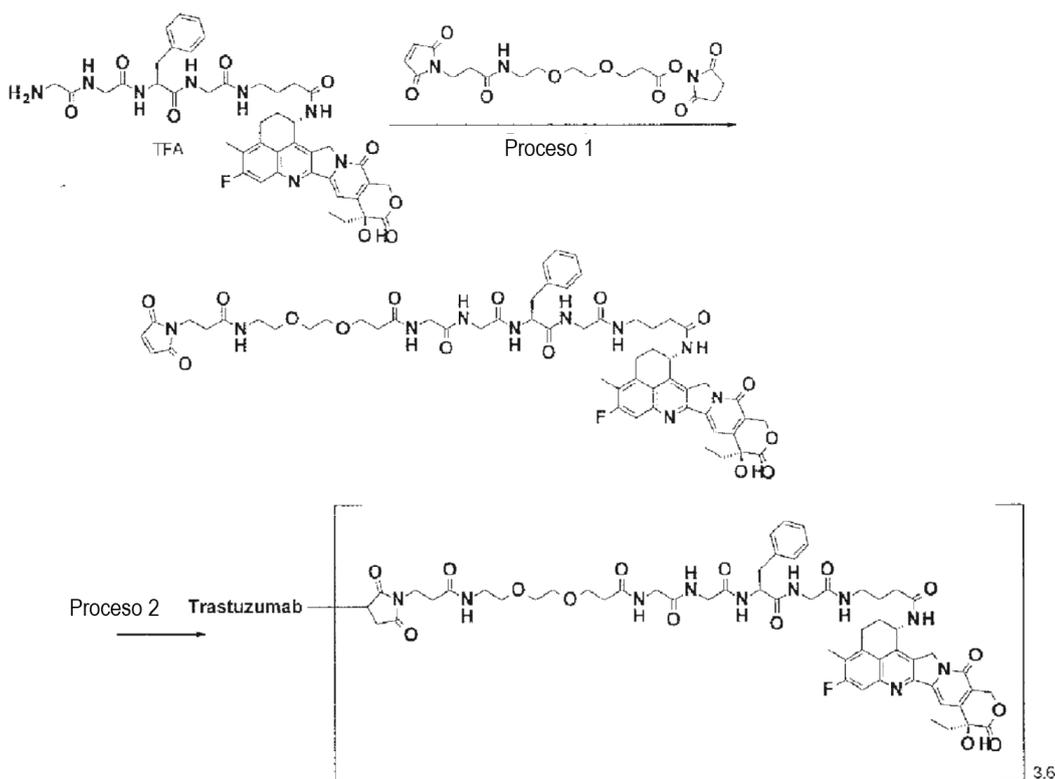
Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (5)

- 5 La cantidad de la solución acuosa de TCEP 10 mM se ajustó de tal manera que la relación molar de TCERP al anticuerpo en la reducción de anticuerpo fue de 4,6. Y la cantidad de la solución de enlazador de fármaco 10 mM añadida se ajustó de tal manera que la relación molar del compuesto del Proceso 1 del Ejemplo 4 al anticuerpo en la conjugación del enlazador de fármaco fue de 9,2. A continuación, la cantidad de la solución acuosa de NAC 100 mM
- 10 añadida se ajustó de tal manera que la relación molar de NAC al anticuerpo en la terminación de la reacción 18.4. Mediante los mismos procedimientos que en el Proceso 2 del Ejemplo 4, se obtuvieron 6 ml de una solución que contenía el conjugado de fármaco-anticuerpo del título, y se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,23 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 7,4 mg (74 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,1.

15 Ejemplo 6: Conjugado de fármaco-anticuerpo (6)

[Fórmula 32]



Proceso 1: N-{3-[2-(2-[[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil]amino)etoxi]etoxi]propanoil}glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-[[[1S,9S)-9-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 (100 mg, 0,119 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 2 se hizo reaccionar de la misma manera que en el proceso 3 del Ejemplo 2 utilizando diisopropiletilamina (20,8 μ l, 0,119 mmol) en vez de trietilamina y N-succinimidil 3-(2-(2-(3-maleimidapropanamida)etoxi)etoxi)propanoato (50,7 mg, 0,119 mmol) en vez de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo pálido (66,5 mg, 48 %).
- 10 RMN¹H (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 (CLEM) m/z: 1149 (M+H)⁺

Proceso 2: Conjugado de fármaco-anticuerpo (6)

- Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, 1,48 mlmg⁻¹ cm⁻¹). La solución (1,25 ml) se colocó en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,019 ml; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,0625 ml). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 \pm 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: tras añadir DMSO (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,109 ml) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 1 (0,039 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó esta utilizando un rotor de tubos 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 se añadió a lo anterior y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante 20 minutos más.
- 30

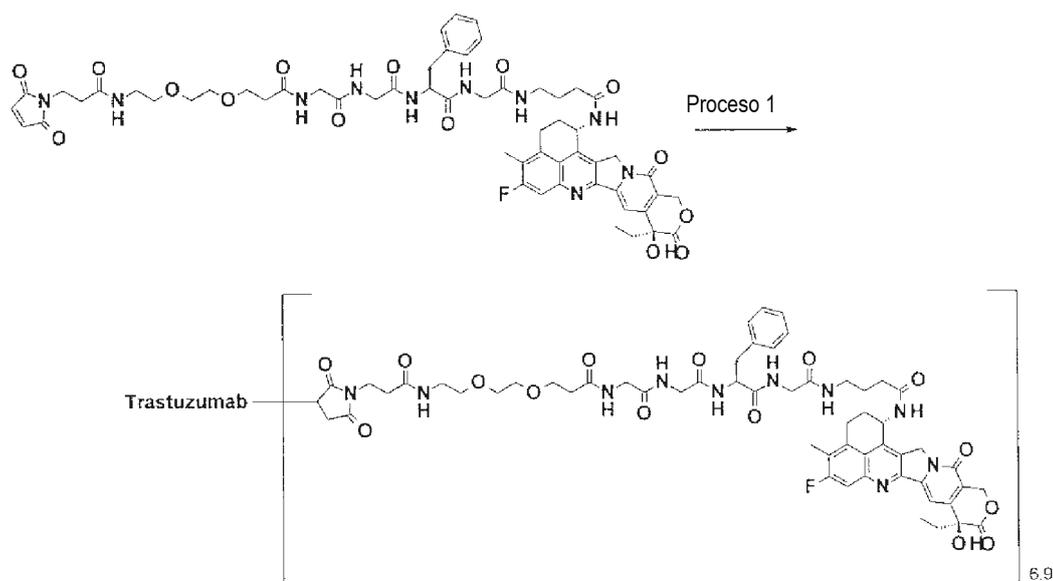
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D (se usó ABS como solución tampón) descrito en el procedimiento de producción 1 para proporcionar 6 ml de una solución que contiene el compuesto de interés.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,76 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 10,6 mg (85 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,6.

5 Ejemplo 7 Conjugado de fármaco-anticuerpo (7)

[Fórmula 33]



Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (7)

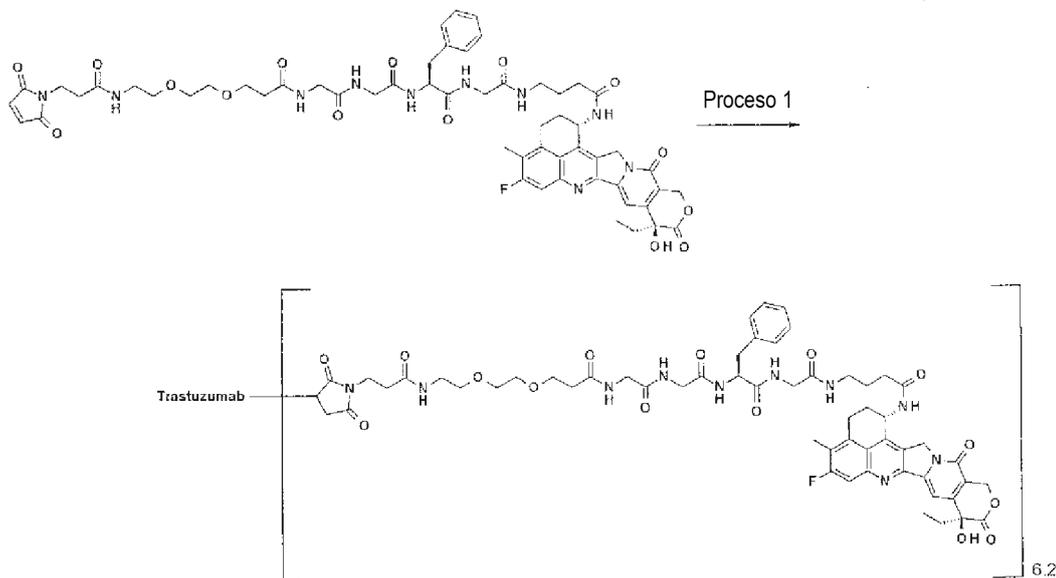
- 10 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción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

Caracterización fisicoquímica: Utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

- 25 Concentración de anticuerpo: 1,93 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 11,6 mg (93 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,9.

Ejemplo 8 Conjugado de fármaco-anticuerpo (8)

[Fórmula 34]

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

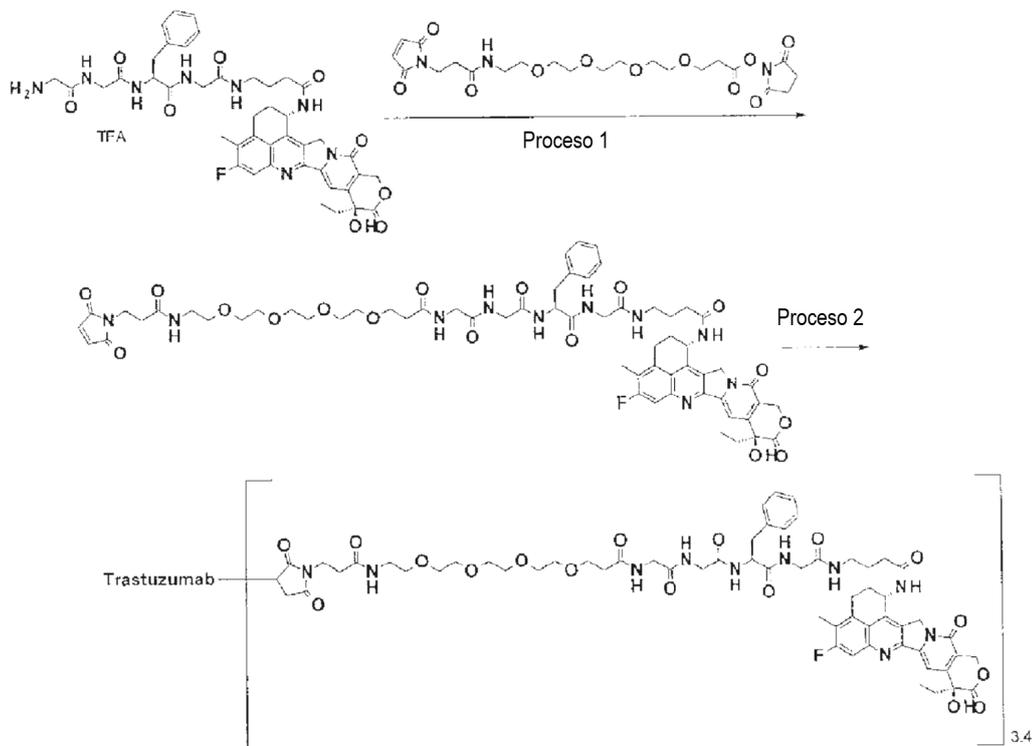
- 5 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a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

- 20 Caracterización fisicoquímica: Utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,50 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 8,55 mg (86 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,2.

Ejemplo 9 Conjugado de fármaco-anticuerpo (9)

[Fórmula 35]



5 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

10 El compuesto (90 mg, 0,107 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 2 se hizo reaccionar de la misma manera que en el proceso 3 del Ejemplo 2 utilizando diisopropil etilamina (18,7 µl, 0,107 mmol) en vez de trietilamina y N-succinimidil 1-maleinimida-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecan-19-oato (55,1 mg, 0,107 mmol) en vez de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo pálido (50 mg, 37 %).

15 RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,85 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,64-1,74 (2H, m), 1,77-1,90 (2H, m), 2,06-2,19 (4H, m), 2,27-2,32 (2H, m), 2,33-2,37 (2H, m), 2,38 (3H, s), 2,72-2,80 (3H, m), 2,96-3,19 (6H, m), 3,39-3,48 (10H, m), 3,52-3,75 (10H, m), 4,39-4,48 (1H, m), 5,14 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,38 (1H, d, J=17,0 Hz), 5,42 (1H, d, J=17,0 Hz), 5,52-5,58 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,98 (1H, s), 7,13-7,24 (5H, m), 7,29 (1H, s), 7,69 (1H, t, J=5,5 Hz), 7,78 (1H, d, J=10,9 Hz), 7,98-8,03 (2H, m), 8,10 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,16 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,23 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,44 (1H, d, J=8,6 Hz).

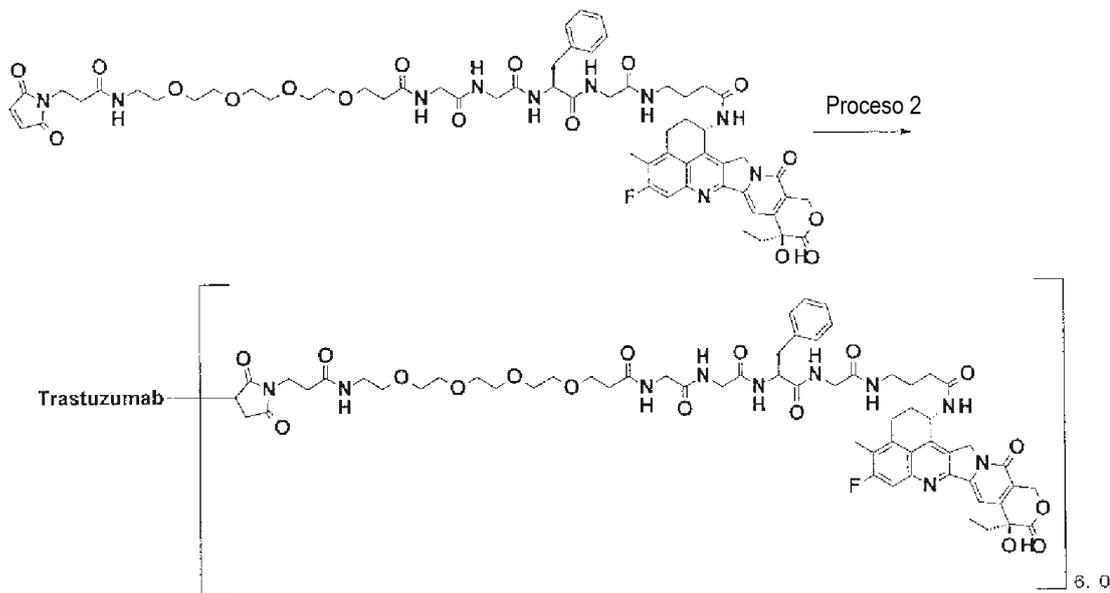
EM (CLEM) m/z: 1237 (M+H)⁺

Proceso 2: Conjugado de fármaco-anticuerpo (9)

20 Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 6. Concentración de anticuerpo: 1,75 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 10,5 mg (84 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,4.

Ejemplo 10 Conjugado de fármaco-anticuerpo (10)

[Fórmula 36]

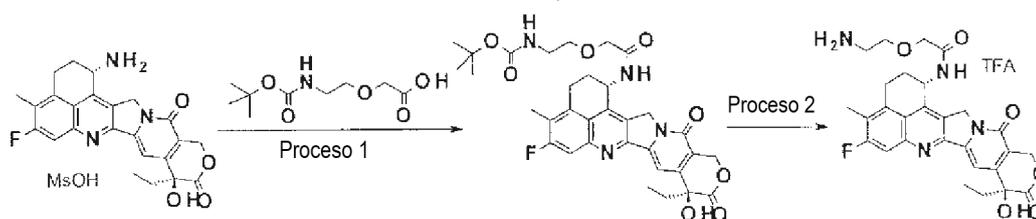


Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (10)

- 5 Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 9, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpo: 1,79 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 10,7 mg (86 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,0.

Ejemplos 11 Intermedio (11)

10 [Fórmula 37]



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

- 15 Se hizo reaccionar una sal de exatecano del ácido metanosulfónico (3,10 g, 5,47 mol) 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, pág. 292; 1,55 g, 6,01 mmol) en vez de ácido 4-(*terc*-butoxicarbonilamino)butanoico para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo pálido (2,56 g, 73 %).

- 20 RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,26 (9H, s), 1,81-1,91 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 3,08-3,26 (4H, m), 3,43-3,53 (2H, m), 4,00 (1H, d, J=15,1 Hz), 4,05 (1H, d, J=15,1 Hz), 5,14 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,22 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,40 (1H, d, J=16,6 Hz), 5,44 (1H, d, J=16,6 Hz), 5,59-5,66 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,86 (1H, t, J=5,4 Hz), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,49 (1H, d, J=9,1 Hz).

EM (CLEM) m/z: 637 (M+H)⁺

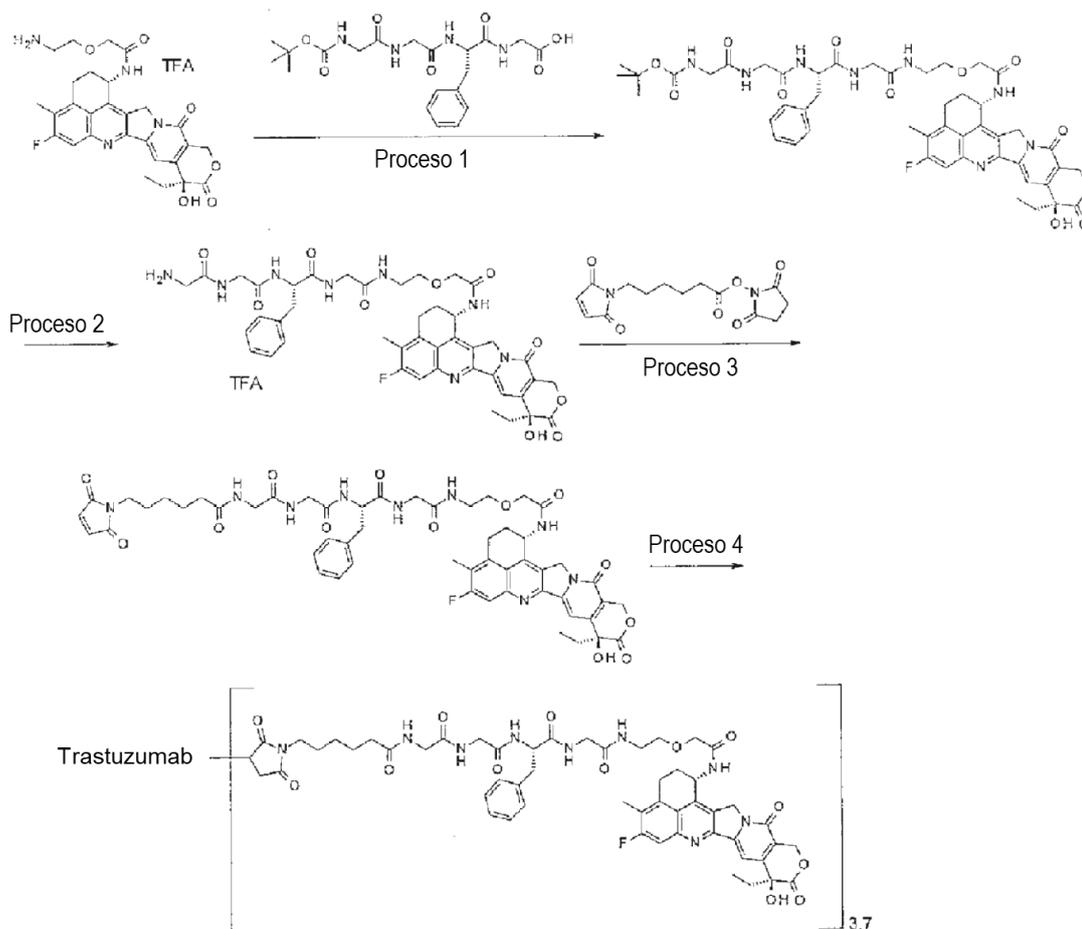
Proceso 2: 2-(2-Aminoetoxi)-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]acetamida

- 25 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 proporcionar la sal del ácido trifluoroacético del compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (1,50 g, cuantitativo). RMN¹H (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 (CLEM) m/z: 537 (M+H)⁺

Ejemplo 12 Conjugado de fármaco-anticuerpo (12)

[Fórmula 38]



10 Proceso 1: N-(*tert*-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]amino]-2-oxoetoxi)etil]glicinamida

15 El compuesto (554 mg, 0,85 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 11 se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 1 del Ejemplo 2 para proporcionar el compuesto del título (775 mg, 95 %). RMN¹H (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).
20 EM (CLEM) m/z: 955 (M+H)⁺

Proceso 2: 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

25 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 proporcionar la sal del ácido trifluoroacético del compuesto del título (588 mg, 92 %). RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,79-1,90 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H,

dd, J = 13,4, 10,1 Hz), 2,99 (1H, dd, J = 13,4, 4,3 Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,24-3,32 (3H, m), 3,41-3,71 (7H, m), 3,86 (1H, dd, J = 16,8, 5,8 Hz), 4,04 (2H, s), 4,52 (1H, td, J = 9,0, 4,1 Hz), 5,17 (1H, 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).

5 EM (CLEM) 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)metil]glicinamida

10 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 proporcionar el compuesto del título (162 mg, 62 %).

15 RMN¹H (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 (CLEM) m/z: 1048 (M+H)⁺

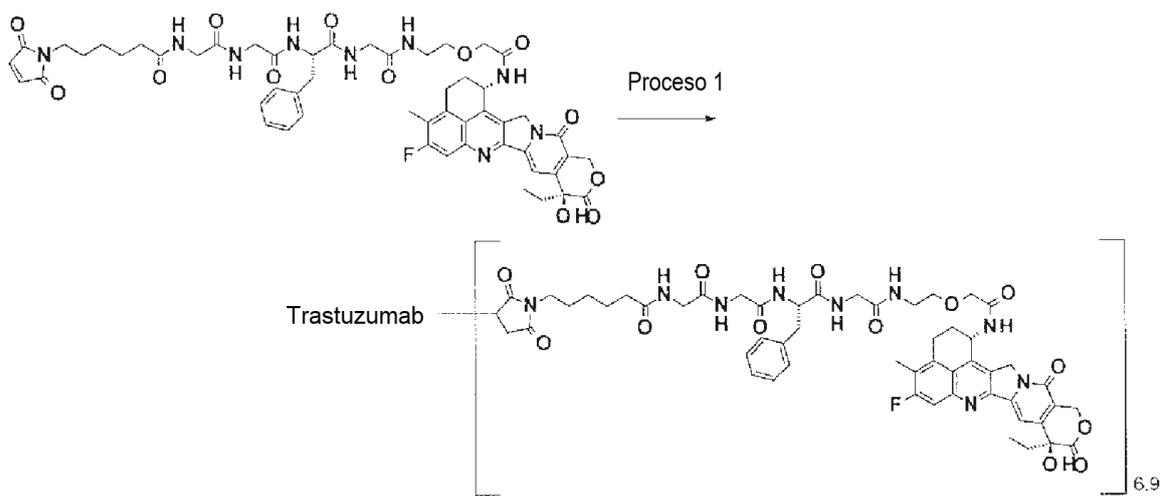
Proceso 4: Conjugado de fármaco-anticuerpo (12)

20 Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 3, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 6. La solución se concentró adicionalmente mediante el Procedimiento general A. Tras esto, utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 10,77 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 7,5 mg (60 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,7.

25 Ejemplo 13 Conjugado de fármaco-anticuerpo (13)

[Fórmula 39]



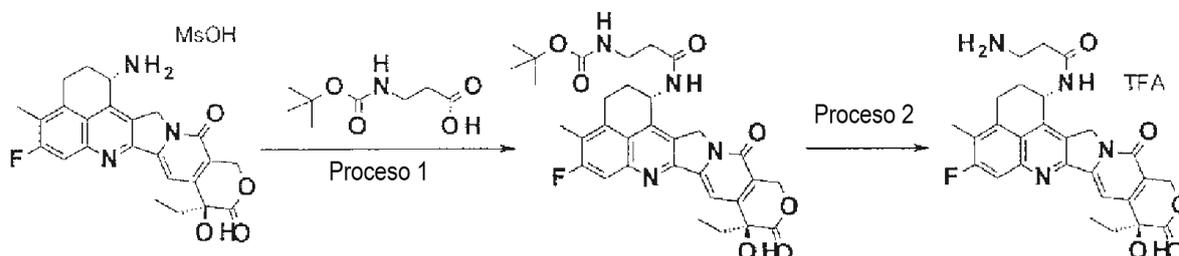
Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (13)

30 Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 3 del Ejemplo 12, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. La solución se concentró adicionalmente mediante el Procedimiento general A. Tras esto, utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 10,69 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 7,5 mg (60 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,9.

35

Ejemplos 14 Intermedio (14)

[Fórmula 40]



5 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]amino]-3-oxopropil)carbamato deterc-butilo

La sal de exatecano del ácido metanosulfónico (500 mg, 0,941 mmol) se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 1 del Ejemplo 1 utilizando N-(*terc*-butoxicarbonil)- β -alanina en vez del ácido 4-(*terc*-butoxicarbonilamino)butanoico para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color marrón amarillento (616 mg, cuantitativo).

10 RMN¹H (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)⁺

15 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

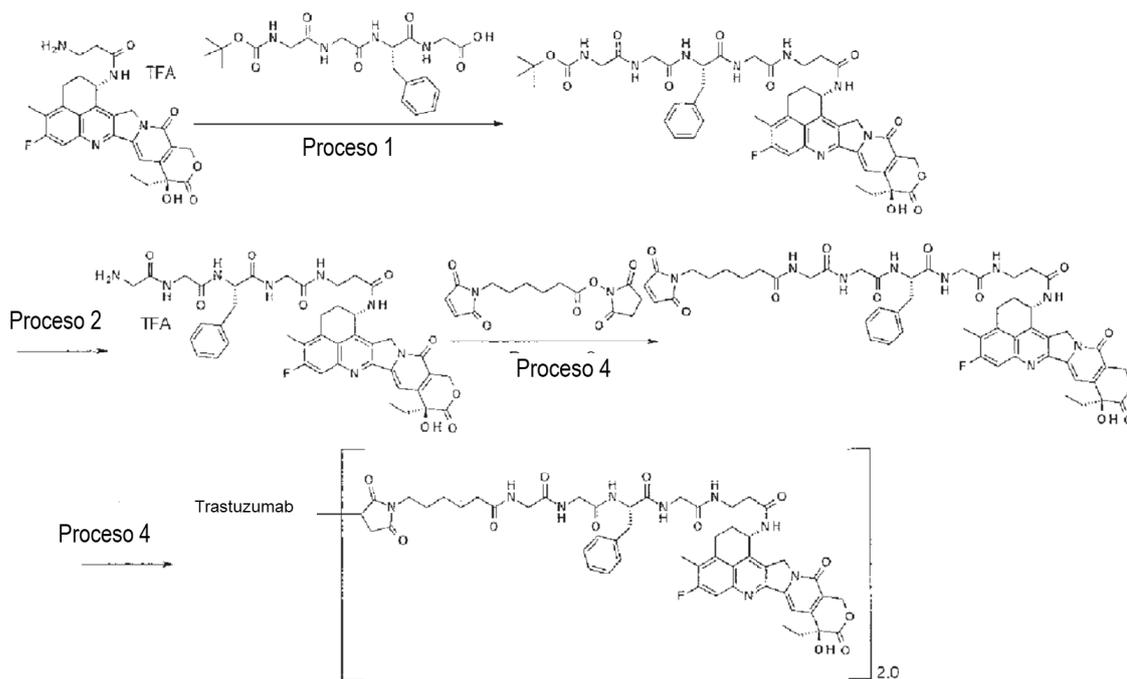
El compuesto obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 2 del Ejemplo 1 para proporcionar la sal del ácido trifluoroacético del compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (499 mg, 86 %).

20 RMN¹H (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)⁺

25 **Ejemplo 15 Conjugado de fármaco-anticuerpo (15)**

[Fórmula 41]



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

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

10 RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0,87 (3*H*, t, J=7,4 Hz), 1,27-1,42 (9*H*, m), 1,77-1,93 (2*H*, m), 2,06-2,22 (2*H*, m), 2,36 (2*H*, t, J=7,2 Hz), 2,40 (3*H*, d, J=1,6 Hz), 2,44-2,54 (2*H*, m), 2,76 (1*H*, dd, J = 14,5, 10,2 Hz), 3,02 (1*H*, dd, J = 13,9, 4,5 Hz), 3,12-3,22 (2*H*, m), 3,52 (6*H*, d, J=6,3 Hz), 4,42-4,54 (1*H*, m), 5,19 (1*H*, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1*H*, d, J=18,4 Hz), 5,42 (1*H*, dd, J = 18,4, 16,4 Hz), 5,57 (1*H*, dt, J = 8,7, 4,4 Hz), 6,53 (1*H*, s), 6,98 (1*H*, t, J=5,9 Hz), 7,14-7,28 (5*H*, m), 7,31 (1*H*, s), 7,77-7,84 (1*H*, m), 7,91 (1*H*, t, J=5,5 Hz), 8,16 (1*H*, d, J=7,8 Hz), 8,27 (1*H*, t, J=5,1 Hz), 8,52 (1*H*, d, J=9,0 Hz).

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

15 El compuesto (624 g, 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 proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (626 mg, 92 %).

20 RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0,87 (3*H*, t, J=7,4 Hz), 1,86 (2*H*, tt, J = 14,5, 7,2 Hz), 2,07-2,22 (2*H*, m), 2,36 (2*H*, t, J=7,2 Hz), 2,40 (3*H*, s), 2,44-2,54 (2*H*, m), 2,75 (1*H*, dd, J = 13,7, 9,8 Hz), 3,04 (1*H*, dd, J = 13,7, 4,3 Hz), 3,12-3,22 (2*H*, m), 3,58 (2*H*, d, J=4,7 Hz), 3,69 (3*H*, td, J = 11,2, 5,7 Hz), 3,87 (1*H*, dd, J = 17,0, 5,7 Hz), 4,54 (1*H*, m, J = 17,8, 4,5 Hz), 5,19 (1*H*, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1*H*, d, J=18,8 Hz), 5,43 (2*H*, s), 5,51-5,60 (1*H*, m), 6,55 (1*H*, s), 7,14-7,29 (5*H*, m), 7,32 (1*H*, s), 7,81 (1*H*, d, J=10,9 Hz), 7,88 (1*H*, t, J=5,7 Hz), 7,97 (3*H*, s a), 8,29-8,38 (2*H*, m), 8,50 (1*H*, t, J=5,7 Hz), 8,55 (1*H*, d, J=8,6 Hz).
EM (IEN) m/z: 825 (M+H)⁺

25 Proceso 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-*il*)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanilglicil-N-[(1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-*il*]-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 proporcionar el compuesto del título como un sólido (14,0 mg, 21 %).

30 RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0,86 (3*H*, t, J=7,2 Hz), 1,12-1,22 (2*H*, m), 1,39-1,51 (4*H*, m), 1,79-1,91 (2*H*, m), 2,02-2,20 (2*H*, m), 2,07 (2*H*, t, J=7,4 Hz), 2,30-2,42 (4*H*, m), 2,40 (3*H*, s), 2,78 (1*H*, dd, J = 14,1, 9,4 Hz), 3,02 (1*H*, dd, J = 14,7, 4,9 Hz), 3,12-3,21 (2*H*, m), 3,26-3,42 (2*H*, m), 3,50-3,80 (6*H*, m), 4,40-4,51 (1*H*, m), 5,19 (1*H*, d, J=19,6 Hz), 5,26 (1*H*, d, J=19,2 Hz), 5,42 (2*H*, s a), 5,51-5,62 (1*H*, m), 6,53 (1*H*, s), 6,99 (2*H*, s), 7,13-7,28 (5*H*, m), 7,31 (1*H*, s), 7,74-7,84 (2*H*, m), 8,01 (1*H*, t, J=5,3 Hz), 8,06 (1*H*, t, J=5,7 Hz), 8,14 (1*H*, d, J=8,2 Hz), 8,25 (1*H*, t, J=5,7 Hz), 8,53 (1*H*, d, J=8,6 Hz).

35

EM (IEN) m/z: 1018 (M+H)⁺

Proceso 4: Conjugado de fármaco-anticuerpo (15)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, 1,37 mlmg⁻¹ cm⁻¹). La solución (1,0 ml) se introdujo en un tubo de polipropileno de 2 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,0155 ml; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,050 ml). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

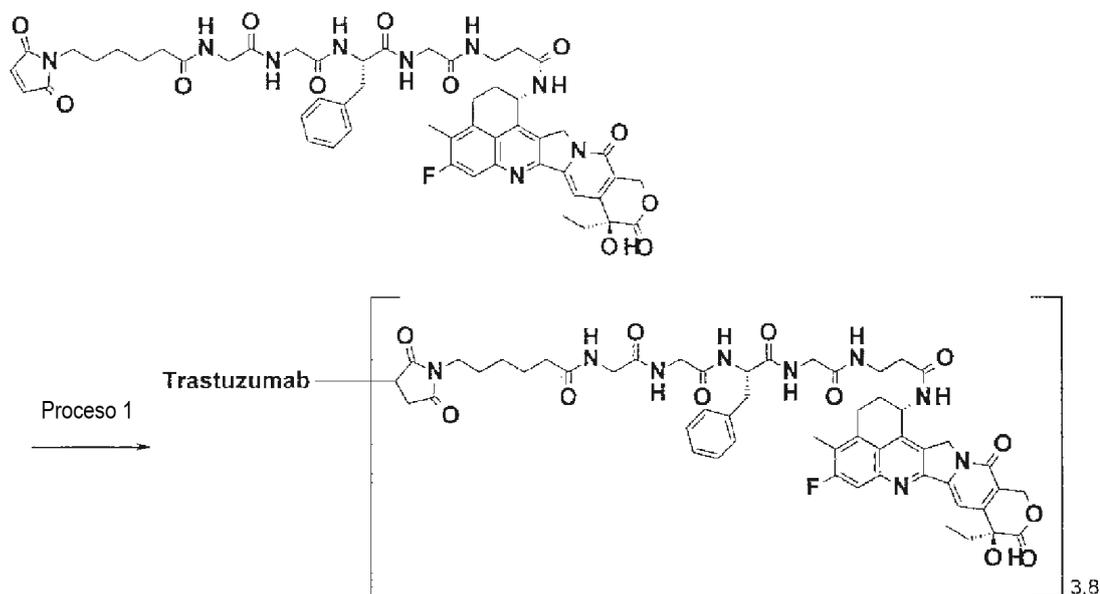
Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: tras incubar la solución a 22 °C durante 10 minutos, una solución de DMSO (0,0311 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 3 se añadió a lo anterior y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,00622 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a lo anterior y se incubó a 22 °C para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante 20 minutos más. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D-1 (se usó PBS6.0 como solución tampón) para proporcionar 6 ml de una solución que contenía el conjugado fármaco-anticuerpo del título.

Caracterización fisicoquímica: Utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,18 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 7,08 mg (71 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 2,0.

Ejemplo 16 Conjugado de fármaco-anticuerpo (16)

[Fórmula 42]



Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (16)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, 1,37 mlmg⁻¹ cm⁻¹). La solución (1,0 ml) se introdujo en un tubo de polipropileno de 2 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,0311 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,050 ml). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

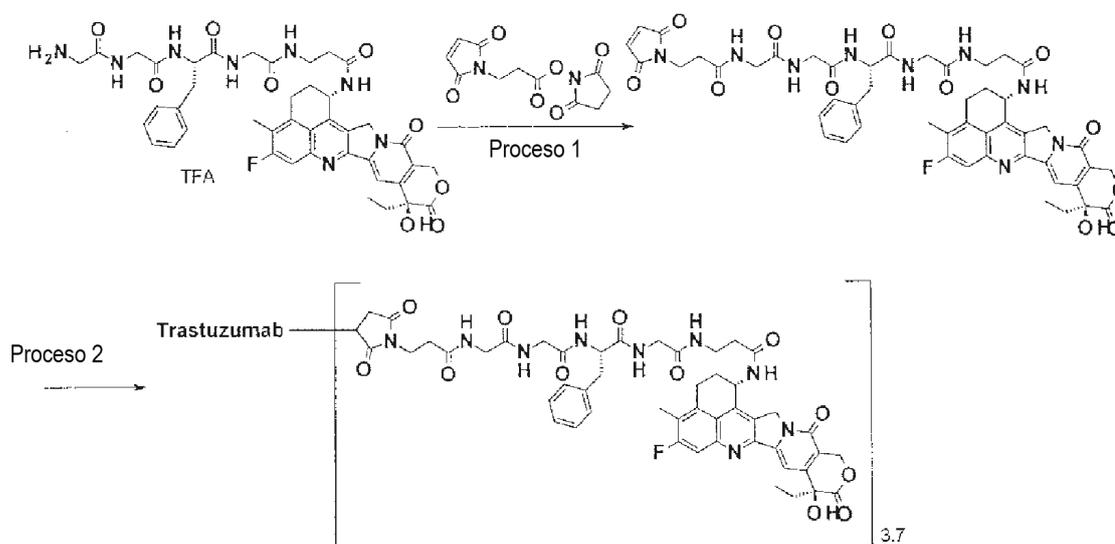
Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: tras incubar la solución a 22 °C durante 10 minutos, una solución de DMSO (0,0622 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto

obtenido en el Proceso 3 del Ejemplos 15 se añadió a lo anterior y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,0124 ml; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a lo anterior y se incubó a 22 °C para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante 20 minutos más. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D-1 (se usó PBS6.0 como solución tampón) para proporcionar 6 ml de una solución que contenía el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,03 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 6,18 mg (62 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,8.

10 Ejemplo 17 Conjugado de fármaco-anticuerpo (17)

[Fórmula 43]



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 15 se hizo reaccionar de la misma manera como en el Proceso 3 del Ejemplo 2 utilizando propionato de N-succinimidil 3-maleimida en vez de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo pálido (36,0 mg, 57 %).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,85 (2H, dt, J = 14,4, 7,5 Hz), 2,05-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,30-2,44 (5H, m), 2,73-2,84 (1H, m), 3,02 (1H, dd, J = 13,9, 4,5 Hz), 3,17 (3H, d, J=5,1 Hz), 3,26-3,40 (2H, m), 3,41-3,81 (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)⁺

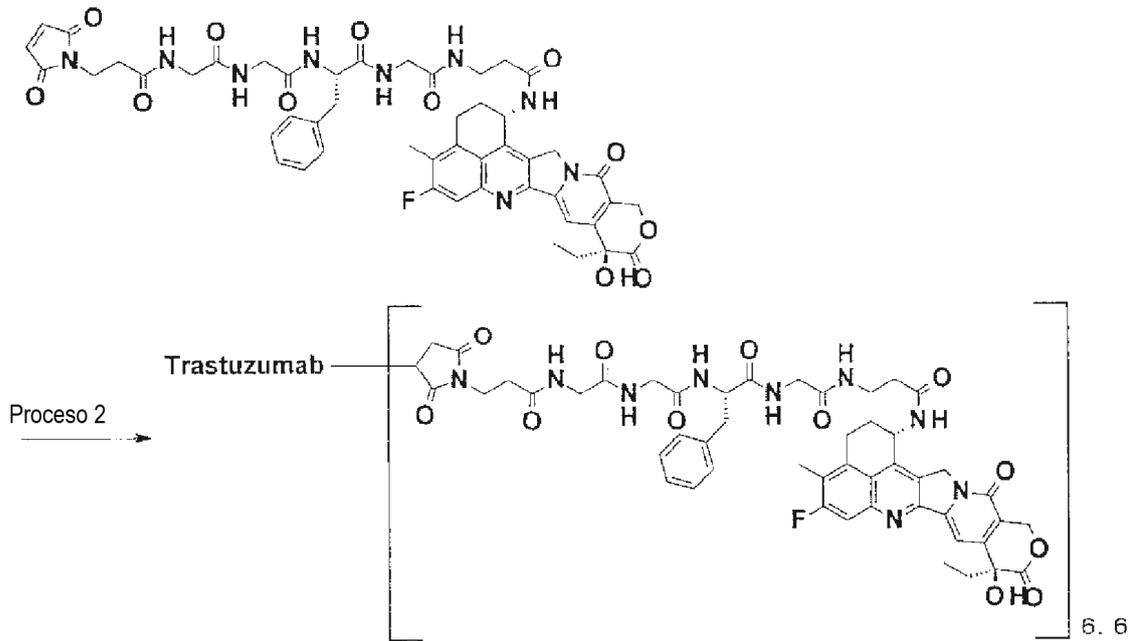
Proceso 2: Conjugado de fármaco-anticuerpo (17)

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

Concentración de anticuerpo: 1,74 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 10,4 mg (83 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,7.

Ejemplo 18 Conjugado de fármaco-anticuerpo (18)

[Fórmula 44]

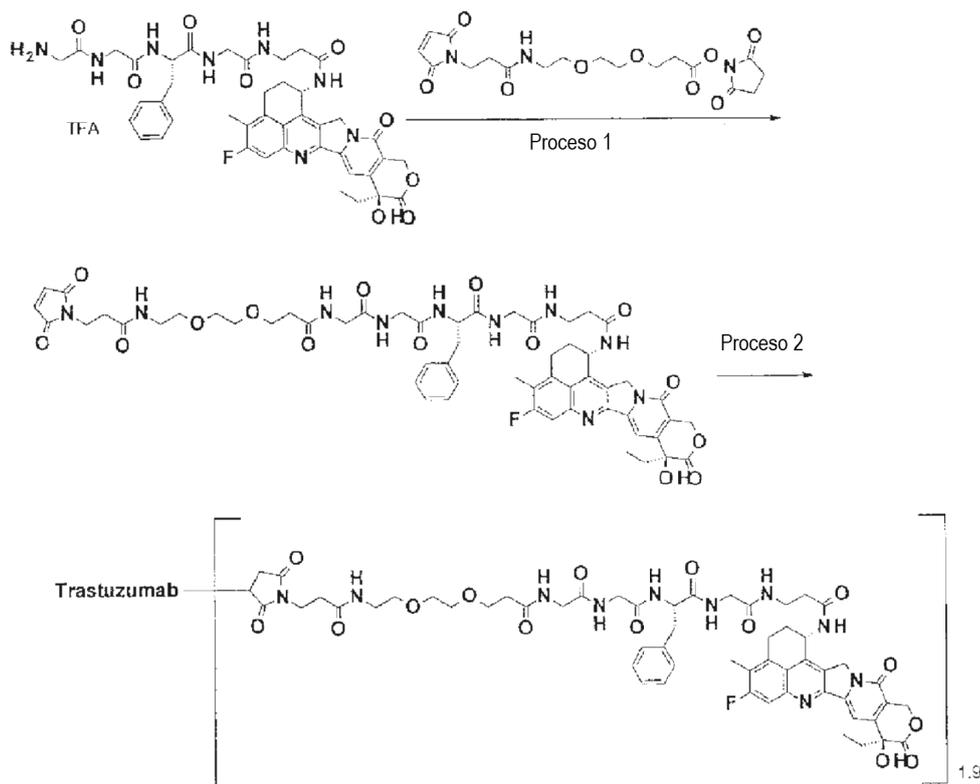


Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (18)

- 5 Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 17, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpo: 1,98 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 11,9 mg (95 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,6.

Ejemplo 19 Conjugado de fármaco-anticuerpo (19)

10 [Fórmula 45]



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

- 5 El compuesto (60,0 mg, 0,0646 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 15 se hizo reaccionar de la misma manera que en el Proceso 3 del Ejemplo 2 utilizando N-succinimidil 3-(2-(2-(3-maleimidapropanamida)etoxi)etoxi)propanoato en vez de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para proporcionar el compuesto del título como un sólido (23,0 mg, 31 %). RMN¹H (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)⁺

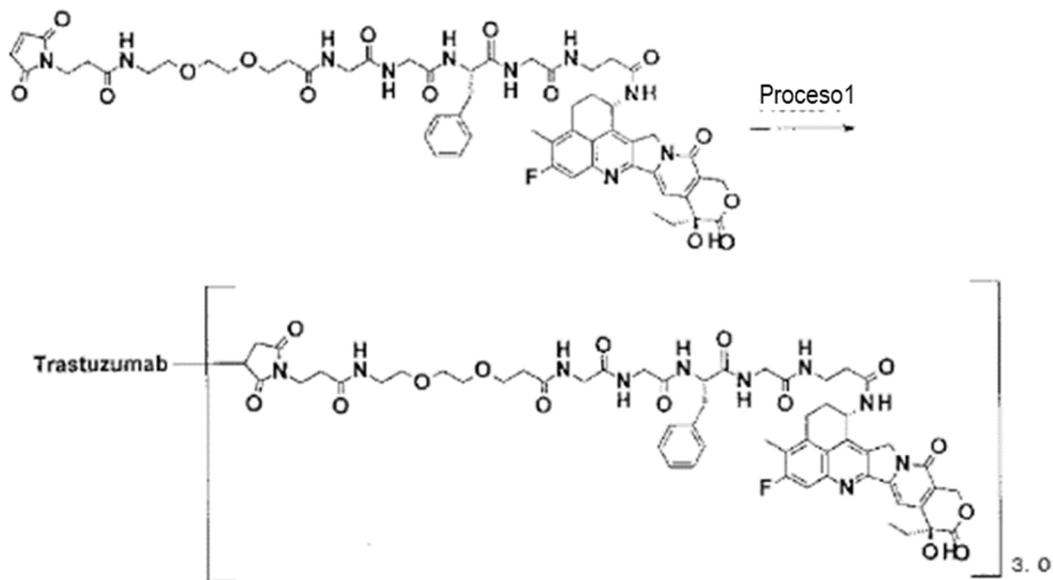
Proceso 2: Conjugado de fármaco-anticuerpo (19)

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

Concentración de anticuerpo: 1,60 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 9,6 mg (77 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 1,9.

Ejemplo 20 Conjugado de fármaco-anticuerpo (20)

[Fórmula 46]

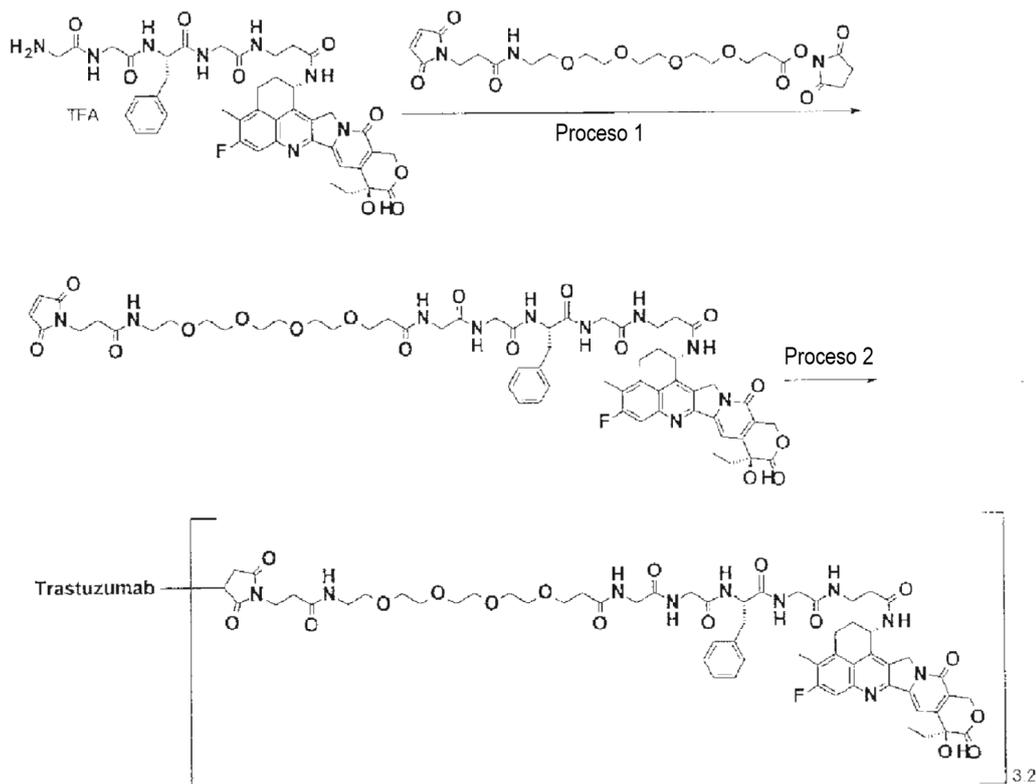


Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (20)

Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 19, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpo: 1,69 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 10,1 mg (81 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,0.

Ejemplo 21 Conjugado de fármaco-anticuerpo (21)

[Fórmula 47]



10

Proceso 1: N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oi]lglicilglicil-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 15 se hizo reaccionar de la misma manera que en el proceso 3 del Ejemplo 2 utilizando N-succinimidil 1-maleinimida-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecanoato en vez de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para proporcionar el compuesto del título como un sólido (23,0 mg, 29 %).

RMN¹H (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=6,6 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)⁺

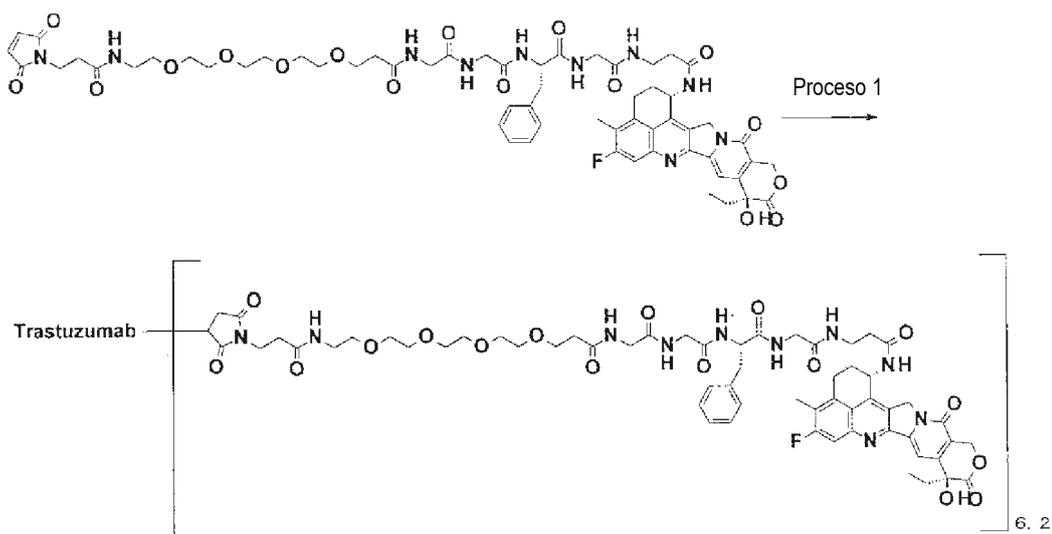
Proceso 2: Conjugado de fármaco-anticuerpo (21)

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

Concentración de anticuerpo: 1,77 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 10,6 mg (85 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,2.

Ejemplo 22 Conjugado de fármaco-anticuerpo (22)

[Fórmula 48]

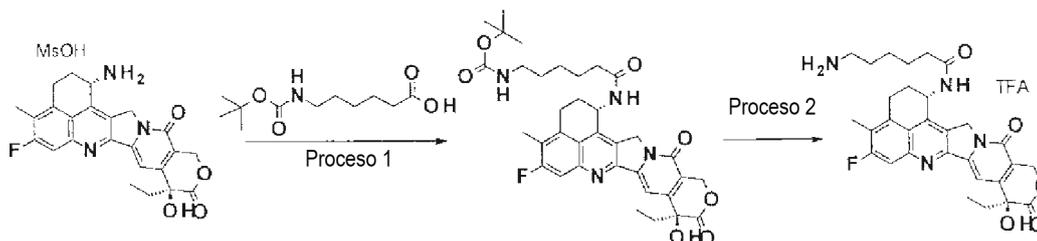


Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (22)

Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 21, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpo: 1,89 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 11,3 mg (90 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,2.

Ejemplos 23 Intermedio (23)

[Fórmula 49]



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]amino]-6-oxohexil]carbamato de *tert*-butilo

5 La sal de exatecano del ácido metanosulfónico (0,500 g, 0,882 mmol) se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 1 del Ejemplo 1 utilizando ácido 6-(*tert*-butoxicarbonilamino)hexanoico en vez del ácido 4-(*tert*-butoxicarbonilamino)butanoico para proporcionar el compuesto del título (0,620 g, cuantitativo).

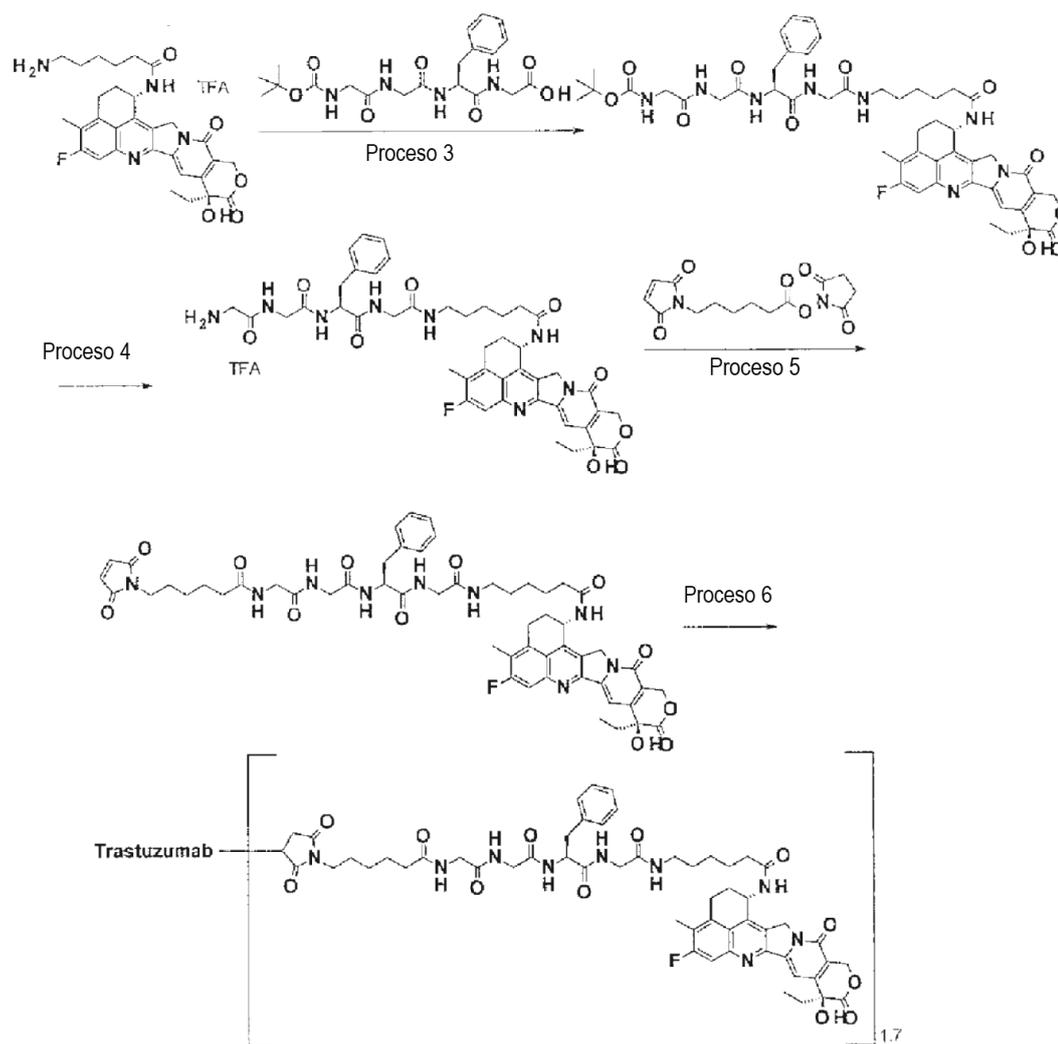
10 RMN¹H (DMSO-*d*₆) δ: 0,83 (3H, t, J=7,8 Hz), 1,14-1,28 (2H, m), 1,31 (9H, s), 1,47-1,61 (2H, m), 1,75-1,89 (2H, m), 2,04-2,17 (4H, m), 2,35 (3H, s), 2,81-2,88 (2H, m), 3,09-3,16 (2H, m), 5,10 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,16 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,39 (2H, s), 5,48-5,55 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,73-6,78 (1H, m), 7,26 (1H, s), 7,74 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,39 (1H, d, J=9,0 Hz).

Proceso 2: 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

15 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 proporcionar la sal del ácido trifluoroacético del compuesto del título (0,342 g, 84 %).
 RMN¹H (DMSO-*d*₆) 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).

Ejemplo 24 Conjugado de fármaco-anticuerpo (24)

20 [Fórmula 50]



Proceso 1: N-(*tert*-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-oxohexil)glicinamida

- 5 El compuesto (0,170 g, 0,516 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 23 se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 1 del Ejemplo 2 para proporcionar el compuesto del título (0,225 g, 91 %).
 RMN¹H (DMSO-*d*₆) 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),
 10 7,02 (1H, t, J=6,1 Hz), 7,11-7,28 (5H, m), 7,33 (1H, s), 7,63-7,69 (1H, m), 7,82 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,90-7,96 (1H, m), 8,17 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,28 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,46 (1H, d, J=9,0 Hz).

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

- 15 El compuesto (0,105 g, 0,108 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 2 del Ejemplo 2 para proporcionar el compuesto del título (0,068 mg, 65 %).
 RMN¹H (DMSO-*d*₆) δ: 0,89 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,15-1,67 (6H, m), 1,79-1,97 (2H, m), 2,08-2,24 (4H, m), 2,42 (3H, s), 2,76-2,82 (1H, m), 3,00-3,10 (5H, m), 3,19 (1H, s), 3,50-3,63 (2H, m), 3,64-3,76 (3H, m), 3,84-3,92 (1H, m), 4,51-4,59 (1H, m), 5,17 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,24 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,44 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, 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).
 20 m).

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

El compuesto (58 mg, 0,060 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el

Proceso 3 del Ejemplo 2 para proporcionar el compuesto del título (39 mg, 62 %).

RMN¹H (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 4: Conjugado de fármaco-anticuerpo (24)

- 10 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, 1,37 mlmg⁻¹ cm⁻¹). La solución (9,0 ml) se introdujo en un tubo de polipropileno de 50 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,140 ml; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,450 ml). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

- 20 Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: tras incubar la solución a 22 °C durante 10 minutos, una solución de DMSO (0,280 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto en el Proceso 3 se añadió a lo anterior y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,0559 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a lo anterior y se incubó a 22 °C para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante 20 minutos más.

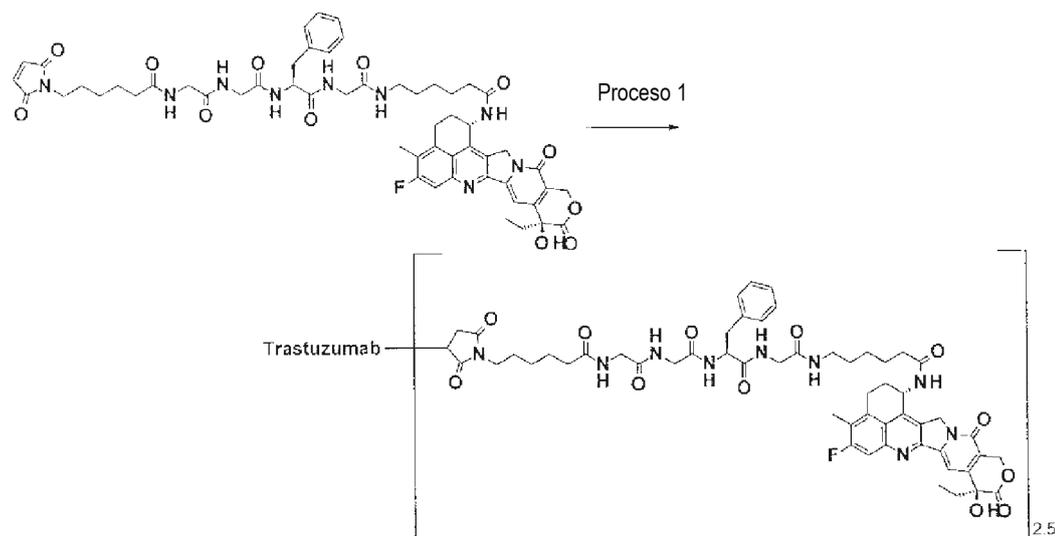
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D-1 (se usó PBS7.4 como solución tampón) para proporcionar una solución que contenía el conjugado de fármaco-anticuerpo del título.

- 25 Caracterización fisicoquímica: Utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 3,30 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 53,5 mg (59 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 1,7.

Ejemplo 25 Conjugado de fármaco-anticuerpo (25)

30 [Fórmula 51]



Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (25)

- 35 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, 1,37 mlmg⁻¹ cm⁻¹). La solución (9,0 ml) se introdujo en un tubo de polipropileno de 50 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,280 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,450 ml). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del

anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

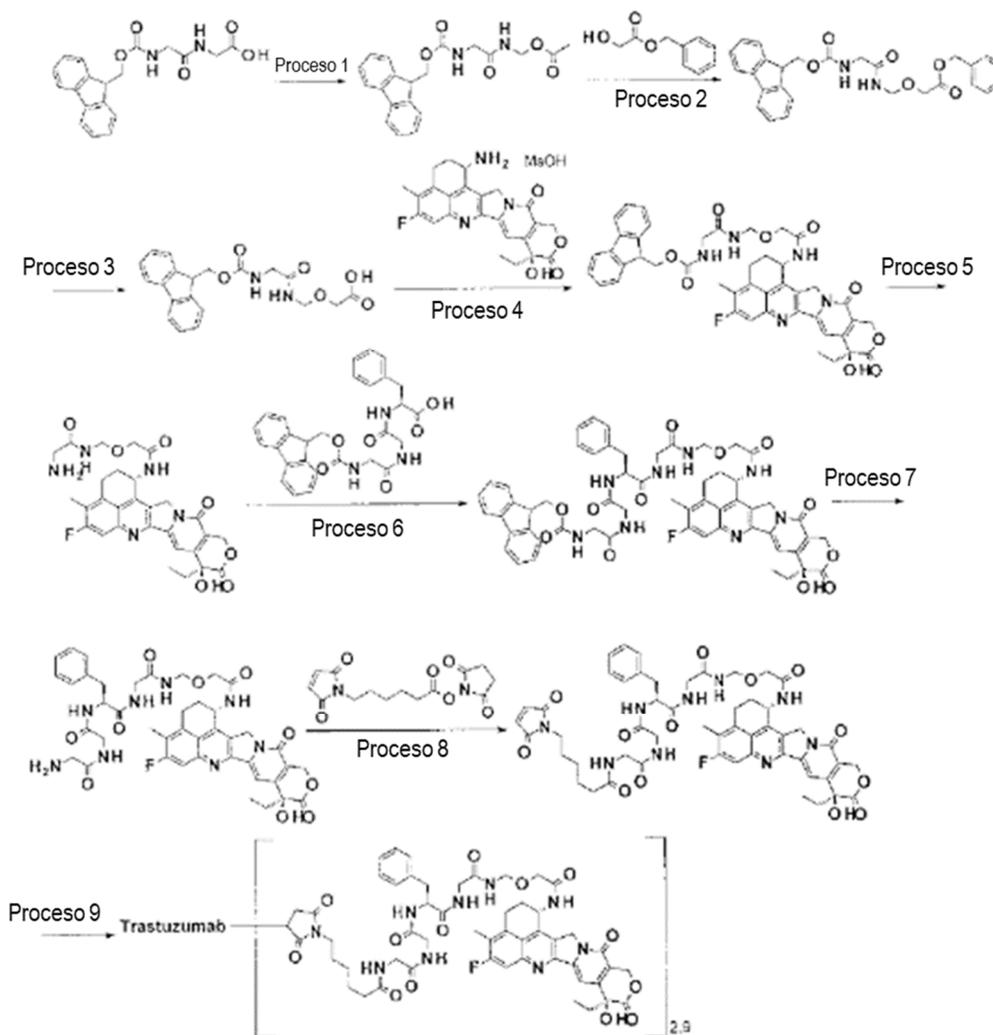
Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: tras incubar la solución a 22 °C durante 10 minutos, una solución de DMSO (0,559 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto en el Proceso 3 del Ejemplo 24 se añadió a lo anterior y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,112 ml; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a lo anterior y se incubó a 22 °C para terminar la reacción y del enlazador de fármaco durante 20 minutos más. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D-1 (se usó PBS6.0 como solución tampón) para proporcionar una solución que contenía el conjugado de fármaco-anticuerpo del título.

- 5
- 10 Caracterización fisicoquímica: Utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 10,65 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 55,1 mg (61 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 2,5.

Ejemplo 26 Conjugado de fármaco-anticuerpo (26)

- 15 [Fórmula 52]



Proceso 1: Acetato de ((N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil)amino)metilo

A una mezcla que contenía N-9-fluorenilmetoxicarbonilglicilglicina (4,33 g, 12,2 mmol), tetrahidrofurano (THF; 120 ml), y tolueno (40,0 ml), piridina (1,16 ml, 14,7 mmol) y tetraacetato de plomo (6,84 g, 14,7 mmol) se añadieron y calentaron a reflujo durante 5 horas. Después de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, las sustancias insolubles

- 20

se eliminaron mediante filtración en Celite, y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua y solución saturada de salmuera, y a continuación la capa acuosa se secó con sulfato de magnesio anhidro. Una vez que el disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 9 : 1 (v/v) - acetato de etilo] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (3,00 g, 67 %).

5 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).

Proceso 2: N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil]amino]metoxi]acetato de bencilo

10 A una solución en THF (40,0 ml) del compuesto (3,68 g, 10,0 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior y glicolato de bencilo (4,99 g, 30,0 mmol), se añadió *tert*-butóxido de potasio (2,24 g, 20,0 mmol) a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución de reacción se cargó con acetato de etilo y agua a 0 °C y se extrajo con acetato de etilo y cloroformo. La capa orgánica obtenida se secó con sulfato sódico y se filtró. El disolvente se retiró a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en dioxano (40,0 ml) y agua (10,0 ml), se cargó con hidrogenocarbonato de sodio (1,01 g, 12,0 mmol) y cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (2,59 g, 10,0 mmol), y se agitó 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 con sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 100 : 0 (v/v) - 0 : 100] para proporcionar el compuesto del título en forma de una sustancia oleosa incolora (1,88 g, 40 %).

20 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]metoxi]acético

25 El compuesto (1,88 g, 3,96 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior se disolvió en etanol (40,0 ml) y acetato de etilo (20,0 ml). Tras añadir catalizador de paladio sobre carbono (376 mg), se agitó bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 2 horas. Las sustancias insolubles se eliminaron mediante filtración con Celite, y el disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (1,52 g, cuantitativo).

30 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: (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)carbamatato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

35 Con enfriamiento de hielo, a una solución de N,N-dimetilformamida (10,0 ml) de la sal del ácido metanosulfónico de exatecano (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'-diciclohexilcarbodiimida (0,143 g, 0,693 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo: metanol: agua = 7: 3 : 1 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color marrón 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).

45 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

50 A una solución en N,N-dimetilformamida (11,0 ml) del compuesto (0,881 g, 1,10 mmol) obtenido en el Proceso 4 anterior, se añadió piperidina (1,1 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar una mezcla que contenía el compuesto del título. La mezcla se utilizó en 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

55 Con enfriamiento de hielo, a una solución en 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 consulta n.º 2002-60351; 0,440 g, 0,878 mmol), se añadió N,N'-diciclohexilcarbodiimida (0,181 g, 0,878 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El

disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 9:1 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color naranja pálido (0,269 g, 58 %).

EM (IEN) m/z: 1063 (M+H)⁺

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

10

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

15

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,83 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,09-1,21 (2H, m), 1,33-1,47 (4H, m), 1,75-1,90 (2H, m), 2,00-2,23 (4H, m), 2,36 (3H, s), 2,69-2,81 (1H, m), 2,94-3,03 (1H, m), 3,06-3,22 (2H, m), 3,23-3,74 (6H, m), 3,98 (2H, s), 4,39-4,50 (1H, m), 4,60 (2H, d, J=6,7 Hz), 5,17 (2H, s), 5,39 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,96 (2H, s), 7,11-7,24 (5H, m), 7,28 (1H, s), 7,75 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,97 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,09 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,27 (1H, t, J=6,5 Hz), 8,48 (1H, d, J=9,0 Hz), 8,60 (1H, t, J=6,5 Hz). EM (IEN) m/z: 1034 (M+H)⁺

20

Proceso 9: Conjugado de fármaco-anticuerpo (26)

25

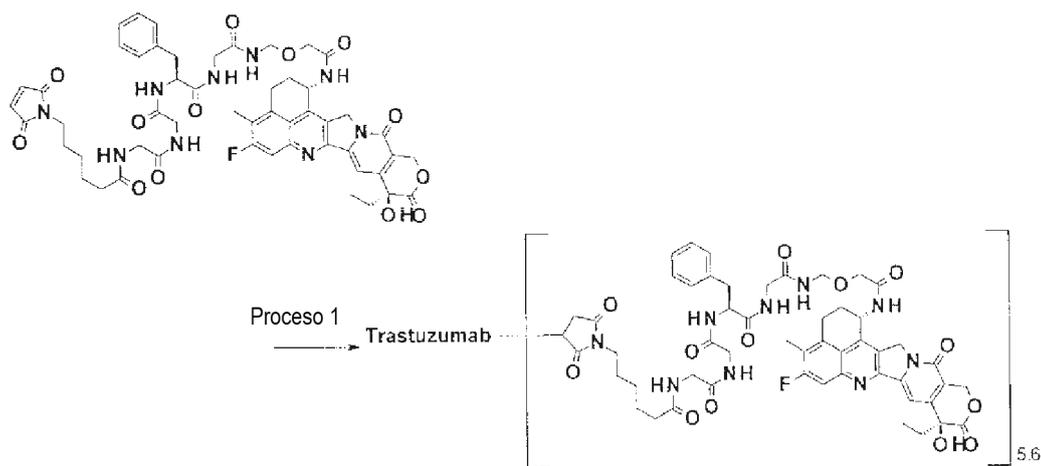
Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 8 anterior, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 2 del Ejemplo 6.

Concentración de anticuerpo: 1,61 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 9,7 mg (77 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 2,9.

Ejemplo 27 Conjugado de fármaco-anticuerpo (27)

30

[Fórmula 53]



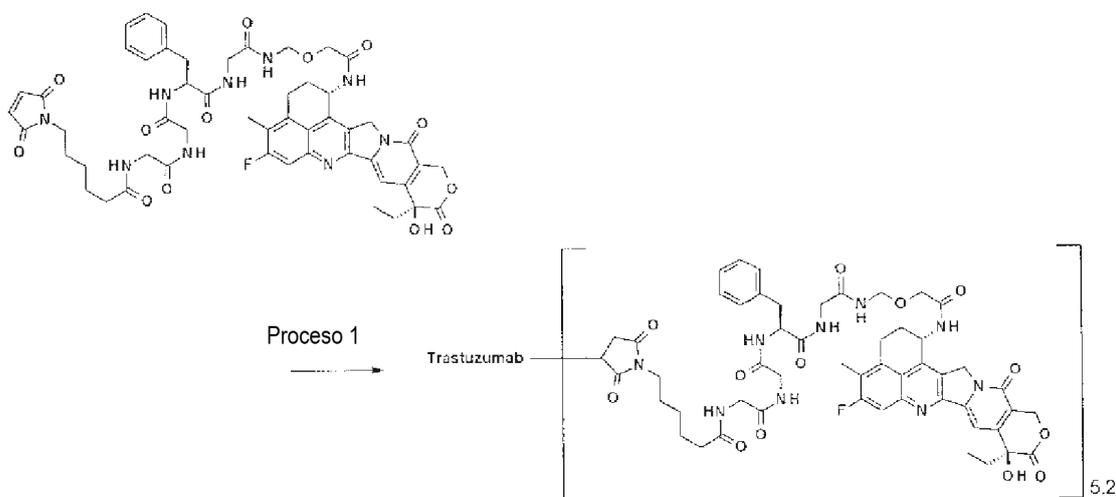
Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (27)

35

Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 26, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpo: 1,58 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 9,5 mg (76 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,6.

Ejemplo 28 Conjugado de fármaco-anticuerpo (28)

[Fórmula 54]



Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (28)

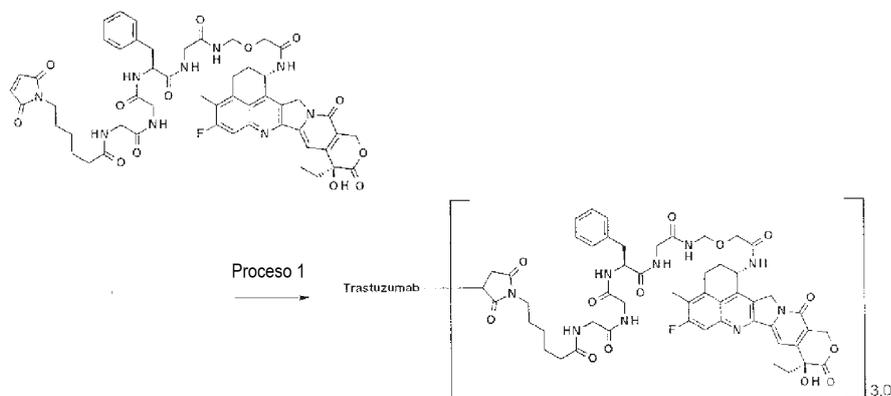
5 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, $1,48 \text{ mlmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (1,25 ml) se colocó en dos tubos de polipropileno de 1,5 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,039 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,0625 ml). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,4 \pm 0,1$, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora. Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Tras añadir DMSO (0,072 ml) y una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto en el Proceso 8 del Ejemplo 26 (0,078 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, se agitó esta utilizando un rotor de tubos para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa de NAC 100 mM (0,0155 ml) se añadió a lo anterior y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante 20 minutos más.

10 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D-1 (se usó ABS como solución tampón) para proporcionar 11,7 ml de una solución que contiene el compuesto de interés. Caracterización fisicoquímica: Utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

15 Concentración de anticuerpo: 1,60 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 18,7 mg (94 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,2.

Ejemplo 29 Conjugado de fármaco-anticuerpo (29)

[Fórmula 55]



Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (29)

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

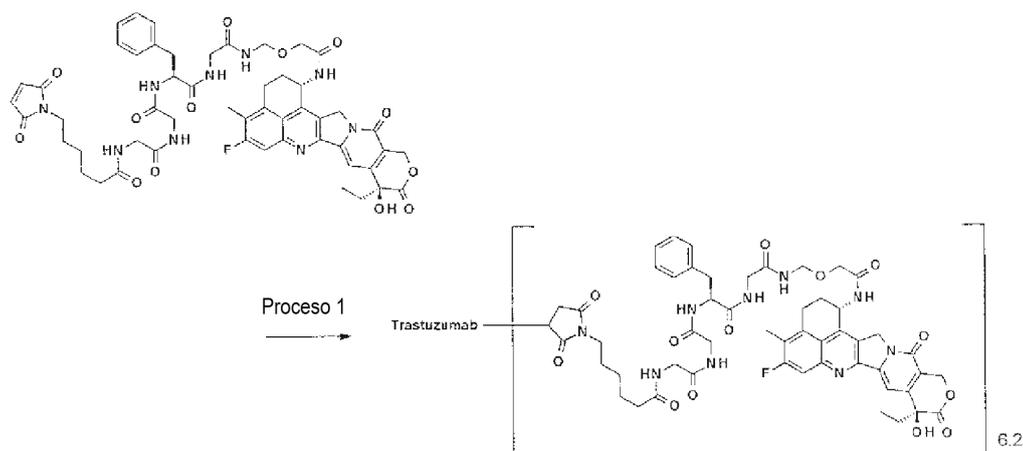
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D (se usó ABS como solución tampón) para proporcionar 24 ml de una solución que contiene el compuesto de interés.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos generales E y F (se utilizaron $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido), y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,77 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 42 mg (85 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento general E: 3,0, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento general F: 3,4.

Ejemplo 30 Conjugado de fármaco-anticuerpo (30)

[Fórmula 56]



Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (30)

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

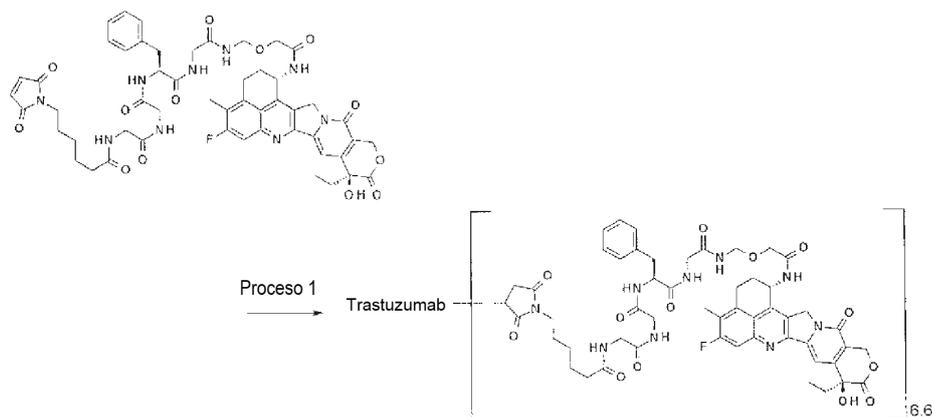
Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Tras añadir una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (0,370 ml; 8,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) a la solución anterior a temperatura ambiente, Esta se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 15 °C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,056 ml) de NAC 100 mM se añadió a lo anterior y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante 20 minutos más. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D (se usó ABS como solución tampón) para proporcionar 24 ml de una solución que contiene el compuesto de interés.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos generales E y F (se usaron $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido), y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,92 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 46 mg (92 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento general E: 6,2, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento general F: 7,1.

5 Ejemplo 31 Conjugado de fármaco-anticuerpo (31)

[Fórmula 57]



Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (31)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, $1,48 \text{ mlmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (50.00 ml) se colocó en un recipiente de polipropileno y se cargó con una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M dipotásico (0,745 ml) a temperatura ambiente con agitación y a continuación con una solución acuosa de TCEP 10 mM (1,868 ml; 5,4 equivalentes por molécula de anticuerpo). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, la agitación se finalizó, y el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37°C durante 1 hora.

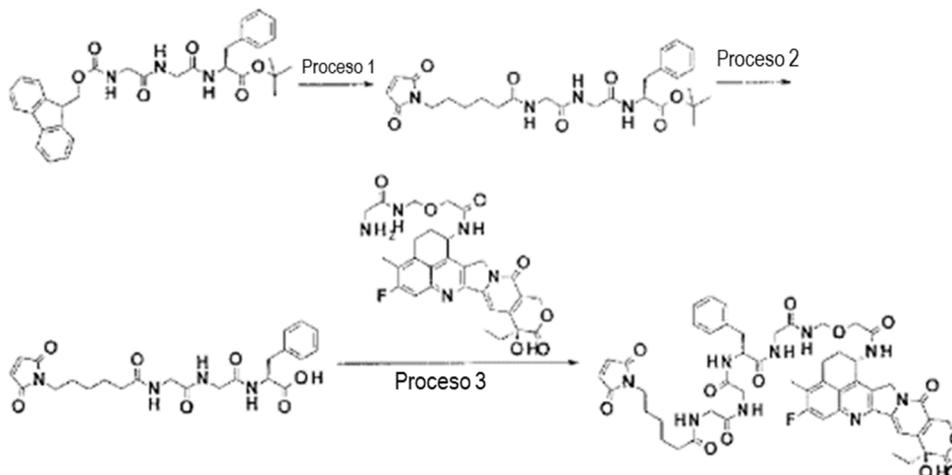
Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Después de enfriar la solución anterior a 15°C , una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (2,958 ml; 8,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadieron gradualmente gota a gota al anterior. Mientras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

Purificación: Añadiendo gradualmente una solución acuosa de ácido acético al 20 % (aproximadamente 0,25 ml) y ABS (50 ml) a la solución anterior con agitación, se ajustó el pH del filtrado a $5,5 \pm 0,1$. Esta solución se sometió a microfiltración (Millipore Corp., filtro Millex-HV, $0,45 \mu\text{m}$, membrana PVDF) para eliminar la materia blanquecina. Este filtrado se sometió a purificación mediante ultrafiltración usando un aparato de ultrafiltración compuesto por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Ultracell 50 kDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump modelo 77521-40, Pump Head modelo 7518-00), y un tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Específicamente, mientras el ABS se añadió gota a gota (un total de 800 ml) como solución tampón para purificación a la solución de reacción, se llevó a cabo la purificación por ultrafiltración para eliminar los enlazadores de fármaco no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, sustituyendo también la solución tampón con ABS, y concentrando además la solución. La solución purificada obtenida se sometió a microfiltración ($0,22 \mu\text{m}$ (Millipore Corp., filtro Millex-GV, membrana PVDF) y $0,10 \mu\text{m}$ (Millipore Corp., filtro Millex-VV, membrana PVDF)) para proporcionar una solución que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos generales E y F (se usaron $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido), y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 11,28 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 451 mg (90 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento general E: 6,6, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento general F: 7,7.

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

[Fórmula 58]



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

Con enfriamiento de hielo, a una solución en THF (12,0 ml) de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenil alaninato de *tert*-butilo (J. Pept. Res., 1999, vol. 53, pág. 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 a continuación 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 de sodio, y salmuera saturada, y a continuación la capa orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro. Una vez que el disolvente se eliminó a presión reducida, los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 9 : 1 (v/v)] para proporcionar 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 en diclorometano (8,00 ml) del compuesto (0,295 g, 0,558 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior, se añadió ácido trifluoroacético (4,00 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. el disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,240 g, 91 %).

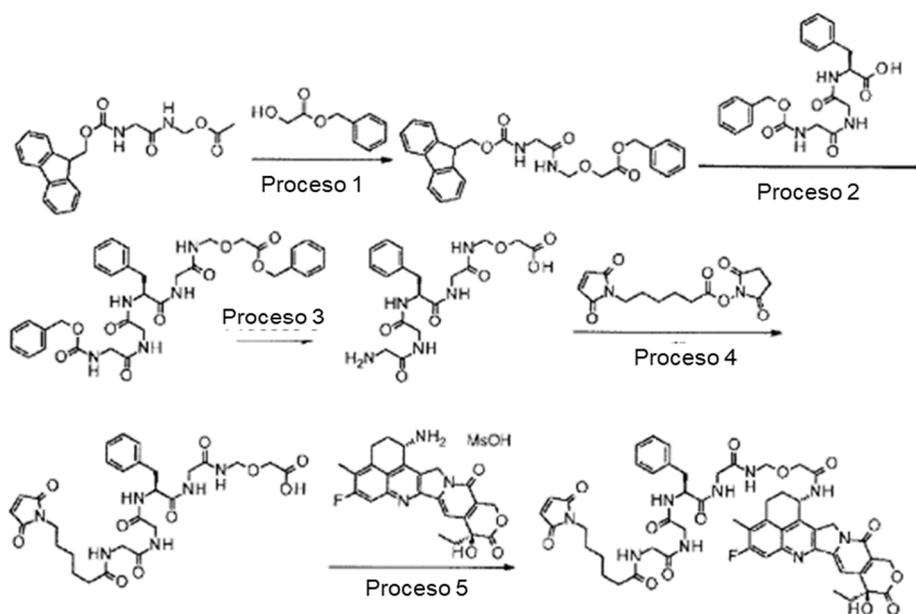
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1,15-1,23 (2H, m), 1,40-1,53 (4H, m), 2,10 (2H, t, J=7,6 Hz), 2,88 (1H, dd, J = 13,7, 8,9 Hz), 3,04 (1H, dd, J = 13,7, 5,0 Hz), 3,35-3,43 (2H, m), 3,58-3,77 (4H, m), 4,41 (1H, td, J = 7,8, 5,0 Hz), 7,00 (2H, s), 7,16-7,31 (5H, m), 8,00 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,06 (1H, t, J=5,7 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 anterior del Ejemplo 26, y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de reacción se cargó con una solución acuosa de ácido cítrico al 10 % y se extrajo con cloroformo. La capa orgánica obtenida se secó con sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 8 : 2 (v/v)] para proporcionar 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 26.

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

[Fórmula 59]



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

A una solución en THF (200 ml) del compuesto (7,37 g, 20,0 mmol) obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 26, se añadieron glicolato de bencilo (6,65 g, 40,0 mmol) y ácido p-toluenosulfónico monohidratado (0,381 g, 2,00 mmol) a 0 °C y se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas y 30 minutos. La solución de reacción se cargó con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se secó con sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 100:0 (v/v) - 0: 100] para proporcionar 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 26.

Proceso 2: N-[(Benciloxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina-N-[[2-(benciloxi)-2-oxoetoxi]metil]glicinamida

A una solución en 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 con una solución de N,N-dimetilformamida (140 ml) de N-[(benciloxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina (6,33 g, 15,3 mmol), N-hidroxisuccinimida (1,92 g, 16,7 mmol), y clorhidrato de 1-(3-dimetil-aminopropil)-3-etilcarbodiimida (3,20 g, 16,7 mmol) agitado 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 con sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 8:2 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (7,10 g, 79 %).

RMN¹H (DMSO-d₆) δ: 2,78 (1H, dd, J = 13,9, 9,6 Hz), 3,05 (1H, dd, J = 13,9, 4,5 Hz), 3,56-3,80 (6H, m), 4,15 (2H, s), 4,47-4,55 (1H, m), 4,63 (2H, d, J=6,6 Hz), 5,03 (2H, s), 5,15 (2H, s), 7,16-7,38 (15H, m), 7,52 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,17 (1H, d, J=8,2 Hz), 8,36 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,61 (1H, t, J=6,6 Hz).

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

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

RMN¹H (DMSO-d₆) δ: 2,84 (1H, dd, J = 13,7, 9,8 Hz), 3,08 (1H, dd, J = 13,7, 4,7 Hz), 3,50-3,72 (4H, m), 3,77-3,86 (2H, m), 3,87 (2H, s), 4,52-4,43 (1H, m), 4,61 (2H, d, J=6,6 Hz), 7,12-7,30 (5H, m), 8,43 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,54 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,70 (1H, t, J=6,3 Hz), 8,79 (1H, t, J=5,5 Hz).

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

A una solución en N,N-dimetilformamida (85,0 ml) del compuesto (3,59 g, 8,48 mmol) obtenido en el Proceso 3

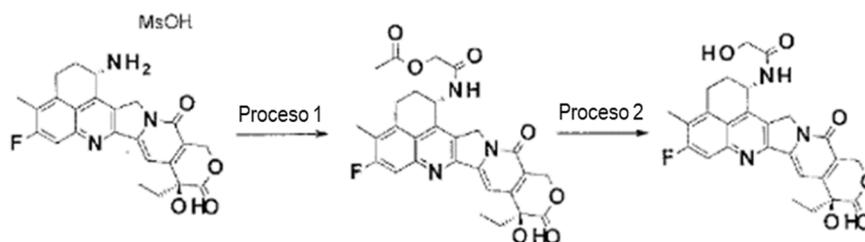
anterior, se añadieron hexanoato de N-succinimidil-6-maleimida (2,88 g, 9,33 mmol) y trietilamina (0,858 g, 8,48 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de reacción se cargó con ácido clorhídrico 0,1 N y se extrajo con cloroformo y un disolvente mixto de cloroformo y metanol [cloroformo: metanol = 4:1 (v/v)]. La capa orgánica obtenida se secó con sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo: metanol: agua = 7: 3 : 1 (v/v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (3,70 g, 71 %). RMN¹H (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).

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

20 **Ejemplos 34 Intermedio (34)**

[Fórmula 60]



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

25 Con enfriamiento de hielo, a una suspensión de N,N-dimetilformamida (20,0 ml) de la sal de exatecano del ácido metanosulfónico (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 días. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo: metanol: agua = 7:3:1 (v/v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,505 g, cuantitativo).

30 RMN¹H (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)⁺

35 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 solución en metanol (50,0 ml) del compuesto (0,504 g, 0,941 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior, se añadieron un THF (20,0 ml) y una solución acuosa de hidróxido sódico 1 N (4,00 ml, 4,00 mmol) y se agitaron 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 se eliminó el disolvente a presión reducida. Los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo: metanol: agua = 7:3:1 (v/v/v)] para proporcionar 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 que recibió el conjugado de anticuerpo-fármaco (45) o (46).

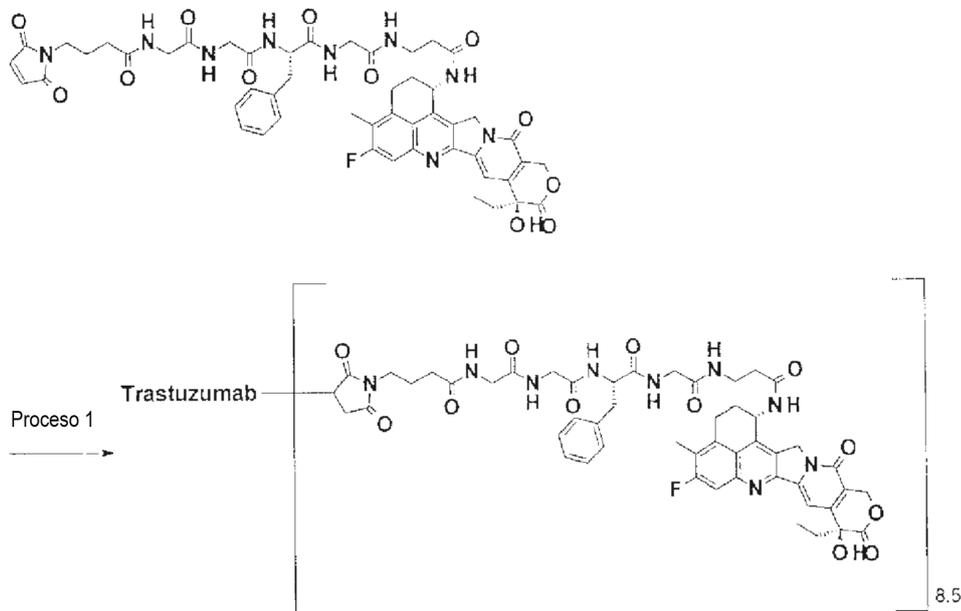
45 RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,78-1,95 (2H, m), 2,09-2,28 (2H, m), 2,39 (3H, s), 3,07-3,27 (2H, m), 3,96 (2H, d, J=6,0 Hz), 5,11-5,26 (2H, m), 5,42 (2H, s), 5,46-5,54 (1H, m), 5,55-5,63 (1H, m), 6,52 (1H, s), 7,30 (1H, s), 7,78 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,41 (1H, d, J=9,1 Hz). EM (IEN) m/z: 494 (M+H)⁺

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

moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 4,7.

Ejemplo 37 Conjugado de fármaco-anticuerpo (37)

[Fórmula 63]

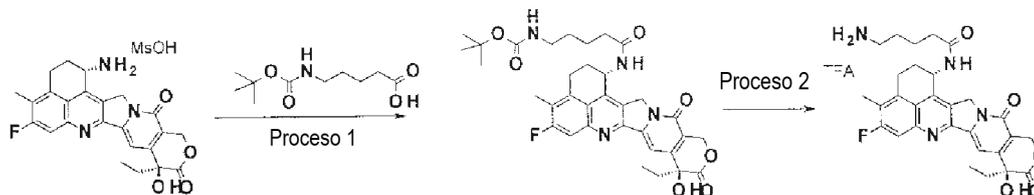


5 **Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (37)**

Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 1 del Ejemplo 36, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpo: 1,89 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 11,3 mg (90 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 8,5.

10 **Ejemplo 38 Intermedio (38)**

[Fórmula 64]



Proceso 1: (5-[[[(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]-5-oxopentil]carbamato de *tert*-butilo

15 La sal de exatecano del ácido metanosulfónico (500 mg, 0,941 mmol) se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 1 del Ejemplo 1 utilizando ácido 5-(*tert*-butoxicarbonilamino)valérico en vez del ácido 4-(*tert*-butoxicarbonilamino)butanoico para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color marrón amarillento (571 mg, 96 %). El compuesto se usó para la siguiente reacción sin llevar a cabo purificación adicional.
EM (IEN) m/z 635 (M+H)⁺

20 Proceso 2: 5-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]pentanamida

El compuesto (558 mg, 0,879 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 2 del Ejemplo 1 para proporcionar el trifluoroacetato del compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (363 mg, 64 %).

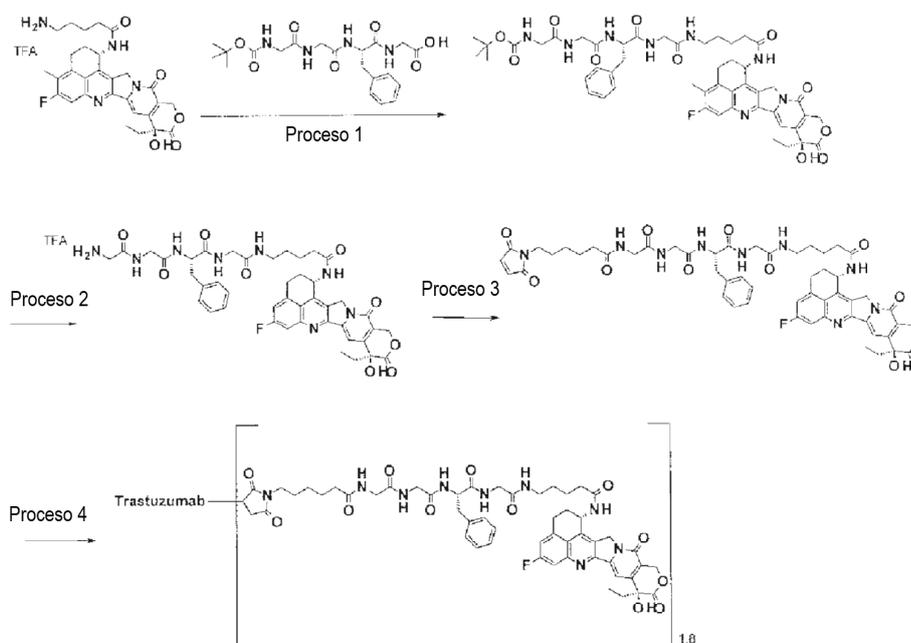
25 RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,88 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,52-1,71 (4H, m), 1,87 (2H, tt, J = 14,4, 6,9 Hz), 2,07-2,18

(2H, m), 2,22 (2H, t, J = 7,0 Hz), 2,40 (3H, s), 2,76-2,88 (2H, m), 3,13-3,22 (2H, m), 5,18 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,24 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,43 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,33 (1H, s), 7,65 (3H, a.s.), 7,81 (1H, d, J = 11,3 Hz), 8,49 (1H, d, J = 8,6 Hz).

EM (IEN) m/z: 535 (M+H)⁺

5 Ejemplo 39 Conjugado de fármaco-anticuerpo (39)

[Fórmula 65]



Proceso 1: N-(*tert*-Butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-N-(5-[[[(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]-5-oxopentil]glicinamida

10

El compuesto (348 mg, 0,537 mmol) obtenido en el Proceso 2 del Ejemplo 38 se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 1 del Ejemplo 2 para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (429 mg, 84 %). El compuesto se usó para la siguiente reacción sin llevar a cabo purificación adicional.

Proceso 2: Glicilglicil-L-fenilalanil-N-(5-[[[(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]-5-oxopentil]glicinamida

15

El compuesto (427 mg, 0,448 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 2 del Ejemplo 2 para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (430 mg, 99 %).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,38-1,49 (2H, m), 1,54-1,66 (2H, m), 1,86 (2H, tt, J = 14,5, 7,0 Hz), 2,08-2,16 (2H, m), 2,19 (2H, t, J = 7,2 Hz), 2,40 (3H, s), 2,76 (1H, dd, J = 13,9, 10,0 Hz), 3,00-3,12 (3H, m), 3,14-3,21 (2H, m), 3,57 (2H, d, J = 4,7 Hz), 3,60-3,75 (3H, m), 3,87 (1H, dd, J = 16,8, 5,9 Hz), 4,55 (1H, td, J = 9,0, 4,7 Hz), 5,16 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J = 18,4 Hz), 5,44 (2H, s), 5,53-5,60 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,14-7,29 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,74 (1H, t, J = 5,5 Hz), 7,81 (1H, d, J = 10,9 Hz), 7,96 (3H, a.s.), 8,30-8,37 (1H, m), 8,44-8,53 (2H, m).

20

EM (IEN) m/z: 853 (M+H)⁺

25

Proceso 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(5-[[[(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]-5-oxopentil]glicinamida

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

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,13-1,21 (2H, m), 1,36-1,52 (6H, m), 1,53-1,65 (2H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,05-2,15 (4H, m), 2,19 (2H, s), 2,40 (3H, s), 2,79 (1H, dd, J = 13,7, 10,2 Hz), 2,98-3,10 (3H, m), 3,12-3,21 (2H, m), 3,29-3,37 (2H, m), 3,53-3,79 (6H, m), 4,41-4,50 (1H, m), 5,16 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,43 (2H, s), 5,52-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,12-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,63 (1H, t, J = 5,7 Hz), 7,80 (1H, d, J = 10,6 Hz), 8,02 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,08 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,12 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,24 (1H,

30

35

t, J = 5,7 Hz), 8,45 (1H, d, J = 8,6 Hz).
EM (IEN) m/z: 1046 (M+H)⁺

Proceso 4: Conjugado de fármaco-anticuerpo (39)

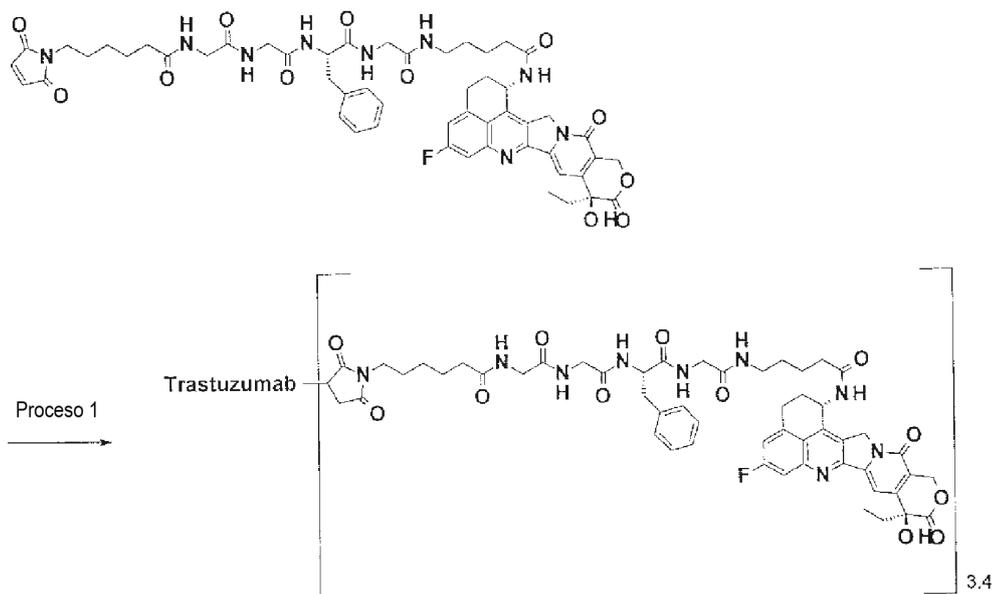
5 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, 1,37 mlmg⁻¹ cm⁻¹). La solución (1,0 ml) se introdujo en un tubo de polipropileno de 2 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,0155 ml; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,050 ml). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

10 Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Tras incubar la solución durante 10 minutos a 22 °C, una solución de DMSO (0,0311 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 3 se añadió a lo anterior y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,00622 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a lo anterior y se incubó a 22 °C para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante 20 minutos más. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D-1 (se usó PBS6.0 como solución tampón) para proporcionar 6 ml de una solución que contenía el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

20 Concentración de anticuerpo: 1,12 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 6,72 mg (67 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 1,8.

Ejemplo 40 Conjugado de fármaco-anticuerpo (40)

[Fórmula 66]



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

30 Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, 1,37 mlmg⁻¹ cm⁻¹). La solución (1,0 ml) se introdujo en un tubo de polipropileno de 2 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (0,0311 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (0,050 ml). Tras confirmar que la solución tenía un pH de 7,4 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

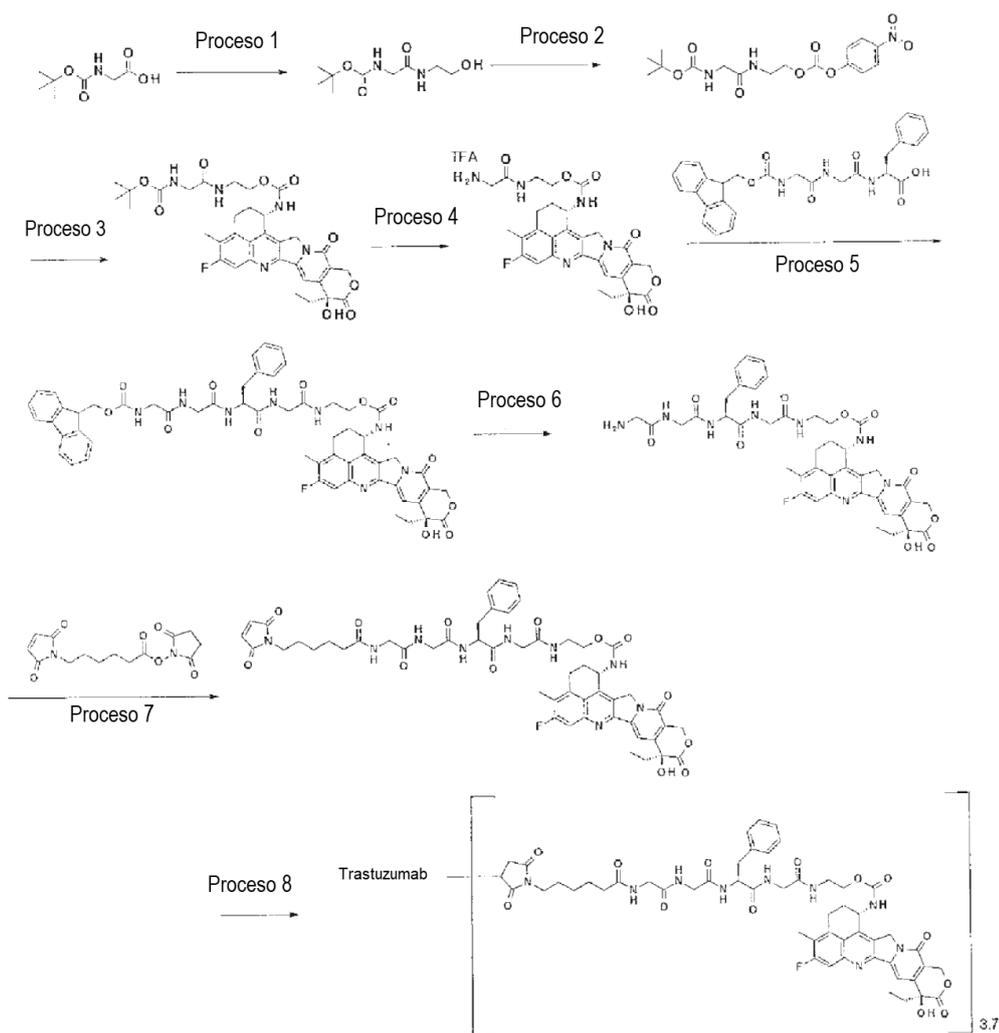
35 Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: tras incubar la solución a 22 °C durante 10 minutos, una solución de DMSO (0,0622 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 3 del Ejemplos 39 se añadió a lo anterior y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a 22 °C durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,0124 ml; 18,4 equivalentes por

molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a lo anterior y se incubó a 22 °C para terminar la reacción del enlazador de fármaco durante 20 minutos más. Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D-1 (se usó PBS6.0 como solución tampón) para proporcionar 6 ml de una solución que contenía el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Utilizando el Procedimiento general E, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 0,98 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 5,88 mg (59 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,4.

Ejemplo 41 Conjugado de fármaco-anticuerpo (41)

[Fórmula 67]



10

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

N-(*terc*-Butoxicarbonil)glicina (4,2 g, 24 mmol) se disolvió en dimetilformamida (40 ml). Tras añadir aminoetanol (2,9 g, 48 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (3,7 g, 24 mmol) y añadir clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (6,9 g, 36 mmol), se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y los residuos se cargaron con tolueno para la destilación azeotrópica. Los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice [acetato de etilo - acetato de etilo: metanol = 10:1 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de una sustancia oleosa incolora (3,8 g, 72 %).

15

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

20

Proceso 2: 2-[[N-(*terc*-Butoxicarbonil)glicil]amino]etil4-nitrofenilcarbonato

A una solución en THF (23 ml) del compuesto (1,0 g, 4,59 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior, se añadieron

diisopropiletilamina (0,80 ml, 4,59 mmol) y carbonato de bis(4 nitrofenilo) (1,32 g, 6,88 mmol) y se agitaron a temperatura ambiente durante 12 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano - hexano: acetato de etilo = 1:3 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (1,13 g, 64 %).

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

Proceso 3: 2-(((*tert*-Butoxicarbonil)amino)acetil)amino)etil-((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)carbamato

10 a una sal de exatecano del ácido metanosulfónico (0,70 g, 1,2 mmol), el compuesto (0,57 g, 1,5 mmol) obtenido en el Proceso 2, y 1-hidroxibenzotriazol (3,7 g, 24 mmol), se añadió dimetilformamida (23 ml), y se añadió diisopropiletilamina (0,43 ml, 2,5 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y los residuos se cargaron con tolueno para la destilación azeotrópica. Los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 10:1 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título (0,86 g, cuantitativo) como un sólido de color amarillo pálido.

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

20 Proceso 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)carbamato de 2-(glicilamino)etilo

El compuesto (0,86 g, 2,1 mmol) obtenido en el Proceso 3 anterior se disolvió en diclorometano (15 ml). Después de añadir el ácido trifluoroacético (15 ml), se agitó durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida, y los residuos se cargaron con tolueno para la destilación azeotrópica. Los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo: metanol: agua = 7:3:1 (v/v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,86 g, 99 %).

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

30 EM (CLEM) m/z: 939 (M+H)⁺

Proceso 5: 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)carbamoi]oxi)etil]glicinamida

35 N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina (Patente japonesa abierta a consulta n.º 2002-60351; 0,21 g, 0,41 mmol) se disolvieron en N,N-dimetilformamida (3 ml). Tras añadir N-hidroxisuccinimida (0,052 g, 0,45 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,086 g, 0,45 mmol), se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (2 ml) cargada con el compuesto (0,24 g, 0,35 mmol) obtenido en el Proceso 4 anterior y trietilamina (0,078 ml, 0,45 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 8:2 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,24 g, 65 %).

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

45 EM (CLEM) m/z: 1063 (M+H)⁺

50 Proceso 6: 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)carbamoi]oxi)etil]glicinamida

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

55 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,78-1,94 (2H, m), 2,06-2,27 (2H, m), 2,37 (3H, s), 2,72-2,81 (1H, m), 2,98-3,07 (1H, m), 3,12-3,17 (2H, m), 3,57-3,81 (6H, m), 4,00-4,21 (3H, m), 4,45-4,54 (1H, m), 5,15-5,35 (3H, m), 5,41 (1H, d, J = 17,2 Hz), 5,45 (1H, d, J = 17,2 Hz), 6,54 (1H, s), 7,11-7,26 (6H, m), 7,32 (1H, s), 7,78 (1H, d, J = 11,0 Hz), 7,93-8,00 (1H, m), 8,03 (1H, d, J = 9,4 Hz), 8,06-8,13 (1H, m), 8,21-8,27 (2H, m), 8,30-8,36 (1H, m).

EM (CLEM) m/z: 841 (M+H)⁺

Proceso 7: 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]carbamoil}oxi)etil]glicinamida

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

10 RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,12-1,23 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,80-1,95 (2H, m), 2,05-2,27 (4H, m), 2,38 (3H, s), 3,43-2,40 (8H, m), 3,53-3,78 (6H, m), 4,00-4,21 (2H, m), 4,44-4,55 (1H, m), 5,17-5,36 (3H, m), 5,43 (2H, s), 6,54 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,19 (5H, d, J = 23,9 Hz), 7,33 (1H, s), 7,78 (1H, d, J = 10,6 Hz), 7,91-8,16 (5H, m), 8,24-8,31 (1H, m). EM (IEN) m/z: 1034 (M+H)⁺

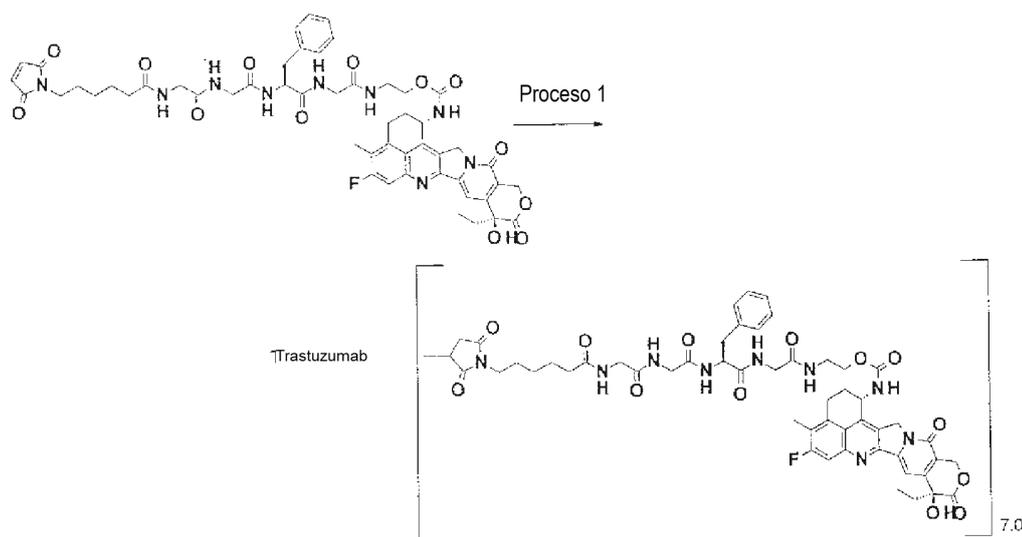
Proceso 8: Conjugado de fármaco-anticuerpo (41)

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

15 Concentración de anticuerpo: 1,54 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 9,2 mg (74 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 3,7.

Ejemplo 42 Conjugado de fármaco-anticuerpo (42)

[Fórmula 68]

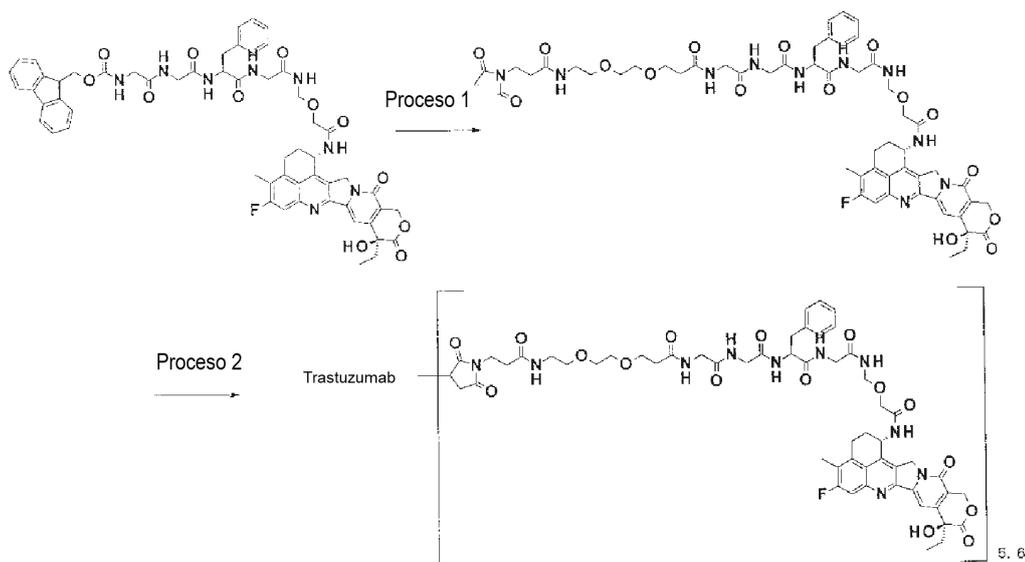


Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (42)

20 Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 7 del Ejemplo 41, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpo: 1,47 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 8,8 mg (71 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 7,0.

Ejemplo 43 Conjugado de fármaco-anticuerpo (43)

25 [Fórmula 69]



Proceso 1: N-{3-[2-(2-[[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil]amino)etoxi]etoxi]propanoil}glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-[[[(1S,9S)-9-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-oxoetox)metil]glicinamida

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

15 RMN¹H (DMSO-d₆) δ : 0,87 (3H, t, J = 7,0 Hz), 1,79-1,91 (2H, m), 2,18 (2H, t, J = 15,1 Hz), 2,29-2,33 (4H, m), 2,39 (3H, s), 2,76 (1H, dd, J = 13,9, 9,2 Hz), 3,02 (1H, dd, J = 13,7, 3,9 Hz), 3,13-3,15 (2H, m), 3,44-3,46 (6H, m), 3,57-3,59 (6H, m), 3,69-3,75 (6H, m), 4,01 (2H, s), 4,46-4,48 (1H, m), 4,63 (2H, d, J = 6,3 Hz), 5,21 (2H, s), 5,42 (2H, s), 5,60 (1H, dd, J = 13,5, 5,7 Hz), 6,54 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,17-7,24 (6H, m), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d, J = 11,0 Hz), 8,00-8,02 (2H, m), 8,13 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,17 (1H, t, J = 6,3 Hz), 8,52 (1H, d, J = 9,0 Hz), 8,65 (1H, t, J = 6,5 Hz).
EM (IEN) m/z 1151 (M+H)⁺

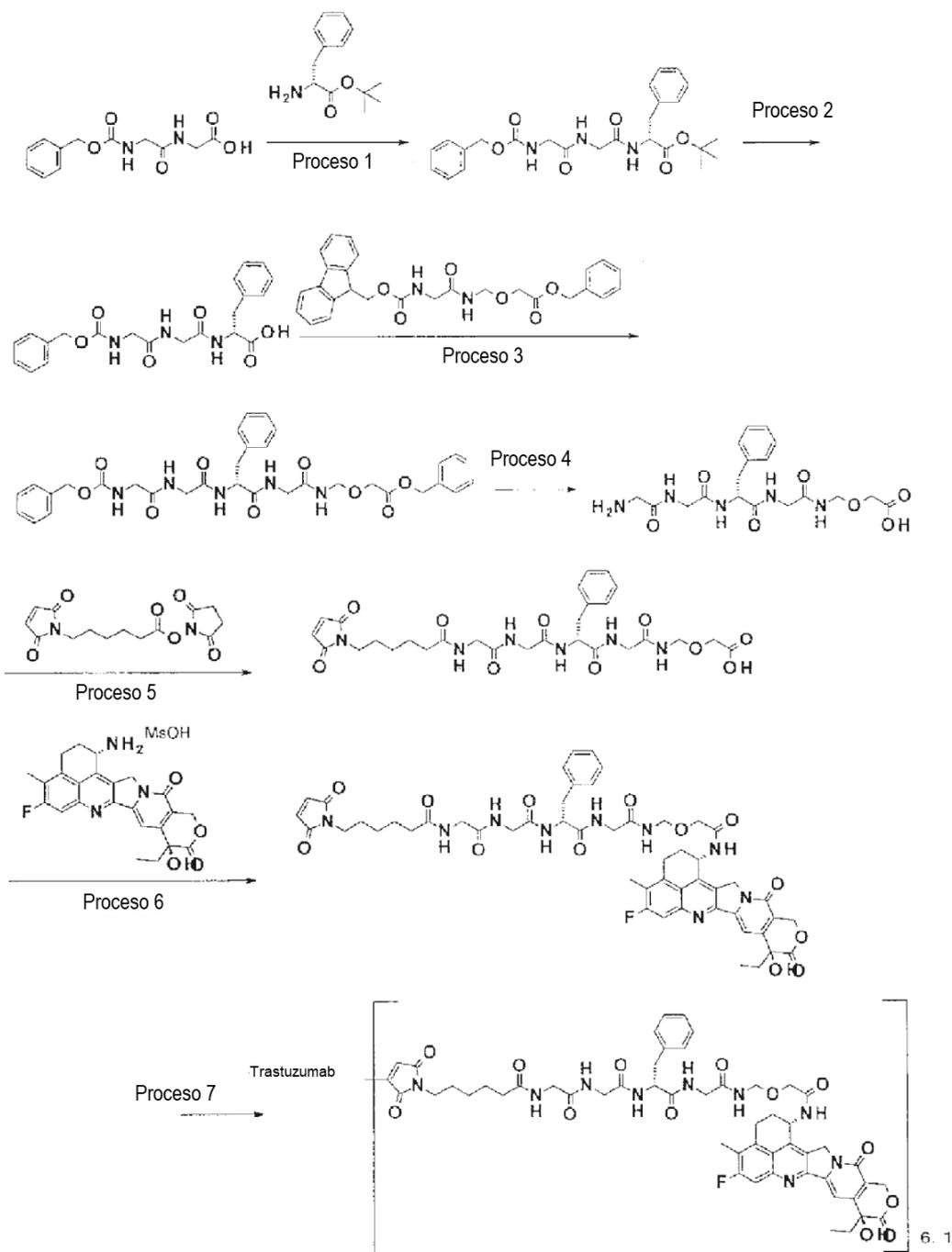
Proceso 2: Conjugado de fármaco-anticuerpo (43)

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

Concentración de anticuerpo: 1,96 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 17,6 mg (88 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,6.

Ejemplo 44 Conjugado de fármaco-anticuerpo (44)

25 [Fórmula 70]



Proceso 1: N-[(benciloxi)carbonil]glicilglicil-D-fenilalaninato de *terc*-butilo

5 N-[(benciloxi)carbonil]glicilglicina (3,00 g, 11,3 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida (20,0 ml). Tras añadir N-hidroxisuccinimida (1,43 g, 12,4 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (2,37 g, 12,4 mmol), se agitó durante 1 hora. Una solución de N,N-dimetilformamida (10 ml) se cargó con D-fenilalanina *terc*-butilo (2,74 g, 12,38 mmol) y trietilamina (1,73 ml, 12,4 mmol) se añadió gota a gota a la solución de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se cargó con diclorometano y se lavó con agua, ácido clorhídrico 1 N, y una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, y a continuación la capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 9:1 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en

10 un sólido incoloro (4,21 g, 80 %).

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

EM (CLEM) m/z: 470 (M+H)⁺

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

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

RMN¹H (CDCl₃) δ: 2,92-3,01 (1H, m), 3,10-3,18 (1H, m), 3,65-3,81 (3H, m), 3,88-3,98 (1H, m), 4,64-4,73 (1H, m), 5,06 (2H, s), 5,87 (1H, s a), 7,10-7,37 (13H, m).

EM (CLEM) m/z: 412 (M+H)⁺

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

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

RMN¹H (DMSO-d₆) δ: 2,78 (1H, dd, J = 13,6, 10,0 Hz), 3,05 (1H, dd, J = 13,9, 4,2 Hz), 3,56-3,79 (6H, m), 4,15 (2H, s), 4,47-4,54 (1H, m), 4,63 (2H, d, J = 6,7 Hz), 5,03 (2H, s), 5,15 (2H, s), 7,14-7,39 (15H, m), 7,50 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,02 (1H, t, J = 5,4 Hz), 8,16 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,34 (1H, t, J = 6,0 Hz), 8,60 (1H, t, J = 7,0 Hz).

EM (CLEM) m/z: 648 (M+H)⁺

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

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

RMN¹H (DMSO-d₆) δ: 2,85 (1H, dd, J = 13,3, 9,7 Hz), 3,08 (1H, dd, J = 13,9, 5,4 Hz), 3,43-3,52 (4H, m), 3,62-3,89 (7H, m), 4,36-4,44 (1H, m), 4,58-4,67 (2H, m), 7,12-7,29 (5H, m), 8,44 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,67 (1H, d, J = 7,3 Hz), 8,78 (1H, t, J = 5,4 Hz), 8,91 (1H, s a).

EM (CLEM) m/z: 424 (M+H)⁺

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

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

RMN¹H (DMSO-d₆) δ: 1,13-1,24 (2H, m), 1,42-1,53 (4H, m), 2,12 (2H, t, J = 7,3 Hz), 2,82 (1H, dd, J = 13,9, 10,0 Hz), 3,09 (1H, dd, J = 13,9, 4,8 Hz), 3,17 (2H, d, J = 4,2 Hz), 3,47-3,89 (8H, m), 4,08-4,14 (1H, m), 4,41-4,49 (1H, m), 4,58-4,69 (2H, m), 7,00 (2H, s), 7,14-7,27 (5H, m), 8,31 (1H, t, J = 6,0 Hz), 8,39 (1H, s a), 8,55 (2H, s a), 8,93 (1H, s a).

EM (CLEM) m/z: 615 (M-H)⁻

Proceso 6: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-D-fenilalanil-N-[[2-[(1S,9S)-9-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 en N,N-dimetilformamida (10 ml) de la sal de exatecano del ácido metanosulfónico (22 mg, 0,388 mmol), se añadieron trietilamina (5,42 µl, 0,388 mmol), el compuesto (29 mg, 0,466 mmol) obtenido en el Proceso 5 anterior, y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (19 mg, 0,686 mmol) que contenía 16,4 % de agua a 0 °C y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente en la solución de reacción se eliminó a presión reducida, y a continuación, el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo: metanol: agua = 7:3:1 (v/v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (26 mg, 65 %).

RMN¹H (DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,09 (2H, t, J = 7,6 Hz), 2,13-2,23 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,78 (1H, dd, J = 13,6, 9,4 Hz), 2,98-3,05 (1H, m), 3,13-3,23 (2H, m), 3,54-

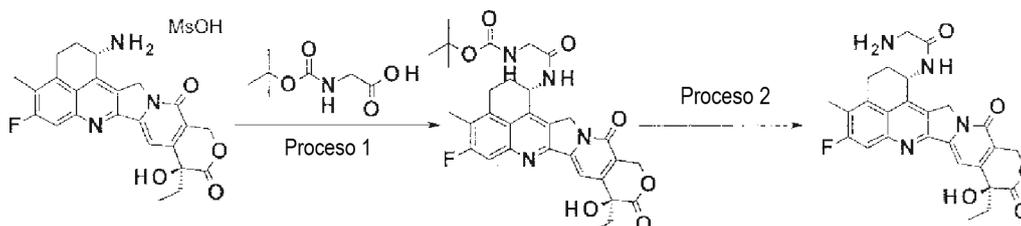
3,78 (8H, m), 4,02 (2H, s), 4,41-4,50 (1H, m), 4,61-4,66 (2H, m), 5,21 (2H, s), 5,42 (2H, s), 5,56-5,64 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,14-7,27 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d, J = 10,9 Hz), 8,01 (1H, t, J = 5,4 Hz), 8,07 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,14 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,31 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,53 (1H, d, J = 9,1 Hz), 8,63 (1H, t, J = 6,3 Hz).
EM (CLEM) m/z: 1034 (M+H)⁺

5 Proceso 7: Conjugado de fármaco-anticuerpo (44)

Utilizando el trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 y el compuesto obtenido en el Proceso 6 anterior, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo del título de la misma manera que en el Proceso 1 del Ejemplo 7. Concentración de anticuerpo: 1,87 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 16,8 mg (84 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,1.

10 Ejemplo 45 Intermedio (45)

[Fórmula 71]



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-oxoetil)carbamato de *tert*-butilo

15 A una solución en diclorometano (3,00 ml) de N-(*tert*-butoxicarbonil)-glicina (0,395 g, 2,26 mmol), se añadieron N-hidroxisuccinimida (0,260 g, 2,26 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,433 mg, 2,26 mmol) y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora. se añadió esta solución a una solución consistente en una sal de exatecano del ácido metanosulfónico (1,00 g, 1,88 mmol) y trietilamina (0,315 ml, 2,26 mmol), y N,N-dimetilformamida (3,00 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 16,5 horas. La solución de reacción se diluyó con cloroformo y se lavó con una solución de ácido cítrico al 10 %, y a continuación, la capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 9:1 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (1,16 g, 99 %).

25 RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,30 (9H, s), 1,81-1,89 (2H, m), 2,09-2,21 (2H, m), 2,38 (3H, s), 3,15-3,17 (2H, m), 3,55-3,56 (2H, m), 5,15 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J = 19,2 Hz), 5,41 (2H, s), 5,55-5,56 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,95 (1H, t, J = 5,5 Hz), 7,28 (1H, s), 7,77 (1H, d, J = 11,0 Hz), 8,39 (1H, d, J = 8,6 Hz).
EM (CLEM) m/z: 593 (M+H)⁺

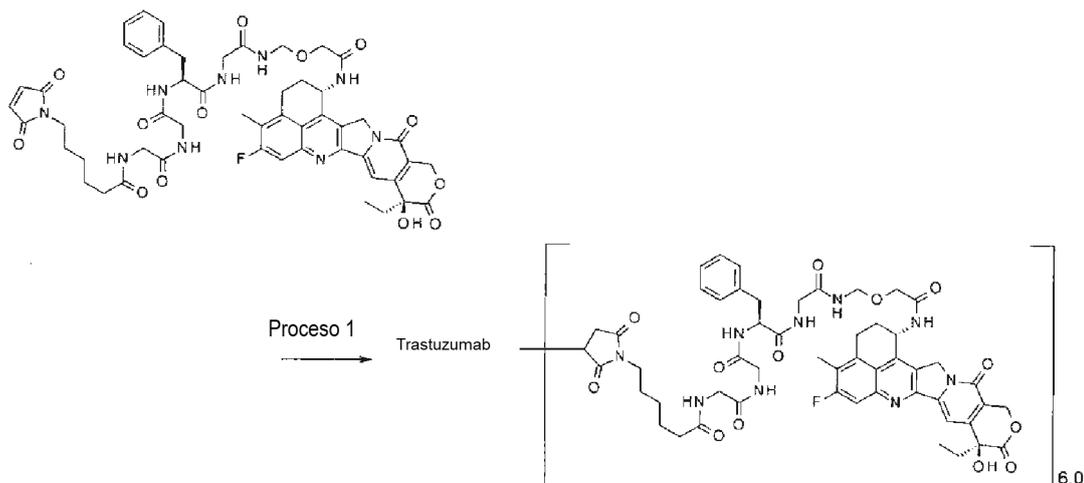
Proceso 2: N-[(1S,9S)-9-Etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]glicinamida

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

35 RMN¹H (400 MHz, CD₃OD) δ: 0,96 (3H, t, J = 7,0 Hz), 1,89-1,91 (2H, m), 2,14-2,16 (1H, m), 2,30 (3H, s), 2,40-2,42 (1H, m), 3,15-3,21 (2H, m), 3,79-3,86 (2H, m), 4,63-4,67 (1H, m), 5,00-5,05 (1H, m), 5,23 (1H, d, J = 16,0 Hz), 5,48 (1H, d, J = 16,0 Hz), 5,62-5,64 (1H, m), 7,40-7,45 (2H, m).
EM (CLEM) m/z: 493 (M+H)⁺

Ejemplo 46 Conjugado de fármaco-anticuerpo (46)

[Fórmula 72]



Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (46)

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

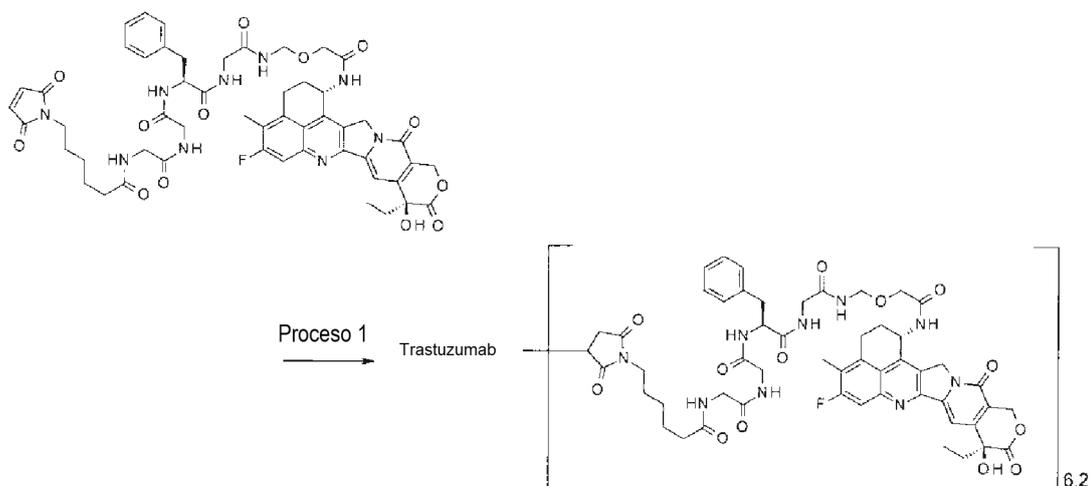
Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Después de enfriar la solución anterior a 15°C , una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (2,958 ml; 8,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadieron gradualmente gota a gota al anterior. A 15°C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

Purificación: Añadiendo gradualmente una solución acuosa de ácido acético al 20 % (aproximadamente 0,25 ml) y ABS (50 ml) a la solución anterior con agitación, se ajustó el pH del filtrado a $5,5 \pm 0,1$. Esta solución se sometió a microfiltración (Millipore Corp., filtro Millex-HV, $0,45 \mu\text{m}$, membrana PVDF) para eliminar la materia blanquecina. Este filtrado se sometió a purificación mediante ultrafiltración usando un aparato de ultrafiltración compuesto por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Ultracell 50 KDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump modelo 77521-40, Pump Head modelo 7518-00), y un tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Específicamente, mientras el ABS se añadió gota a gota (un total de 800 ml) como solución tampón para purificación a la solución de reacción, se llevó a cabo la purificación por ultrafiltración para eliminar los enlazadores de fármaco no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, sustituyendo también la solución tampón con ABS, y concentrando además la solución. La solución purificada obtenida se sometió a microfiltración ($0,22 \mu\text{m}$ (Millipore Corp., filtro Millex-GV, membrana PVDF) y $0,10 \mu\text{m}$ (Millipore Corp., filtro Millex-VV, membrana PVDF)) para proporcionar 42.5 ml de una solución que contenía el conjugado de fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos generales E y F (se usaron $\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor medido), y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 10,4 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 442 mg (88,5 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento general E: 6,0, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento general F: 7,5.

Ejemplo 47 Conjugado de fármaco-anticuerpo (47)

[Fórmula 73]



Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (47)

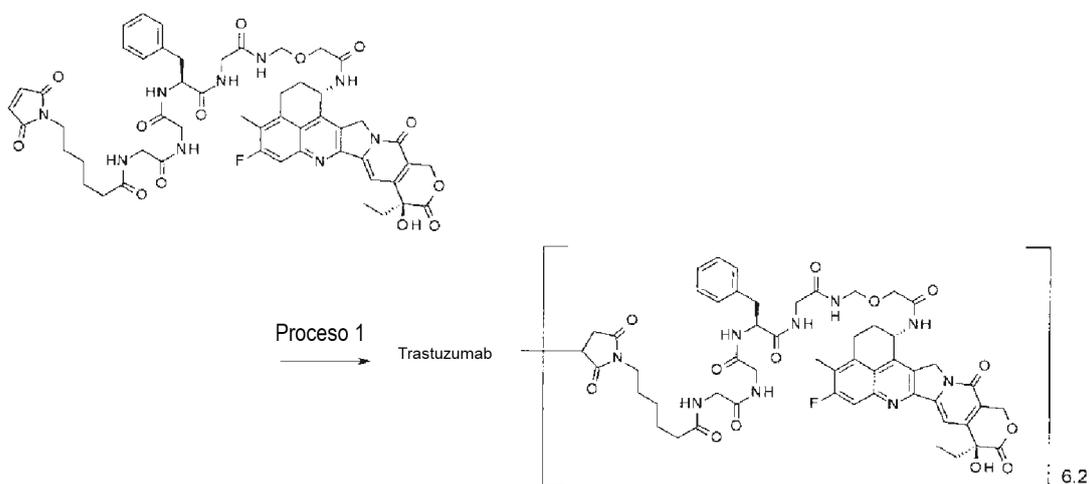
Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280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

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento general D (se usó ABS como solución tampón) para proporcionar 49 ml de una solución que contiene el compuesto de interés.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento general E (se usaron $\epsilon_{D,280} = 5178$, y $\epsilon_{D,370} = 20217$), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 2,91 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 143 mg (95 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,2.

Ejemplo 48 Conjugado de fármaco-anticuerpo (48)

[Fórmula 74]



Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (48)

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

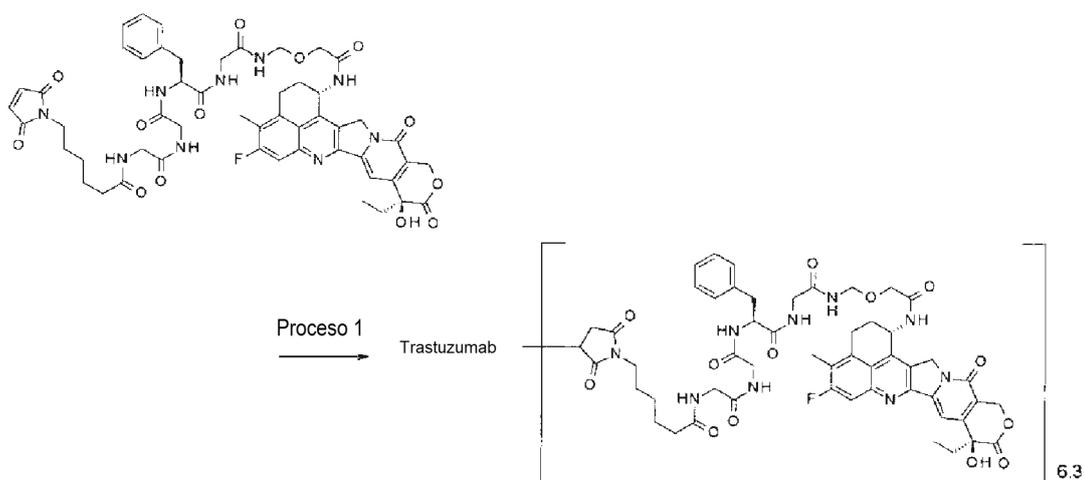
Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Después de enfriar la solución anterior a 15°C , una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (17,335 ml; 9,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadieron gradualmente gota a gota al anterior. La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

Purificación: Añadiendo gradualmente una solución acuosa de ácido acético al 20 % (aproximadamente 1,4 ml) y ABS (280 ml) a la solución anterior con agitación, se ajustó el pH del filtrado a $5,5 \pm 0,1$. Esta solución se sometió a microfiltración ($0,45 \mu\text{m}$, membrana de PVDF) para la materia blanquecina y proporcionar aproximadamente 600 ml de un filtrado. Este filtrado se sometió a purificación mediante ultrafiltración usando un aparato de ultrafiltración compuesto por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Ultracell 50 KDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump modelo 77521-40, Pump Head modelo 7518-00), y un tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Específicamente, mientras el ABS se añadió gota a gota (un total de 4800 ml) como solución tampón para purificación a la solución de reacción, se llevó a cabo la purificación por ultrafiltración para eliminar los enlazadores de fármaco no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, sustituyendo también la solución tampón con ABS, y concentrando además la solución. La solución obtenida y purificada se sometió a microfiltración (dos veces $0,22 \mu\text{m}$ y $0,10 \mu\text{m}$, membrana de PVDF) para dar 70 ml de una solución que contenía el conjugado de fármaco-anticuerpo del título.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento general E (se usaron $\epsilon_{D,280} = 5178$, y $\epsilon_{D,370} = 20217$), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 35,96 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 2517 mg (90 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,2.

Ejemplo 49 Conjugado de fármaco-anticuerpo (49)

[Fórmula 75]



35

Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (49)

Reducción del anticuerpo: El trastuzumab producido en el Ejemplo de referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml sustituyendo el medio con PBS6.0/EDTA utilizando el Procedimiento general C-1 y el procedimiento general B (se utilizó como coeficiente de extinción a 280 nm, $1,48 \text{ mlmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La solución (280 ml) se introdujo en un matraz Erlenmeyer de policarbonato de 1000 ml, se cargó con una solución acuosa de

40

hidrogenofosfato dipotásico 1 M a temperatura ambiente (4,200 ml) con agitación mediante agitador magnético, y a continuación se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (10,594 ml; 5,5 equivalentes por molécula de anticuerpo). Tras confirmar que la solución tenía un pH de $7,0 \pm 0,1$, la agitación se finalizó, y el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 hora.

- 5 Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Después de enfriar la solución anterior a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto del Proceso 8 del Ejemplo 26 (17,335 ml; 9,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadieron gradualmente gota a gota al anterior. La solución de reacción se agitó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. A continuación, una solución acuosa (2,485 ml; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadieron a lo anterior con agitación y se agitó a temperatura ambiente para terminar la reactividad de los enlazadores de fármaco sin reaccionar durante 20 minutos más.

- 15 Purificación: Añadiendo gradualmente una solución acuosa de ácido acético al 20 % (aproximadamente 1,4 ml) y ABS (280 ml) a la solución anterior con agitación, se ajustó el pH del filtrado a $5,5 \pm 0,1$. Esta solución se sometió a microfiltración ($0,45\text{ }\mu\text{m}$, membrana de PVDF) para la materia blanquecina y proporcionar aproximadamente 600 ml de un filtrado. Este filtrado se sometió a purificación mediante ultrafiltración usando un aparato de ultrafiltración compuesto por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Ultracell 30 KDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump modelo 77521-40, Pump Head modelo 7518-00), y un tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Específicamente, mientras el ABS se añadió gota a gota (un total de 4800 ml) como solución tampón para purificación a la solución de reacción, se llevó a cabo la purificación por ultrafiltración para eliminar los enlazadores de fármaco no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, sustituyendo también la solución tampón con ABS, y concentrando además la solución. La solución obtenida y purificada se sometió a microfiltración (dos veces $0,22\text{ }\mu\text{m}$ y $0,10\text{ }\mu\text{m}$, membrana de PVDF) para dar 130 ml de una solución que contenía el conjugado de fármaco-anticuerpo del título.

- 25 Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento general E (se usaron $\epsilon_{D,280} = 5178$, y $\epsilon_{D,370} = 20217$), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 21,00 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 2730 mg (97,5 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 6,3.

Ejemplo 50 Conjugado de fármaco-anticuerpo (50)

Proceso 1: Conjugado de fármaco-anticuerpo (50)

- 30 Los conjugados de fármaco-anticuerpo (47), (48), y (49) producidos en los Ejemplos 47, 48, y 49 se mezclaron (243 ml) y se cargaron adicionalmente con ABS (39,75 ml) para dar 283 ml de una solución que contenía el conjugado de fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos generales E y F (se usaron $\epsilon_{D,280} = 5178$, y $\epsilon_{D,370} = 20217$), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 20,0 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 5655 mg, número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento general E: 6,3, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento general F: 7,8.

Ejemplo de evaluación 1 Efecto inhibitor del crecimiento celular (1) del conjugado de fármaco-anticuerpo

- 40 La línea de células KPL-4 de cáncer de mama humano de células positivas para el antígeno de HER2 (Dr. Junichi Kurebayashi, Kawasaki Medical School, British Journal of Cancer, (1999) 79 (5/6). 707-717) o la línea MCF7 de cáncer de mama humano de células negativas para el antígeno (European Collection of Cell Cultures; ECACC) se cultivó en medio RPMI1640 (GIBCO) que contenía 10 % de suero de feto de bovino (MOREGATE) (a partir de ahora en el presente documento, denominado medio). La línea KPL-4 o la MCF7 se preparó para tener una concentración de $2,5 \times 10^4$ células/ml utilizando el medio, añadido a una concentración de 100 μl /pocillo a una microplaca de 96 pocillo para el cultivo de células, y se cultivó durante la noche.

- 45 Al día siguiente, trastuzumab o el conjugado de fármaco-anticuerpo diluido en 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM, y 0,064 nM utilizando el medio, se añadió a una concentración de 10 μl /pocillo a la microplaca. Se añadió el medio a una concentración de 10 μl /pocillo a pocillos no suplementados con anticuerpo. Las células se cultivaron en CO_2 al 5 % a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 a 7 días. Después del cultivo, la microplaca se extrajo de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad equivalente del ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) y se agitó. Después, se dejó reposar la microplaca a temperatura ambiente durante 10 minutos, se midió la intensidad de la luminiscencia de cada pocillo usando un lector de placas.(PerkinElmer). Se calculó el valor de la CI_{50} de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{CI}_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog} \left((50 - d) \times (\text{LOG}_{10} (b) - \text{LOG}_{10} (a)) / (d - c) + \text{LOG}_{10} (b) \right)$$

- 55 a: Concentración de la muestra a
b: Concentración de la muestra b
c: Viabilidad celular de la muestra a
d: Viabilidad celular de la muestra b

Se calculó la viabilidad celular en cada concentración de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

a: Intensidad de la luminiscencia promedio de los pocillos de muestras (n = 2)

b: Intensidad de la luminiscencia promedio de los pocillos no suplementados con anticuerpo (n = 10)

5 Los conjugados de fármaco-anticuerpo (2), (3), (5), (7), (10), (12), (13), (16), (18), (40), y (42) presentaron un efecto inhibitor del crecimiento celular de la $CI_{50} < 0,1$ (nM) frente a las células KPL-4.

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

10 Los conjugados de fármaco-anticuerpo (20), (24), y (27) presentó un efecto inhibitor del crecimiento celular de $1 < CI_{50} < 100$ (nM) frente a las células. Ninguno de los conjugados de fármaco-anticuerpo (19) o (26) presentó un efecto inhibitor del crecimiento celular frente a las células (> 100 (nM)).

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

Trastuzumab no presentó un efecto inhibitor del crecimiento celular frente a las células KPL-4 ni frente a las células MCF7 (> 100 (nM)).

Ejemplo de evaluación 2 Ensayo antitumoral (1)

20 Ratón: Ratonos alotímicos hembra de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) se aclimataron durante de 4 a 7 días en condiciones 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 proporcionó agua corriente esterilizada (preparada mediante la adición de 5 a 15 ppm de solución de hipoclorito sódico).

25 Ensayo y cálculo de la expresión: En todos los estudios, el eje mayor y el eje menor del tumor se midieron dos veces a la semana mediante el uso de un calibre digital (CD-15CX, Mitutoyo Corp.), y se calculó el volumen tumoral (mm^3). La expresión de cálculo es como se muestra a continuación.

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{Eje mayor (mm)} \times [\text{Eje menor (mm)}]^2$$

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

30 Las células KPL-4 se suspendieron en solución salina fisiológica, y $1,5 \times 10^7$ células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón alotímico hembra (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente en el día 15. El conjugado de fármaco-anticuerpo (27), o el anticuerpo trastuzumab dirigido contra HER2 (Ejemplo de referencia 1) para un grupo de control se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en los Días 15 y 22. Un grupo sin tratar se estableció como grupo de control.

35 Los resultados se muestran en la Figura 3. La administración de trastuzumab inhibió el crecimiento tumoral, mientras que la administración del conjugado de fármaco-anticuerpo (27) produjo un efecto inhibitor del crecimiento tumoral más significativo. En el dibujo, la abscisa representa gráficamente el número de días tras la inoculación del tumor, y la ordenada representa gráficamente el volumen tumoral. Además, los ratones que recibieron trastuzumab o el conjugado de fármaco-anticuerpo (27) estuvieron exentos de signos notables tales como la pérdida de peso, sugiriendo que el conjugado de fármaco-anticuerpo (27) en muy seguro. En los Ejemplos de evaluación siguientes con respecto al ensayo antitumoral, el ensayo se llevó a cabo mediante el procedimiento usado en este Ejemplo de evaluación, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo de evaluación 3 Ensayo antitumoral (2)

45 células de la línea NCI-N87 de cáncer gástrico humano adquiridas de la ATCC (American Type Culture Collection) se suspendieron en solución salina fisiológica, y 1×10^7 células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón alotímico hembra (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente en el Día 7. El conjugado de fármaco-anticuerpo (8) o (28), o trastuzumab emtansina (Ejemplo de referencia 2) se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en el Día 7. Un grupo sin tratar se estableció como grupo de control.

50 Los resultados se muestran en la Figura 4. Se confirmó que los conjugados de fármaco-anticuerpo (8) y (28) tenían un fuerte efecto antitumoral con una regresión del tumor equivalente a la de trastuzumab emtansina . Además, se encontró que la administración del conjugado de fármaco-anticuerpo (8) o (28), o trastuzumab emtansina estaba

exenta de la pérdida de peso de los ratones.

Ejemplo de evaluación 4 Ensayo antitumoral (3)

5 Células de la línea JIMT-1 de cáncer de mama humano adquiridas de (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) se suspendieron en solución salina fisiológica y 3×10^6 células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón alotímico hembra (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente en el Día 12. El conjugado de fármaco-anticuerpo (8), (29), o (30), trastuzumab, o trastuzumab emtansina se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón los Días 12 y 19. Un grupo de administración de solución salina fisiológica se estableció como grupo de control.

10 Los resultados se muestran en la Figura 5. La administración de trastuzumab o trastuzumab emtansina no inhibe el crecimiento del tumor JIMT-1. Por otra parte, La administración del conjugado de fármaco-anticuerpo (8), (29), o (30) inhibió el crecimiento del tumor. Además, La administración del conjugado de fármaco-anticuerpo (8), (29), o (30), trastuzumab, o trastuzumab emtansina se encontró que estaba exenta de la pérdida de peso de los ratones.

Ejemplo de evaluación 5 Efecto inhibitor del crecimiento celular (2) del conjugado de fármaco-anticuerpo

15 Se cultivó la línea Calu-3 (ATCC) de cáncer de pulmón no microcítico humano en medio esencial mínimo de Eagle (GIBCO) que contenía 10 % de suero de feto de bovino (MOREGATE) (a partir de ahora en el presente documento, denominado medio MEM).

La línea NCI-N87 (ATCC) de cáncer gástrico humano o la línea MKN-45 (Health Science Research Resources Bank) de cáncer gástrico humano se cultivó en medio RPMI1640 (GIBCO) que contenía 10 % de suero de feto de bovino (a partir de ahora en el presente documento, denominado medio RPMI).

20 La línea MDA-MB-453 (ATCC) de cáncer de mama humano o la línea MDA-MB-468 (ATCC) de cáncer de humano se cultivó en medio L-15 de Leibovitz (GIBCO) que contenía 10 % de suero de feto de bovino (a partir de ahora en el presente documento, denominado medio de Leibovitz).

Entre estos 5 tipos de líneas de células, Calu-3, NCI-N87, y MDA-MB-453 son células positivas para HER2, y MKN-45 y MDA-MB-468 son células negativas para HER2.

25 Calu-3, NCI-N87, o MKN-45 se preparó para tener una concentración de 4×10^4 células/ml utilizando medio MEM o medio RPMI, añadido a una concentración de 25 μ l/pocillo a una microplaca de 96-pocillos por cultivo de células cargado con 65 μ l/pocillo de un medio, y se cultivó durante la noche en CO₂ al 5 % a 37 °C. También, MDA-MB-453 o MDA-MB-468 se preparó para tener una concentración de 4×10^4 células/ml utilizando el medio de Leibovitz, añadido a una concentración de 25 μ l/pocillo a una microplaca de 96-pocillo por cultivo de células cargado con 65 μ l/pocillo, y se cultivó durante la noche a 37 °C sin ajustar la concentración de CO₂.

30 Al día siguiente, la sustancia de ensayo diluida en 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM, y 0,064 nM utilizando el medio RPMI o el medio de Leibovitz, o se añadió el medio RPMI o el medio de Leibovitz a una concentración de 10 μ l/pocillo a la microplaca. Las células se cultivaron en CO₂ al 5 % a 37 °C o a 37 °C sin ajustar la concentración de CO₂ durante 6 días.

35 Para Calu-3, NCI-N87 y MDA-MB-468, el conjugado de fármaco-anticuerpo (46) se añadió como la sustancia de ensayo. Para las otras células, el conjugado de fármaco-anticuerpo (50) se añadió como la sustancia de ensayo. Después del cultivo, la microplaca se extrajo de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad equivalente de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) y se agitó usando un mezclador de placas para lisar completamente las células. Después, se dejó reposar la microplaca a temperatura ambiente durante 10 minutos, se midió la intensidad de la luminiscencia usando un lector de placas.

40 Se calculó la viabilidad celular de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

45 a: Intensidad de la luminiscencia promedio de los pocillos suplementados con sustancia de ensayo
b: Intensidad de la luminiscencia promedio de los pocillos suplementados con medio

Se calculó el valor de la CI₅₀ de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{CI}_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10} (b) - \text{LOG}_{10} (a)) / (d - c) + \text{LOG}_{10} (b))$$

50 a: Concentración a de la sustancia de ensayo
b: Concentración b de la sustancia de ensayo
c: Viabilidad celular suplementada con la sustancia de ensayo que tiene la concentración a
d: Viabilidad celular suplementada con la sustancia de ensayo que tiene la concentración b

Las concentraciones a y b establecen la relación $a > b$ cruzando el 50 % de la viabilidad celular.

El conjugado de fármaco-anticuerpo (46) presentó un efecto de inhibición del crecimiento celular de la $CI_{50} < 1$ (nM) frente a las líneas de células Calu-3 y NCI-N87 positivas para HER2. Por otra parte, el conjugado de fármaco-anticuerpo (46) no presentó efecto inhibitor del crecimiento celular frente a las células MDA-MB-468 (> 100 (nM)) negativas para HER2.

El conjugado de fármaco-anticuerpo (50) presentó un efecto de inhibición del crecimiento celular de la $CI_{50} < 1$ (nM) frente a las líneas de células MDA-MB-453 positivas para HER2. Por otra parte, el conjugado de fármaco-anticuerpo (50) no presentó efecto inhibitor del crecimiento celular frente a las células MKN-45 (> 100 (nM)) negativas para HER2.

Ejemplo de evaluación 6 Ensayo antitumoral (4)

células de la línea Capan-1 (ATCC) de cáncer de páncreas humano que expresaban débilmente HER2 se suspendieron en solución salina fisiológica, y 4×10^7 células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón alotímico hembra para generar el tumor sólido Capan-1. Posteriormente, este tumor sólido se mantuvo en varios pases mediante el trasplante a ratones alotímicos hembra y se usó en este ensayo. Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón alotímico hembra (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente en el día 20.

El conjugado de fármaco-anticuerpo (31), trastuzumab, o trastuzumab emtansina se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en el Día 20. Un grupo de administración de solución salina fisiológica se estableció como grupo de control.

Los resultados se muestran en la Figura 6. La administración de trastuzumab o trastuzumab emtansina no inhibe el crecimiento del tumor Capan-1. Por el contrario, la administración del conjugado de fármaco-anticuerpo (31) inhibió el crecimiento del tumor, demostrando que el conjugado de fármaco-anticuerpo (31) es eficaz para incluso un tumor con expresión baja de HER2. El conjugado de fármaco-anticuerpo (31) no inhibe el crecimiento del tumor de la línea GCIY de cáncer gástrico que no expresa HER2.

Como para la expresión de HER2 en el tumor, sobre la base de los resultados de medición de la tinción inmunohistoquímica descritos en la 3ª edición de las directrices para los ensayos con HER2 (desarrollados por el Japanese Pathology Board for Optimal Use of Trastuzumab, The Japanese Society of Pathology), se llevó a cabo la clasificación de tal manera que la puntuación de 3+ indica: alta expresión, 2+: expresión moderada, y 1+: expresión baja. Incluso si la puntuación fuera 0 en este procedimiento de medición, en el tumor se encuentran células positivas para HER2 mediante otros procedimientos de medición tales como el procedimiento de medición que utiliza un citómetro de flujo se clasificó como tumor de expresión baja.

Ejemplo de evaluación 7 Ensayo antitumoral (5)

células de la línea NCI-N87 de cáncer gástrico humano adquiridas de la ATCC se suspendieron en solución salina fisiológica, y 1×10^7 células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón alotímico hembra (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente en el Día 6. El conjugado de fármaco-anticuerpo (50) se administró por vía intravenosa a una dosis de 0,3, 1,3, o 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en el Día 6. Un grupo de administración de solución de tampón acetato se estableció como grupo de control.

Los resultados se muestran en la Figura 7. El conjugado de fármaco-anticuerpo (50) presentó un efecto antitumoral dependiente de la dosis. Además, se encontró que la administración del conjugado de fármaco-anticuerpo o (50) estaba exenta de la pérdida de peso de los ratones.

Ejemplo de evaluación 8 Ensayo antitumoral (6)

Este ensayo se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento.

Ratón: ratones alotímicos hembra de 6 a 12 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) se sometieron al experimento.

Ensayo y cálculo de la expresión: el eje mayor y el eje menor del tumor se midieron dos veces a la semana mediante el uso de un calibre digital electrónico, y se calculó el volumen del tumor (mm^3). La expresión de cálculo es como se muestra a continuación.

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 0,52 \times \text{Eje mayor (mm)} \times [\text{Eje menor (mm)}]^2$$

El conjugado de anticuerpo fármaco, trastuzumab, y trastuzumab emtansina se diluyeron con una solución de tampón acetato y se utilizaron a un volumen de 10 ml/kg para la administración intravenosa en la vena de la cola de cada ratón.

Se usó en este ensayo un tumor (ST225; South Texas Accelerated Research Therapeutics (START)) extirpado de un paciente con cáncer de mama y mantenido en varios pases mediante trasplante a ratones alotímicos hembra. Este

tumor expresó moderadamente HER2 (que recibió una puntuación de 2+ en la tinción inmunohistoquímica).

5 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado del cuerpo de cada ratón alotímico hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen del tumor alcanzó 100 a 300 mm³. Los datos de agrupamiento se definieron como Día 0. El conjugado de fármaco-anticuerpo (50), trastuzumab, o trastuzumab emtansina se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en el Día 0. Un grupo de administración de solución de tampón acetato se estableció como grupo de control.

Los resultados se muestran en la Figura 8. La administración de trastuzumab no inhibe el crecimiento del tumor ST225 de cáncer de mama que expresa moderadamente HER2. Por el contrario, la administración de trastuzumab emtansina o del conjugado de fármaco-anticuerpo (50) inhibió de forma notable el crecimiento del tumor.

10 Ejemplo de evaluación 9 Ensayo antitumoral (7)

Se usó en este ensayo el tumor (ST910; START) extirpado de un paciente con cáncer de mama y mantenido en varios pases mediante el trasplante a ratones alotímicos hembra. Este tumor expresó moderadamente HER2 (que recibió una puntuación de 1+ en la tinción inmunohistoquímica).

15 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado del cuerpo de cada ratón alotímico hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen del tumor alcanzó 100 a 300 mm³. Los datos de agrupamiento se definieron como Día 0. El conjugado de fármaco-anticuerpo (50), trastuzumab, o trastuzumab emtansina se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en el Día 0. Un grupo de administración de solución de tampón acetato se estableció como grupo de control.

20 Los resultados se muestran en la Figura 9. La administración de trastuzumab o trastuzumab emtansina no inhibe el crecimiento del tumor ST910 de cáncer de mama que expresa moderadamente HER2. Por el contrario, la administración del conjugado de fármaco-anticuerpo (50) inhibió de forma notable el crecimiento del tumor, demostrando que el conjugado de fármaco-anticuerpo (50) es eficaz para el tumor de cáncer de mama exprese moderadamente HER2. Este Ejemplo de evaluación 9 se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que el Ejemplo de evaluación 8.

25 Ejemplo de evaluación 10 Ensayo antitumoral (8)

Este ensayo se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento. Los Ejemplos de evaluación 11 a 13 se llevaron también a cabo mediante este procedimiento.

Ratón: ratones alotímicos hembra de 5 a 8 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) se sometieron al experimento.

30 Ensayo y cálculo de la expresión: el eje mayor y el eje menor del tumor se midieron dos veces a la semana mediante el uso de un calibre digital electrónico, y se calculó el volumen del tumor (mm³). La expresión de cálculo es como se muestra a continuación.

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 0,52 \times \text{Eje mayor (mm)} \times [\text{Eje menor (mm)}]^2$$

35 El conjugado de anticuerpo fármaco, trastuzumab, y trastuzumab emtansina se diluyeron con una solución de tampón acetato y se utilizaron a un volumen de 10 ml/kg para la administración intravenosa en la vena de la cola de cada ratón.

Se usó en este ensayo el tumor (CTG-0401; Champions Oncology Inc.) extirpado de un paciente con cáncer colorrectal y mantenido en varios pases mediante el trasplante a ratones alotímicos hembra. Este tumor expresó de forma baja o moderada HER2 (que recibió una puntuación de 1+ o 2+ en la tinción inmunohistoquímica).

40 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado izquierdo del cuerpo de cada ratón alotímico hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen del tumor alcanzó 100 a 300 mm³. Los datos de agrupamiento se definieron como Día 0. El conjugado de fármaco-anticuerpo (50), trastuzumab, o trastuzumab emtansina se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en el Día 0. Un grupo de administración de solución de tampón acetato se estableció como grupo de control.

45 Los resultados se muestran en la Figura 10. La administración de trastuzumab o trastuzumab emtansina no inhibe el crecimiento del tumor CTG-0401 de cáncer colorrectal que expresa de forma baja o moderada HER2. Por el contrario, la administración del conjugado de fármaco-anticuerpo (50) inhibió de forma notable el crecimiento del tumor.

Ejemplo de evaluación 11 Ensayo antitumoral (9)

50 Se usó en este ensayo el tumor (CTG-0860; Champions Oncology Inc.) extirpado de un paciente con cáncer de pulmón no microcítico y mantenido en varios pases mediante el trasplante a ratones alotímicos hembra. Este tumor expresó moderadamente HER2 (que recibió una puntuación de 2+ en la tinción inmunohistoquímica).

5 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado izquierdo del cuerpo de cada ratón alotímico hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen del tumor alcanzó 100 a 300 mm³. Los datos de agrupamiento se definieron como Día 0. El conjugado de fármaco-anticuerpo (50), trastuzumab, o trastuzumab emtansina se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en el Día 0. Un grupo de administración de solución de tampón acetato se estableció como grupo de control.

Los resultados se muestran en la Figura 11. La administración de trastuzumab o trastuzumab emtansina no inhibe el crecimiento del tumor CTG-0860 de cáncer de pulmón no microcítico que expresa moderadamente HER2. Por el contrario, la administración del conjugado de fármaco-anticuerpo (50) inhibió de forma notable el crecimiento del tumor.

Ejemplo de evaluación 12 Ensayo antitumoral (10)

10 Se usó en este ensayo el tumor (CTG-0927; Champions Oncology Inc.) extirpado de un paciente con cáncer del conducto biliar y mantenido en varios pases mediante el trasplante a ratones alotímicos hembra. Este tumor expresó de forma elevada HER2 (que recibió una puntuación de 3+ en la tinción inmunohistoquímica.

15 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado izquierdo del cuerpo de cada ratón alotímico hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen del tumor alcanzó 100 a 300 mm³. Los datos de agrupamiento se definieron como Día 0. El conjugado de fármaco-anticuerpo (50), trastuzumab, o trastuzumab emtansina se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en el Día 0. Un grupo de administración de solución de tampón acetato se estableció como grupo de control.

20 Los resultados se muestran en la Figura 12. La administración de trastuzumab no inhibe el crecimiento del tumor CTG-0927 de cáncer del conducto biliar que expresa de forma elevada HER2. Por el contrario, La administración de trastuzumab o trastuzumab emtansina inhibió el crecimiento del tumor. Además, la administración del conjugado de fármaco-anticuerpo (50) indujo la regresión del tumor.

Ejemplo de evaluación 13 Ensayo antitumoral (11)

25 Se usó en este ensayo el tumor (CTG-0137; Champions Oncology Inc.) extirpado de un paciente con cáncer de esófago y mantenido en varios pases mediante el trasplante a ratones alotímicos hembra. Este tumor expresó de forma elevada HER2 (que recibió una puntuación de 3+ en la tinción inmunohistoquímica.

30 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado izquierdo del cuerpo de cada ratón alotímico hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen del tumor alcanzó 100 a 300 mm³. Los datos de agrupamiento se definieron como Día 0. El conjugado de fármaco-anticuerpo (50), trastuzumab, o trastuzumab emtansina se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en el Día 0. Un grupo de administración de solución de tampón acetato se estableció como grupo de control.

Los resultados se muestran en la Figura 13. La administración de trastuzumab no inhibe el crecimiento del tumor CTG-0137 de cáncer de esófago que expresa de forma elevada HER2. Por el contrario, la administración de trastuzumab emtansina o del conjugado de fármaco-anticuerpo (50) inhibió de forma notable el crecimiento del tumor.

Ejemplo de evaluación 14 Ensayo antitumoral (12)

35 células de la línea SK-OV-3 de cáncer de ovario humano que expresaban débilmente HER2 de forma elevada se suspendieron en solución salina fisiológica, y 4×10^7 células se trasplantaron por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón alotímico hembra para preparar el tumor sólido SK-OV-3. Posteriormente, este tumor sólido se mantuvo en varios pases mediante el trasplante a ratones alotímicos hembra y se usó en este ensayo.

40 Una sección tumoral del tumor sólido se trasplantó por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón alotímico hembra, y los ratones se agruparon aleatoriamente cuando el volumen del tumor alcanzó 100 a 300 mm³. Los datos de agrupamiento se definieron como Día 0. El conjugado de fármaco-anticuerpo (50), trastuzumab, o trastuzumab emtansina se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la vena de la cola de cada ratón en el Día 0. Un grupo de administración de solución salina fisiológica se estableció como grupo de control.

45 Los resultados se muestran en la Figura 14. La administración de trastuzumab no inhibe el crecimiento del tumor SK-OV-3. Por el contrario, la administración de trastuzumab emtansina o del conjugado de fármaco-anticuerpo (50) inhibió de forma notable el crecimiento del tumor.

Texto libre del listado de secuencias

50 SEQ ID NO: 1 - Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada del anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra HER2
 SEQ ID NO: 2 - Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera del anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra HER2

ES 2 727 351 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Daiichi Sankyo Company, Limited
 <120> CONJUGADO DE FÁRMACO-ANTICUERPO DIRIGIDO CONTRA ANTI-HER2
 <130> PD20-9008WO
 5 <150> JP2014-017777
 <151> 31/01/2014
 <150> JP2014-168944
 <151> 22/08/2014
 <150> JP2014-227886
 <151> 10/11/2014
 10 <160> 2
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 450
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Trastuzumab
 <400> 1

1	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
				5						10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
				20					25					30		
	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
	Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115					120					125			

ES 2 727 351 T3

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

ES 2 727 351 T3

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Trastuzumab

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

ES 2 727 351 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

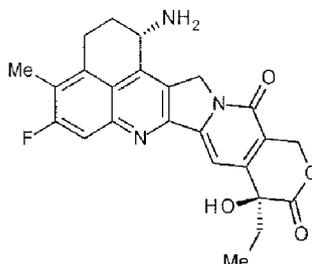
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

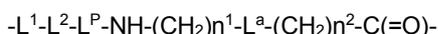
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

REIVINDICACIONES

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



5 se conjuga con un anticuerpo anti-HER2 a través de un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



mediante un enlace tioéter que se forma en un resto de enlace disulfuro presente en la parte de la bisagra del anticuerpo anti-HER2, en la que

10 el anticuerpo anti-HER2 se une al extremo de L^1 , el compuesto antitumoral se une al grupo carbonilo del resto $-(CH_2)n^2-C(=O)-$ con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como la posición de unión, en la que

n^1 representa un entero de 0 a 6,

n^2 representa un entero de 0 a 5,

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

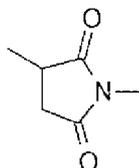
en la que n^3 representa un entero de 2 a 8,

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

en el que n^4 representa un entero de 1 a 6,

L^P representa un resto del tetrapéptido $-GGFG-$,

20 L^a representa $-O-$ o un enlace simple, y $-(Succinimid-3-yl-N)-$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



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

25 2. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con reivindicación 1, en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco que tiene un fármaco unido a $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ es una estructura de enlazador-fármaco seleccionada 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)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

30 - (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)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

35 - (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)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)$

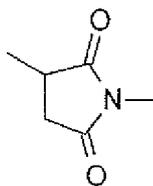
- (NH-DX)

- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

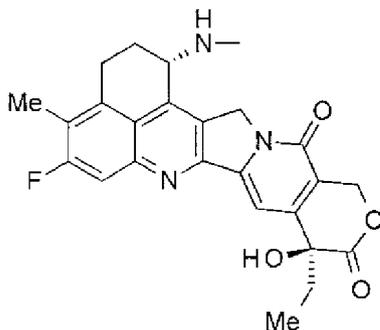
40 - (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

- (Succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

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



que se une al anticuerpo anti-HER2 en la posición 3 del mismo y se une a un grupo metileno en la estructura del enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1, -(NH-DX) representa un grupo representado por la siguiente fórmula:



5

en el que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 está en la posición de unión, y -GGFG- representa un resto del tetrapéptido -Gly-Gly-Phe-Gly-.

3. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con reivindicación 2, en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco es una estructura de enlazador fármaco seleccionada entre el siguiente grupo:

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

15 4. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con reivindicación 3, en el que el resto de la estructura de enlazador fármaco es -(Succinimid-3-il- N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

5. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con reivindicación 3, en el que resto de la estructura de enlazador-fármaco es -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

20 6. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con reivindicación 3, en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco es -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

7. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo anti-HER2 comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 449 de la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

25 8. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo anti-HER2 comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

30 9. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el número promedio de unidades de la estructura de enlazador-fármaco seleccionada conjugada por molécula de anticuerpo está en el intervalo de entre 2 a 8.

10. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que un número promedio de unidades de la estructura de enlazador-fármaco seleccionada conjugada por molécula de anticuerpo está en el intervalo de entre 3 a 8.

35 11. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, una sal del mismo, o un hidrato del mismo, para su uso como un medicamento.

12. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, una sal del

mismo, o un hidrato del mismo, para su uso como un fármaco antitumoral y/o un fármaco anticanceroso.

5 13. El fármaco antitumoral y/o el fármaco anticanceroso de acuerdo con la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de cuello de útero, cáncer de esófago, carcinoma de escamocelular, cáncer peritoneal, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de útero, cáncer de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, cáncer de pene, leucemia, linfoma maligno, plasmacitoma, mieloma o sarcoma.

10 14. Una composición farmacéutica que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, una sal del mismo, o un hidrato del mismo como un componente activo, y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.

15 15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de cuello de útero, cáncer de esófago, carcinoma de escamocelular, cáncer peritoneal, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de útero, cáncer de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, cáncer de pene, leucemia, linfoma maligno, plasmacitoma, mieloma o sarcoma.

FIG.1

SEQ ID NO:1 – Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

FIG.2

SEQ ID NO:1 – Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG.3

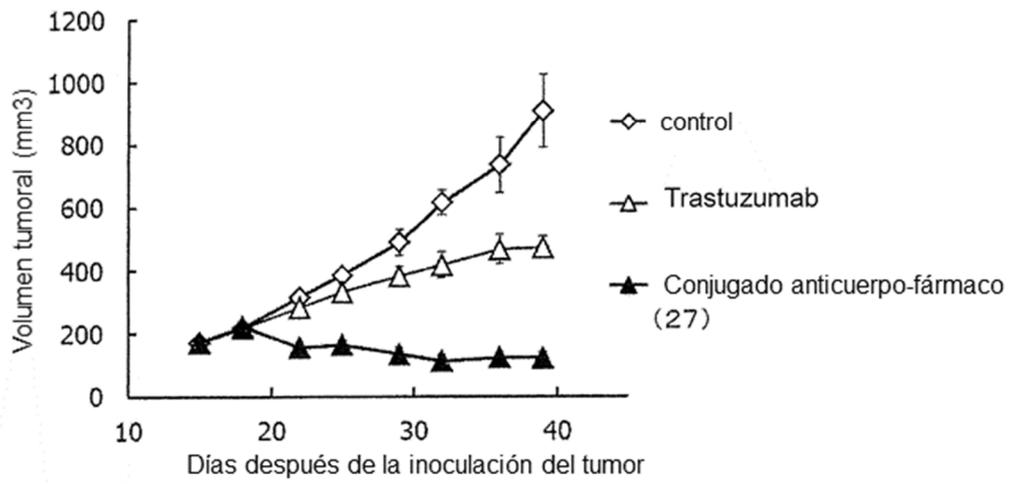


FIG.4

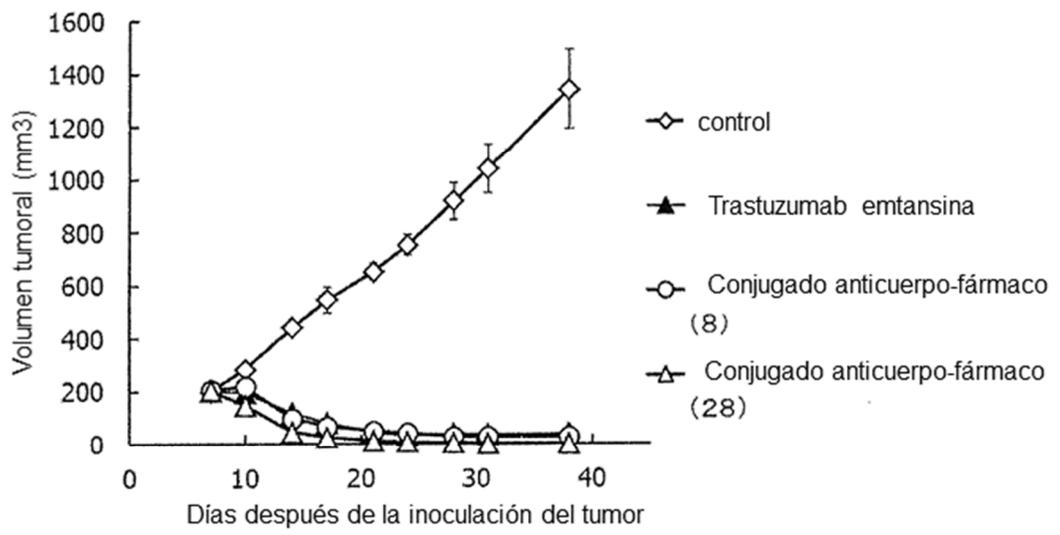


FIG.5

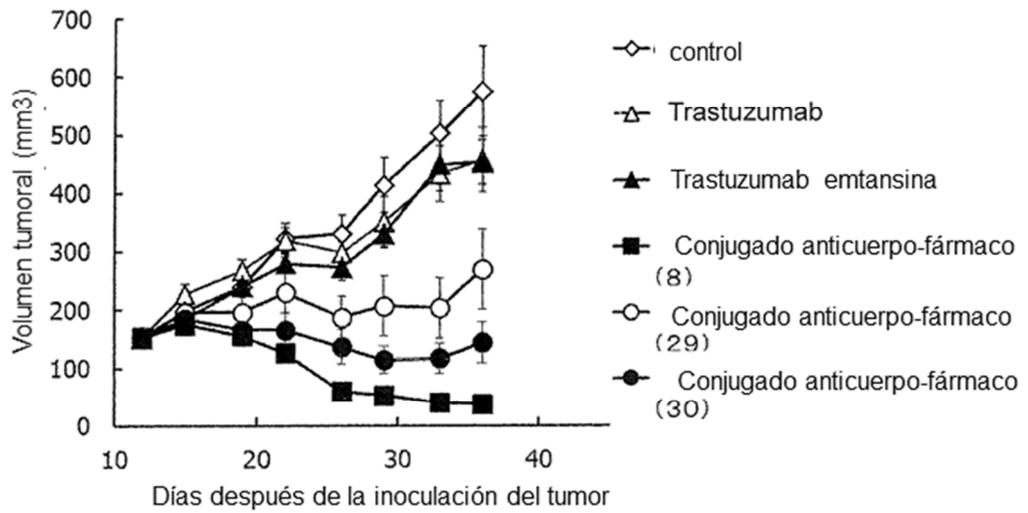


FIG.6

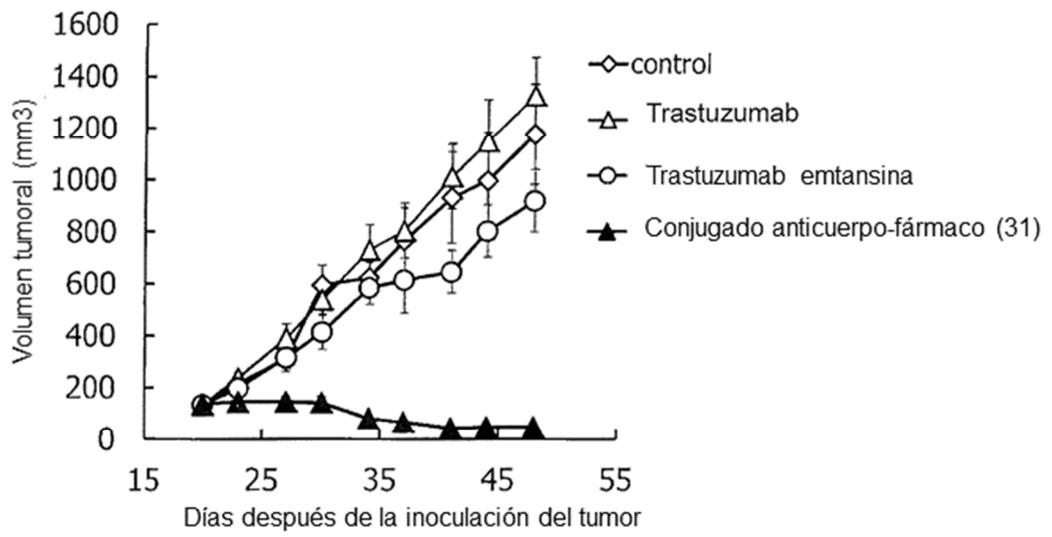


FIG.7

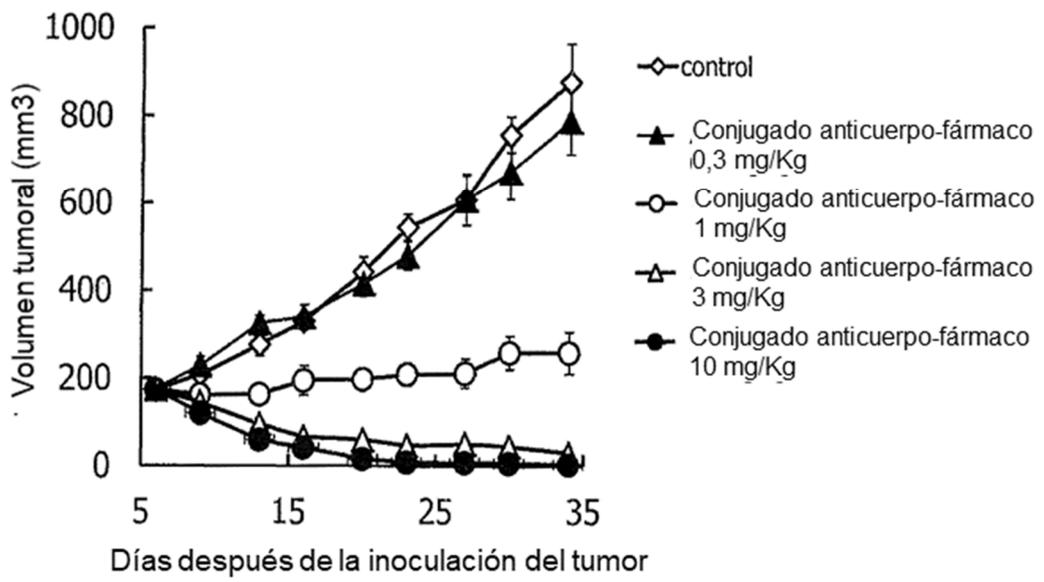


FIG.8

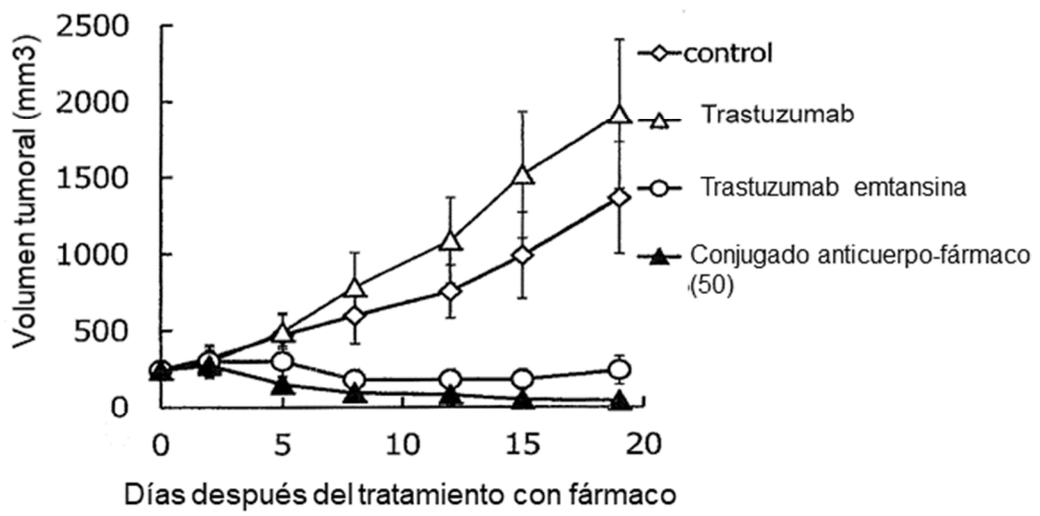


FIG.9

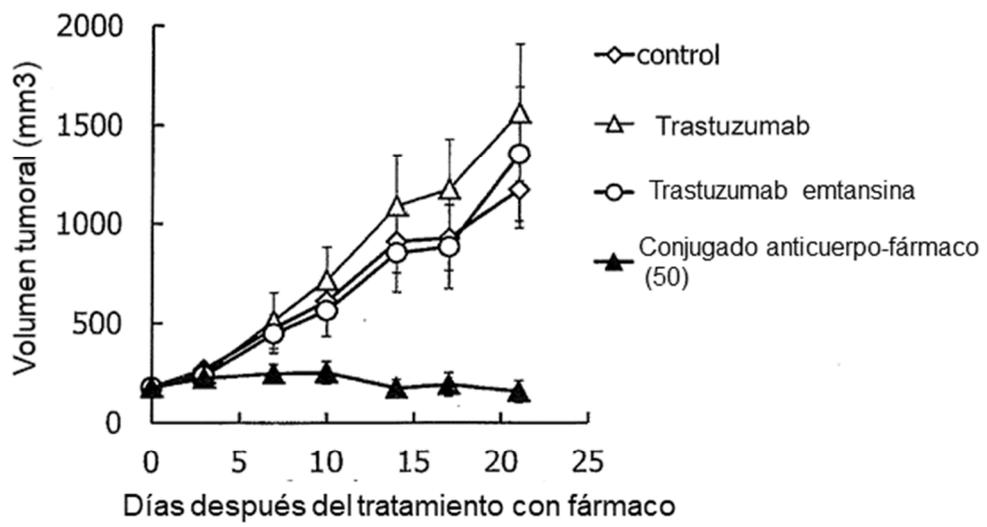


FIG.10

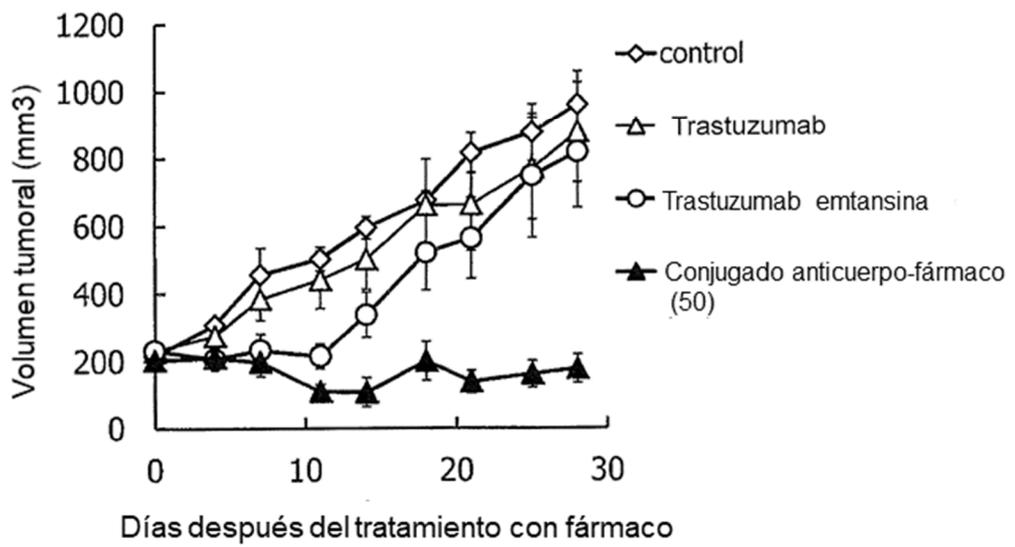


FIG.11

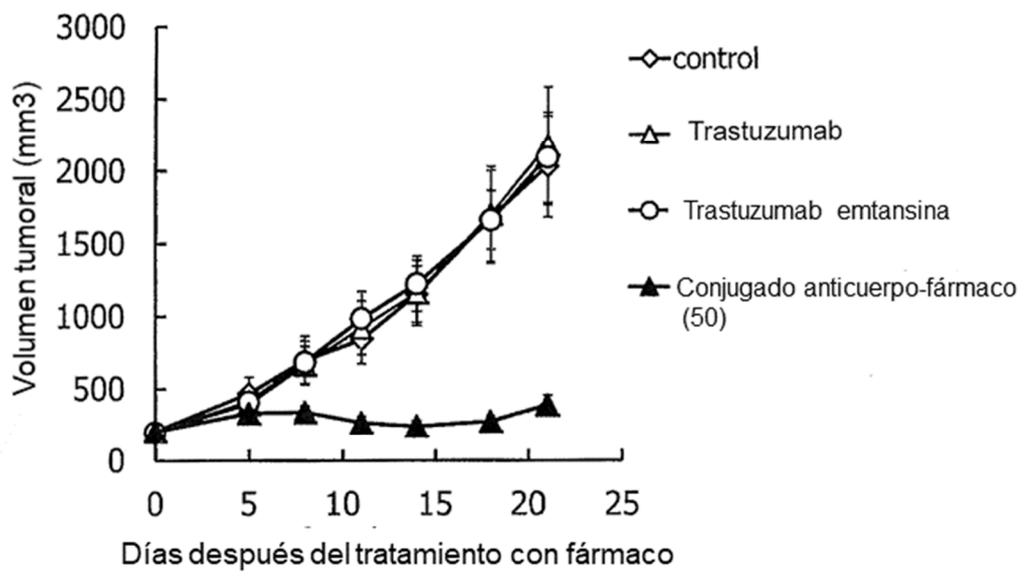


FIG. 12

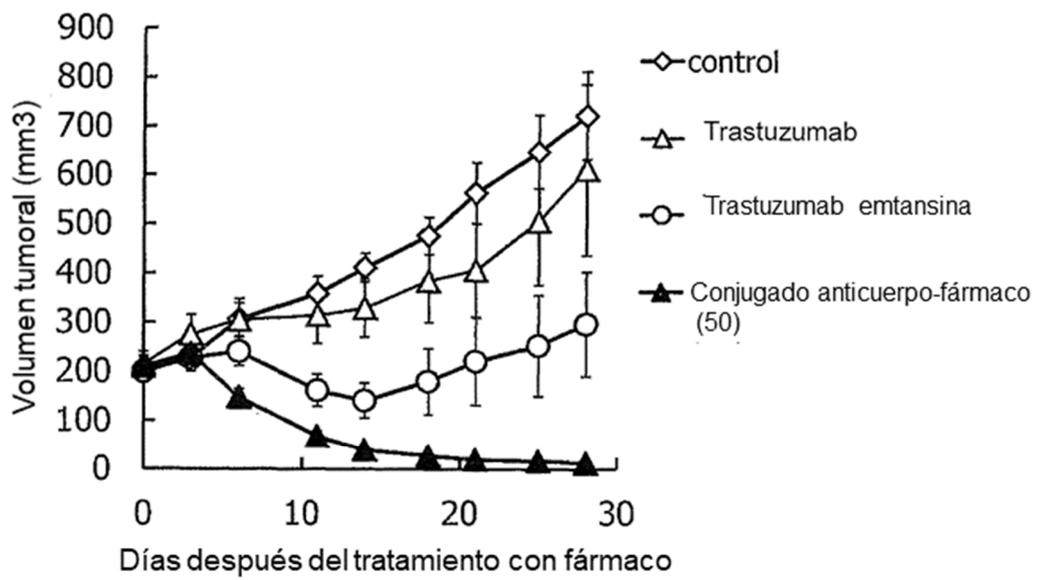


FIG. 13

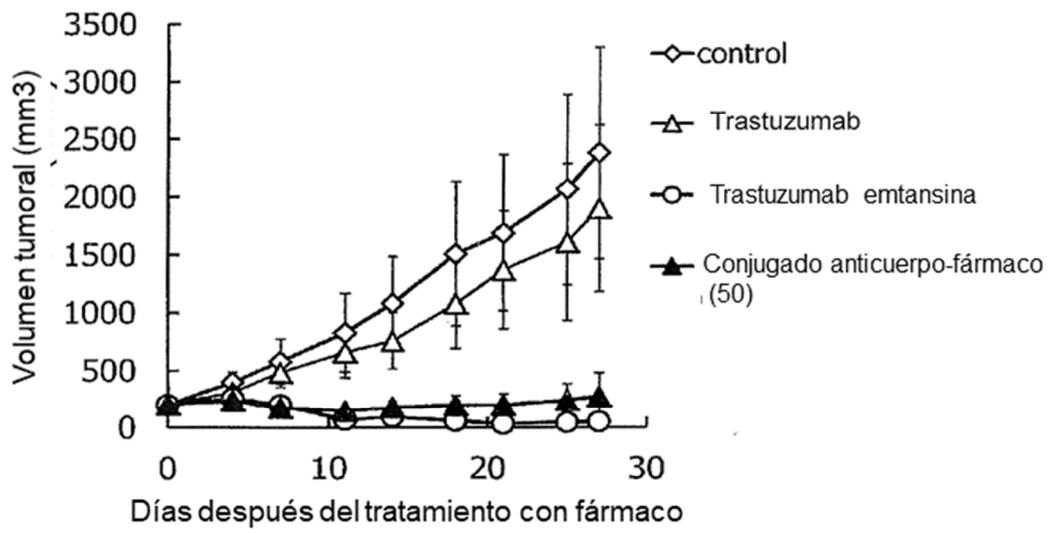


FIG.14

