

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 505**

51 Int. Cl.:

A61K 31/537 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2015 PCT/CN2015/077887**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15165413**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2015 E 15786402 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3138568**

54 Título: **Nuevo conjugado estable de anticuerpo-fármaco, método de preparación y uso del mismo**

30 Prioridad:

29.04.2014 CN 201410174890

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

02.01.2020

73 Titular/es:

**FOR ALL DESIGNATED STATES (100.0%)
105C, A2 Building, 218 Xinghu Street, Suzhou
Industrial park, Suzhou
Jiangsu 215123, CN**

72 Inventor/es:

**QIN, GANG;
YUAN, JINDUO;
TAN, CHUBING;
JIANG, LU;
SHI, LILI;
LV, CAO y
CHEN, LEILEI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 736 505 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

Nuevo conjugado estable de anticuerpo-fármaco, método de preparación y uso del mismo

Campo técnico

5 La presente invención pertenece al campo biofarmacéutico y biotecnológico, particularmente se refiere a un nuevo conector (también llamado agente de acoplamiento) con una función de acoplamiento, un nuevo intermedio de conector-citotoxina con una estructura estable de anillo abierto y su método de preparación, y su uso en el acoplamiento de moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, moléculas trazadoras, etc., al extremo C de proteínas y péptidos de una manera específica del sitio. Los conectores y los métodos de acoplamiento de la presente invención se pueden utilizar en la preparación de ADC para terapia dirigida a tumores, reactivos de diagnóstico trazadores dirigidos y reactivos de administración muy eficaces para tipos celulares específicos. El ADC preparado según la presente invención tiene una estructura estable de anillo abierto, una carga de fármaco particular y datos farmacocinéticos reproducibles. Esto proporciona soluciones fundamentales a los dos problemas principales de los ADC actuales: estabilidad y heterogeneidad. En particular, se refiere a un nuevo conjugado de anticuerpo anti-ErbB2/Her2 humano-derivado de maitansina, un nuevo conjugado de anticuerpo anti-ErbB2/Her2 humano-derivado de auristatina, sus métodos de preparación y uso en la terapia dirigida de tumores positivos para ErbB2/Her2.

Antecedentes de la invención

20 Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) son una nueva generación de fármacos antitumorales potentes basados en anticuerpos monoclonales, combina las ventajas de los anticuerpos (como un grupo de dirección) y los fármacos citotóxicos tradicionales (con fuerte citotoxicidad). En 2011, ADC Adcetris (brentuximab vedotina) fue aprobado por la FDA de los Estados Unidos para el tratamiento del linfoma de Hodgkin; en 2013 se aprobó Kadcyla (ado-trastuzumab emtansina) para el tratamiento del cáncer de mama metastásico avanzado. Hasta abril de 2015, hay aproximadamente 50 candidatos a ADC en ensayos clínicos de fase I, II o III respectivamente.

25 El mecanismo de los ADC es el siguiente: un anticuerpo o ligando basado en anticuerpo reconoce específicamente un antígeno particular en la superficie celular y se une a él; el complejo formado es endocitado, junto con el fármaco de molécula pequeña; el fármaco de molécula pequeña se libera en la célula en una forma activa adecuada después de que el anticuerpo es hidrolizado por proteinasas o el propio conector se rompe y destruye las células diana. Los fármacos citotóxicos de moléculas pequeñas utilizados en ADC son muy potentes, habitualmente 10-1000 veces más potentes que los fármacos quimioterapéuticos de primera línea que se utilizan actualmente en la clínica.

30 El ADC consta de tres partes: un anticuerpo, un conector y una citotoxina. En donde el anticuerpo determina el tipo de célula diana y el sitio; la citotoxina puede ser cualquier compuesto que pueda causar muerte celular, inducir apoptosis celular o reducir la viabilidad celular; y el conector es un puente que conecta los dos entre sí, por tanto, es la parte clave de un diseño de ADC y el factor clave para realizar la administración de fármacos dirigida.

35 Hay dos tipos de conectores empleados por ADC: escindible y no escindible. Un conector ideal debe cumplir los siguientes requisitos: ser suficientemente estable fuera de las células para asegurar que el fármaco de molécula pequeña esté conectado al ligando; después de entrar en la célula, el conector escindible se romperá en condiciones apropiadas y liberará los fármacos de moléculas pequeñas activos; para el conector no escindible, el componente activo consta de una pequeña molécula, un conector y restos de aminoácidos producidos por la hidrolización enzimática de los ligandos.

40 Un conector conecta un anticuerpo y citotoxinas de moléculas pequeñas. Si las citotoxinas se desprenden antes de alcanzar la diana, provocará toxicidad en tejidos normales y, por otro lado, reducirá la eficacia de ADC que han alcanzado la diana. Por tanto, en el desarrollo de ADC, el diseño del conector y las estrategias de acoplamiento relacionadas son críticos. No solo desempeña un papel clave en la estabilización del ADC, sino que también afecta directamente a la actividad biológica, estados de agregación, la biodisponibilidad *in vivo*, distribución y metabolismo del conjugado. La mayoría de los ADC actualmente comercializados y en ensayos clínicos utilizan conectores y estrategias de acoplamiento originadas de Seattle Genetics e Immunogen. Estas dos empresas utilizaron estrategias de acoplamiento ligeramente diferentes, pero ambas utilizaron la estructura de sulfosuccinimida (enlace de tiosuccinimida) formada a través de la reacción de un grupo tiol y una maleimida para conectar los fármacos de moléculas pequeñas y el anticuerpo de dirección (Figura 1); Ya que esta reacción es rápida, cuantitativa y se produce en condiciones suaves, su uso está generalizado (Hermanson GT, Bioconjugate Techniques 2ª edición, 2008.). Desafortunadamente, el enlace de sulfosuccinimida no es estable, este grupo tiol se intercambiará de forma reversible con otros tioles *in vivo* (reacción de eliminación de maleimida). La cisteína, el glutatión y la albúmina *in vivo* proporcionan altas concentraciones de grupos tiol, que pueden capturar el anillo de succinimida en el enlace de sulfosuccinimida e intercambiarse con el grupo tiol en el ADC. Dicha reacción de intercambio conduce directamente al desprendimiento de las citotoxinas del anticuerpo en un ADC (Alley SC *et al*, Bioconjug Chem 2008; Shen BQ *et*

al, Nat Biotechnol 30, 184-189, 2012; Chudasama VL, *et al.*, Clin. Pharmacol. Ther. 92, 520-527, 2012).

5 Basándose en investigaciones químicas previas, la estructura de sulfosuccinimida podría abrirse mediante hidrólisis (hidrólisis de apertura de anillo). Después de abrir el anillo, la reacción de intercambio de tiol *in vivo* con sulfosuccinimida no tendrá lugar (Fig. 1, una vista esquemática de una reacción de apertura de anillo), aumentando de este modo la estabilidad *in vivo* del ADC. Las condiciones químicas convencionales de apertura de anillos incluyen: tratamiento con base, tratamiento con molibdato, etc. (Kalia J *et al.*, 2007), pero estas condiciones no se pueden aplicar directamente a la apertura de anillo de succinimida en ADC, ya que estas duras condiciones de procesamiento provocarán daños irreversibles a las proteínas (anticuerpos), de modo que las condiciones anteriores no pueden aplicarse directamente a la apertura de anillo de succinimida en los ADC.

10 Se ha hecho un gran esfuerzo para resolver este problema. Por ejemplo: en Genentech, examinaron la estructura de la superficie del anticuerpo y evaluaron las propiedades químicas para encontrar una ubicación adecuada como el sitio de acoplamiento citotóxico, que acelerará la reacción de apertura del anillo de sulfosuccinimida (Shen BQ *et al.*, Nat Biotechnol 30,184-189,2012); en Seattle Genetics, utilizan ácido diaminopropiónico (DPR) para introducir un amino básico en una posición adyacente a la maleimida en el conector, para promover la hidrólisis rápida de la estructura de sulfosuccinimida en ADC (Lyon RP *et al.*, Nat Biotechnol oct 2014; 32 (10): 1059-62; documento US2013/0309256 A1); en Pfizer, utilizaron un tampón de borato alcalino suave para promover la hidrólisis de la estructura de sulfosuccinimida (Tumey LN, *et al.*, Bioconjugate Chem 2014, (25):1871-1880). Todas las estrategias anteriores pueden promover la hidrólisis de la estructura de sulfosuccinimida en cierta medida, estabilizando de este modo los ADC, pero todas se enfrentan el mismo problema: el proceso de hidrólisis debe llevarse a cabo después del acoplamiento de anticuerpo-citotoxina, lo que hace que el proceso de preparación farmacéutica de ADC sea más complicado, con un etapa de apertura de anillo adicional, y aumenta el riesgo de daño e inactivación de anticuerpos; lo que es más importante, debido a que el proceso de hidrólisis se lleva a cabo después de la conjugación de citotoxina-anticuerpo, el grado de hidrólisis de la estructura de sulfosuccinimida no se puede controlar con precisión, haciendo difícil preparar el patrón de control de calidad.

25 Sin embargo, las estrategias mejoradas anteriores solo son aplicables a las que utilizan cisteínas de anticuerpo como los sitios de conjugación. En cuanto a las que utilizan lisinas de anticuerpos como sitios de acoplamiento, y la citotoxina tiene uno o varios grupos tiol reactivos (por ejemplo, el fármaco comercializado Kadcyly, que utiliza moléculas de DM1 de Immunogen y el conector SMCC correspondiente), la citotoxina se puede reemplazar fácilmente por el grupo tiol de cisteína, glutatión y albúmina abundantes *in vivo*. En la actualidad, no hay ninguna manera eficaz de promover activamente la reacción de apertura de anillo de sulfosuccinimida y por tanto el desprendimiento de citotoxina *in vivo* está fuera de control, dejando un riesgo potencial para la seguridad de los fármacos.

35 La tecnología de conjugación principal actual es la estrategia de acoplamiento químico basada principalmente en los restos de lisina o cisteína en el anticuerpo. Debido a la diversidad en número y ubicación de estos aminoácidos en el anticuerpo que pueden reaccionar con conectores, el número y la ubicación de las citotoxinas en los ADC son variables y los ADC obtenidos de este modo son heterogéneos. Esta heterogeneidad afectará a la calidad, estabilidad, eficacia, metabolismo y toxicidad de los ADC. Por ejemplo, en las instrucciones farmacológicas de Kadcyly, un ADC que se comercializó en 2013, se indicaba claramente que el número de citotoxinas en cada anticuerpo está entre 0 y 8, el n promedio es aproximadamente 3,5. Resolver el problema de la heterogeneidad de los ADC se ha convertido en la tarea principal y un gran desafío en el desarrollo de una nueva generación de ADC.

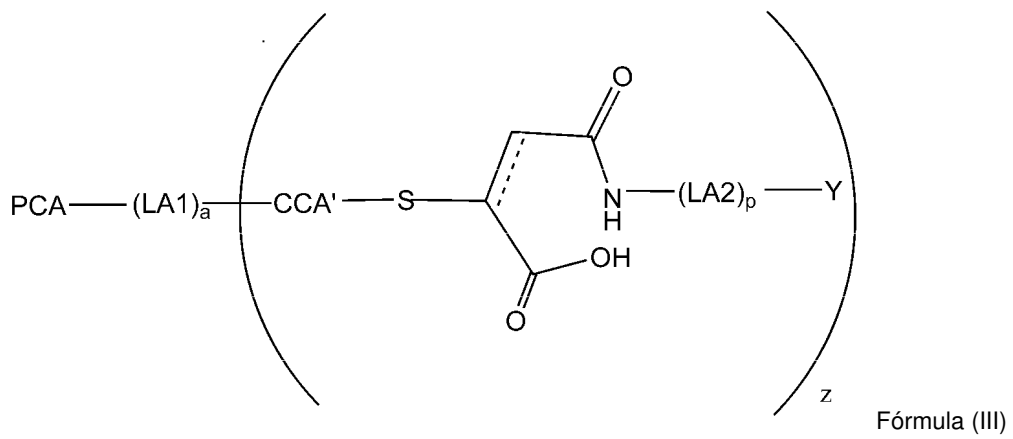
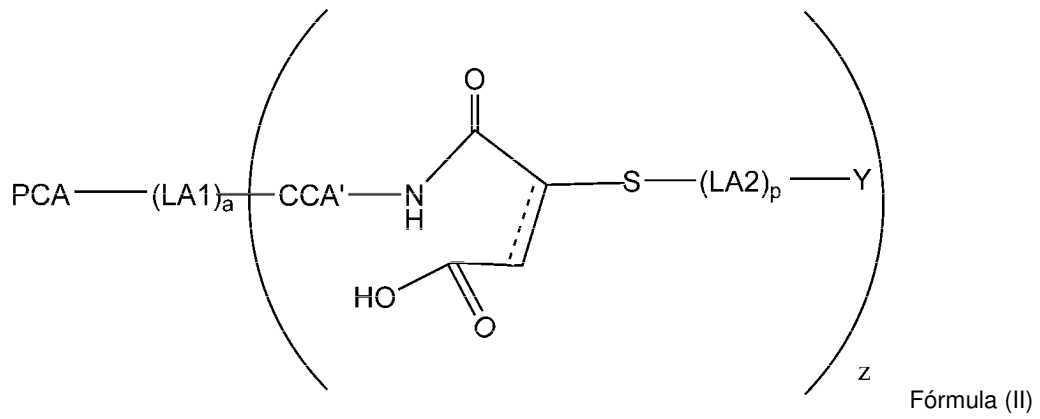
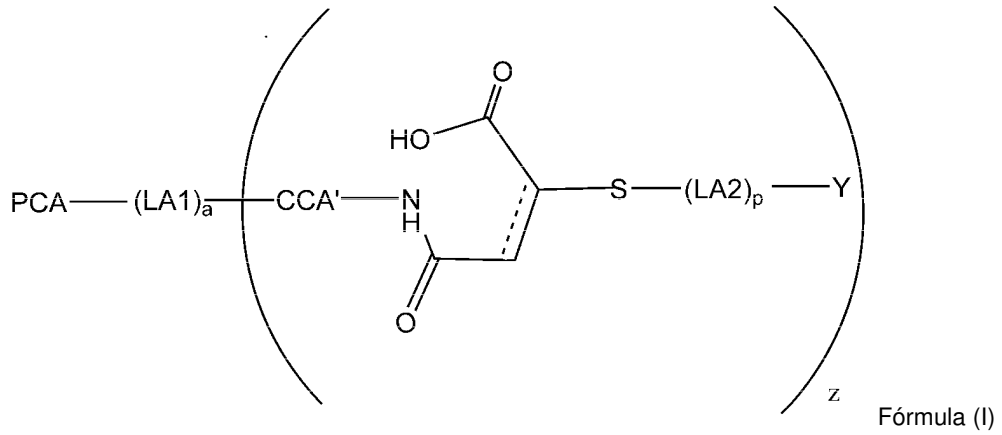
45 El antígeno ErbB2/Her2, que es un miembro de la familia de receptores transmembrana del receptor del factor de crecimiento epidérmico de mamíferos (incluyendo seres humanos), se sobreexpresa en aproximadamente el 20 % del cáncer de mama y el 16 % de la superficie celular del cáncer gástrico (Slamon *et al.* 1987, Science, Vol 235: 177-182). El anticuerpo monoclonal humanizado de Trastuzumab (nombre comercial Herceptin) puede unirse selectivamente a la región extracelular del antígeno ErbB2/Her2 humano con alta afinidad ($K_d = 5$ nM), inhibiendo la proliferación y el crecimiento de células tumorales (Hudziak *et al.* 1989, Mol. Cell Biol, Vol 9: 1165-1172; Lewis *et al.* 1993, Cancer Immuno Immunother, Vol 37: 255-263; Baselga *et al.* 1998, Cancer Res, Vol 58:2825-2831). Herceptin mostró efectos más significativos que la quimioterapia sola cuando se usó para tratar pacientes positivos para ErbB2/Her2 y logró un gran éxito comercial. Sin embargo, con el amplio uso de Herceptin, poco a poco ha surgido el problema de que algunos pacientes tienen menos o ninguna respuesta al tratamiento.

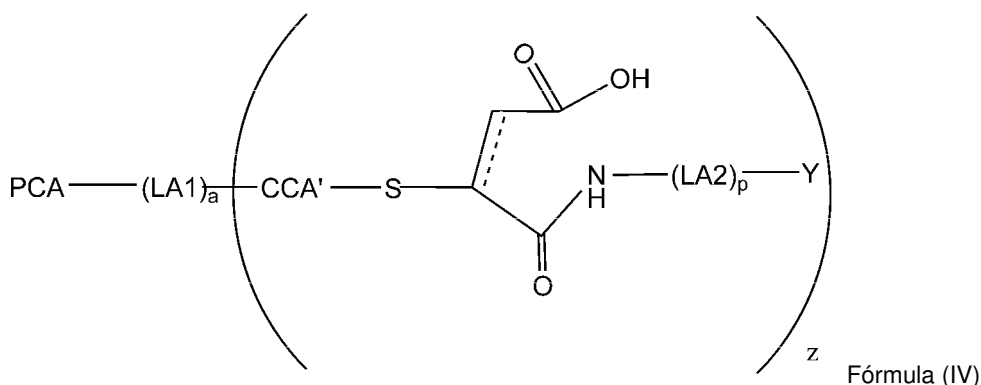
Sumario de la invención

55 La presente invención se refiere a un conector funcional de acoplamiento (también denominado agente de acoplamiento) novedoso, un intermedio de carga útil del conector, la reacción de apertura de anillo del mismo y el método de preparación del mismo. La presente invención también se refiere a un conjugado formado por el acoplamiento del extremo C de proteínas y péptidos a un intermedio de carga útil del conector de una manera específica de sitio, y el método de preparación del mismo. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende el conjugado. La presente invención también se refiere al uso del conjugado o la composición farmacéutica que comprende el conjugado en el tratamiento o prevención de una

enfermedad.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV):





o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

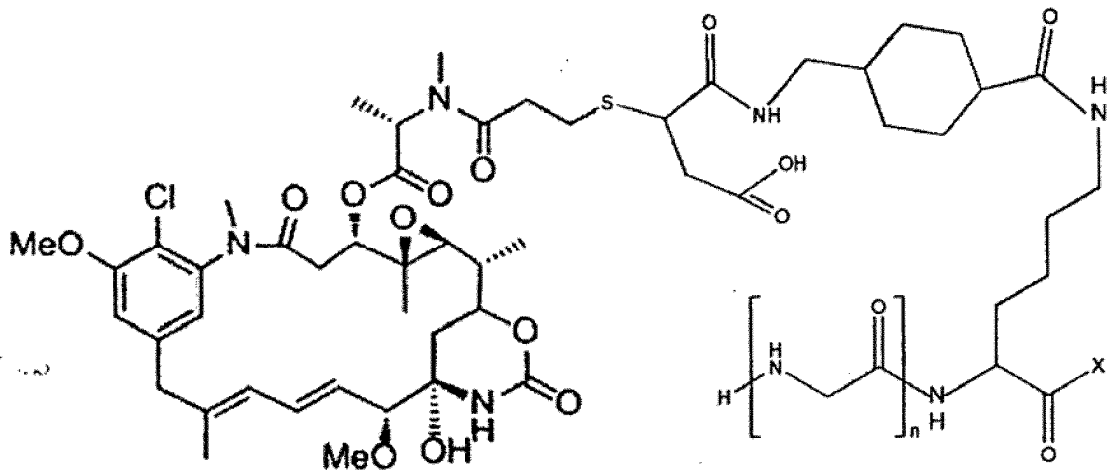
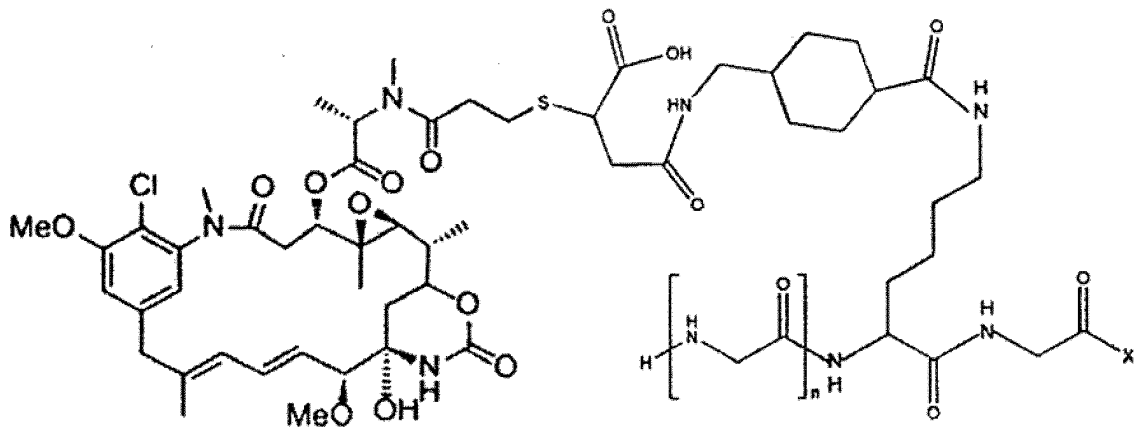
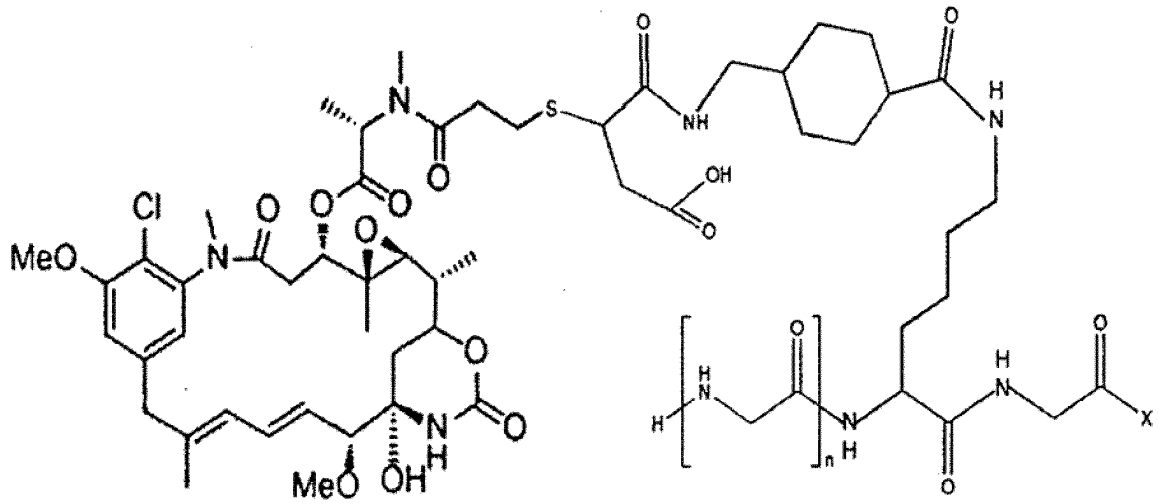
En donde, PCA es una secuencia de reconocimiento de sustrato específica de la ligasa. Dicha ligasa es capaz de unir dos moléculas formando un nuevo enlace químico. En algunas realizaciones, la ligasa es una transpeptidasa, incluyendo, pero sin limitación, diversas sortasas naturales y las nuevas transpeptidasas modificadas y optimizadas. En algunas realizaciones, la sortasa es sortasa A o sortasa B. En algunas realizaciones, PCA es una secuencia de reconocimiento específica del sustrato del receptor de ligasa. En algunas realizaciones, PCA comprende al menos una unidad estructural conectada en serie que se selecciona del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. En determinadas realizaciones, PCA comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. Preferentemente, PCA comprende de 1 a 50 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. Más preferentemente, PCA comprende de 1 a 20 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. Más preferentemente, PCA comprende 5 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. Más preferentemente, PCA comprende 3 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina.

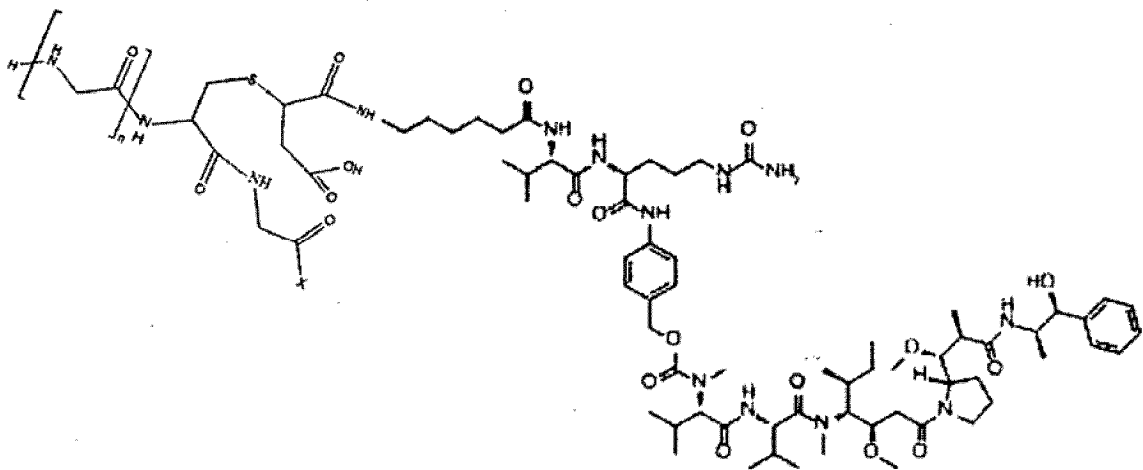
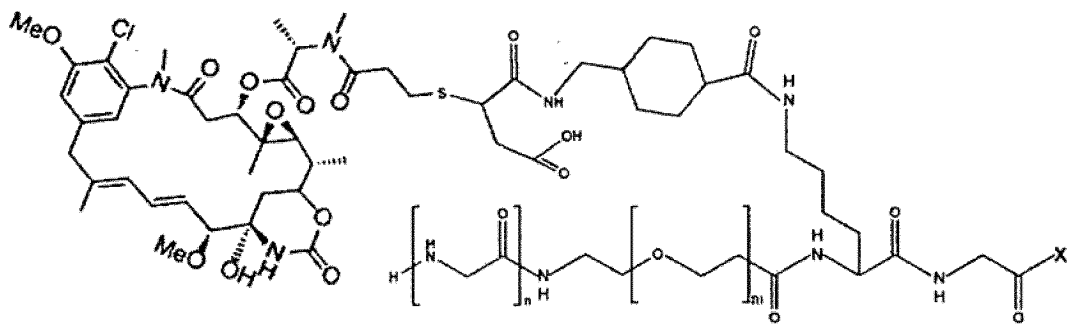
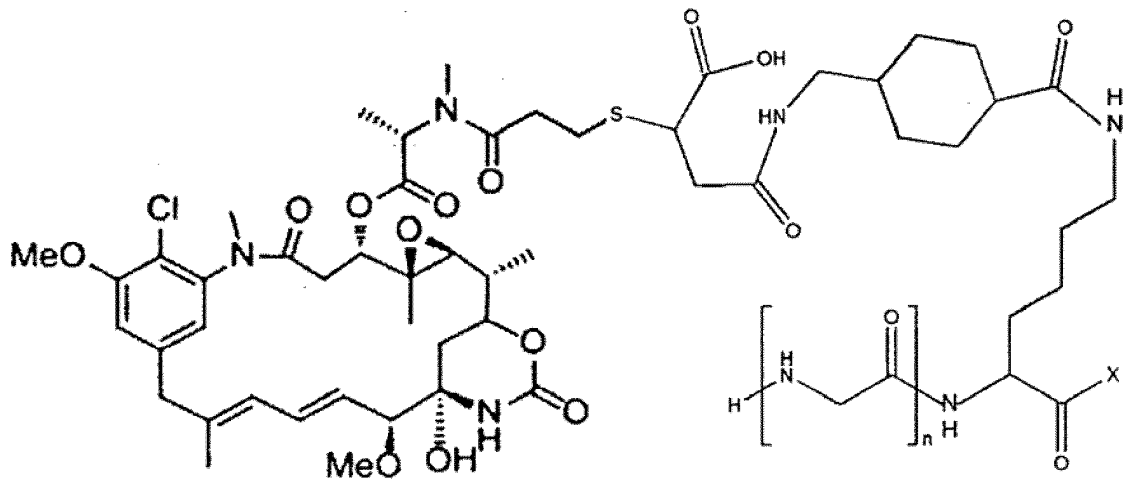
LA1, LA2 son restos conectores, a y p son independientemente 0 o 1, es decir, LA1 y LA2 están presentes o ausentes de forma independiente. LA1 es el enlace entre PCA y CCA', LA2 es el enlace entre el grupo -S- e Y. CCA' es un resto de conjugación química. ----- representa un enlace simple o doble. En determinadas realizaciones, ----- representa un enlace simple.

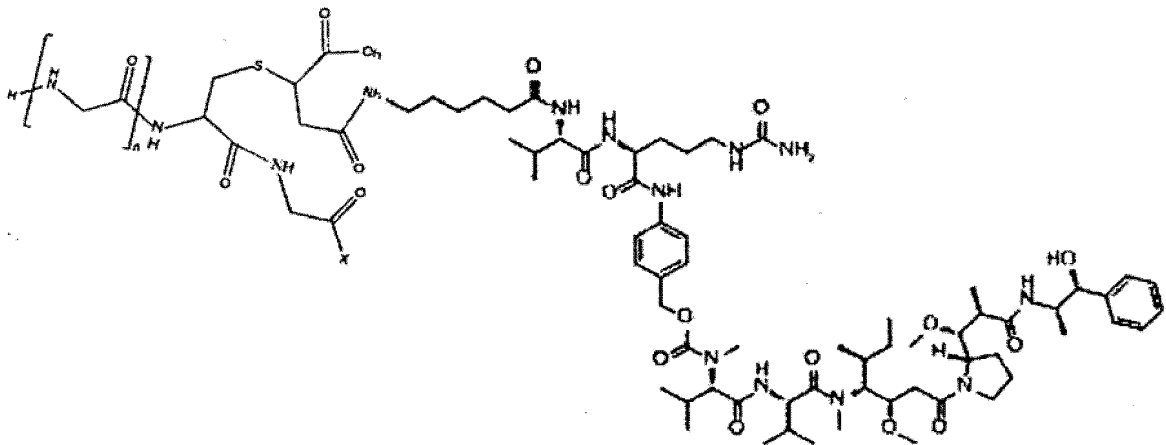
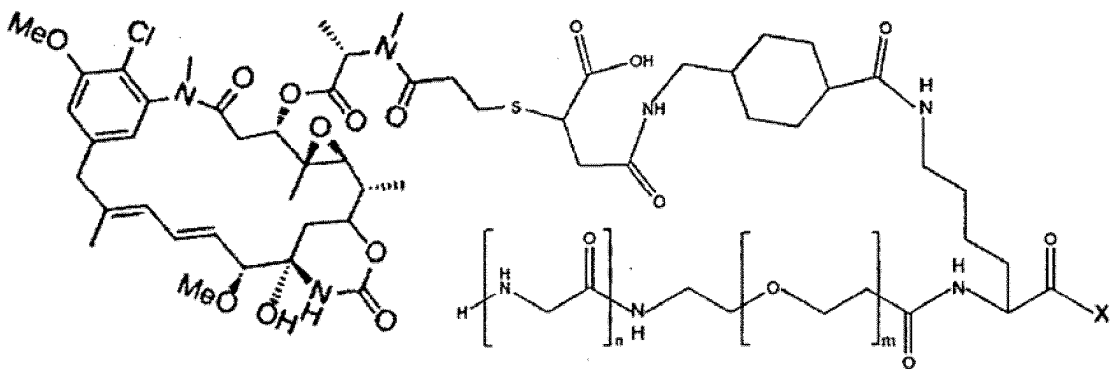
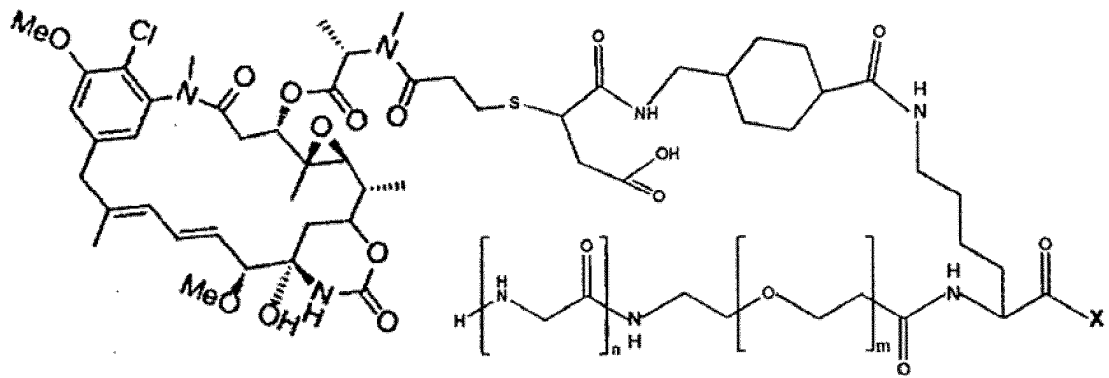
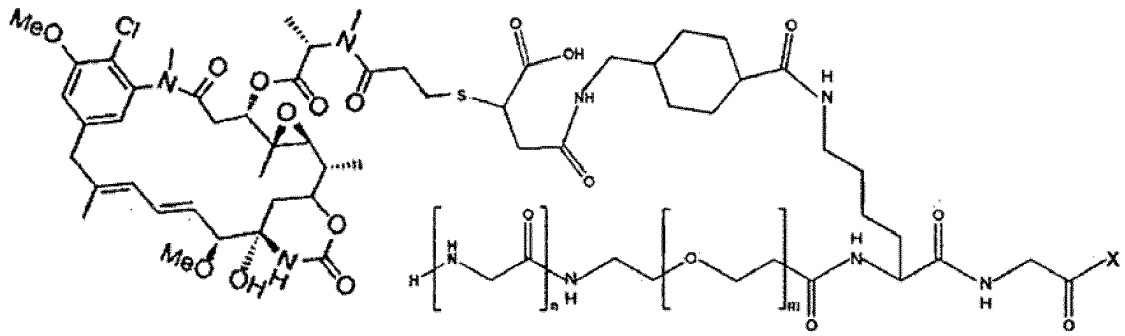
Y es una carga útil, que se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de ácido nucleico, una secuencia peptídica corta, un polipéptido, una proteína, una molécula pequeña y una sustancia biológica. En determinadas realizaciones, Y es una secuencia de ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, un marcador, una etiqueta o un fármaco. En determinadas realizaciones, Y es un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, una etiqueta de purificación de afinidad, una molécula trazadora o molécula pequeña. En determinadas realizaciones, Y es una citotoxina. En determinadas realizaciones, Y es maitansina o un derivado de la misma, auristatina o un derivado de la misma, epotilona o un análogo de la misma, paclitaxel o un derivado del mismo o un compuesto alcaloide de la vinca. En determinadas realizaciones, Y es maitansina o un derivado de la misma.

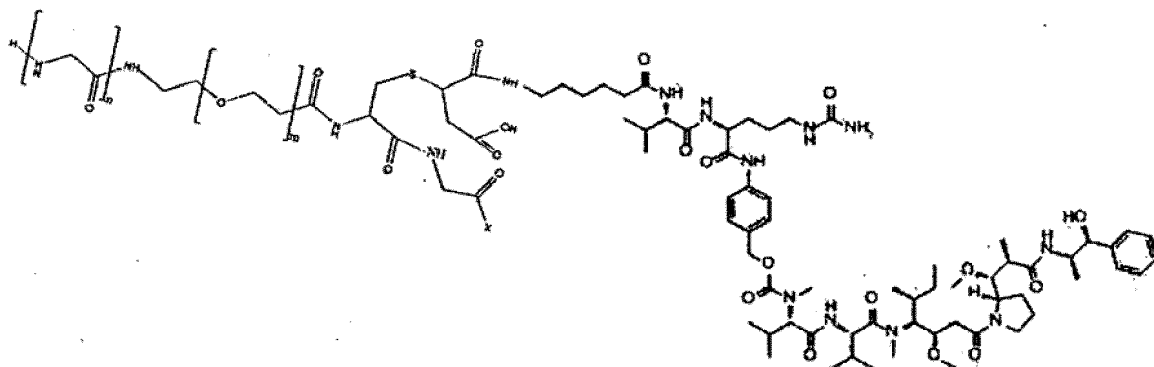
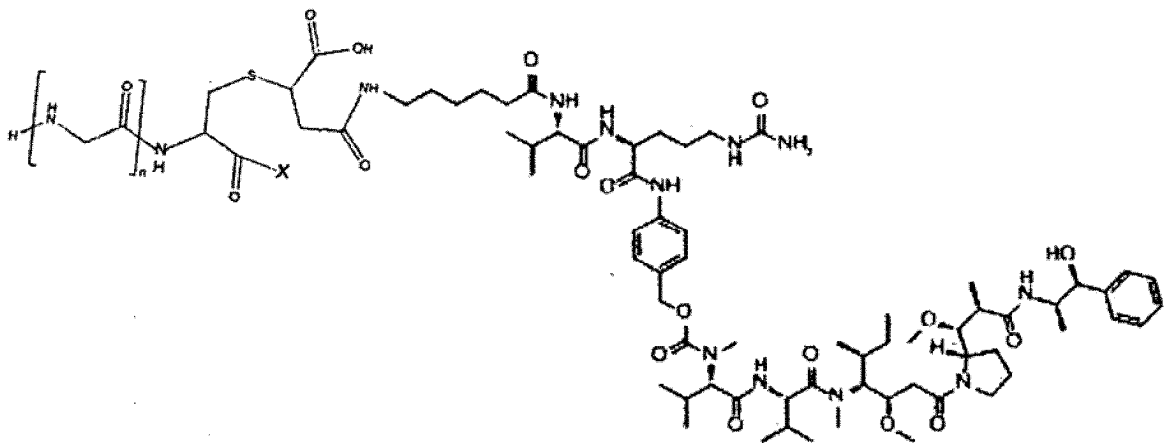
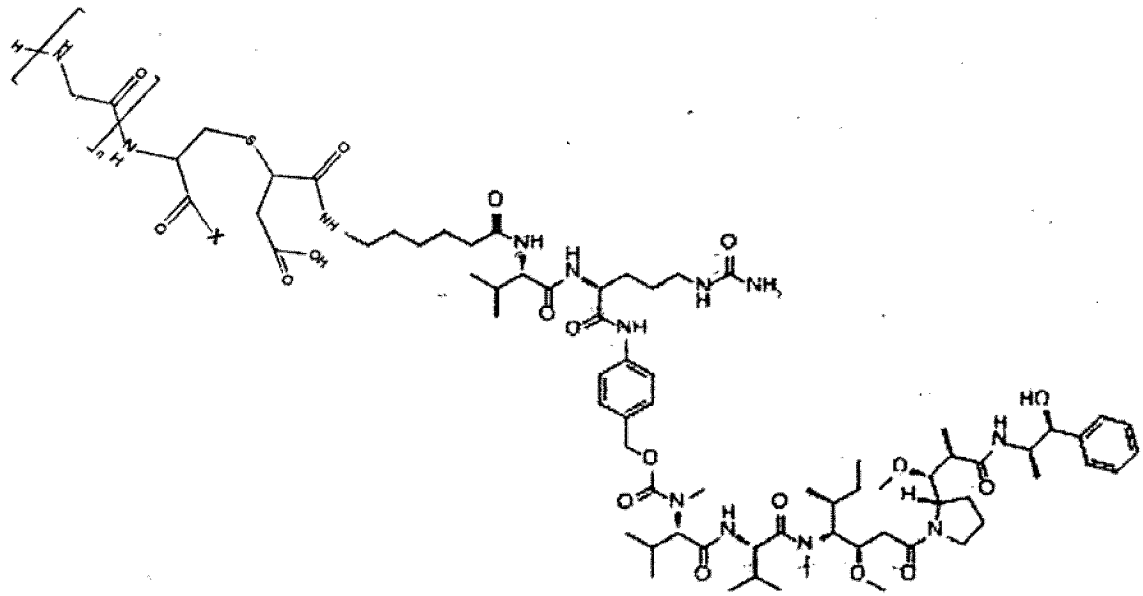
z es cualquiera de los números enteros entre 1 y 1000. Preferentemente, z es cualquiera de los números enteros entre 1 y 100, entre 1 y 50, entre 1 y 40, entre 1 y 30, entre 1 y 20, entre 1 y 10 o entre 1 y 5.

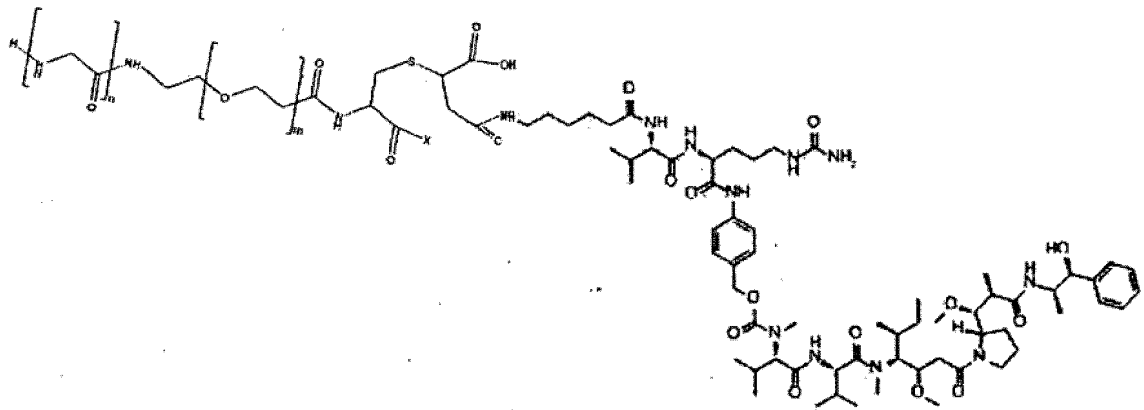
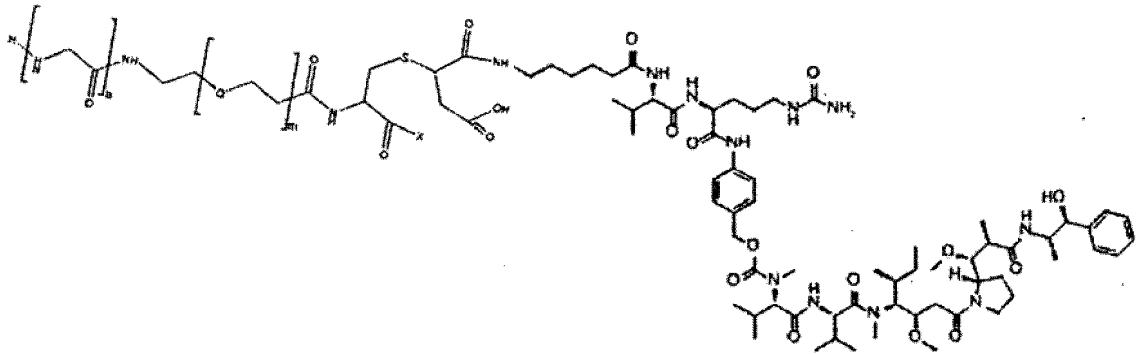
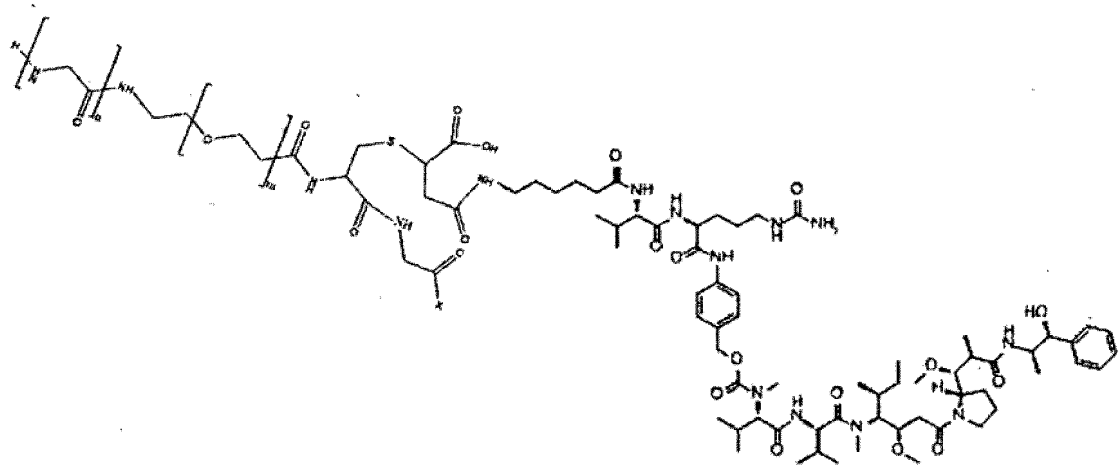
En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula:







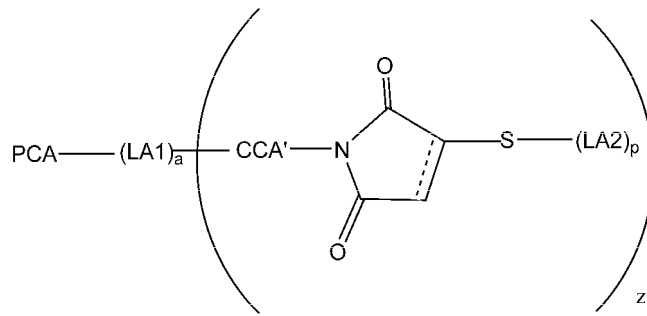




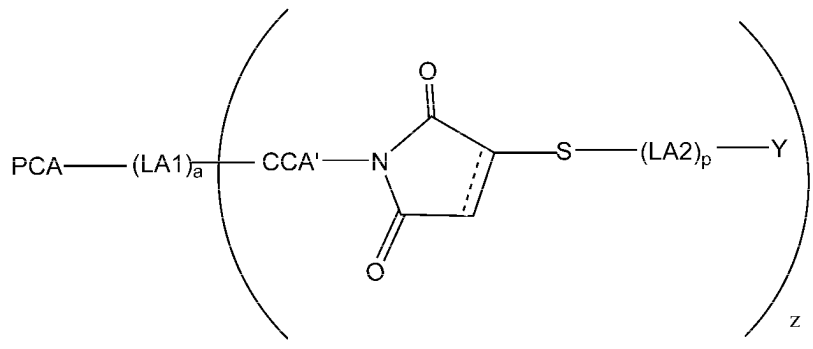
5 En donde n representa cualquiera de los números enteros entre 1 y 100, por ejemplo, n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o similares. m es 0 o cualquiera de los números enteros entre 1 y 1000, por ejemplo, m puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o similares.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende uno o más de los compuestos descritos anteriormente, que se prepara mediante las siguientes etapas:

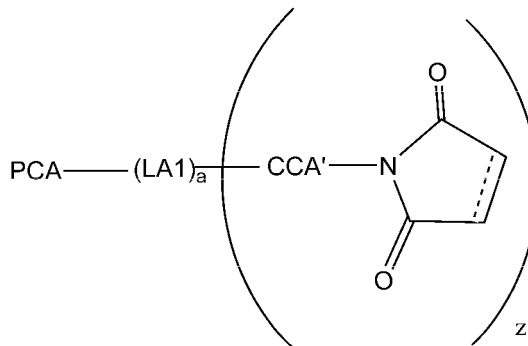
A) una solución de Y una solución de



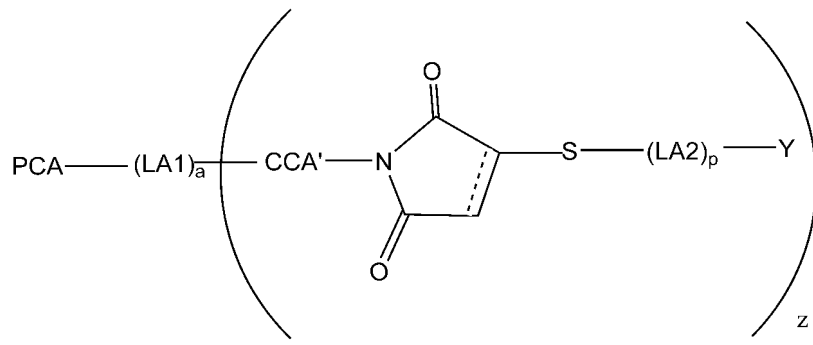
se mezclan e incuban para obtener una solución de conjugado:



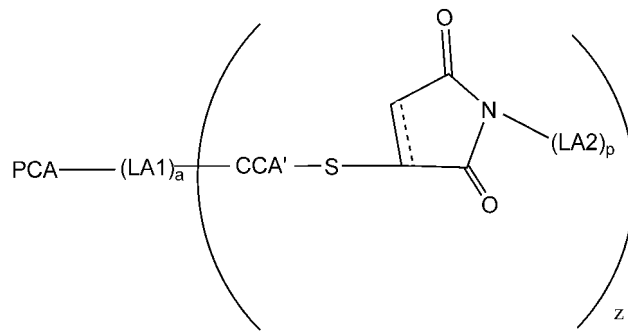
5 ^o una solución de Y una solución de



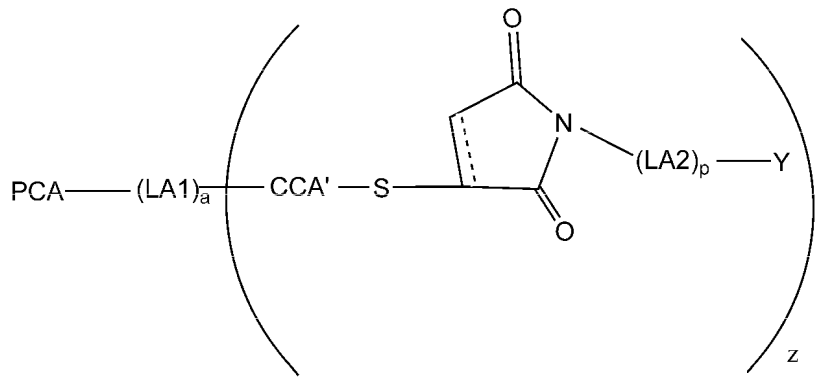
se mezclan e incuban para obtener una solución del conjugado



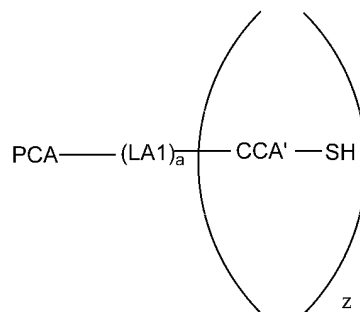
10 en este caso, un grupo -S-(LA2)_p está conectado a Y; o una solución de Y una solución de



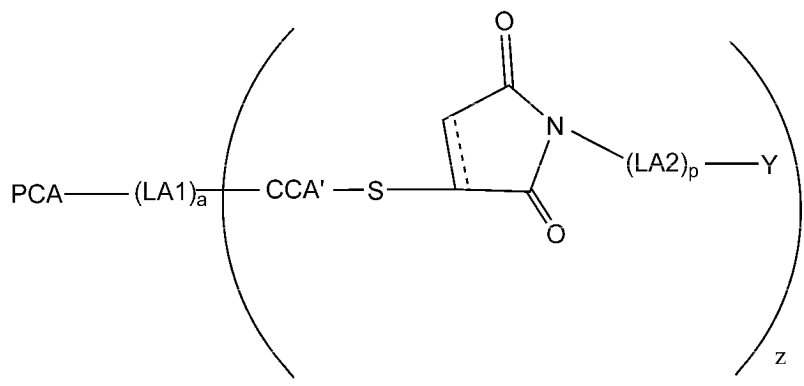
se mezclan e incuban para obtener una solución de



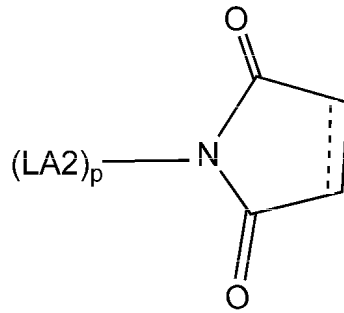
5 o una solución de Y una solución de



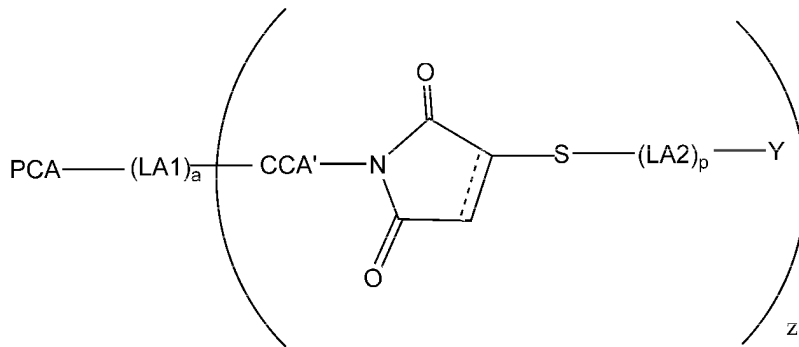
se mezclan e incuban para obtener una solución de conjugado



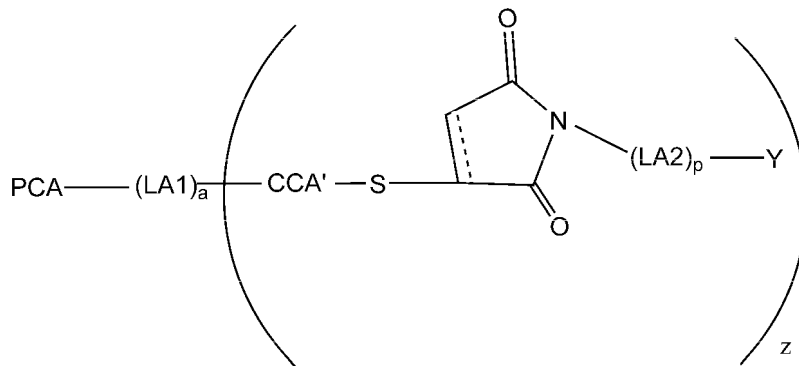
en este caso, un



grupo está conectado a Y;
B) a una solución del conjugado



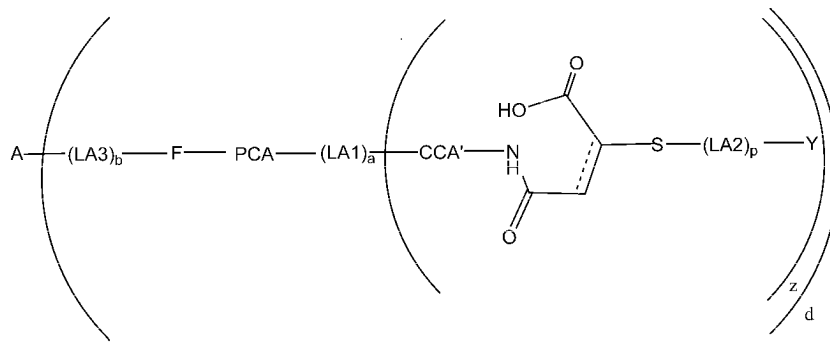
5 o



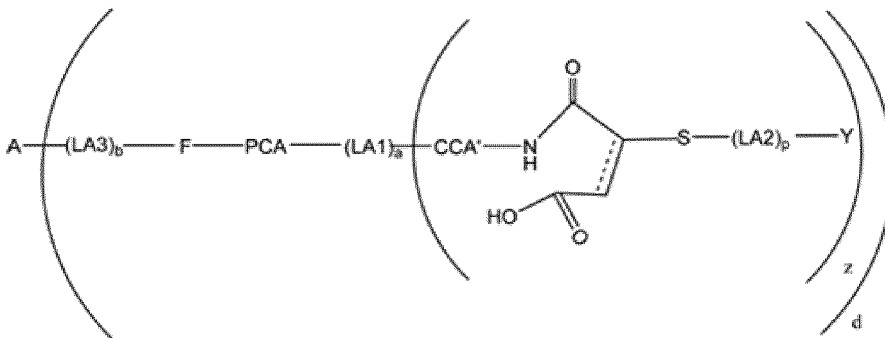
preparado en A) se añade una solución de base Tris u otra solución que facilita la apertura del anillo.

10 En determinadas realizaciones, la etapa descrita anteriormente comprende además purificar el producto obtenido mediante HPLC. En determinadas realizaciones, la etapa descrita anteriormente comprende además purificar el producto obtenido mediante HPLC semipreparativa/preparativa. En determinadas realizaciones, el contenido molar total de los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) es más del 50 %, por ejemplo, más del 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más.

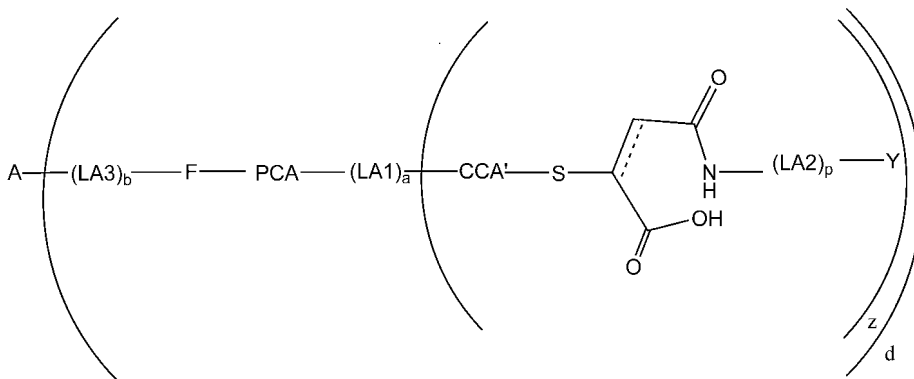
En otro aspecto, la presente invención también proporciona un compuesto de Fórmula (V), (VI), (VII) u (VIII):



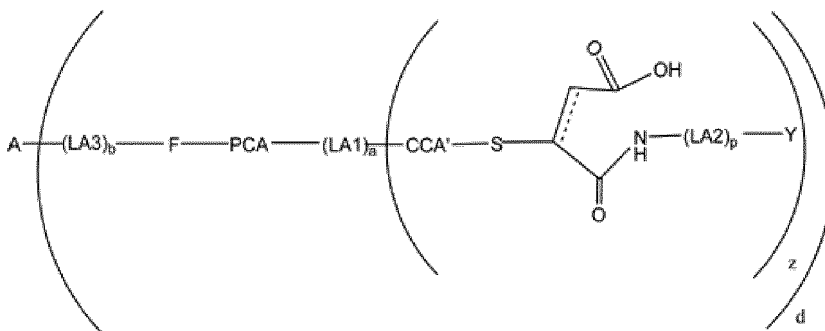
Fórmula (V)



Fórmula (VI)



Fórmula (VII)



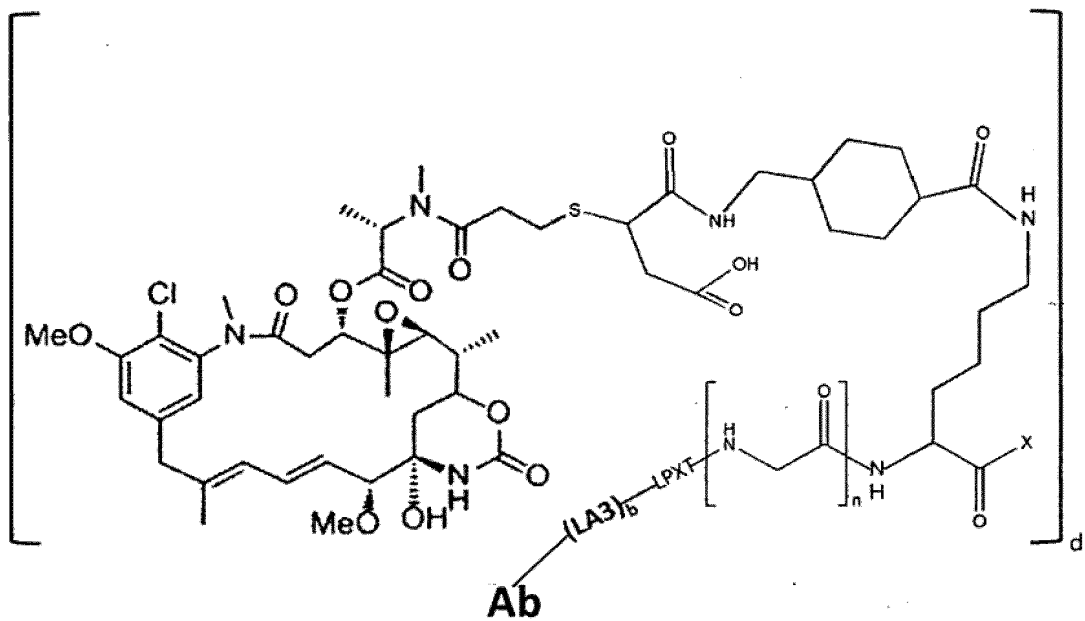
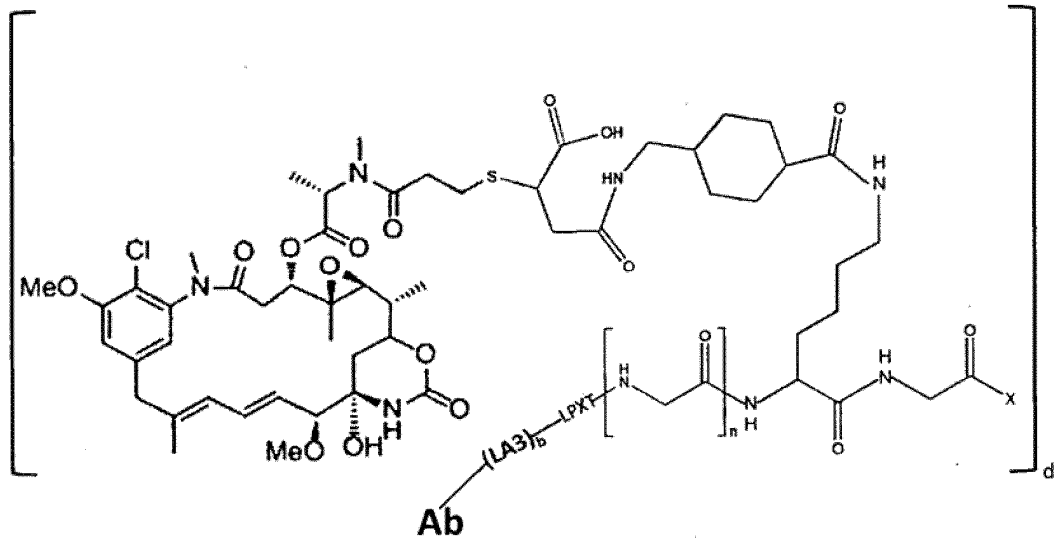
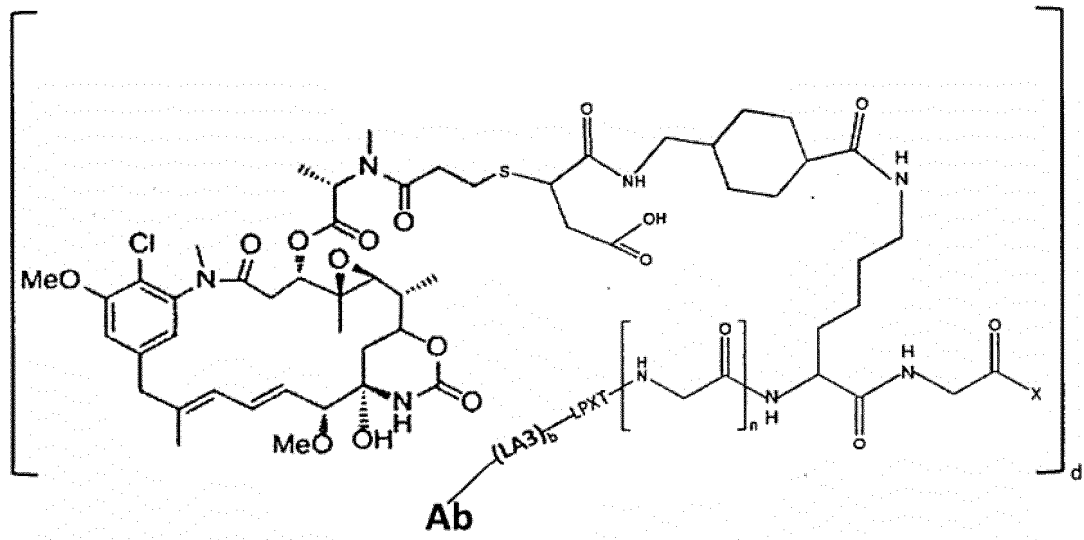
Fórmula (VIII),

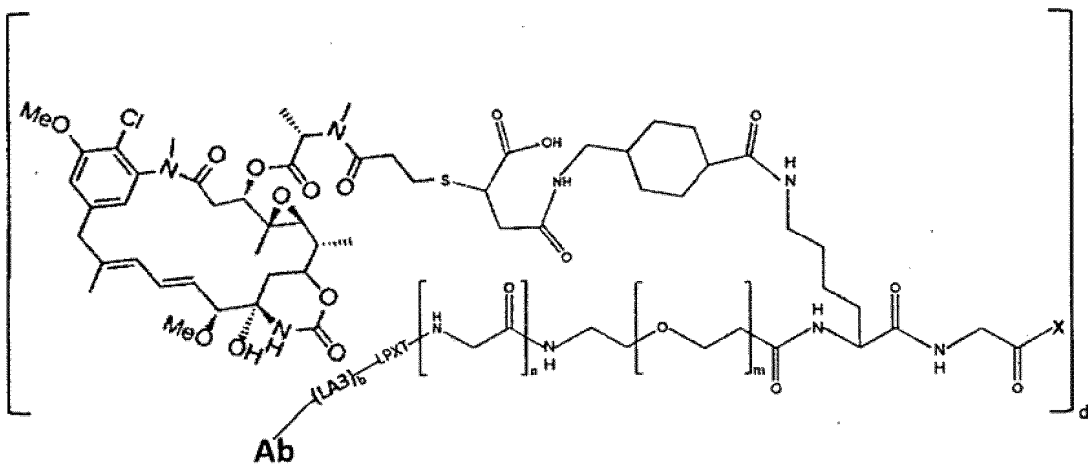
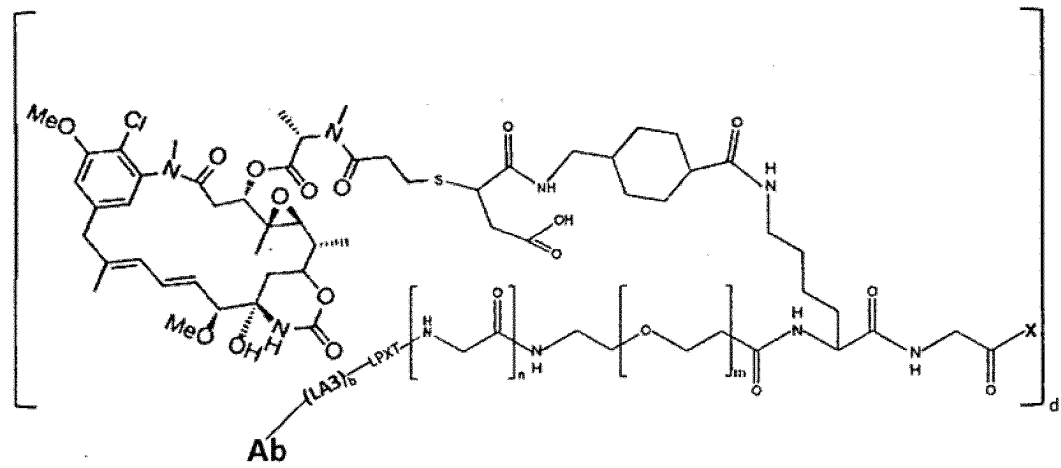
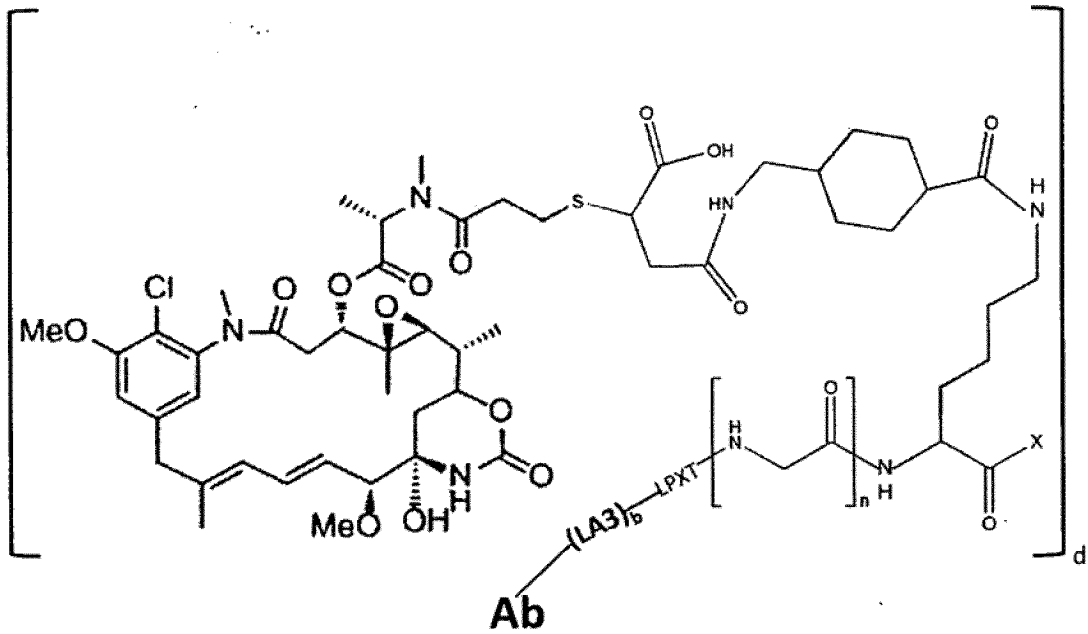
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

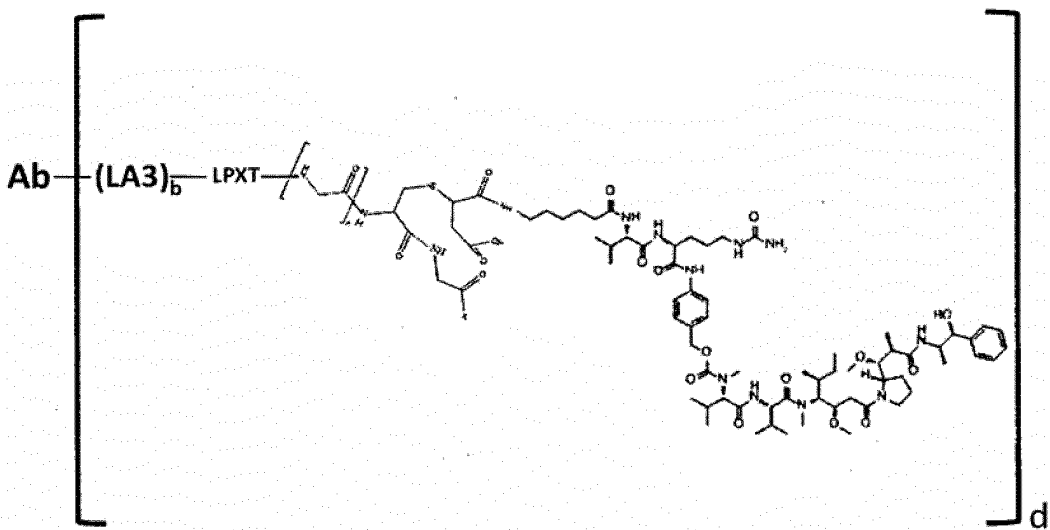
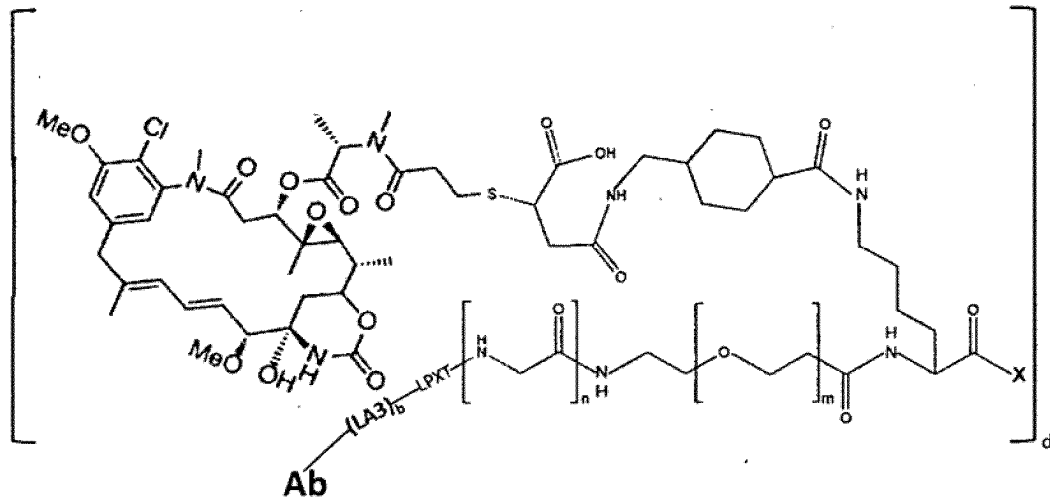
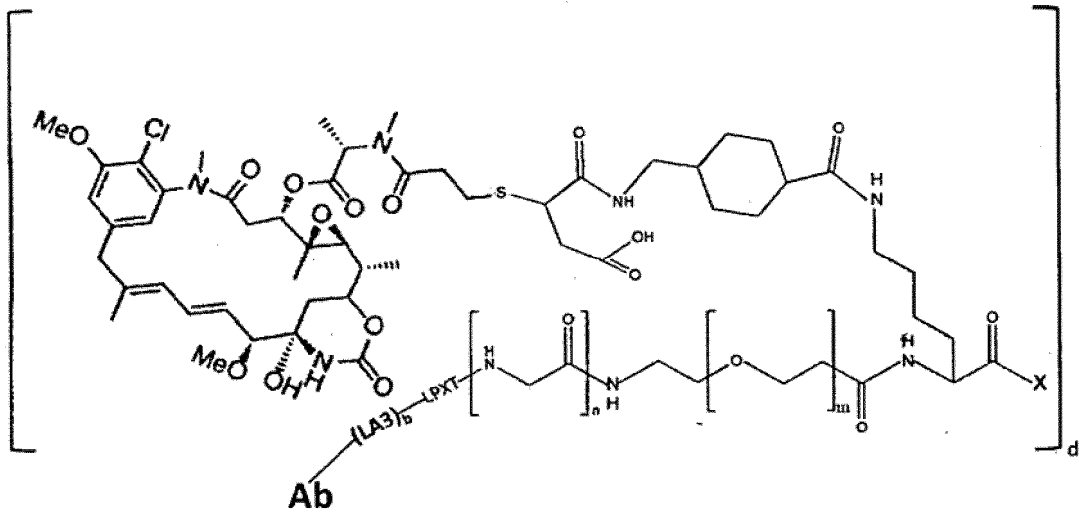
En donde, A es una proteína, un péptido, un factor de transducción de señal, un factor de crecimiento celular, una inmunoglobulina o un anticuerpo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal preparado de forma recombinante, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpo y mimético de anticuerpo (por ejemplo, Fab, ScFv, minicuerpo, diacuerpo, nanocuerpo, etc.). En determinadas realizaciones, A es un anticuerpo anti-ErbB2/Her2. En determinadas realizaciones, el compuesto de Fórmula (V), (VI), (VII) u (VIII) puede unirse específicamente al dominio extracelular del receptor Her2 y, por tanto, inhibir el crecimiento de células tumorales positivas para el receptor ErbB2/Her2.

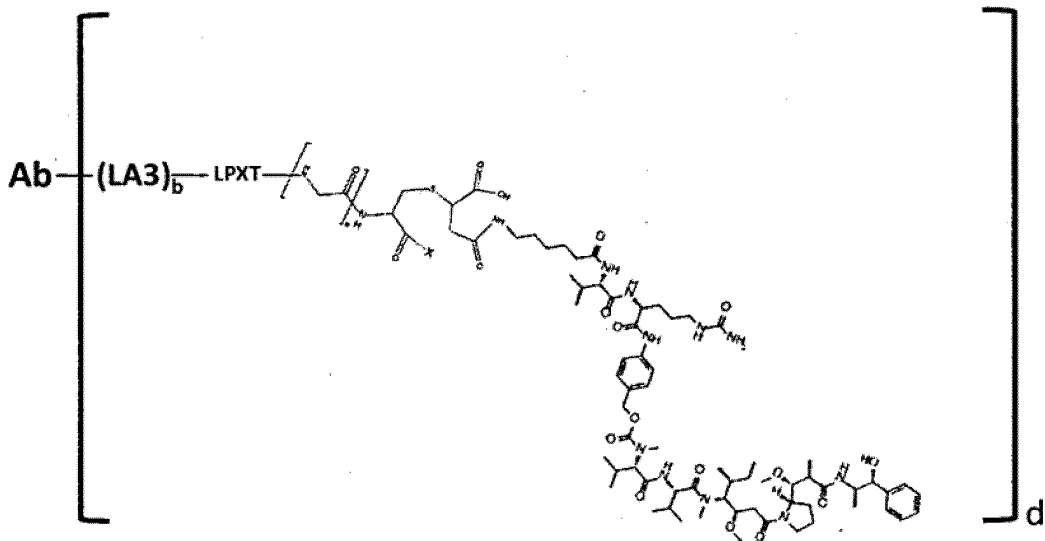
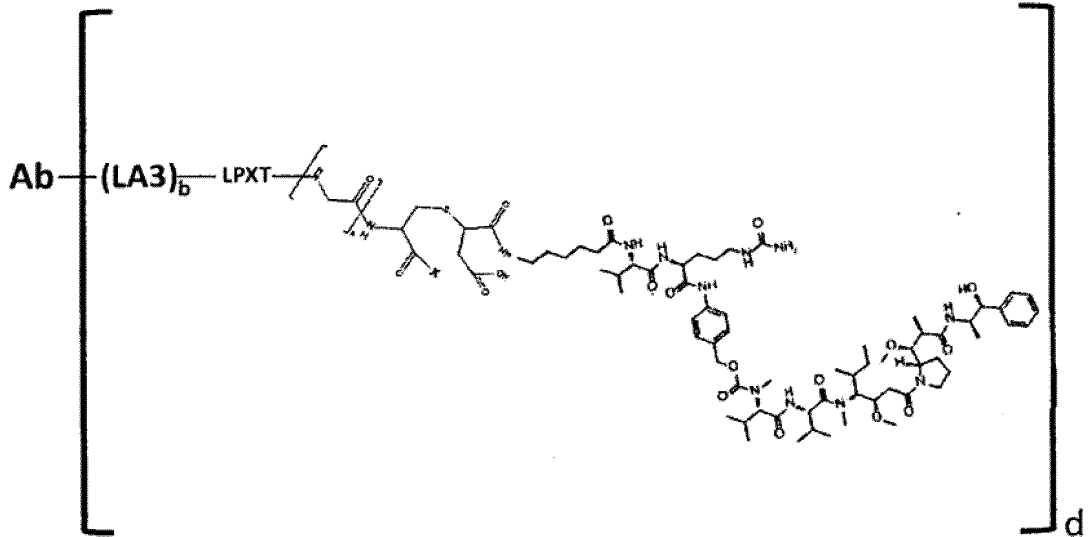
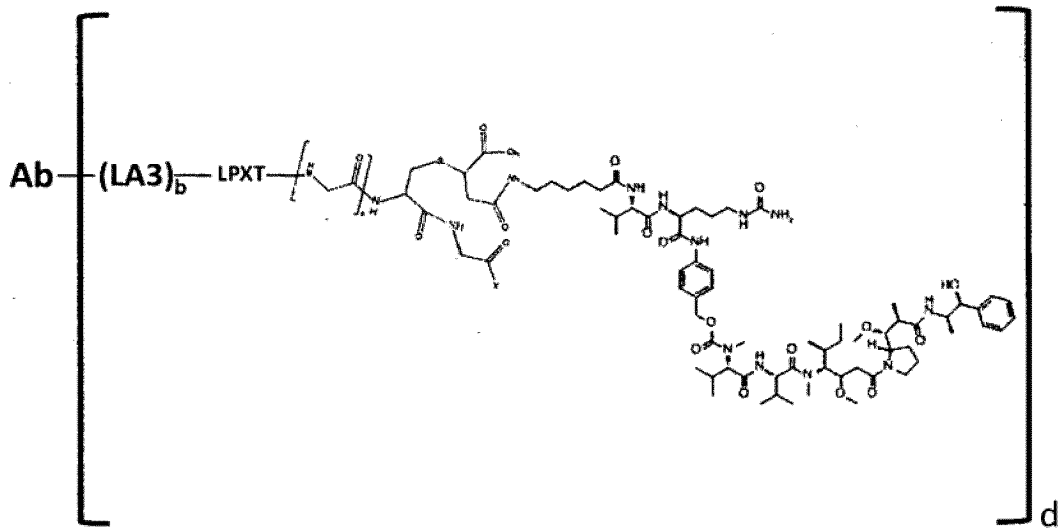
10

- LA1, LA2 y LA3 son cada uno de forma independiente un resto conector. LA1 es un enlace entre PCA y CCA', LA2 es un enlace entre el grupo -S- e Y, LA3 es un enlace entre A y F. LA3 comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina; preferentemente, LA3 comprende de 1 a 50 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. Más preferentemente, LA3 comprende de 1 a 20 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. Más preferentemente, LA3 comprende 5 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. a, b y p son independientemente 0 o 1, es decir, LA1, LA2 y LA3 pueden estar presentes o ausentes de forma independiente.
- 5
- 10 PCA y F son secuencias de reconocimiento específicas de la ligasa, respectivamente, por la acción de dicha ligasa, el PCA puede unirse específicamente a F. Las ligasas incluyen, pero sin limitación, diversas sortasas naturales y, preferentemente, nuevas transpeptidasas modificadas y optimizadas. En determinadas realizaciones, la sortasa es sortasa A o sortasa B. En determinadas realizaciones, F es una secuencia de reconocimiento específica del sustrato del donador de ligasa; PCA es una secuencia de reconocimiento específica del sustrato del receptor de ligasa;
- 15 En determinadas realizaciones, F es una secuencia de reconocimiento específica del sustrato del receptor de ligasa; PCA es una secuencia de reconocimiento específica del sustrato del donador de ligasa. En determinadas realizaciones, PCA comprende al menos una unidad estructural conectada en serie que se selecciona del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. En determinadas realizaciones, PCA comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina.
- 20 Preferentemente, PCA comprende de 1 a 50 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. Más preferentemente, PCA comprende de 1 a 20 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. Más preferentemente, PCA comprende 5 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina. En determinadas realizaciones, F está ligado al extremo C de la cadena pesada o ligera de A a través de LA3 o directamente a través de un enlace covalente.
- 25 En determinadas realizaciones, F es $X_1X_2X_3TX_4X_5$, siendo X_1 leucina o asparagina, siendo X_2 prolina o alanina, siendo X_3 cualquiera de los aminoácidos naturales o no naturales, siendo T treonina, representando X_4 glicina, serina o asparagina o estando ausente y siendo X_5 cualquiera de los aminoácidos naturales o no naturales o estando ausente. En determinadas realizaciones, F es LPX₃T o LPX₃TGG, siendo L leucina, siendo P prolina, siendo X₃ cualquiera de los aminoácidos naturales o no naturales, siendo T treonina y siendo G glicina.
- 30
- CCA' es un resto de conjugación química. ----- representa un enlace simple o doble. En determinadas realizaciones, ----- representa un enlace simple.
- Y es una carga útil, que se selecciona del grupo que consiste en un hidrógeno, una secuencia de ácido nucleico, una secuencia peptídica corta, un polipéptido, una proteína, un compuesto y una sustancia biológica. En determinadas realizaciones, Y es una secuencia de ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, un marcador, una etiqueta o un fármaco. En determinadas realizaciones, Y es un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, una etiqueta de purificación de afinidad, una molécula trazadora o molécula pequeña. En determinadas realizaciones, Y es una citotoxina. En determinadas realizaciones, Y es maitansina o un derivado de la misma, auristatina o un derivado de la misma, epotilona o un análogo de la misma, paclitaxel o un derivado del mismo o un compuesto alcaloide de la vinca. En determinadas realizaciones, Y es maitansina o un derivado de la misma.
- 35
- 40
- z es cualquiera de los números enteros entre 1 y 1000. Preferentemente, z es cualquiera de los números enteros entre 1 y 100, entre 1 y 50, entre 1 y 40, entre 1 y 30, entre 1 y 20, entre 1 y 10, entre 1 y 5 d es cualquiera de los números enteros entre 1 y 20, por ejemplo, d puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o similares.
- 45 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de cualquiera de las siguientes fórmulas:









5 En donde Ab es cualquiera de las secuencias de las SEQ ID NO: 1-8, z representa cualquiera de los números enteros entre 1 y 20, n representa cualquiera de los números enteros entre 1 y 100, m es 0 o cualquiera de los

números enteros entre 1 y 1000, d representa cualquiera de los números enteros entre 1 y 20, LA3 comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina; b es independientemente 0 o 1, es decir, LA3 puede estar presente o ausente de forma independiente.

5 En otro aspecto, La presente invención proporciona una composición que comprende cualquiera de los compuestos anteriores, que se prepara mediante las siguientes etapas:

- i) se prepara un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV);
- ii) se prepara A-(LA₃)_b-F;
- iii) A-(LA₃)_b-F obtenido en la etapa ii) y un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se conjugan en presencia de una ligasa y en condiciones adecuadas para la acción de la ligasa.

10 En determinadas realizaciones, el contenido molar total de los compuestos de Fórmula (V), (VI), (VII) u (VIII) en una composición obtenida en las etapas descritas anteriormente, fue más del 50 %, por ejemplo, más del 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir la proliferación celular en un animal, que incluye tratar el animal con el compuesto o la composición según la invención. En determinadas realizaciones, el animal es un mamífero. En determinadas realizaciones, el animal es un ser humano.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del compuesto según la presente invención en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad en seres humanos. En determinadas realizaciones, la enfermedad incluye un tumor y una enfermedad autoinmunitaria. En determinadas realizaciones, la superficie de la célula tumoral tiene un antígeno específico o una proteína receptora que reconoce y se une al compuesto o composición. En determinadas realizaciones, el antígeno específico o la proteína receptora en la superficie de la célula tumoral es ErbB2/Her2. En determinadas realizaciones, el tumor es cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal o cáncer esofágico.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de Fórmula (V), (VI), (VII) u (VIII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica está en forma de polvo liofilizado para inyección o líquido de inyección.

30 La presente invención proporciona un sistema de acoplamiento mejorado, para resolver los problemas de inestabilidad y heterogeneidad asociados con los ADC actuales. Las soluciones proporcionadas en la presente invención también pueden aplicarse a la preparación de fármacos de ácido nucleico dirigidos, reactivos trazadores de diagnóstico dirigidos y similares. La presente invención incluye una serie de conectores y los métodos de preparación de los mismos, intermedios de conector-carga útil y los métodos de preparación de los mismos, intermedios estables de conector de anillo abierto-carga útil y métodos de preparación. La presente invención comprende una serie de anticuerpos (Ab) anti-ErbB2/Her2 humano basados en Herceptin u otros modificados por ingeniería genética, conectores, así como maitansina modificada y sus derivados o el derivado de auristatina MMAE y nuevos ADC obtenidos de esta manera utilizando la tecnología de plataforma de CDL de los inventores, método de preparación y usos de los mismos.

40 La presente invención utiliza una tecnología de conjugación catalizada por ligasa única (conjugación dependiente de ligasa, CDL) para preparar ADC, como se muestra en la Fig. 2. La ligasa en el presente documento se refiere a transpeptidasa, incluyendo, pero sin limitación, varias sortasas naturales (incluyendo sortasa A, B, C, D y sortasa de *L. plantarum*, etc., véase la patente US20110321183A1) y una diversidad de transpeptidasas nuevas optimizadas y modificadas. La reacción de conjugación es catalizada por una bio-enzima y en condiciones suaves, reduce significativamente el daño físico y químico de los anticuerpos durante el proceso de acoplamiento, haciendo el proceso de producción de ADC más optimizado, fácil de actualizar y beneficioso para el control de calidad de los productos de ADC.

50 La principal ventaja de la tecnología de CDL es la conjugación catalizada por enzimas en una etapa por medio de catálisis por bioenzimas, que permite el acoplamiento eficaz de las citotoxinas al anticuerpo de una manera específica de sitio, asegurando la alta homogeneidad de los fármacos de ADC obtenidos de este modo. La reacción de apertura de anillo de sulfosuccinimida se lleva a cabo durante la preparación de los intermedios de conector-citotoxina, que no implica al anticuerpo macromolecular. Este enfoque tiene dos ventajas: en primer lugar, solo están implicadas en la reacción de apertura del anillo moléculas pequeñas, por tanto, se puede aplicar una diversidad de condiciones de hidrólisis sin el riesgo de dañar los anticuerpos; por otro lado, incluso si la reacción de apertura del anillo de sulfosuccinimida no se completa, el producto de anillo abierto se puede purificar fácilmente mediante HPLC para obtener un producto de anillo abierto muy purificado.

La presente invención es aplicable a la preparación de cualquier ADC, fármaco de ácido nucleico diana y trazador de diana que comprende una estructura de sulfosuccinimida.

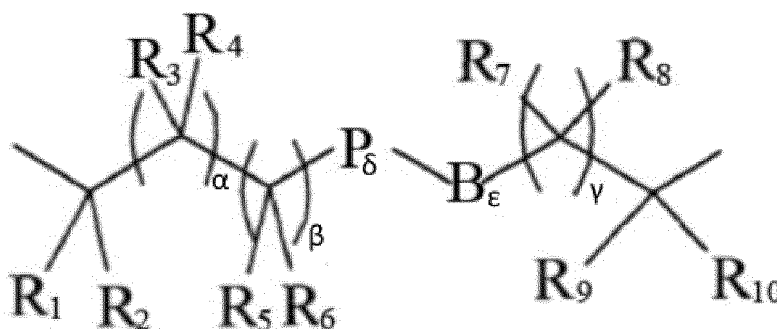
1. Conector

5 La presente invención se refiere a una serie de conectores bifuncionales, que se compone de tres partes: un resto de conjugación de proteínas (PCA), un resto conector 1 (LA1) y un resto de conjugación química (CCA), mostradas en la estructura esquemática:



10 en donde PCA puede ser un sustrato receptor adecuado de sortasa A, incluyendo, pero sin limitación, la secuencia de glicina oligomérica (Gly) Gn (n es normalmente 1-100), el grupo α -carboxilo del aminoácido C-terminal se usa para acoplar con LA; en donde PCA también puede ser un sustrato receptor adecuado de otra sortasa o preferentemente sortasa optimizada, tal como la secuencia de oligo alanina (Ala) o la secuencia de mezcla de oligo glicina/alanina.

LA1 es el resto de enlace entre PCA y CCA, a es 0 o 1, es decir, LA1 puede estar presente o ausente. La estructura de LA1 se muestra a continuación:



15 en donde R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 y R10 son iguales o diferentes, y cada uno es independientemente H; un grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 6 carbonos; un grupo alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 carbonos; un grupo alqueno/alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 2 a 6 carbonos; un grupo con carga seleccionado de grupos sustituidos aniónicos y catiónicos, dicho anión se selecciona de SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, PO₃²⁻, X-PO₃²⁻, CO₂⁻ y dicho catión se selecciona de entre el anillo heterocíclico que contiene nitrógeno, N+R11R12R13 o X-N+R11R12R13, o un fenilo, en donde: R11, R12 y R13 son iguales o diferentes y cada uno es independientemente H, un grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 6 carbonos o un grupo alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 carbonos;

20 α , β y γ es 0 o cualquiera de los números enteros entre 1 y 4;
 25 B es fenilo o fenilo sustituido, en donde el sustituyente es un grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 6 carbonos, un grupo alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 carbonos; un grupo cargado seleccionado de sustituyentes aniónicos y catiónicos - dicho anión se selecciona de SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, PO₃²⁻, X-PO₃²⁻, CO₂⁻ y dicho catión se selecciona de entre el anillo heterocíclico que contiene nitrógeno, N+R11R12R13 o X-N+R11R12R13, en donde X tiene la misma definición que se ha descrito anteriormente), y es 0 o 1; P es una
 30 unidad de polietilenglicol de Fórmula (OCH₂CH₂)_z, en donde z es 0 o cualquiera de los números enteros entre 1 y 1000.

LA2 en la presente invención puede tener el mismo significado que LA1, puede ser un péptido o peptido formado a partir de aminoácidos naturales o no naturales mediante formación de enlaces amida, y también puede ser una combinación adecuada de ambas definiciones. LA3 comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina.

40 Tanto CCA como CCA' contienen grupos funcionales adecuados, que podrían acoplarse covalentemente con moléculas pequeñas, ácidos nucleicos o moléculas trazadoras mediante enlaces amida, enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces tioéster, enlaces peptídicos, enlaces de hidrazona, enlaces éster, enlaces éter o enlaces de uretano. Los grupos químicos preferidos incluyen, pero sin limitación: éster N-succinimidílico y éster N-sulfosuccinimidílico (para reaccionar con amina primaria); grupo maleimida (para reaccionar con grupo tiol); piridilditio (para reaccionar con un grupo sulfhidrilo y formar un enlace disulfuro); y haloalquilo o haloacetilo (para reaccionar con un grupo tiol); un grupo isocianato (para reaccionar con un grupo hidroxilo).

El CCA1 preferido en la presente invención contiene una secuencia peptídica (el enlace amida se forma por la

reacción de condensación de los grupos α -amino y carboxilo), en donde debe contener una Lys (lisina) (número 1-100), el α -amino del aminoácido N-terminal de este péptido formará un enlace amida con LA (o directamente con el PCA). Basándose en el número deseado de acoplamientos, el ϵ -amino de la lisina se puede usar para introducir un grupo funcional maleimida mediante un agente de reticulación bifuncional adecuado, o se puede usar para formar un enlace amido con el grupo α -carboxilo de otra lisina para formar una cadena ramificada, y después los α - y ϵ -aminos de la lisina en la cadena ramificada se pueden usar para introducir grupos de maleimida mediante un reticulador bifuncional adecuado. Y así sucesivamente, aumentado el número de la lisina en la cadena principal y la cadena lateral ramificada, el número de grupos funcionales introducidos por dicho CCA1 puede alcanzar 1-1000. Los agentes de reticulación bifuncionales preferidos para introducir el grupo funcional maleimida incluyen, pero sin limitación, 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC), el análogo de SMCC de "cadena larga" éster de N-[α -maleimidoacetoxi] succinimida (AMAS), éster de N-gamma-Maleimidobutiril-oxisuccinimida (GMBS), N-hidroxisuccinimida éster de ácido 3-maleimidobenzoico (MBS), N-hidroxisuccinimida éster de ácido 6-maleimidohexanoico (EMCS), 4-(4-maleimidofenil) butirato de N-succinimidilo (SMPB), 6-[(beta-maleimidopropionamido) hexanoato de succinimidilo (SMPH), 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) de succinimidilo (LC-SMCC), 11-(maleimido) undecanoato de N-succinimidilo (KMUS) y un agente de reticulación bifuncional que comprende N-hidroxisuccinimida - (alcohol de polietilenglicol) n (SM (PEG) n), en donde n indica que hay 2, 4, 6, 8, 12 o 24 unidades de polietilenglicol (PEG).

Algunos ejemplos de los conectores preferidos que cumplen con los requisitos anteriores se muestran en las Figuras 3-6, pero no se limitan a los mismos. Los conectores 1, 2, 3 y 4, todos los cuales tienen una estructura de maleimida, pueden reaccionar rápidamente con cualquier compuesto que contenga tiol (véase a continuación la "carga útil") de forma cuantitativa, para formar una estructura de sulfosuccinimida.

Otro grupo del CCA2 preferido tiene secuencias de oligo cisteína (el número de cisteína es 1-100, para formar un enlace amida a través de la condensación de los grupos α -amino y carboxilo), el grupo α -amino de la cisteína N-terminal formará un enlace amida con LA (o directamente con PCA) y sus grupos tiol de cadena lateral pueden acoplarse a cualquier molécula que comprenda un grupo funcional de maleimida.

Los conectores preferidos que cumplen con los requisitos anteriores se muestran en la Figura 7-10, pero no se limitan a los mismos.

El conector de la presente invención, puede realizarse mediante el método convencional de síntesis de polipéptidos en fase sólida con modificaciones, como se muestra en las siguientes etapas:

- 30 (1) Selección de resina: para la amida C-terminal se usa una resina de amida-MBHA Rink y para el ácido carboxílico C-terminal se usa la resina Wang.
- (2) El hinchado de resina: tomar la cantidad calculada de resina basada en la cantidad diana de péptido, añadir a una columna de reacción empapada con DCM, lavar dos veces con DCM, después fusionar en DMF durante 30 minutos para permitir que se hinche completamente.
- 35 (3) Eliminación de Fmoc: tratar la resina con una solución al 20 % de piperidina en DMF durante 10 min con nitrógeno y eliminar por filtración, añadir la solución anterior nuevamente y reaccionar durante otros 5 min. La resina se lava dos veces con DCM, tres veces con DMF, seguido de ensayo de ninhidrina, la resina debe ser de color marrón rojizo o azul oscuro.
- (4) Acoplamiento del aminoácido: pesar 2-4 equivalentes del aminoácido para acoplar, añadir suficiente DMF para disolver, seguido de equivalentes adecuados del agente de acoplamiento DIC o HBTU, activar durante 5 min. La mezcla activada se añade al reactor de columna con nitrógeno para reaccionar durante 2 h. Se usa ensayo de ninhidrina para probar la resina y se repite el acoplamiento hasta que sea incoloro, lo que muestra reacción completa. La resina se lava dos veces con DCM y tres veces con DMF.
- 45 (5) Repetir las etapas (3) y (4) hasta que todos los aminoácidos en la secuencia estén acoplados. Se usa aminoácido protegido por Boc para el último resto.
- (6) Fijación de la cadena lateral SMCC u otras moléculas bifuncionales: Dependiendo de los grupos protectores de cadena lateral de Lys, usar diferentes métodos para eliminarlo. Por ejemplo, se emplea hidrogenación catalítica para quitar Z e hidrato de hidracina para eliminar iVdE. El SMCC activado u otras moléculas bifuncionales se introducen directamente en el grupo amino de la cadena lateral de lisina expuesta. Si no hay ninguna modificación de la cadena lateral, se finaliza la reacción.
- 50 (7) Tratamiento y escisión de resina: Después finalizarse la reacción, el compuesto de resina se secó con nitrógeno. Se añadió un cóctel de escisión (TFA/fenol/H₂O/tioanisol/EDT/TIS) (80/5/5/5/3/2) (10 ml/g de resina), la reacción se agitó durante 2 h a 0-5 °C con nitrógeno. La resina se filtró y al filtrado se añadieron 30X volúmenes de éter frío y se dejó durante 2 h en el frigorífico. Se recogió el precipitado por centrifugación, y se liofilizó para obtener el péptido en bruto.
- 55 (8) Purificación y caracterización por espectrometría de masas: El péptido en bruto se disolvió en una proporción apropiada de acetonitrilo acuoso y se purificó hasta la pureza deseada mediante HPLC inversa, se utiliza EM para verificar si el peso molecular es coherente con los valores teóricos.

2. La carga útil

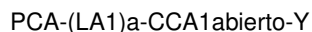
Las cargas útiles en la presente invención son moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, moléculas trazadoras (incluyendo radionúclidos enjaulados y moléculas fluorescentes, etc.), las moléculas pequeñas preferidas son citotoxinas.

- 5 Dichas citotoxinas se seleccionan de inhibidores de microtúbulos tales como paclitaxel y sus derivados, maitansina y derivados, auristatina y sus derivados, epotilona y análogos, fosfato de combretastatina A-4, combretastatina A-4 y sus derivados, compuestos indol-sulfa, compuestos de alcaloides de la vinca tales como vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, vinflunina, vinglicinato, anhidrovinblastina, dolastatinas 10 y análogos, halicondrina B y eribulina, indol-3-oxalil amidas, indol-3-oxalil amidas sustituidas, podofilotoxinas, 7-dietilamino-3-(2'-benzoxazolil)-
 10 cumarina (DBC), discodermolida, laulimalida; inhibidores de ADN topoisomerasa, tales como camptotecina y sus derivados, mitoxantrona; mitoguazona; análogos de mostaza de nitrógeno tales como clorambucilo, clomafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mustina, nitromina, melfalán, novembiquina, fenamet, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas tales como carmustina, estreptozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina, dinemicina, esperamicina, neocarzinostatina, aclacinomicina, actinomicina, antroamicina, azaserina, bleomicinas, actinomicina C, carabicina, idarubicina, carcinofilina, carminomicina, actinomicina D, daunorubicina, doxorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, adriamicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, bofeimeisu, puromicina, adriamicina-fe, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato, edatrexato; análogos de la purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, gemcitabina, enoxaparina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, desoxifluorouridina, fluorouridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; compuestos antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; tricotecenos tales como toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina;
 20 arizidinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; análogos de platino tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, miriplatino, etopósido; antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide y goserelina; proteína quinasa e inhibidores de proteasoma.

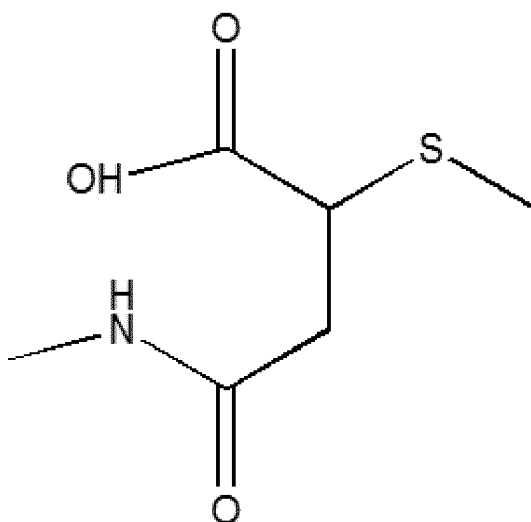
Las citotoxinas preferidas de la presente invención son maitansina y sus derivados DM1, DM4 y derivados de auristatina MMAE, MMAF, MMAD y similares.

30 3. Intermedio de conector-citotoxina y la reacción de apertura de anillo

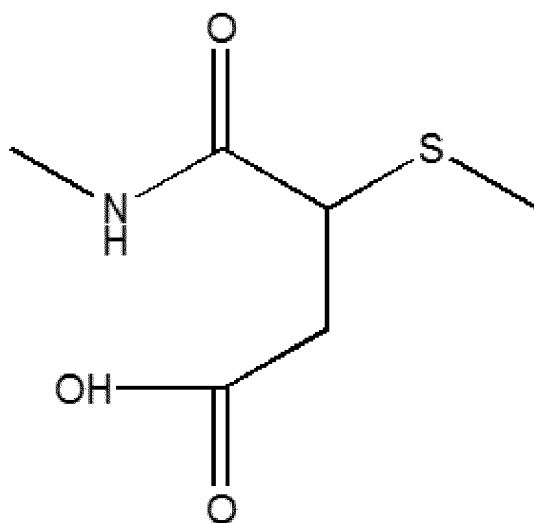
Todos los conectores que contienen CCA1 preferidos tienen una estructura de anillo de maleimida en CCA1, que puede reaccionar con cualquier compuesto con un grupo tiol para formar una estructura de sulfosuccinimida. Dicho compuesto con un grupo tiol puede ser una molécula pequeña, un péptido corto, un polipéptido, un análogo peptídico, una proteína, un ácido nucleico y un análogo de ácido nucleico. Dicho intermedio de acoplamiento puede tratarse en cualquier condición apropiada para la apertura del anillo de sulfosuccinimida, para obtener el intermedio de apertura de anillo estable correspondiente, como se muestra a continuación:



en donde, CCA1abierto-Y contiene la siguiente estructura:



(IX)



Se ha señalado que el anillo de succinimida de maleimida formará un par de isómeros de sulfosuccinimida cuando se acopla con un grupo tiol. La sulfosuccinimida también forma isómeros cuando se abre el anillo, como se muestra en Fórmulas (IX) y (X), pero la actividad no se ve afectada.

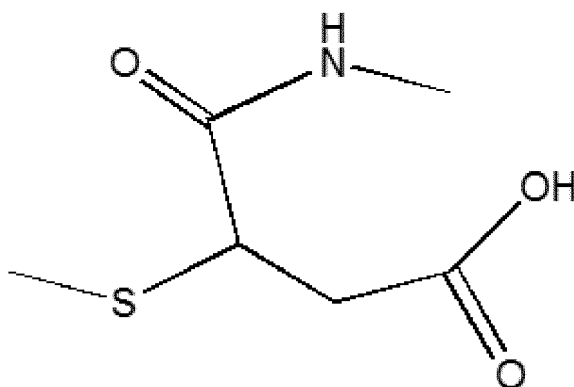
5 Una solución del conector preferido 1, 2, 3 o 4 de la presente invención se incuba con una solución de la citotoxina preferida, derivado de maitansina DM1, para formar un intermedio de conector-DM1 que contiene estructura de sulfosuccinimida, como se muestra en las FIG 11-14 respectivamente. Las moléculas formadas por acoplamiento del conector preferido 1, 2, 3 o 4 de la presente invención con la citotoxina preferida DM1, seguido de apertura de anillo se muestran en las Figuras 15-18. La reacción de apertura de anillo se puede llevar a cabo en las siguientes condiciones, pero sin limitación: Lys 0,1-0,5 M, Arg 0,1-0,5 M, Base Tris 0,1-0,5 M, bicarbonato de sodio 0,1-0,5 M, carbonato de sodio 0,1-0,5 M, borato de sodio 0,1-0,5 M, a temperatura ambiente durante 2-12 h. En las condiciones preferidas, la eficacia de apertura de anillo puede alcanzar el 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o casi 100 %. En los ejemplos se ilustra un proceso completo de apertura de anillo del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3).

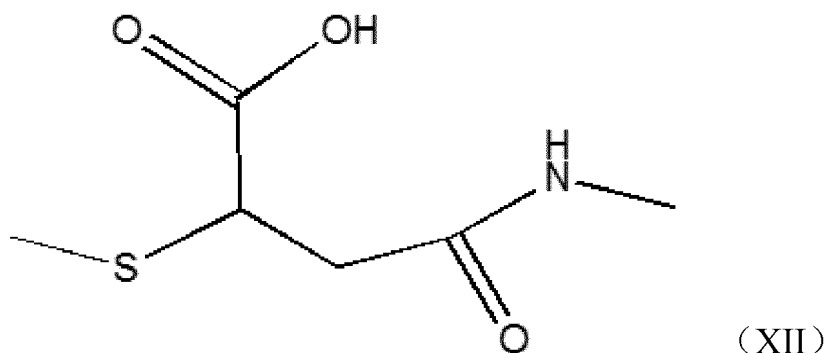
15 Lo que es más importante, la preparación de un intermedio de apertura de anillo muy puro se puede lograr mediante HPLC semipreparativa/preparativa u otros métodos de separación adecuados, independientemente de la eficacia de apertura de anillo de succinimida, asegurando de este modo el uso posterior en el acoplamiento de anticuerpos (véase los Ejemplos).

20 Dichos conectores que contienen CCA2 preferidos tienen todos un grupo tiol en CCA2, que puede reaccionar con cualquier molécula que contenga maleimida para formar una estructura de sulfosuccinimida. La sustancia que comprende una maleimida puede ser una molécula pequeña, un péptido corto, un polipéptido, un mimético peptídico, una proteína, un ácido nucleico y un análogo de ácido nucleico. El intermedio de acoplamiento descrito anteriormente se puede tratar completamente en cualquier condición de apertura de anillo apropiada para el anillo de succinimida, para obtener la estructura de anillo abierto estable correspondiente, como se muestra a continuación:

25 PCA-(LA1)_a-CCA2abierto-Y

En donde, CCA2abierto-Y contiene la siguiente estructura:





Se ha señalado que el anillo de succinimida de maleimida formará un par de isómeros de sulfosuccinimida cuando se acopla con un grupo tiol. La sulfosuccinimida también forma isómeros cuando se abre el anillo, como se muestra en Fórmulas (IX) y (XII), pero la actividad no se ve afectada.

- 5 Una solución del conector 5, 6, 7 u 8 anterior se acopla a MC-VC-PAB-MMAE respectivamente para formar un intermedio de conector-MMAE que contiene sulfosuccinimidias mostradas en las FIG. 19-22. Las citotoxinas utilizadas en la presente invención incluyen, pero sin limitación, MMAE. Las moléculas formadas por acoplamiento del conector preferido 5, 6, 7 u 8 de la presente invención con la citotoxina preferida MMAE, seguido de apertura de anillo se muestran en las Figuras 23-26. La reacción de apertura de anillo se puede llevar a cabo en las siguientes condiciones, pero sin limitación: Lys 0,1-0,5 M, Arg 0,1-0,5 M, Base Tris 0,1-0,5 M, bicarbonato de sodio 0,1-0,5 M, carbonato de sodio 0,1-0,5 M, borato de sodio 0,1-0,5 M, a temperatura ambiente durante 2-12 h. En las condiciones preferidas, la eficacia de apertura de anillo puede alcanzar el 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o casi 100 %. En el ejemplo 13 se ilustra un proceso completo de apertura de anillo del intermedio de conector 5-MMAE (n = 3).
- 10
- 15 Lo que es más importante, la preparación de un intermedio de apertura de anillo muy puro se puede lograr mediante HPLC semipreparativa/preparativa u otros métodos de separación adecuados, independientemente de la eficacia de apertura de anillo de succinimida, asegurando de este modo el uso posterior en el acoplamiento de anticuerpos (véase los Ejemplos).

4. Anticuerpo (Ab)

- 20 El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal preparado de forma recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo y mimético de anticuerpo (por ejemplo, Fab, ScFv, minicuerpo, diacuerpo, nanocuerpo, etc.).

Los anticuerpos preferidos de la invención son anticuerpos recombinantes modificados por ingeniería genética, cuyo extremo C de la cadena pesada y/o ligera contiene una modificación específica basada en la secuencia de reconocimiento de ligasa, dicha ligasa en el presente documento se refiere a una transpeptidasa, incluyendo, pero sin limitación, a diversas sortasas naturales (incluyendo sortasa A, B, C, D y sortasa de *L. plantarum*, etc., véase la patente US20110321183A1) y una diversidad de transpeptidasas nuevas optimizadas y modificadas. El sitio de reconocimiento de ligasa puede ser una secuencia de reconocimiento normal (LPXTG) procedente de sortasa A de *Staphylococcus aureus*, en donde X puede ser cualquier aminoácido natural o no natural; el sitio de reconocimiento de ligasa también puede ser una secuencia de reconocimiento de otros tipos de sortasas (la secuencia de reconocimiento del sustrato donante de sortasa es: NPQTN para sortasa B de *Staphylococcus aureus*, NPKTG para sortasa B de *Bacillus anthracis*, LPXTG para sortasa A de *Streptococcus pyogenes*, LAXTG para subfamilia de sortasa 5 de *Streptomyces coelicolor*, LPQTSEQ para sortasa de *Lactobacillus plantarum* etc.); el sitio de reconocimiento de ligasa también puede ser otra secuencia de reconocimiento totalmente nueva de transpeptidasa optimizada por exploración manual.

25

30

35

Los anticuerpos de la presente invención son más preferentemente una serie de anticuerpos anti ErbB2/HER2 humano modificados por ingeniería genética, los anticuerpos anti-ErbB2/HER2 se seleccionan de anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos y miméticos de anticuerpos (tales como Fab, ScFv, minicuerpo, diacuerpo, nanocuerpo, etc.). El anticuerpo anti-ErbB2/HER2 se une específicamente a los dominios extracelulares del receptor ErbB2/HER2 e inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan en gran medida receptores Her2, *in vivo* e *in vitro*.

40

Se prefiere en la presente invención una combinación de anticuerpo anti-ErbB2/HER2 modificado por ingeniería genética basada en la transformación de Herceptin/Trastuzumab. La cadena ligera (LC) de dicho anticuerpo incluye 3 tipos: un tipo silvestre (LC); una cadena ligera modificada en el extremo C, que se modifica mediante la introducción directa de una secuencia de reconocimiento de ligasa LPETGG (LCCT); una cadena ligera modificada

45

5 en el extremo C que se modifica mediante la introducción de un resto conector corto (Gly-Ala) más una secuencia de reconocimiento de ligasa LPETGG (LCCT_L). La cadena pesada (HC) de dicho anticuerpo también incluye 3 tipos: un HC de tipo silvestre; una cadena pesada modificada en el extremo C, que se modifica mediante la introducción directa de una secuencia de reconocimiento de ligasa LPETGG (HCCT); una cadena pesada modificada en el extremo C que se modifica mediante la introducción de un resto conector corto (Gly-Ala) más una secuencia de reconocimiento de ligasa LPETGG (HCCT_L). Las combinaciones de la cadena pesada y la cadena ligera descritas anteriormente formarán 3 anticuerpos preferidos. Las combinaciones de una cualquiera de cadena pesada y una cualquiera de cadena ligera formarán 8 anticuerpos preferidos. Las secuencias de restos de aminoácidos se enumeran en la lista de secuencias de aminoácidos.

10 5. La preparación y el control de calidad de los ADC

Los ADC preparados por acoplamiento químico tradicional no son específicos de sitio. La relación de fármaco con respecto a anticuerpo (DAR) varía mucho, lo que dio como resultado ADC con gran heterogeneidad, que no se pueden purificar adicionalmente. El ADC de la presente invención se prepara mediante acoplamiento específico de sitio.

15 1) El método de preparación

Etapa 1, los intermedios de conector de anillo abierto-citotoxina mostrados en Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se preparan como se ha descrito anteriormente. La separación y preparación del producto de alta pureza se logra mediante HPLC semipreparativa/preparativa, independientemente de la eficacia de la reacción de apertura del anillo de succinimida.

20 Etapa 2, el anticuerpo recombinante modificado por ingeniería genética que contiene la secuencia de reconocimiento específica de ligasa se expresa en células CHO u otro sistema adecuado de cultivo de células de mamíferos y se purifica.

25 Etapa 3, la reacción de acoplamiento entre el anticuerpo recombinante (o mimético de anticuerpo) y el intermedio de apertura de anillo de conector-citotoxina. El anticuerpo recombinante, cuyo extremo C de cadena ligera y/o cadena pesada contiene un sitio de reconocimiento específico de ligasa, está acoplado a un intermedio de conector-citotoxina mediante ligasa apropiada (o combinación de ligasa) en condiciones catalíticas apropiadas.

Los anticuerpos preferidos reaccionan con un intermedio de conector-citotoxina a través de catálisis de ligasa para obtener una serie de ADC preferidos, que se muestran en las Figuras 27-32, cuyos detalles se describen en los ejemplos correspondientes.

30 2) Análisis estructural de los ADC

Los ADC proporcionados por la presente invención se pueden caracterizar de varias maneras. La eficacia de la reacción de acoplamiento se puede ensayar principalmente mediante el método SDS-PAGE, la estructura molecular precisa se puede obtener a partir de espectrometría de masas de alta precisión (ESI-MS), Las distribuciones de DAR se pueden analizar mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de interacción hidrófoba (HIC-HPLC) y el grado de agregación de anticuerpos se puede analizar mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de tamiz molecular (SEC-HPLC).

6. Ensayo de actividad de ADC

1) El ensayo de afinidad de unión del ADC al antígeno específico de superficie de células tumorales

40 La presente invención proporciona un método para la determinación de la afinidad de unión del ADC con antígeno específico de superficie de células tumorales, para explorar e identificar ADC muy potentes que reconocen y se unen a los antígenos o receptores de superficie de células tumorales. En una realización particular, un candidato de ADC se incubó con células procedentes de líneas celulares de cáncer de mama estables (10-60 min) y se usó FACS para ensayar la afinidad de unión del fármaco candidato GQ1001 por los receptores ErbB2/Her2 en la superficie celular de cáncer de mama. Los resultados mostraron que ADC, tales como GQ1001 obtenido mediante el conector y método de acoplamiento de la presente invención, pueden reconocer específicamente el receptor ErbB2/Her2 de superficie celular y la afinidad de unión no es significativamente diferente de la de Herceptin, lo que sugiere que los conectores y los métodos de acoplamiento de la presente invención tienen poco efecto sobre el propio anticuerpo.

2) La inhibición selectiva de ADC en la proliferación de células tumorales

50 Para estudiar la inhibición selectiva de un ADC candidato en células tumorales (por ejemplo, células tumorales de alta expresión de ErbB2/Her2), se utilizaron los siguientes ensayos para determinar la citotoxicidad o inhibición de la

proliferación de ADC candidatos: las células tumorales de mamíferos con antígeno asociado a tumor o proteína receptora (por ejemplo, células de cáncer de mama con expresión alta o baja de ErbB2/Her2) se incubaron con el ADC candidato durante aproximadamente 12-120 h, se usó el método Cell Titer Glo para determinar la viabilidad celular.

5 En un ejemplo, se incubaron ADC GQ1001 con células de cáncer de mama humano (tales como BT474, HCC1954, SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468), células de carcinoma de ovario humano (SK-OV-3), células de cáncer gástrico humano (NCI-N87) 24-120 h, se detectó ATP intracelular mediante el ensayo Cell Titer Glo y la cantidad de ATP reflejará la viabilidad celular. Los resultados muestran que GQ1001 inhibe selectivamente la proliferación de células con alta expresión de ErbB2/HER2.

10 3) El metabolismo y la estabilidad en ratas

Se inyectaron fármacos candidatos a ADC en la vena de la cola de rata a 5-50 mg/kg, se recogieron muestras de sangre en diferentes puntos temporales después de la administración y la concentración de ADC candidatos en suero se detectó mediante ELISA. En un ejemplo particular, se administró GQ1001 o Kadcylla a través de la vena de la cola en una sola inyección a ratas SD, se recogieron muestras de sangre en diferentes puntos temporales de 1 h a 28 días después de la administración, se llevó a cabo ensayo ELISA para detectar la concentración de GQ1001 o Kadcylla en suero. No se observó ninguna diferencia significativa entre el cambio de concentración de GQ1001 y Kadcylla en ratas durante el experimento utilizando el ensayo actual.

15

4) La eficacia *in vivo* de ADC

El efecto antitumoral *in vivo* del ADC candidato se determinó utilizando un modelo de xenoinjerto de ratones desnudos después de la administración del ADC candidato. En un ejemplo, se usó célula tumoral de mama humana como modelo de xenoinjerto y se observó el crecimiento del tumor después de una única inyección en la vena de la cola de ADC GQ1001 a 0,5-50 mg/kg. Los resultados confirman que una única inyección intravenosa de GQ1001 en el intervalo de dosis de 0,5-50 mg/kg puede inhibir significativamente la proliferación de células tumorales positivas para ErbB2/Her2.

20

25 5) Toxicidad para roedores

Se evaluó la toxicidad aguda del ADC candidato en ratas. Se inyectaron a ratas Sprague-Dawley hembras dosis altas (60 mg/kg o más) de ADC y después se observó y analizó la influencia de los fármacos en los animales, y se estudiaron índices tales como el peso corporal, signos clínicos, hematología, bioquímica clínica e histopatología para evaluar la toxicidad del ADC candidato. Se descubrió que al mismo nivel de dosis (60 mg/kg), la toxicidad del ADC GQ1001 fue significativamente menor que la de Kadcylla.

30

La presente invención proporciona una clase especial de conectores, que se pueden utilizar para la conexión de proteínas, especialmente diversos anticuerpos con una diversidad de moléculas pequeñas, péptidos, ácidos nucleicos, trazadores y otras sustancias, para preparar conjugados que puedan utilizarse en investigación académica, diagnóstico clínico y tratamiento.

35 Los conectores proporcionados en la presente invención pueden utilizarse en el ligamiento específico de sitio de moléculas pequeñas con anticuerpo, lo que da como resultado ADC muy homogéneos. La presente invención proporciona especialmente una clase de ADC formados por conexión específica de sitio de agentes citotóxicos de molécula pequeña, especialmente maitansina y derivados de anticuerpos anti-ErbB2/Her2 humano.

40 Los ADC de la presente invención son útiles para tratar una diversidad de enfermedades o trastornos tales como enfermedades tumorales y autoinmunitarias. Los tumores susceptibles al tratamiento con ADC incluyen los que tienen antígenos asociados a tumores específicos o receptores de superficie celular y que serán reconocidos específicamente por el anticuerpo del ADC y después eliminados por la molécula pequeña citotóxica conectada en el ADC.

45 El ADC de la presente invención, GQ1001, que se forma por la conexión del anticuerpo anti-ErbB2/Her2 humano con citotoxina de molécula pequeña, puede unirse específicamente con el ErbB2/Her2 en las superficies de células tumorales, y, por tanto, destruir selectivamente las células tumorales que expresan en gran medida ErbB2/Her2 y curar diversos tumores positivos para ErbB2/Her2, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, etc.

50 1) Los conectores de la presente invención se pueden aplicar al ligamiento específico de sitio de una diversidad de proteínas, especialmente anticuerpos para moléculas pequeñas, péptidos, ácidos nucleicos, trazadores fluorescentes, indicador y muchas otras sustancias. Las condiciones de acoplamiento son suaves, sin efectos adversos sobre la actividad de moléculas biológicas, y por tanto pueden tener amplias aplicaciones.

2) Los conectores de la presente invención son una estructura de anillo abierto de succinimida que, en comparación con la estructura de anillo cerrado, es más estable en mamíferos, más difícil de intercambiar con tioles de cisteína, glutatión y albúmina. El ADC obtenido con este conector puede ser más estable *in vivo*, lo que supera el problema de la liberación fuera de diana de moléculas pequeñas en los ADC actuales.

5 3) El ADC de la presente invención es un producto de acoplamiento específico de sitio, que es altamente homogéneo. En comparación con ADC preparados mediante acoplamiento tradicional inespecífico de sitio, los ADC de la presente invención realizan una mejora significativa en el control de calidad y la seguridad de los fármacos, y proporcionan una solución fundamental al problema de la heterogeneidad de ADC de la industria farmacéutica.

10 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. El diagrama esquemático de la reacción de apertura de anillo.

Figura 2. El diagrama esquemático de la tecnología de acoplamiento catalizado por enzimas.

Figura 3. La estructura química del conector 1 (n es un número entero de 1-100, x es un grupo -OH o -NH₂)

Figura 4. La estructura química del conector 2 (n es un número entero de 1-100, x es un grupo -OH o -NH₂)

15 Figura 5. La estructura química del conector 3 (n es un número entero de 1-100, m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000, X es un grupo -OH o -NH₂)

Figura 6. La estructura química del conector 4 (n es un número entero de 1-100, m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000, X es un grupo -OH o -NH₂)

Figura 7. La estructura química del conector 5 (n es un número entero de 1-100, x es grupos -OH o -NH₂)

20 Figura 8. La estructura química del conector 6 (n es un número entero de 1-100, x es grupos -OH o -NH₂)

Figura 9. La estructura química del conector 7 (n es un número entero de 1-100, m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000, x es un grupo -OH o -NH₂)

Figura 10. La estructura química del conector 8 (n es un número entero de 1-100, m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000, x es grupos -OH o -NH₂)

25 Figura 11. El diagrama esquemático molecular del intermedio de conector 1-DM1 (n es un número entero de 1-100, x es un grupo -OH o -NH₂)

Figura 12. El diagrama esquemático molecular del intermedio de conector 2-DM1 (n es un número entero de 1-100, x es un grupo -OH o -NH₂)

30 Figura 13. El diagrama esquemático molecular del intermedio de conector 3-DM1 (n es un número entero de 1-100, m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000, x es un grupo -OH o -NH₂)

Figura 14. El diagrama esquemático molecular del intermedio de conector 4-DM1 (n es un número entero de 1-100, m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000, x es un grupo -OH o -NH₂)

Figura 15. El diagrama esquemático molecular de anillo abierto del intermedio de conector 1-DM1 (n es un número entero de 1-100, x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros)

35 Figura 16. El diagrama esquemático molecular de anillo abierto del intermedio de conector 2-DM1 (n es un número entero de 1-100, x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros)

Figura 17. El diagrama esquemático molecular de anillo abierto del intermedio de conector 3-DM1 (n es un número entero de 1-100, m es 0 o cualquiera de los números enteros entre 1-1000, x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros)

40 Figura 18. El diagrama esquemático molecular de anillo abierto del intermedio de conector 4-DM1 (n es un número entero de 1-100, m es 0 o cualquiera de los números enteros entre 1-1000, x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros)

Figura 19. La estructura química del intermedio de conector 5-MMAE (n es un número entero de 1-100, x es grupos -

OH o -NH₂)

Figura 20. La estructura química del intermedio de conector 6-MMAE (n es un número entero de 1-100, x es grupos -OH o -NH₂)

5 Figura 21. La estructura química del intermedio de conector 7-MMAE (n es un número entero de 1-100, m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000, x es un grupo -OH o -NH₂)

Figura 22. La estructura química del intermedio de conector 8-MMAE (n es un número entero de 1-100, m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000, x es un grupo -OH o -NH₂)

Figura 23. El diagrama esquemático molecular de anillo abierto del intermedio de conector 5-MMAE (n es un número entero de 1-100, x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros)

10 Figura 24. El diagrama esquemático molecular de anillo abierto del intermedio de conector 6-MMAE (n es un número entero de 1-100, x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros)

Figura 25. El diagrama esquemático molecular de anillo abierto del intermedio de conector 7-MMAE (n es un número entero de 1-100, x es un grupo -OH o -NH₂, m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000; A y B son isómeros)

15 Figura 26. El diagrama esquemático molecular de anillo abierto del intermedio de conector 8-MMAE (n es un número entero de 1-100, x es un grupo -OH o -NH₂, m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000; A y B son isómeros)

20 Figura 27. El diagrama esquemático molecular de moléculas ADC1 preferidas (n es un número entero de 1-100, d es cualquiera de los números enteros de 1-20, X en la secuencia de reconocimiento de ligasa LPXT es ácido glutámico (E) o cualquier otro aminoácido natural/no natural; Ab es un anticuerpo, LA3 es un resto conector, que comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina; cada b es independientemente 0 o 1, lo que indica la presencia o ausencia de LA3; x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros).

25 Figura 28. El diagrama esquemático molecular de moléculas ADC2 preferidas (n es un número entero de 1-100, d es cualquiera de los números enteros de 1-20, X en la secuencia de reconocimiento de ligasa LPXT es ácido glutámico (E) o cualquier otro aminoácido natural/no natural; Ab es un anticuerpo, LA3 es un resto conector, que comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina; cada b es independientemente 0 o 1, lo que indica la presencia o ausencia de LA3; x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros).

30 Figura 29. El diagrama esquemático molecular de moléculas ADC3 preferidas (n es un número entero de 1-100, d es cualquiera de los números enteros de 1-20, X en la secuencia de reconocimiento de ligasa LPXT es ácido glutámico (E) o cualquier otro aminoácido natural/no natural; m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000, Ab es un anticuerpo, LA3 es un resto conector, que comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina; cada b es independientemente 0 o 1, lo que indica la presencia o ausencia de LA3; x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros).

35 Figura 30. El diagrama esquemático molecular de moléculas ADC4 preferidas (n es un número entero de 1-100, d es cualquiera de los números enteros de 1-20, X en la secuencia de reconocimiento de ligasa LPXT es ácido glutámico (E) o cualquier otro aminoácido natural/no natural; m es 0 o cualquiera de los números enteros de 1-1000, Ab es un anticuerpo, LA3 es un resto conector, que comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina; cada b es independientemente 0 o 1, lo que indica la presencia o ausencia de LA3; x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros).

40 Figura 31. El diagrama esquemático molecular de moléculas ADC5 preferidas (n es un número entero de 1-100, d es cualquiera de los números enteros de 1-20, X en la secuencia de reconocimiento de ligasa LPXT es ácido glutámico (E) o cualquier otro aminoácido natural/no natural; Ab es un anticuerpo, LA3 es un resto conector, que comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina; cada b es independientemente 0 o 1, lo que indica la presencia o ausencia de LA3; x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros).

45 Figura 32. El diagrama esquemático molecular de moléculas ADC6 preferidas (n es un número entero de 1-100, d es cualquiera de los números enteros de 1-20, X en la secuencia de reconocimiento de ligasa LPXT es ácido glutámico (E) o cualquier otro aminoácido natural/no natural; Ab es un anticuerpo, LA3 es un resto conector, que comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina

50

y alanina; cada b es independientemente 0 o 1, lo que indica la presencia o ausencia de LA3; x es un grupo -OH o -NH₂; A y B son isómeros).

Figura 33. Los resultados de UPLC del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo cerrado).

Figura 34. Los resultados de MS del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo cerrado).

- 5 Figura 35. El proceso de apertura de anillo del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo cerrado), A, B, C, D y E son los resultados de UPLC de la reacción de anillo abierto que se llevó a cabo durante 20 minutos, 40 minutos, 60 minutos, 2 horas y 4 horas respectivamente.

Figura 36. Los resultados de UPLC del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo abierto).

Figura 37. Los resultados de MS del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo abierto).

- 10 Figura 38. Los resultados de SDS-PAGE del fármaco de ADC GQ1001

Figura 39. Los resultados de la espectrometría de masas de peso molecular (ESI-MS) de alta precisión de la cadena ligera de ADC GQ1001. A, espectro de cadena ligera; B, Peso molecular relativo de cadena ligera (25281) después de la desconvolución con el software ProMass 2.8.

Figura 40. Los resultados de HIC-HPLC de ADC GQ1001.

- 15 Figura 41. Resultados de SEC-HPLC de ADC GQ1001.

Figura 42. La afinidad de unión de ADC GQ1001 con el receptor ErbB2/Her2 de superficie celular BT474.

Figura 43. La afinidad de unión de ADC GQ1001 con el receptor ErbB2/Her2 de superficie celular SK-BR-3.

Figura 44. El efecto de GQ1001, Kadcyly, Herceptin, DM1 en la proliferación de células MCF-7.

Figura 45. El efecto de GQ1001, Kadcyly, Herceptin, DM1 en la proliferación de células MDA-MB-468.

- 20 Figura 46. El efecto de GQ1001, Kadcyly, Herceptin, DM1 en la proliferación de células BT-474.

Figura 47. El efecto de GQ1001, Kadcyly, Herceptin, DM1 en la proliferación de células SK-BR-3.

Figura 48. El efecto de GQ1001, Kadcyly, Herceptin, DM1 en la proliferación de células HCC1954.

Figura 49. El efecto de GQ1001, Kadcyly, DM1 en la proliferación de células SK-OV-3.

Figura 50. El efecto de GQ1001, Kadcyly, Herceptin, DM1 en la proliferación de células NCI-N87.

- 25 Figura 51. El análisis farmacocinético de ratas a las que se administró una única inyección intravenosa de GQ1001, Kadcyly. Se inyecta a ratas SD GQ1001 (10 mg/kg) o Kadcyly (10 mg/kg) a través de la vena de la cola, y se utiliza el método ELISA para detectar la concentración total de ADC en suero de rata.

Figura 52. Los ADC GQ1001 inhiben el tumor de xenoinjerto en ratones desnudos HCC1954 (n = 10, media±ETM).

- 30 Figura 53. El cambio de peso de las ratas después de una única inyección intravenosa de GQ1001 y Kadcyly. Se administra a ratas hembras adultas sanas GQ1001 (6, 60 mg/kg) o Kadcyly (60 mg/kg) mediante una única inyección a través de la vena de la cola. Las ratas en el grupo de administración de GQ1001 no muestran diferencias significativas (P > 0,05) en el aumento de peso en comparación con las ratas en el grupo de control de vehículo, las ratas en el grupo de administración de Kadcyly tienen un peso significativamente menor (P < 0,05 frente a Vehículo).

- 35 Figura 54. El cambio del nivel de ALT y AST en ratas después de una única inyección intravenosa de GQ1001 y Kadcyly. Se administra a ratas hembras adultas sanas GQ1001 (6, 60 mg/kg) o Kadcyly (60 mg/kg) mediante una única inyección a través de la vena de la cola. Las ratas en el grupo de administración de GQ1001 no muestran cambios significativos (P > 0,05) en alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en comparación con ratas en el grupo de control de vehículo, ALT y AST en ratas en el grupo de administración de Kadcyly aumentan significativamente (P < 0,05 frente a vehículo).

Figura 55. Los resultados de HPLC de una solución de reacción de apertura de anillo de intermedios de conector 5-fármaco Mc-Val-Cit-Pab-MMAE (n = 3).

Figura 56. Los resultados de masa de MALDI-TOF de una solución de reacción de apertura de anillo de intermedios de conector 5-fármaco Mc-Val-Cit-Pab-MMAE (n = 3).

5 **Mejor modo para llevar a cabo la invención**

La presente invención se ilustra adicionalmente en combinación con ejemplos específicos que se muestran a continuación. Debe entenderse que estos ejemplos pretenden únicamente ilustrar la presente invención pero sin limitar el alcance de la invención.

10 A menos que se indique otra cosa, todos los términos científicos y técnicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que los entendidos por un experto en la materia. Además, cualquier método y material similar o equivalente al contenido descrito es aplicable en el método de la presente invención. El método de implementación preferido y el material descrito en el presente documento son solamente ejemplares.

Ejemplo

Ejemplo 1-La producción, purificación y caracterización del anticuerpo anti-ErbB2/Her2 humano T-LCCTL-HC

15 1) La producción del anticuerpo T-LCCTL-HC

La construcción del plásmido que codificaba el anticuerpo T-LCCTL-HC de SEQ ID NO: 1 se transfectó en células CHO y la población celular se estableció y se seleccionó para una población celular muy expresada, que se cultivó con referencia al proceso de cultivo de Trastuzumab en un reactor de 5-10 l, y se recogió el sobrenadante.

2) La purificación del anticuerpo T-LCCTL-HC

20 La purificación de T-LCCTL-HC se llevó a cabo en un proceso convencional utilizando la combinación de cromatografía de afinidad MabSelect y cromatografía de intercambio catiónico Sepharose S, los productos purificados se disolvieron en el tampón de fármaco Trastuzumab original (histidina-HCl 5 mM, trehalosa al 2 %, Polisorbato 20 al 0,009 %, PH 6,0) y se congelaron en pequeñas alícuotas.

3) El control de calidad del anticuerpo T-LCCTL-HC

25 La pureza del anticuerpo T-LCCTL-HC purificado anterior es de 98,5 % mediante SDS-PAGE; el contenido de polímero de alto peso molecular de la muestra es menor de 0,4 % por SEC-HPLC; el contenido de endotoxinas es menor de 0,098 EU/mg.

Ejemplo 2-La preparación del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo abierto)

1) La preparación y el control de calidad del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo cerrado)

30 El conector 2 (n = 3) y DM1 se pesaron en una relación molar de 1:1, se mezcló y se disolvió de forma suficiente y se hizo reaccionar a 0-40 °C durante 0,5-20 h, para obtener el intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo cerrado, estructura como se muestra en la FIG. 12). La pureza y el peso molecular del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo cerrado) se detectaron mediante UPLC-M y los resultados mostraron que la pureza aparente es del 100 % (una mezcla de isómeros, en una relación de aproximadamente 1:1, como se muestra en la Figura 33), el peso molecular hallado es 1274 (Figura 34), lo que es coherente con las expectativas.

35

2) La reacción de apertura de anillo y la purificación del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo cerrado)

La solución del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo cerrado) se mezcló con una cantidad apropiada de solución de Base Tris u otra solución para promover la reacción de apertura de anillo, la reacción se llevó a cabo a 0-40 °C durante 0,2-20 h, la estructura resultante del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo abierto) se muestra en la Figura 16. Los resultados de UPLC de la reacción de apertura de anillo a los 20 minutos, 40 minutos, 60 minutos, 2 horas y 4 horas se muestran en la FIG. 35 A-E. A medida que avanza la reacción, la relación del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo abierto) en la mezcla de reacción aumenta (de 10 a 73 %). La preparación de un intermedio de conector 2-DM1 altamente puro (n = 3, anillo abierto) puede lograrse mediante HPLC semipreparativa/preparativa, independientemente de la eficacia de la apertura de anillo de succinimida en el intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo abierto), asegurando de este modo el uso posterior en el acoplamiento de anticuerpos.

45

3) Control de calidad del intermedio de conector 2-DM1 del conector (n = 3, anillo abierto)

Se pesó una cantidad apropiada de intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo abierto) y la pureza y el peso molecular se detectaron mediante UPLC-MS, los resultados se muestran en la Figura 36 y la Figura 37. La pureza del intermedio de conector purificado por HPLC 2-DM1 (n = 3, anillo abierto) es del 100 %, la masa hallada es 1291,8, que es coherente con las expectativas, estableciendo una base sólida para la producción posterior de ADC GQ-1001.

Ejemplo 3-Preparación de ADC GQ1001

El ADC de esta invención se prepara mediante acoplamiento específico de sitio del intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, el anillo abierto) con el anticuerpo T-LCCT_L-HC bajo la catálisis de una transpeptidasa (Figura 28), en donde, n es 3, d es 2, la X en la secuencia de reconocimiento de ligasa LPXT es un ácido glutámico (E).

1) El tratamiento del anticuerpo T-LCCT_L-HC

El tampón de almacenamiento del anticuerpo T-LCCT_L-HC se cambió a tampón de ligasa 1 x mediante ultrafiltración, diálisis o desalinización. El componente principal de tampón de ligasa 1 x fue Tris-HCl 50 mM (pH 5-8), NaCl 150 mM, con o sin CaCl₂.

2) Preparación en fase sólida de ADC GQ1001

La presente invención utiliza la reacción de acoplamiento de un anticuerpo T-LCCT_L-HC catalizado por transpeptidasa optimizado y modificado por ingeniería genética basada en sortasa con intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo abierto), para producir el ADC GQ1001.

En el tampón de transpeptidasa 1 x, el anticuerpo T-LCCT_L-HC y el intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo abierto) se mezclaron completamente en una relación molar apropiada (de 1:1 a 1:100) y la mezcla se inyectó en una columna de acoplamiento de fase sólida. Hay transpeptidasa inmovilizada en la matriz de fase sólida, que cataliza la reacción de acoplamiento entre el anticuerpo T-LCCT_L-HC y el intermedio de conector 2-DM1 (n = 3, anillo abierto). La reacción de acoplamiento se lleva a cabo a 4-40 °C durante 0,5 a 20 horas. Tras la reacción, la mezcla de reacción se eliminó de la columna de acoplamiento de fase sólida y se trató mediante ultrafiltración o diálisis para eliminar los intermedios de fármaco que no han reaccionado. El ADC GQ1001 purificado se almacenó en el tampón Kadcylla original (succinato de sodio 10 mM, pH 5.0; trehalosa 100 mg/ml; polisorbato 20 0,1 % (p/v); con referencia a la formulación de Kadcylla) y se almacenó a 4 °C o -80 °C.

Ejemplo 4-Análisis de SDS-PAGE de ADC GQ1001

La eficacia de acoplamiento y pureza de GQ1001 se pueden detectar mediante SDS-PAGE después de la reacción de acoplamiento. Como se muestra en la Figura 38, el acoplamiento tuvo lugar en las cadenas ligeras del anticuerpo T-LCCT_L-HC de una manera específica de sitio y se observó un cambio de peso molecular evidente para la cadena ligera acoplada a DM1 de GQ1001, en comparación con la cadena ligera de T-LCCT_L-HC desacoplada. No hay ninguna cadena ligera desacoplada en el producto acoplado, lo que indica una eficacia de acoplamiento de hasta 95 %. La pureza del producto acoplado es coherente con las expectativas.

Ejemplo 5-El análisis de masas de peso molecular de alta precisión (ESI-MS) de ADC GQ1001

Se utilizó espectrometría de masas de peso molecular de alta precisión para analizar la cadena ligera de ADC GQ1001 y los resultados mostraron que la masa aparente es 25281, mientras que el peso molecular teórico es 25284, que es coherente con las expectativas, lo que confirma que hay una citotoxina acoplada al extremo de cada cadena ligera. Los resultados del espectro de masas de peso molecular de alta precisión (ESI-MS) se muestran en la Figura 39A y B.

Ejemplo 6-Análisis de HIC-HPLC de ADC GQ1001

La columna de butil-HIC se usa para detectar la distribución DAR de ADC GQ1001 y el resultado se muestra en la Figura 40. El anticuerpo sin citotoxinas T-LCCT_L-HC es menor de 5 %; la mayoría del producto acoplado es GQ1001 con un DAR de 2 y el DAR general de ADC GQ1001 es de aproximadamente 1,8.

Ejemplo 7-Análisis de SEC-HPLC de ADC GQ1001

Se usó SEC-HPLC para detectar el grado de agregación de alto peso molecular de ADC GQ1001. El resultado se muestra en la Figura 41, El polímero de alto peso molecular no se encuentra en el ADC GQ1001, lo que indica que

el daño causado por la reacción de acoplamiento es casi insignificante.

Ejemplo 8-La afinidad de unión de ADC GQ1001 al ErbB2/Her2 de superficie celular

- 5 1) Se recogieron células BT-474 de cáncer de mama humano o células SK-BR-3 y se prepararon en suspensión de células individuales, se ajustó la densidad celular a $(0,5-5) \times 10^6$ /ml. Se tomaron 5×10^5 células/prueba y se añadieron 6,25 nM de Herceptin, T-LCCTL-HC o GQ1001 respectivamente. La mezcla se incubó a 4 °C durante 60 min. Se añadió 1 ml de solución de lavado (PBS + BSA 1 %), se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. El tratamiento se repitió dos veces.
- 10 2) Se añadieron 100 µl de dilución de anticuerpo de cabra IgG anti-humano-FITC a células incubadas con Herceptin, T-LCCTL-HC y GQ1001 respectivamente, y se incubaron a 4 °C durante 30 min en oscuridad. Se añadió 1 ml de solución de lavado, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. El tratamiento se repitió dos veces. Las células se resuspendieron en 500 µl de PBS, se pasaron a través de un tamiz de malla 300 y se almacenaron en un frigorífico en la oscuridad, se realizó detección por citómetro de flujo mediante el BD C6. Los resultados se muestran en las Figuras 42-43, La afinidad de unión de Herceptin, T-LCCTL-HC, GQ1001 por el receptor ErbB2/Her2 en las superficies de células BT-474 y SK-BR-3 no tiene ninguna diferencia significativa.
- 15

Ejemplo 9-El efecto de ADC GQ1001 sobre la proliferación de células tumorales con diferentes niveles de expresión de ErbB2/Her2

- 20 1) Células de cáncer de mama humanas con expresión baja de ErbB2/Her2 MCF-7, MDA-MB-468, células de cáncer de mama humanas con expresión alta de ErbB2/Her2 BT-474, SK-BR-3, HCC1954, células de cáncer de ovario humano SK-OV-3, células de cáncer gástrico humano NCI-N87 se sembraron en una placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo (que contenía de 1000 a 10000 células) y se incubaron en una incubadora de cultivo celular durante una noche (37 °C), CO2 5 %, aire 95 %, 100 % de humedad).
- 25 2) Se añadió a las células incubadas durante una noche GQ1001, Kadcylla, Herceptin y DM1 a diferentes concentraciones (30, 10, 3,333, 1,111, 0,370, 0,123, 0,041, 0,014, 0,005 nM), se añadió al grupo de control puromicina 50 µM, y se incubó a 37 °C durante 48 ~ 96 h más.
- 3) La placa celular se retiró de la incubadora, y se equilibró durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de reactivo CellTiter Glo, se agitaron en un oscilador durante 2 min, después se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, las unidades de luz relativas (ULR) se miden con un lector de microplacas BioTech Gen5.
- 30 4) Los resultados de los efectos de diferentes fármacos sobre la inhibición de la proliferación de células tumorales se muestran en la Tabla 1 y en las Figuras 44-50. DM1 tiene un efecto de inhibición significativo en la proliferación de todas las células, ya sea con expresión alta o baja de ErbB2/Her2, pero Herceptin y GQ1001 solo tienen un efecto de inhibición significativo en la proliferación de células con expresión alta de ErbB2/Her2 y no se observó inhibición significativa para células con expresión baja de ErbB2/Her2. Kadcylla solamente inhibe la
- 35 proliferación de células con baja expresión de ErbB2/Her2 a altas concentraciones.

Tabla 1. Efectos de la inhibición de diferentes fármacos en la proliferación de células tumorales (CI₅₀, nM)

Fármaco	GQ1001	Kadcylla	Herceptin	DM1
Línea celular				
MCF-7	-	-	-	5,708
MDA-MB-468	-	-	-	4,218
BT-474	0,410	0,144	-	16,270
SK-BR-3	0,140	0,030	-	1,918
HCC-1954	0,149	0,049	-	2,897

(continuación)

Fármaco	GQ1001	Kadcyla	Herceptin	DM1
Línea celular				
SK-OV-3	0,144	0,049	-	1,593
NCI-N87	0,113	0,031	0,229	7,185

NOTA: "-" No medida

Ejemplo 10-Estudio farmacocinético *in vivo* en ratas

- 1) Se dividieron al azar ratas SD hembras de tipo SPF de 160 ~ 180 g en el grupo GQ1001, grupo Kadcyla y grupo de control en blanco, con 4 ratas en cada grupo.
- 2) Se administraron GQ1001 10 mg/kg (número de lote: 20141128, pureza > 98 %) o Kadcyla (lote N1003) mediante inyección intravenosa y se administró un volumen igual de PBS (pH 7,4) para el grupo de control.
- 3) Se tomaron 100 ~ 200 µl de muestras de sangre (sin anticoagulante añadido) de la vena angular intraocular al cabo de 1 h, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 6 días, 8 días, 13 días, 17 días, 21 días, 28 días después de la administración del fármaco. Las muestras de sangre recogidas se colocaron en hielo durante 1 ~ 2 h, después se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min (4 °C), el sobrenadante se dividió en alícuotas pequeñas y se añadió a tubos EP nuevos y se almacenó a -80 °C para su uso posterior.
- 4) Los contenidos totales de GQ1001 y Kadcyla en suero se detectaron mediante ELISA.
- 5) Los resultados muestran que, un día después de la administración, las concentraciones en sangre de GQ1001 y Kadcyla disminuyeron rápidamente, que fueron respectivamente 44,7 % y 42,5 % de las detectadas 1 h después de la administración, no se observaron diferencias significativas entre los dos. Esta reducción se debe a la rápida distribución sistémica de los ADC después de la administración. 6 días después de la administración, GQ1001 y Kadcyla fueron respectivamente 20,9 % y 20,5 % de las detectadas 1 h después de la administración; 13 días después de la administración, GQ1001 y Kadcyla fueron respectivamente 9,9 % y 12,2 % de las detectadas 1 h después de la administración. 21 días después de la administración, GQ1001 y Kadcyla fueron respectivamente 5,5 % y 7,7 % de las detectadas 1 h después de la administración. 28 días después de la administración, GQ1001 y Kadcyla fueron respectivamente 3,5 % y 5,2 % de las detectadas 1 h después de la administración. Estos resultados indican que GQ1001 y Kadcyla no mostraron diferencias significativas en la tasa de atenuación en ratas hembras (Fig. 51).

Ejemplo 11-Evaluación farmacodinámica *in vivo* de ADC GQ1001

- 1) Se recogieron células de cáncer de mama HCC1954 en la fase de crecimiento logarítmico y se ajustaron con tampón de matrigel (PBS: BD Matrigel = 1:1) a una densidad celular de $2,5 \times 10^7$ /ml. Se inyectaron por vía subcutánea 0,2 ml de esta suspensión de células HCC1954 preparadas en la escápula derecha de cada ratón desnudo BALB/c (de 6 a 8 semanas de edad, tipo SPF, hembra).
- 2) 7 días después de la inoculación celular, el diámetro del tumor se midió por calibre y el volumen tumoral se calculó según la Fórmula: $V = 0,5a \times b^2$ (a es el diámetro más largo del tumor, b es el diámetro más corto del tumor). Los animales con volúmenes tumorales de 130 ~ 140 mm³ se asignaron al azar a 5 grupos: el grupo de control de vehículo, el GQ1001 0,5 mg/kg, el grupo de GQ1001 5 mg/kg, el grupo de Kadcyla 5 mg/kg y el grupo de Herceptin 5 mg/kg, con 10 animales en cada grupo. La administración fue a través de inyección en la vena de la cola y el grupo de control recibió un volumen igual del vehículo. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana en un período de 31 días, después una vez por semana en lo sucesivo. Los volúmenes del tumor en cada punto temporal se calcularon y se compararon entre grupos. Al mismo tiempo, El valor de T-C o T/C se utilizó como índice para evaluar la actividad antitumoral de cada fármaco. El valor de T-C se calcula de la siguiente manera: T es el tiempo promedio (Días) cuando el volumen tumoral promedio de cada grupo de tratamiento alcanza un tamaño preestablecido (500 mm³), C es el tiempo promedio (Día) cuando el volumen tumoral promedio del grupo controlado alcanza el tamaño preestablecido (500 mm³). Mientras que T/C (porcentaje) es el índice para el efecto de inhibición del tumor, T es el volumen tumoral promedio de todos los grupos de tratamiento farmacológico en un punto temporal fijo y C es el volumen tumoral promedio del grupo de control en el punto temporal fijo.
- 3) Los volúmenes tumorales en el grupo de GQ1001 5 mg/kg y el grupo de Kadcyla 5 mg/kg fueron significativamente menores que el grupo de control 10 días después de la administración y algunos tumores incluso se hicieron indetectables. No apareció ningún signo de regeneración tumoral hasta el final del tratamiento, 38 días después de la administración (Tabla 2, Figura 52). Estos resultados indican que tanto GQ1001 como Kadcyla tienen una inhibición significativa en el cáncer de mama positivo para ErbB2/Her2 a la dosis de 5 mg/kg.

Tabla 2. La inhibición del crecimiento de ADC GQ1001 en xenoinjerto HCC1954 en ratones

Tratamiento	Tamaño del tumor (mm ³) ^a el día 31	T/C ^b (%)	T-C (días) a 500 mm ³	valor de <i>p</i>
Vehículo	2301±566	--	--	--
GQ1001 (0,5 mg/kg)	1045±211	45,4	7	0,359
GQ1001 (5 mg/kg)	34±6	1,5	>17	0,026
Kadcyla (5 mg/kg)	29±4	1,3	>17	0,026
Herceptin (5 mg/kg)	1333±155	57,9	3	0,587

a. Media ± ETM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo para el grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo para el grupo de control (T/C).

Ejemplo 12-Estudios de toxicidad de inyección individual de ADC GQ1001

5 1) Se dividieron aleatoriamente ratas SD hembras adultas sanas en cuatro grupos (n = 6/grupo): el grupo de control del vehículo (0 mg/kg), el grupo de GQ1001 6 mg/kg, el grupo de GQ1001 60 mg/kg y el grupo de Kadcylla 60 mg/kg. El fármaco se administró mediante una única inyección a través de la vena de la cola. La dosis de administración es de 10 ml/kg y la velocidad de administración es de aproximadamente 1 ml/min. Durante el experimento, los animales se sometieron a inspección clínica y se examinó su peso corporal, consumo de alimento, hemograma, índices bioquímicos de la sangre. Al final del experimento, todos los animales fueron sacrificados, anatomizados y comprobados sistemáticamente. Se pesaron todos los órganos principales, se calculó el coeficiente de órganos y se registró cualquier lesión visible.

10 2) Los resultados mostraron que, durante el experimento, no se observó ninguna anomalía clínica para ningún animal en ambos grupos de GQ1001; Para el grupo de Kadcylla 60 mg/kg, se observaron secreciones nasales visibles (2/6), enrojecimiento (partes del oído) e hinchazón de los oídos (6/6), pelaje suave (6/6), pérdida de peso (1/6), arqueado (1/6), orejas y extremidades pálidas (1/6) 5 días después de la administración (D5); en donde la hinchazón del oído desapareció en D6, las secreciones nasales desaparecieron en D7; 4 de los 6 animales volvieron a la normalidad en D8 y los otros 2 de los 6 animales volvieron a la normalidad antes de ser sacrificados en D15, excepto por el pelo visiblemente suave. En comparación con el grupo de control de vehículo, no se observó ningún cambio en el peso corporal asociado con la administración en ambos grupos de GQ1001; mientras que en el grupo de Kadcylla 60 mg/kg, se observó una pérdida de peso significativa después de la administración (D2 ~ D12). Los resultados se muestran en la Figura 53.

Los resultados de hematología y análisis bioquímicos clínicos mostraron que no hay una reacción tóxica significativa en ambos grupos de GQ1001, mientras que los animales en el grupo de Kadcylla 60 mg/kg tuvieron un índice eritroide reducido (RBC, HGB, HCT, Retic) y recuento de glóbulos blancos y su subgrupo aumentado, ALT, AST, TBIL, GGT aumentaron o tuvieron una tendencia a aumentar, especialmente, el ALT y AST aumentaron significativamente, lo que sugiere una toxicidad hepática relacionada con el fármaco de Kadcylla en una única sola inyección a una dosis de 60 mg/kg. Los resultados se muestran en la Figura 54.

La anatomía sistemática y la observación general mostraron que no se observaron cambios anómalos para animales en cada grupo de dosis de GQ1001, mientras que se observaron cambios generales asociados con la administración para animales en el grupo de dosis de Kadcylla de 60 mg/kg, incluyendo el bazo grande (6/6), borde de hígado romo redondo (4/6), timo (1/6).

Los resultados anteriores sugirieron que, a las dosis equivalentes de 60 mg/kg, la toxicidad aguda de GQ1001 es significativamente menor que la de Kadcylla.

Ejemplo 13-La preparación de intermedio estable de conector 5-fármaco Mc-Val-Cit-Pab-MMAE (n = 3, anillo abierto)

35 1) La preparación y el control de calidad de intermedio de conector 5-fármaco Mc-Val-Cit-Pab-MMAE (n = 3, anillo cerrado) El conector 5 (n = 3) y Mc-Val-Cit-PAB-MMAE se pesaron a una relación molar de 1:1, se disolvieron y se mezclaron completamente, y se mantuvieron a 0-40 °C durante 0,5-20 h, para obtener el conector 5-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE (n = 3, anillo cerrado), como se muestra en la Figura 19.

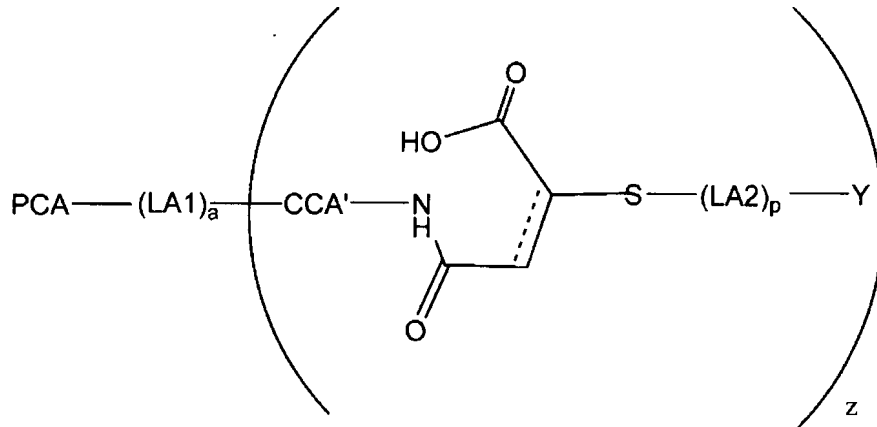
40 2) La reacción de apertura de anillo del intermedio de conector 5-fármaco Mc-Val-Cit-PAB-MMAE (n = 3, anillo cerrado)

El intermedio de conector 5-fármaco Mc-Val-Cit-PAB-MMAE (n = 3, anillo cerrado) se trató con una cantidad apropiada de solución de Base Tris u otra solución para promover la reacción de apertura de anillo, la reacción se llevó a cabo a 0-40 °C durante 0,2-20 h, para obtener la forma de anillo abierto del intermedio como se muestra en la

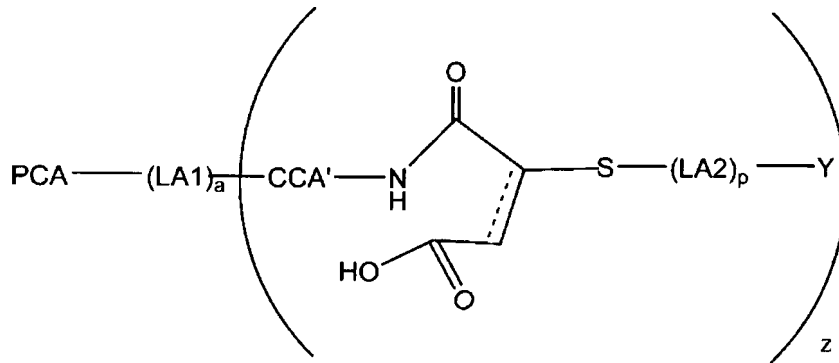
5 Figura 23. La pureza y el peso molecular de los intermedios (anillo abierto) se analizaron mediante HPLC y los resultados se muestran en la Figura 55, los isómeros no pueden separarse mediante HPLC común. El espectro de masas MALDI-TOF se usó para detectar la mezcla de reacción de anillo abierto y se obtuvo una serie de pesos moleculares, como se muestra en la Figura 56, la masa teórica es 1681 y la masa encontrada es 1702, 1718, correspondientes a las sales de Na y K respectivamente, lo que es totalmente coherente con las expectativas, lo que confirma que se obtuvo un producto de anillo abierto esperado. La preparación de un intermedio de anillo abierto muy puro se puede lograr mediante HPLC semipreparativa/preparativa, independientemente de la eficacia de apertura de anillo de succinimida, asegurando de este modo el uso posterior en el acoplamiento de anticuerpos.

REIVINDICACIONES

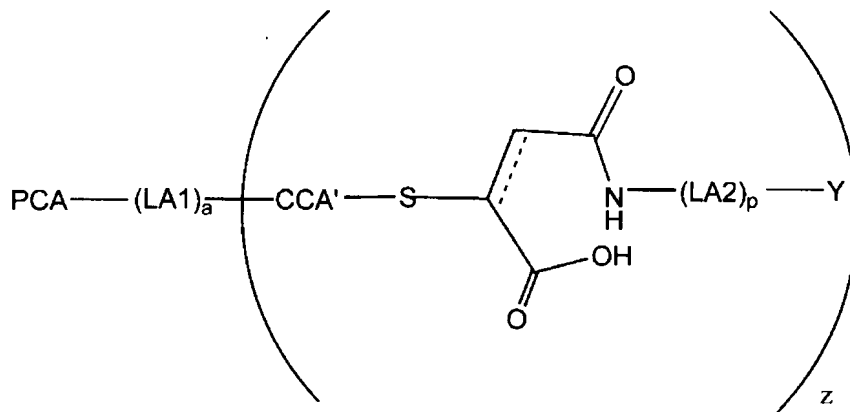
1. Un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV):



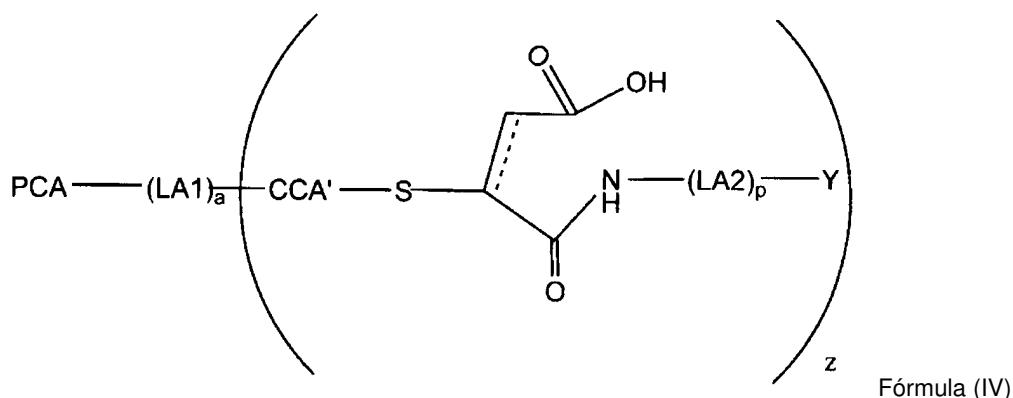
Fórmula (I)



Fórmula (II)



Fórmula (III)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

PCA es una secuencia de reconocimiento de sustrato específica de la ligasa;

LA1 y LA2 son restos conectores;

5 a y p son independientemente 0 o 1, es decir, LA1 y LA2 están presentes o ausentes de forma independiente;

CCA' es un resto de conjugación química;

----- representa un enlace simple o doble;

Y es una carga útil, que se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de ácido nucleico, una secuencia peptídica corta, un polipéptido, una proteína, una pequeña molécula y una sustancia biológica;

10 z es cualquiera de los números enteros entre 1 y 1000.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde la ligasa es una sortasa.

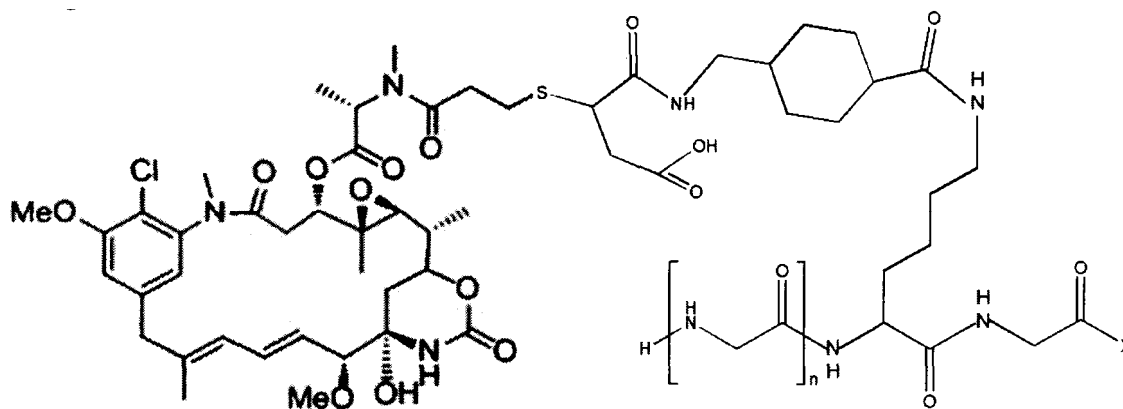
3. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde el PCA es una secuencia de reconocimiento específica del sustrato aceptor de ligasa.

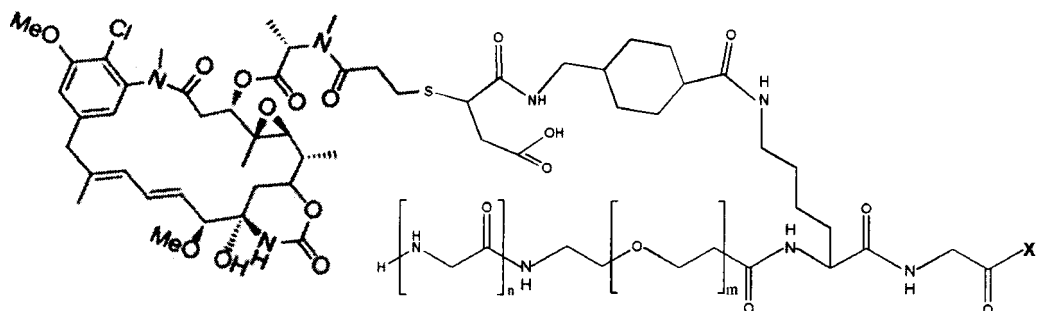
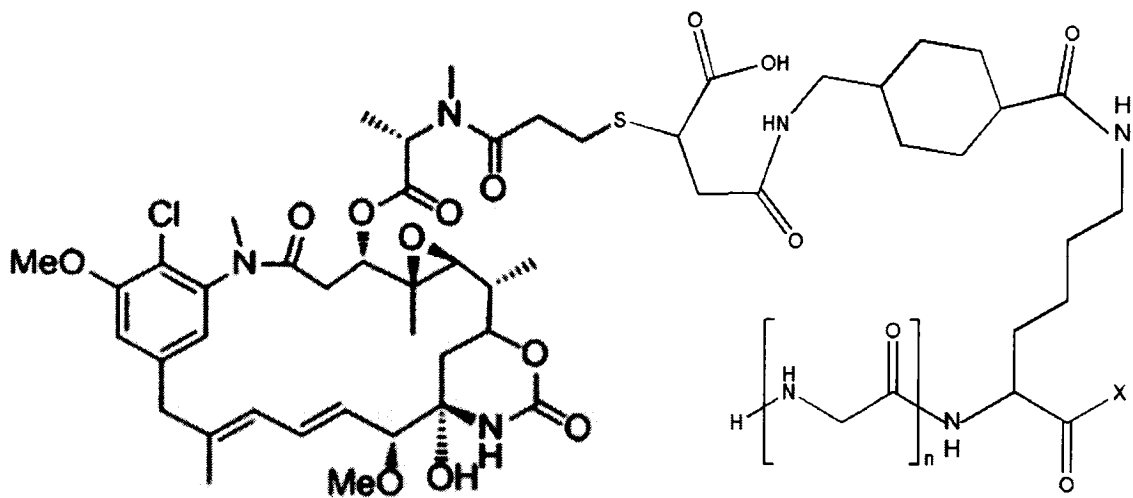
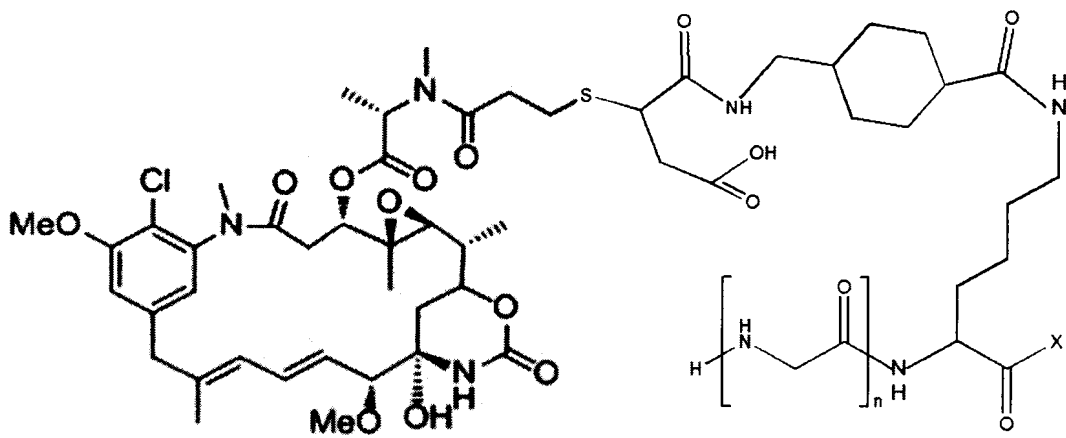
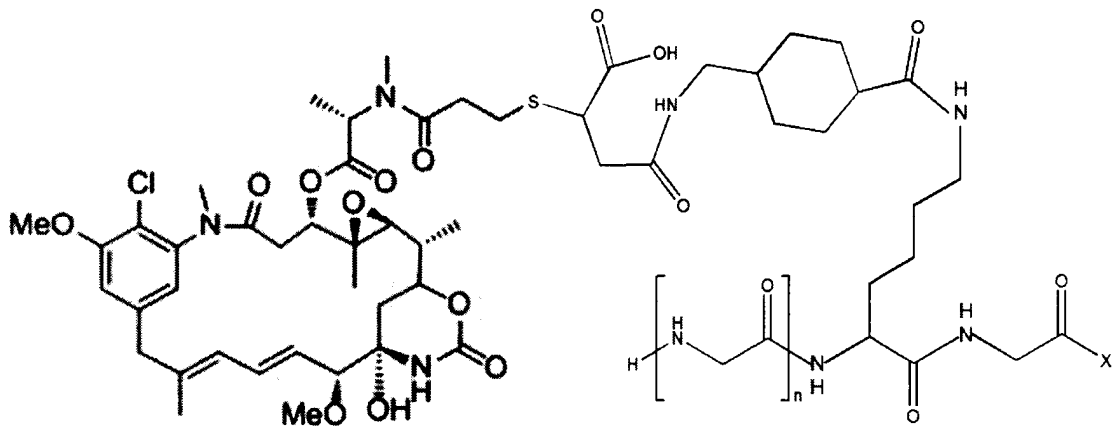
15 4. Un compuesto según la reivindicación 3, en donde el PCA comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina.

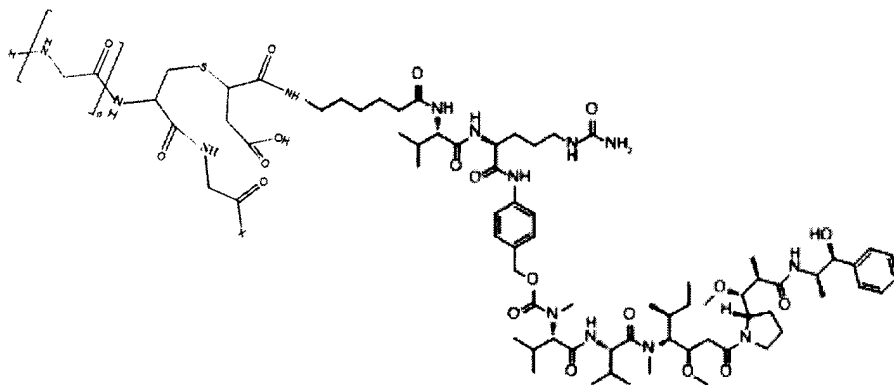
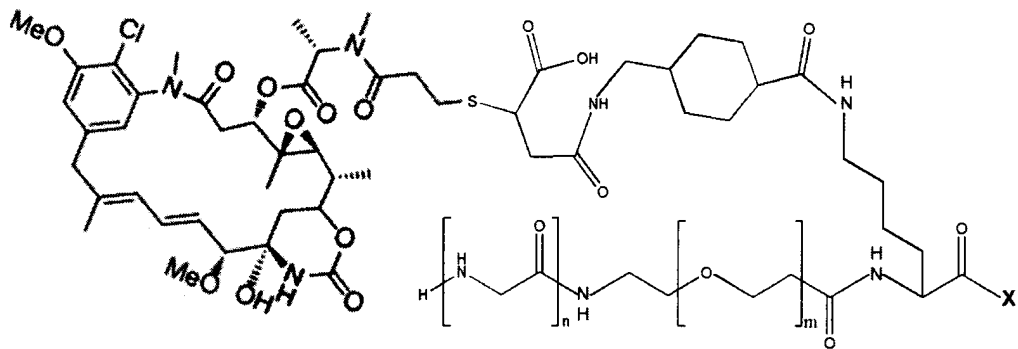
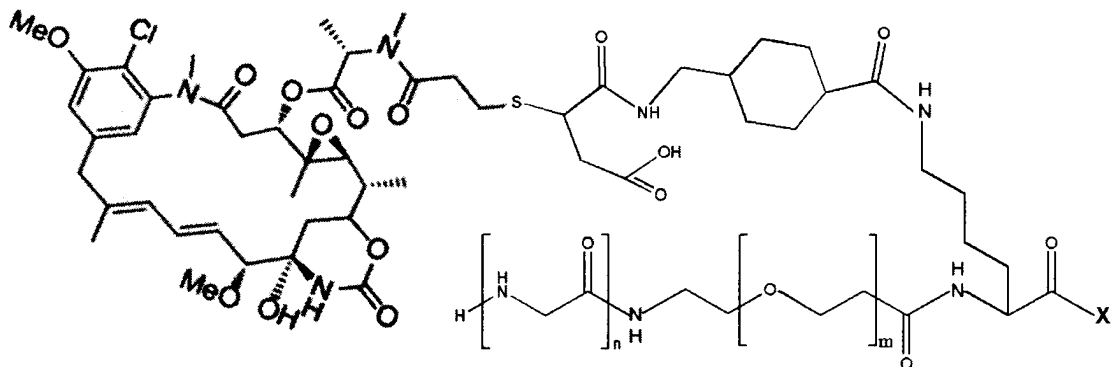
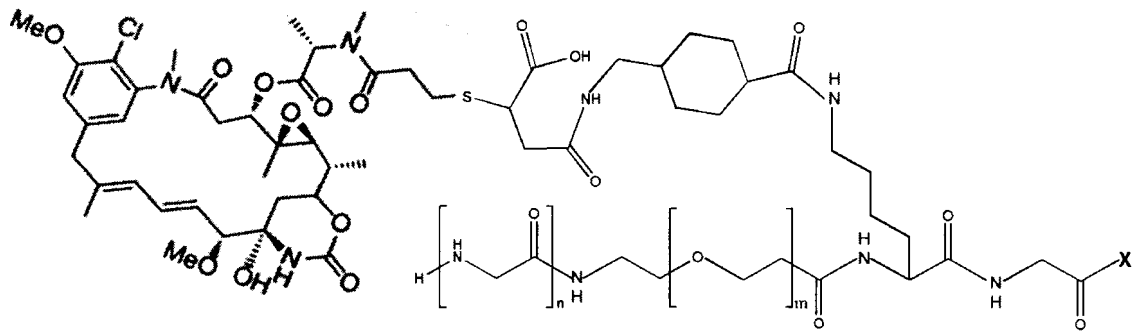
5. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde Y es un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, una etiqueta de purificación de afinidad, una molécula trazadora, un fármaco antineoplásico o una molécula citotóxica.

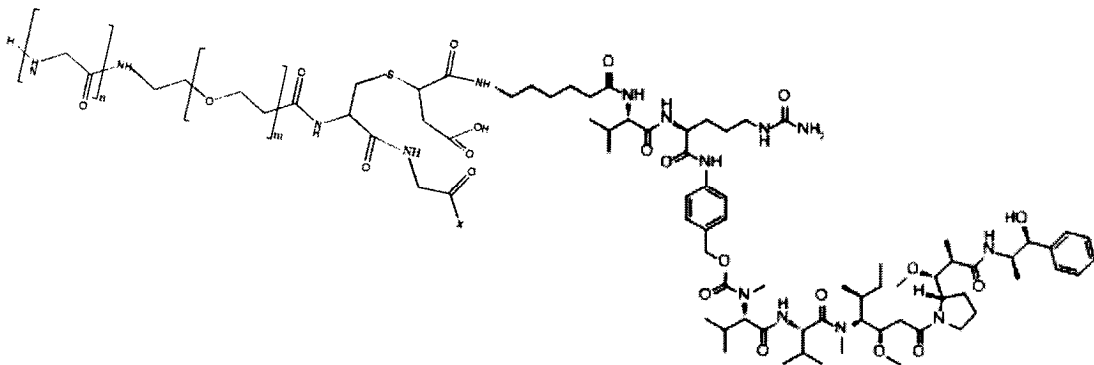
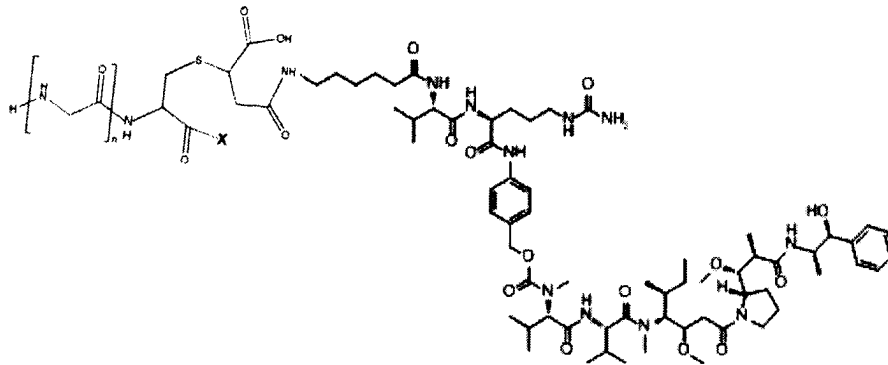
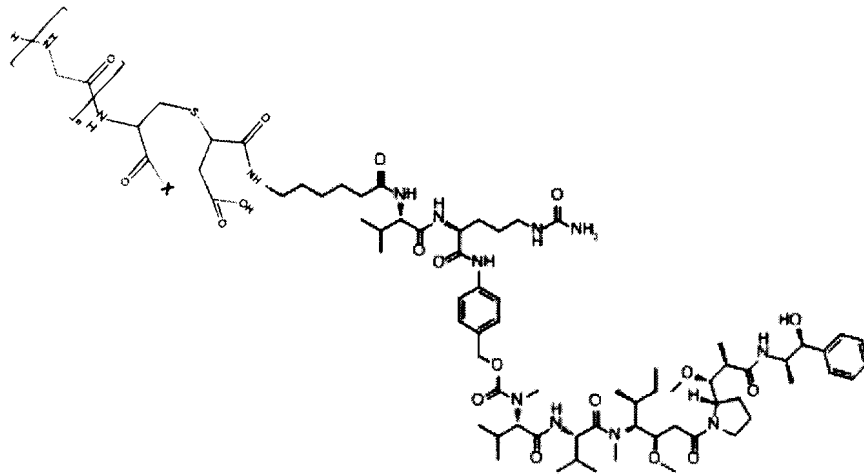
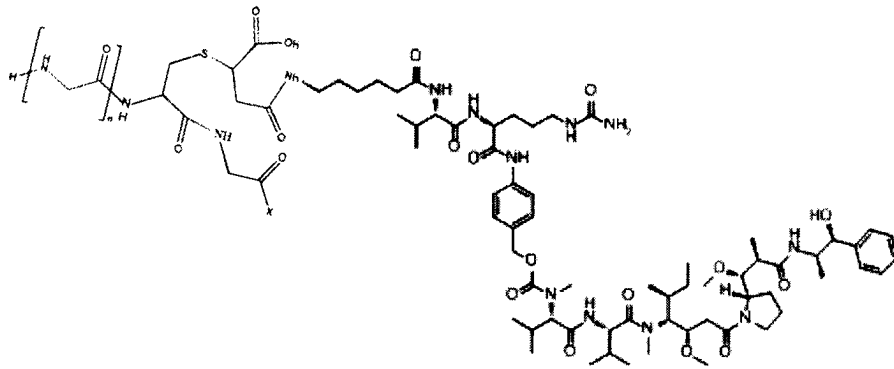
20 6. Un compuesto según la reivindicación 5, en donde Y es maitansina o un derivado de la misma, paclitaxol o un derivado del mismo, auristatina o un derivado de la misma, epotilona o un derivado de la misma o un compuesto alcaloide de la vinca.

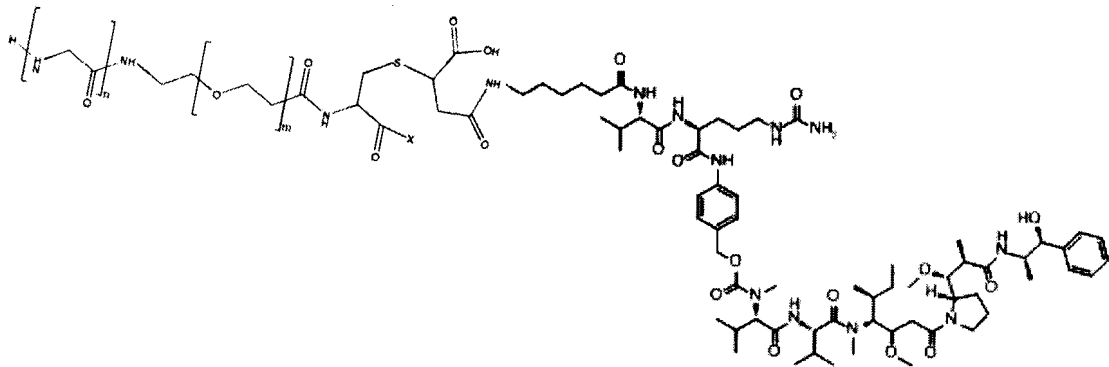
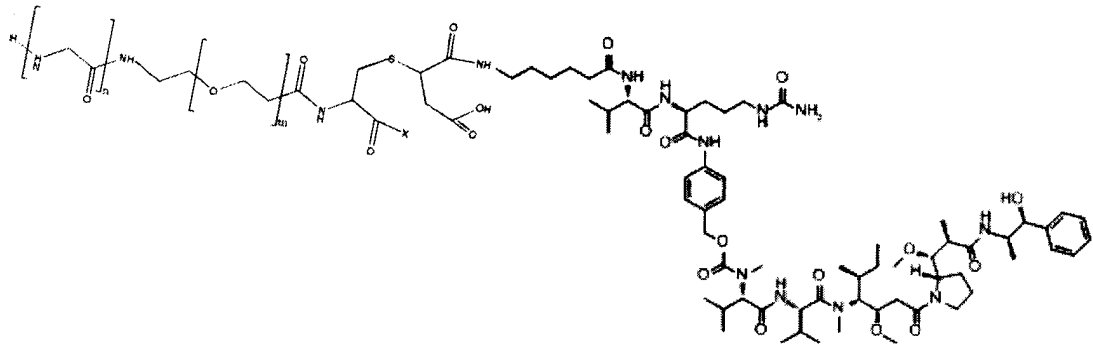
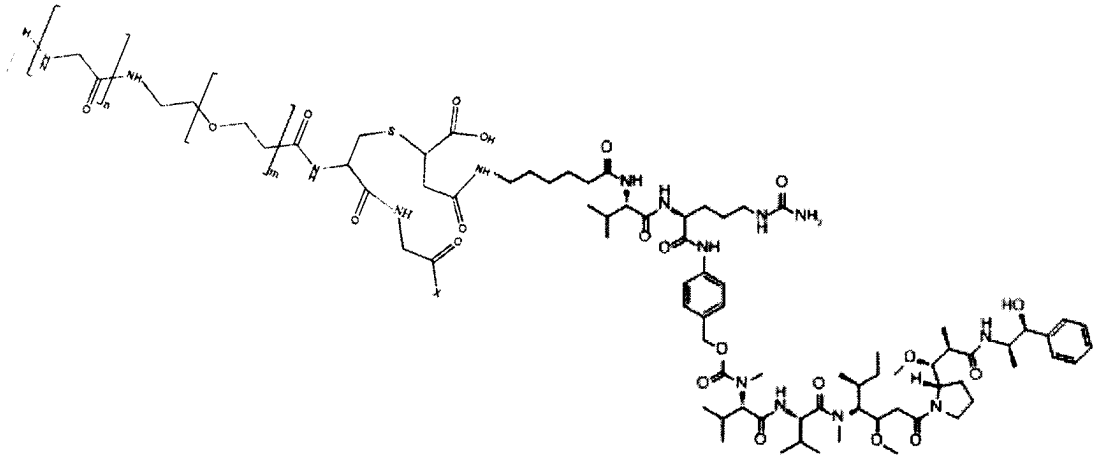
7. Un compuesto según la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en:







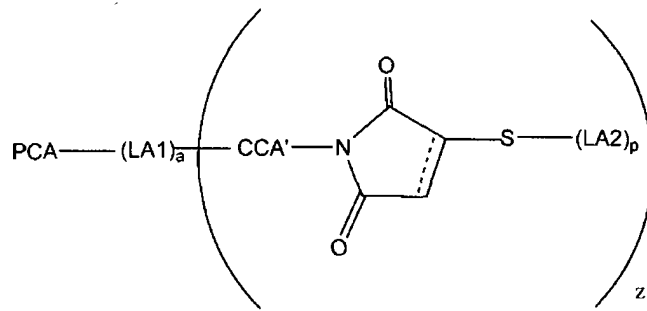




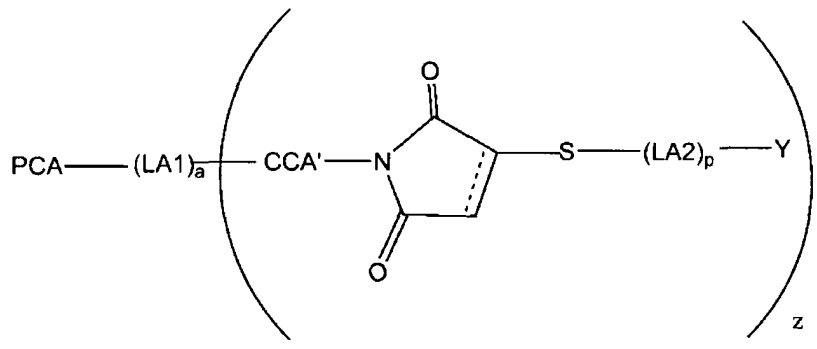
5 en donde n representa cualquiera de los números enteros entre 1 y 100, m es 0 o cualquiera de los números enteros entre 1 y 1000, x es un grupo -OH o -NH₂.

8. Una composición que comprende el compuesto según la reivindicación 1, que se prepara mediante las siguientes etapas:

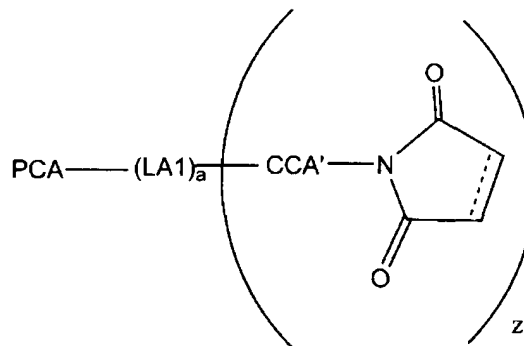
A) una solución de Y y una solución de



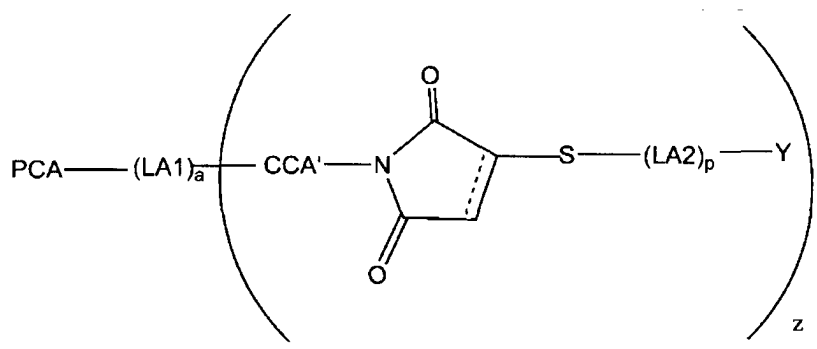
se mezclan e incuban para obtener una solución del conjugado:



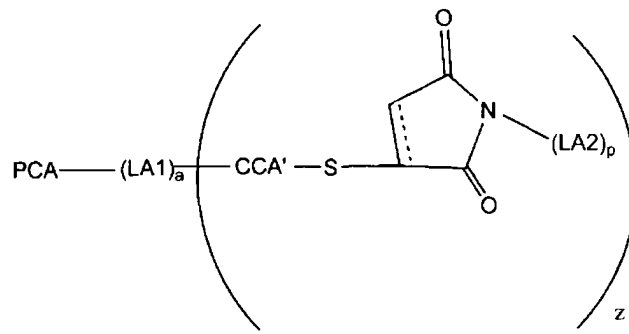
5 o
una solución de Y y una solución de



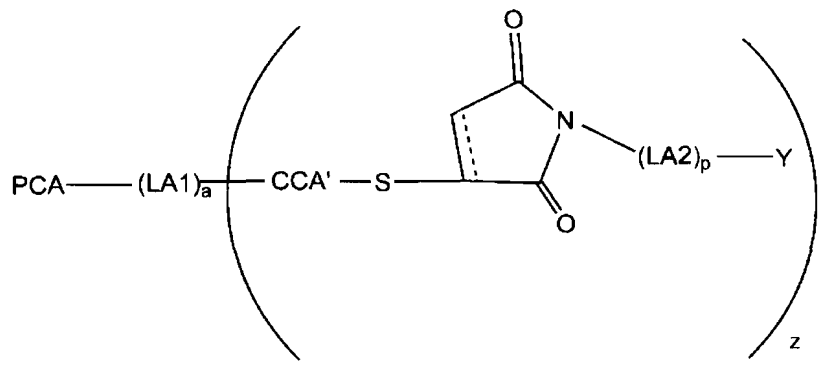
se mezclan e incuban para obtener una solución del conjugado



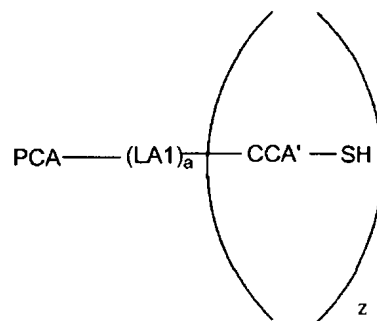
10 en este caso, un grupo -S-(LA2)_p está conectado a Y;
o
una solución de Y y una solución de



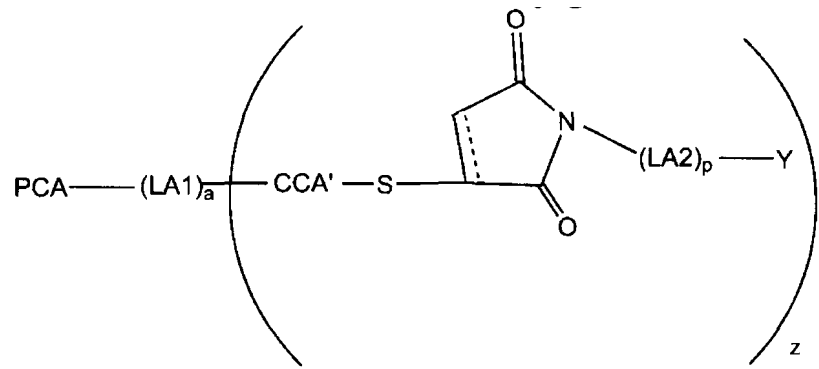
se mezclan e incuban para obtener una solución de



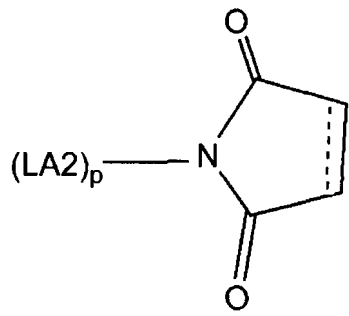
5 o una solución de Y y una solución de



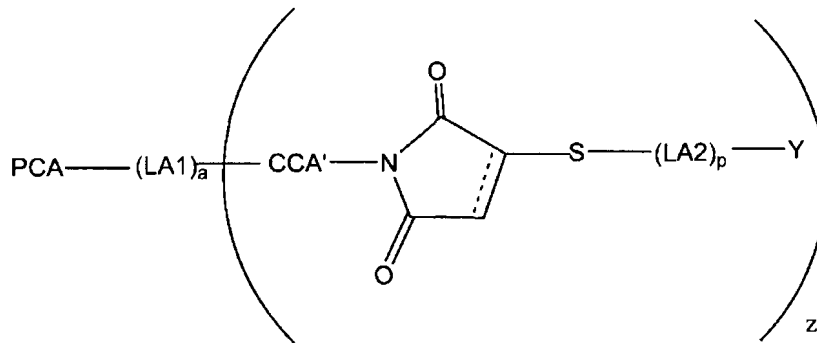
se mezclan e incuban para obtener una solución del conjugado



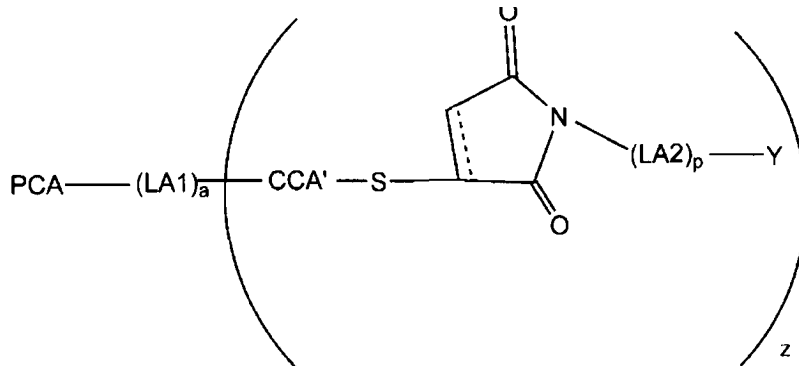
10 en este caso, un



grupo está conectado a Y;
B) a una solución del conjugado

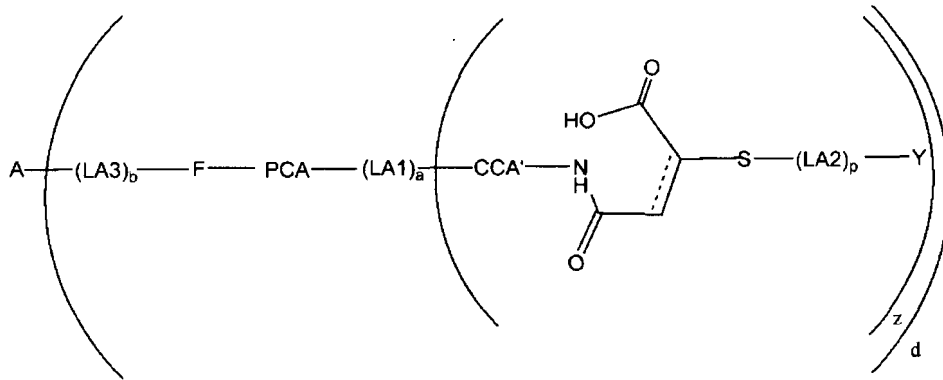


5 o

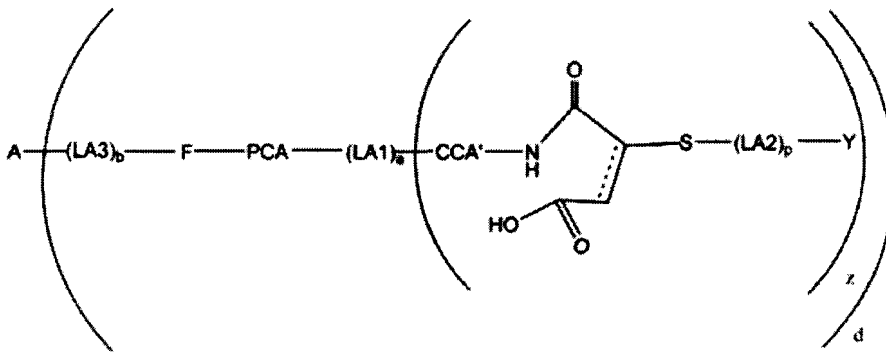


preparado en A) se añade una solución de base Tris u otra solución que facilita la apertura de anillo.

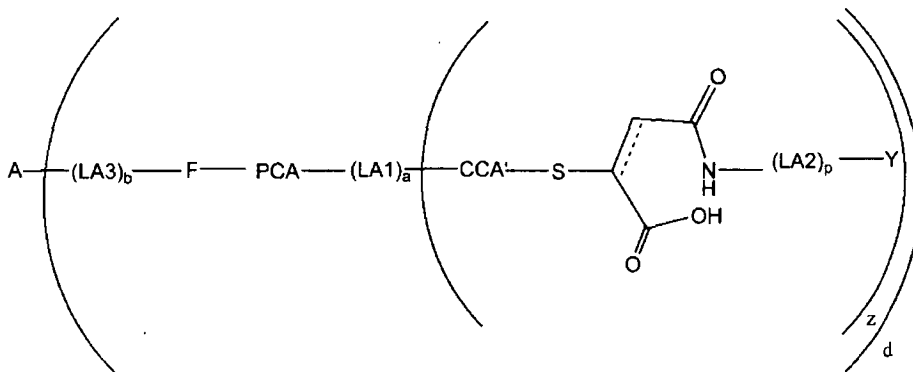
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además purificar el producto obtenido mediante HPLC.
10. Una composición según la reivindicación 9, en donde el contenido molar total de los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) es más del 50 %.
11. Un compuesto de Fórmula (V), (VI), (VII) u (VIII):



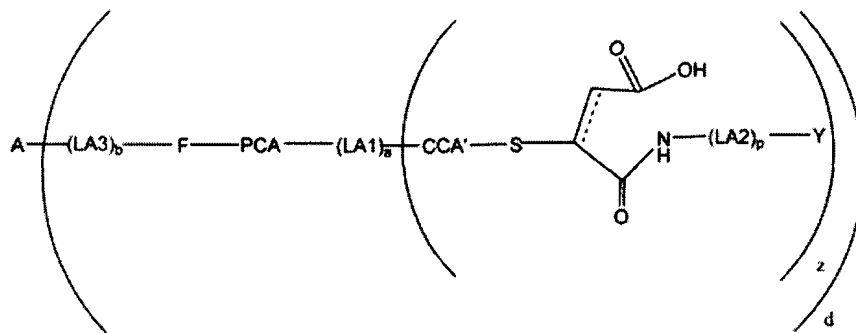
Fórmula (V)



Fórmula (VI)



Fórmula (VII)



Fórmula (VIII)

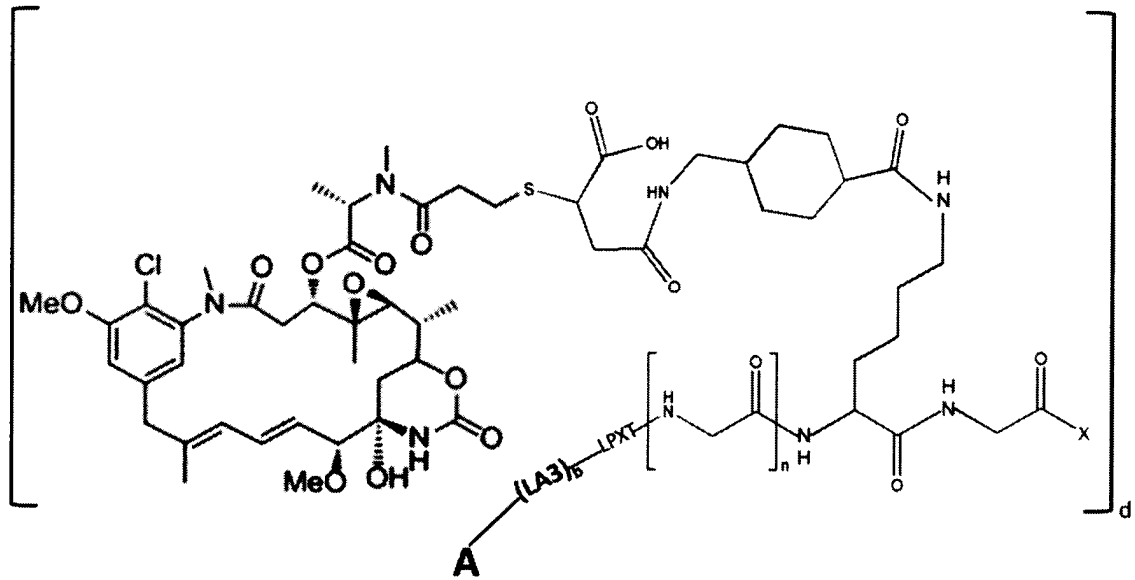
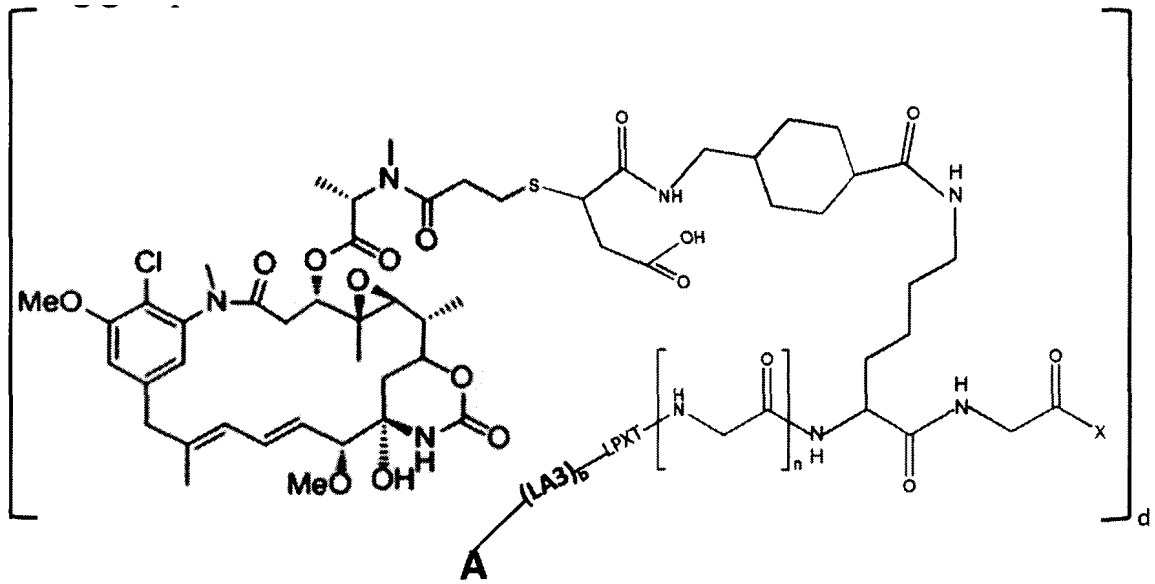
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

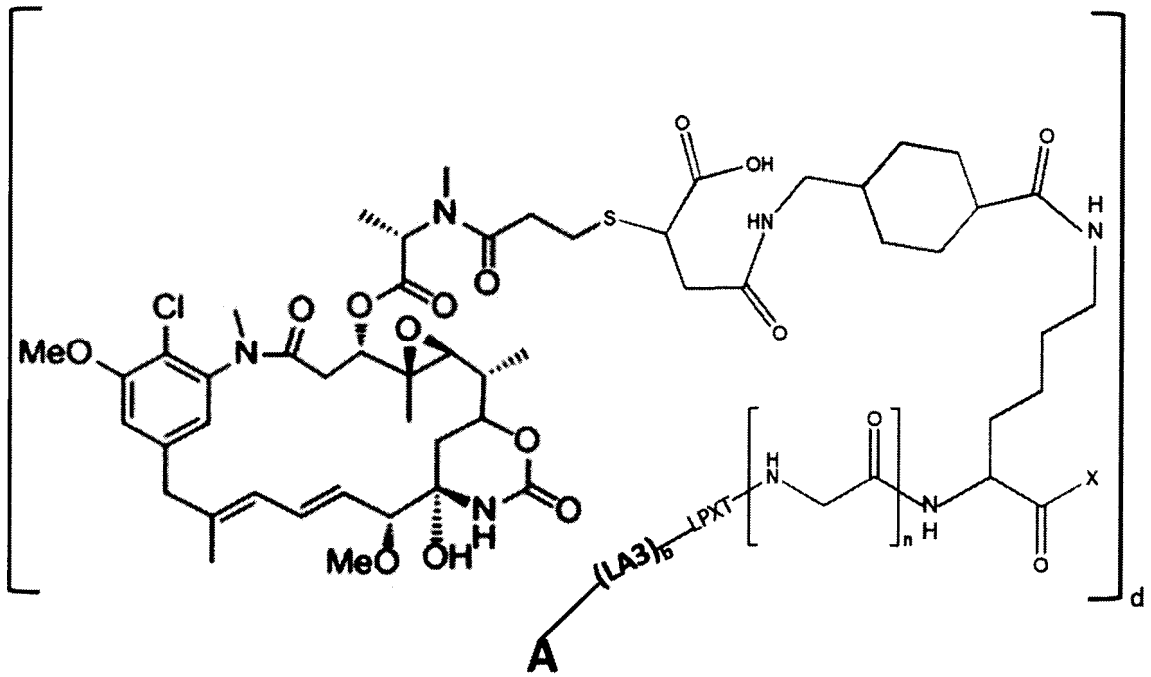
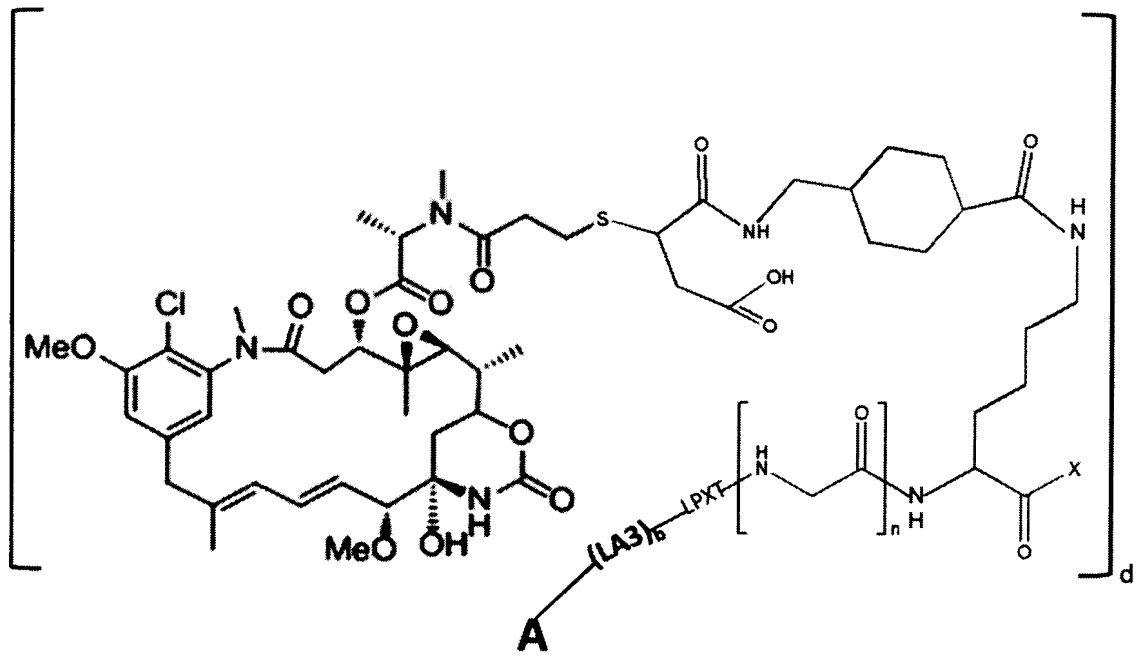
A es una proteína, un péptido, un factor de transducción de señal, un factor de crecimiento celular, una inmunoglobulina o un anticuerpo;

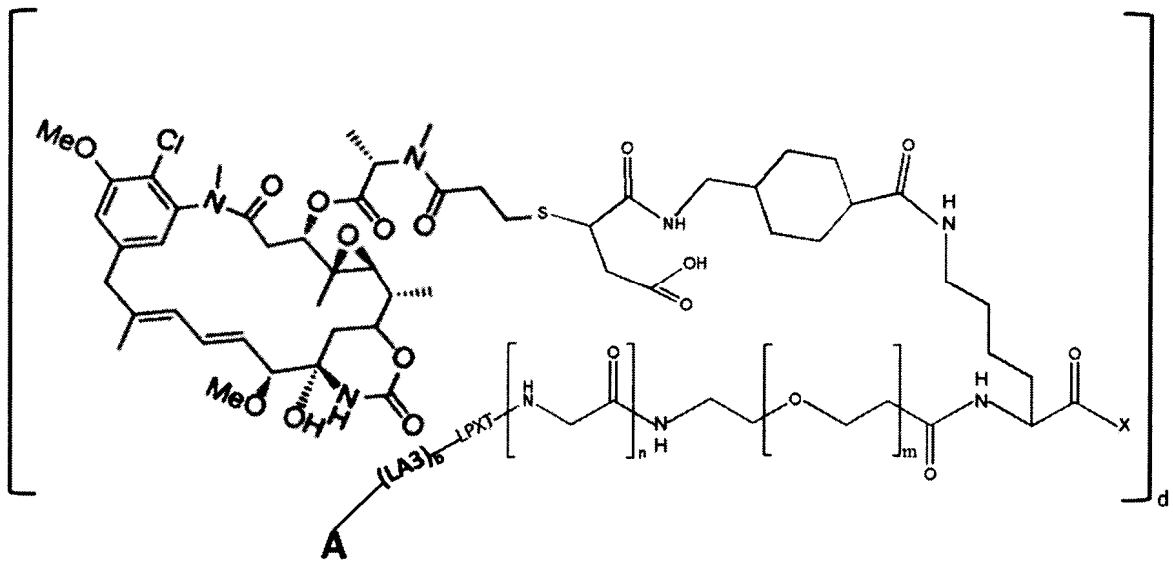
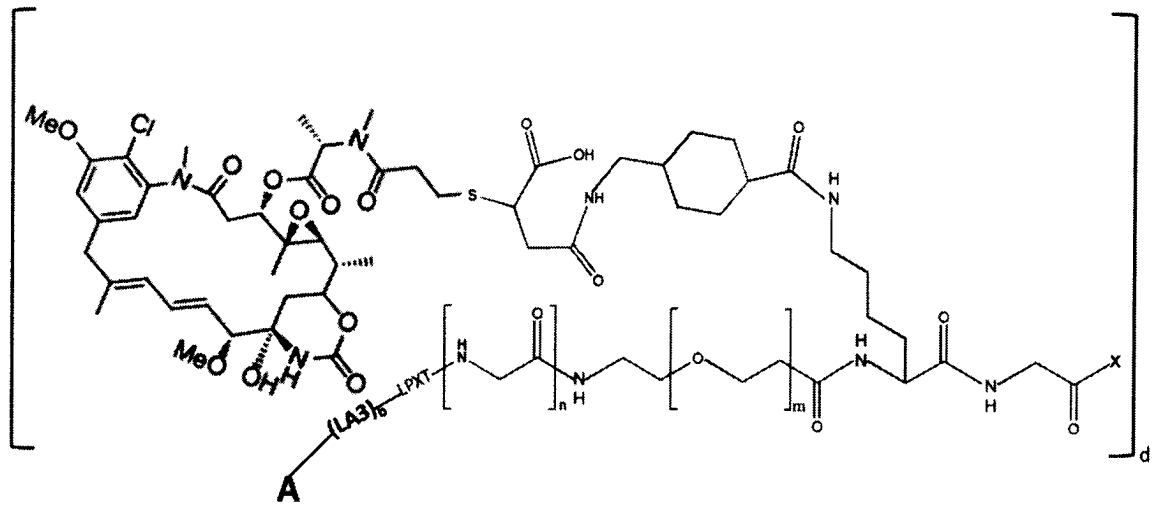
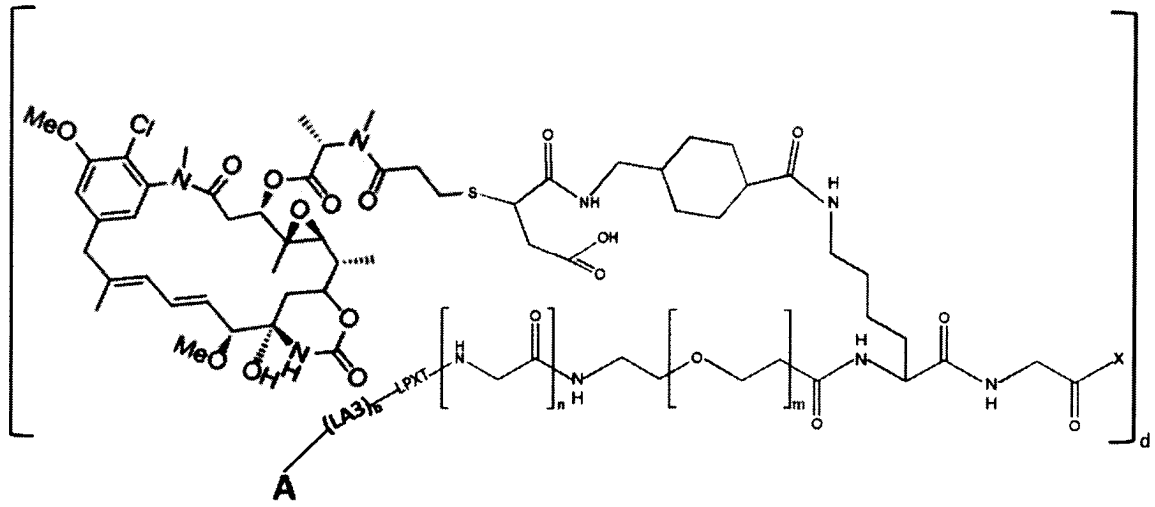
LA1, LA2 y LA3 son cada uno de forma independiente restos conectores, comprendiendo LA3 de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina;

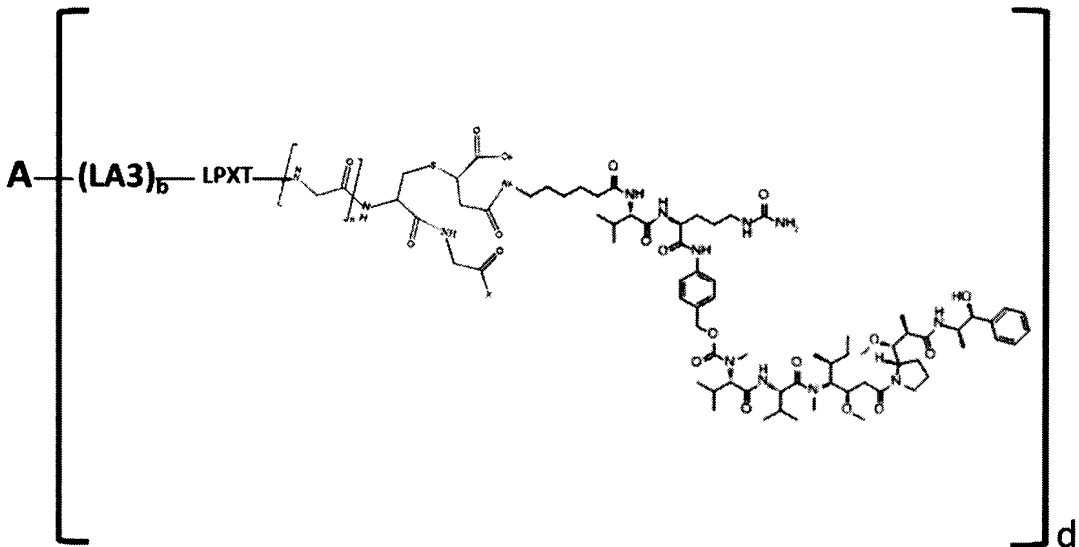
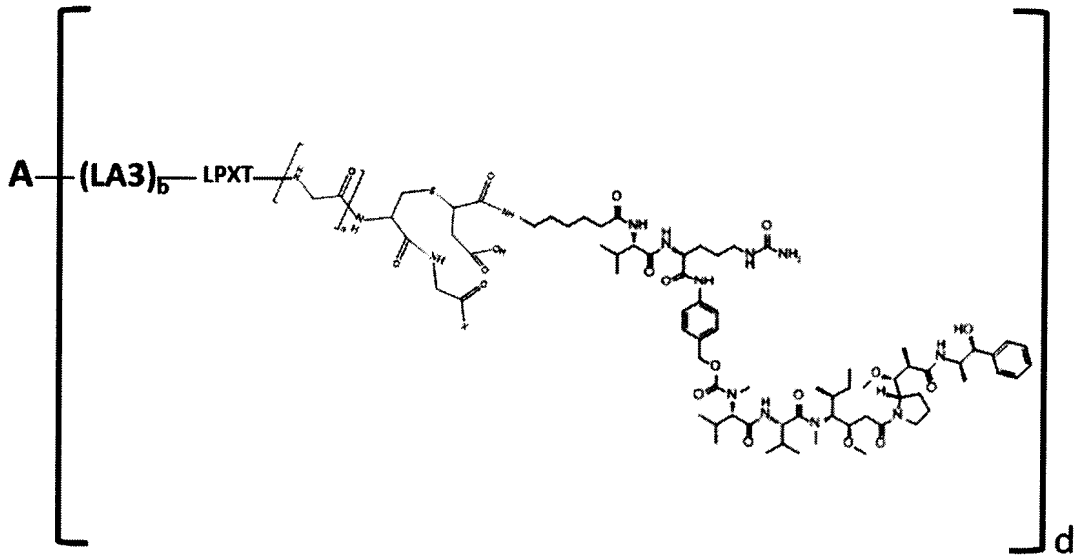
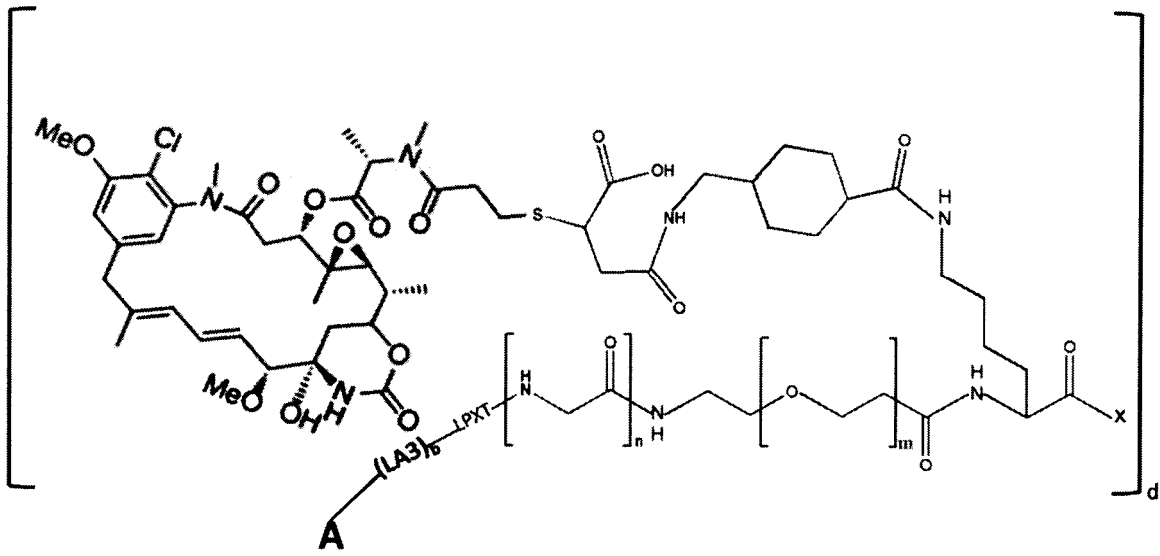
10

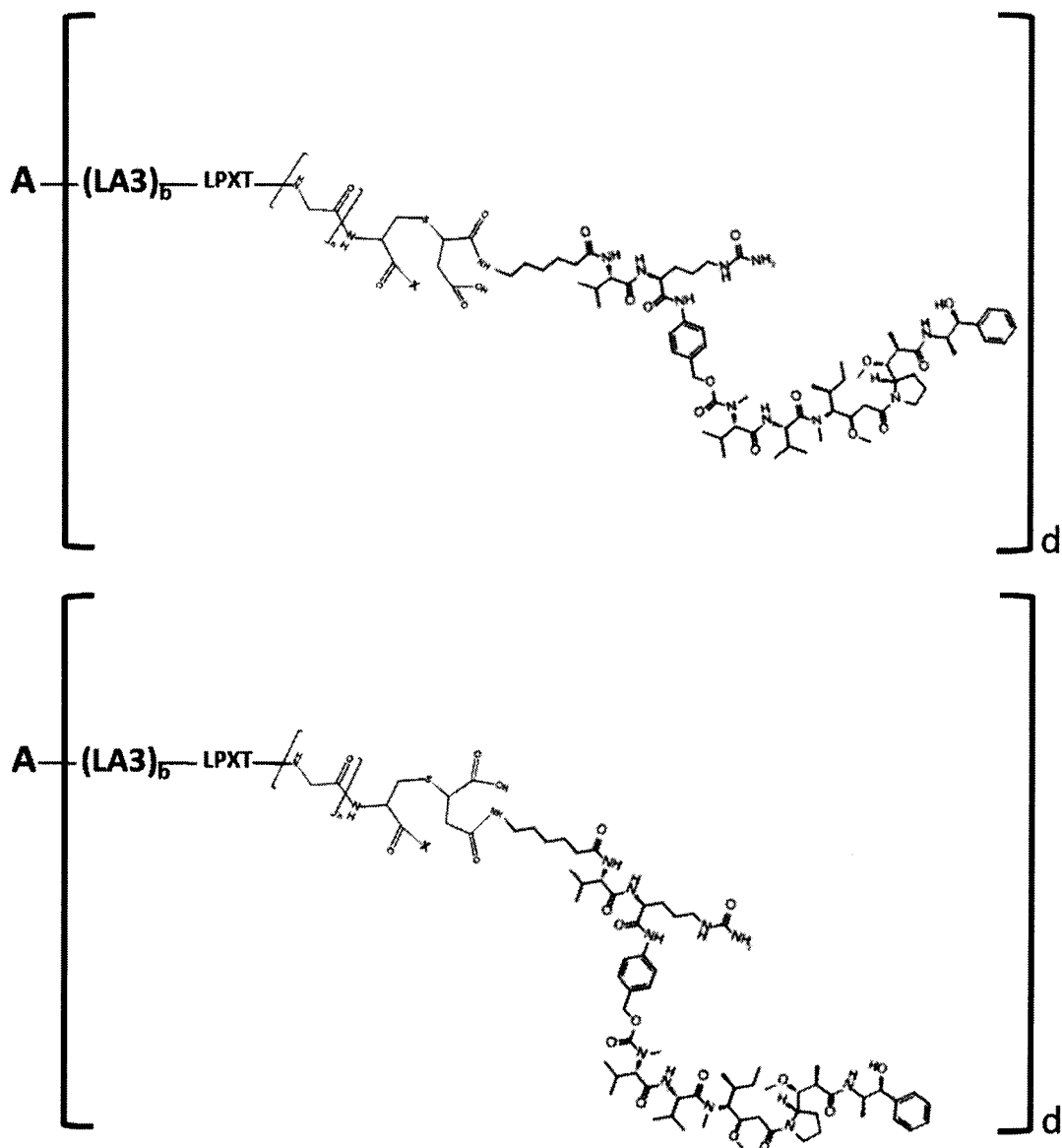
- a, b y p son independientemente 0 o 1, es decir, LA1, LA2 y LA3 pueden estar presentes o ausentes de forma independiente;
- PCA y F son secuencias de reconocimiento específicas de la ligasa, mediante cuya acción el PCA puede unirse específicamente a F;
- 5 CCA' es un resto de conjugación química;
 ----- representa un enlace simple o doble;
- Y es una carga útil, que se selecciona de los grupos que consisten en un hidrógeno, una secuencia de ácido nucleico, una secuencia peptídica corta, un polipéptido, una proteína, un compuesto o una sustancia biológica;
- 10 z es cualquiera de los números enteros entre 1 y 20;
 d es cualquiera de los números enteros entre 1 y 20.
12. Un compuesto según la reivindicación 11, en donde A es un anticuerpo.
13. Un compuesto según la reivindicación 12, en donde F está ligado al extremo C de la cadena pesada o ligera de A a través de LA3 o directamente a través de un enlace covalente.
14. Un compuesto según la reivindicación 11, en donde la ligasa es una sortasa o cualquiera de las nuevas transpeptidasas optimizadas.
- 15 15. Un compuesto según la reivindicación 11, en donde F es una secuencia de reconocimiento específica del sustrato del donador de ligasa y el PCA es una secuencia de reconocimiento específica del sustrato aceptor de ligasa.
16. Un compuesto según la reivindicación 15, en donde F es $X_1X_2X_3TX_4X_5$, siendo X_1 leucina o asparagina, siendo X_2 prolina o alanina, siendo X_3 cualquiera de los aminoácidos naturales o no naturales, siendo T treonina, representando X_4 glicina, serina o asparagina o estando ausente y siendo X_5 cualquiera de los aminoácidos naturales o no naturales o estando ausente.
17. Un compuesto según la reivindicación 16, en donde F es LPX_3T o LPX_3TGG , siendo L leucina, siendo P prolina, siendo X_3 cualquiera de los aminoácidos naturales o no naturales, siendo T treonina y siendo G glicina.
- 25 18. Un compuesto según la reivindicación 11, en donde el PCA comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina.
19. Un compuesto según la reivindicación 11, en donde d es cualquiera de los números enteros entre 1 y 20.
20. Un compuesto según la reivindicación 11, en donde Y es un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, una etiqueta de purificación de afinidad, una molécula trazadora, un fármaco antineoplásico o una molécula citotóxica.
- 30 21. Un compuesto según la reivindicación 20, en donde Y es maitansina o un derivado de la misma, paclitaxol o un derivado del mismo, auristatina o un derivado de la misma, epotilona o un derivado de la misma o un compuesto alcaloide de la vinca.
22. Un compuesto según la reivindicación 11, que se selecciona de los siguientes grupos:











5 en donde n representa cualquiera de los números enteros entre 1 y 100, m es 0 o cualquiera de los números enteros entre 1 y 1000, d representa cualquiera de los números enteros entre 1 y 20, A es un anticuerpo, LA3 comprende de 1 a 100 unidades estructurales conectadas en serie que se seleccionan del grupo que consiste en una o más glicina y alanina; b es independientemente 0 o 1, es decir, LA3 está presente o ausente de forma independiente, X en la secuencia de reconocimiento de ligasa LPXT es ácido glutámico (E) o cualquier otro aminoácido natural/no natural; x es un grupo -OH o -NH₂.

10 23. Una composición que comprende el compuesto según la reivindicación 11, que se prepara mediante las siguientes etapas:

- i) Se prepara un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) según la reivindicación 1;
- ii) Se prepara A-(LA₃)_b-F según la reivindicación 11;
- iii) A-(LA₃)_b-F obtenido en la etapa ii) y un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) obtenidos en la etapa i) se conjugan en presencia de una ligasa y en condiciones adecuadas para la acción de la ligasa.

15 24. Una composición según la reivindicación 23, en donde el contenido molar total de los compuestos de Fórmula (V), (VI) o (VII) es más del 80 %.

25. Un compuesto de Fórmula (V), (VI), (VII) u (VIII) para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad autoinmunitaria en un ser humano, en donde el compuesto se define como en cualquier reivindicación precedente.

26. El compuesto para su uso según la reivindicación 25, en donde la superficie de célula tumoral tiene un antígeno

específico o una proteína receptora que reconoce y se une al compuesto o composición.

27. El compuesto para su uso según la reivindicación 26, en donde el antígeno específico o la proteína receptora en la superficie de la célula tumoral es ErbB2/Her2.

5 28. El compuesto para su uso según la reivindicación 27, en donde el tumor es cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal o cáncer esofágico.

29. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de Fórmula (V), (VI), (VII) u (VIII) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11-22 o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 30. Una composición farmacéutica según la reivindicación 29, en forma de polvo liofilizado para inyección o de inyección.

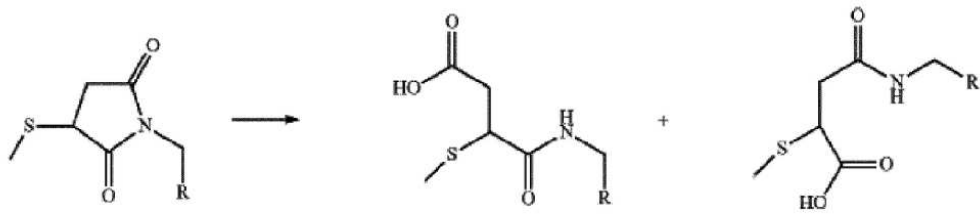
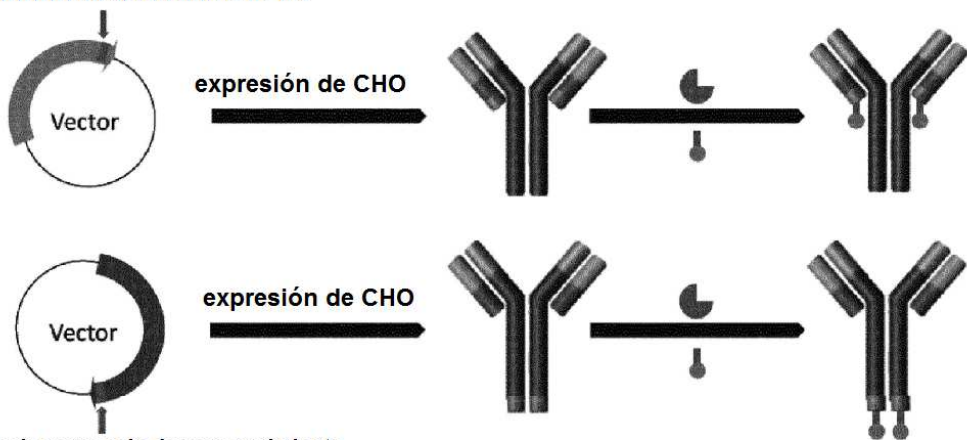


FIGURA 1

Introducir secuencia de reconocimiento
NNNNN en el extremo C de LC



Introducir secuencia de reconocimiento
NNNNN en el extremo C de HC

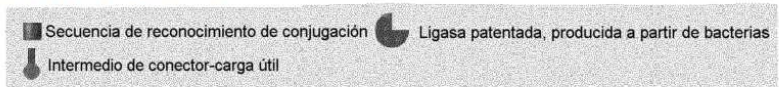


FIGURA 2

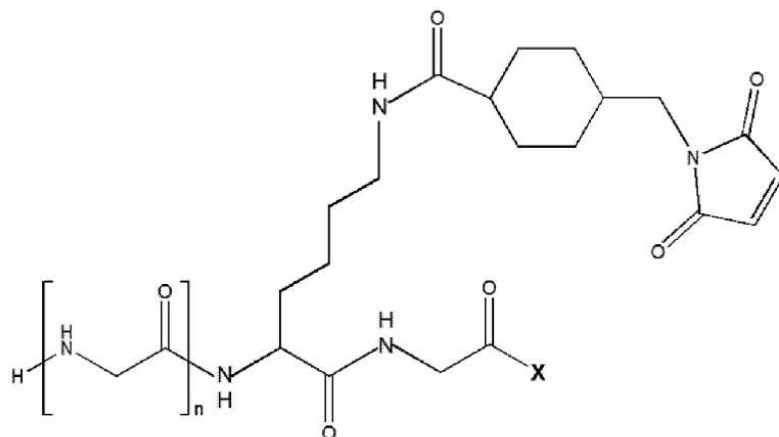


FIGURA 3

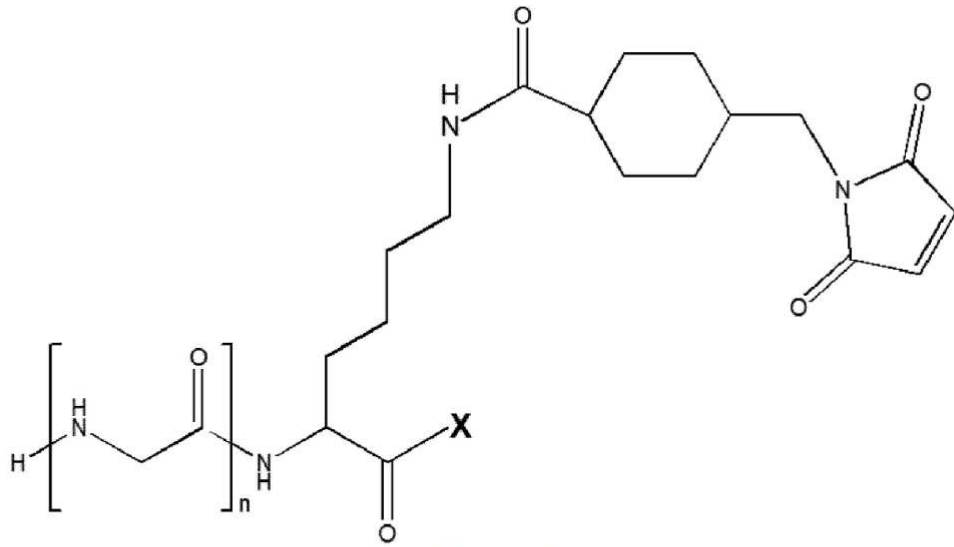


FIGURA 4

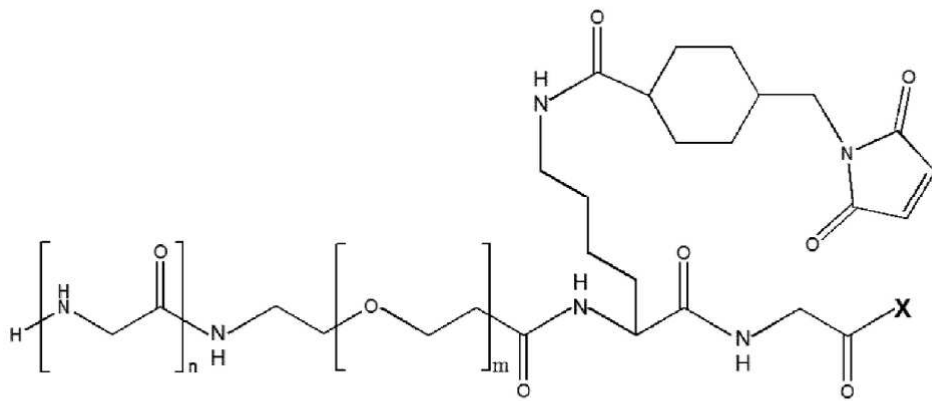


FIGURA 5

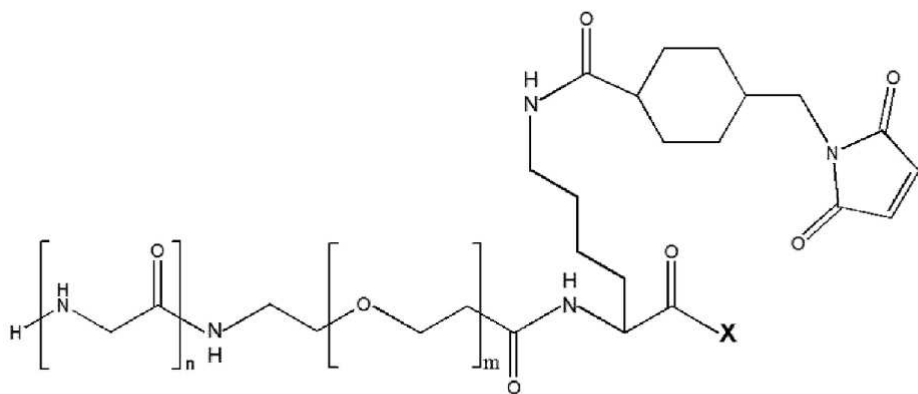


FIGURA 6

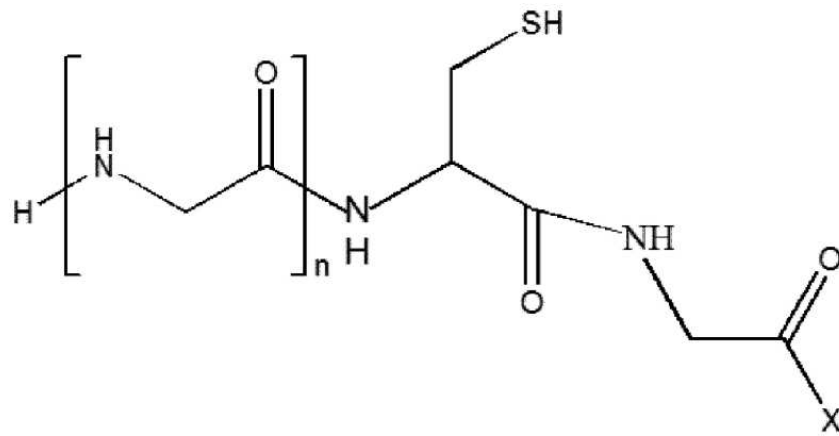


FIGURA 7

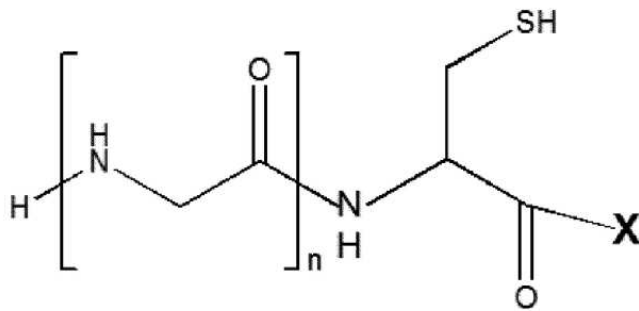


FIGURA 8

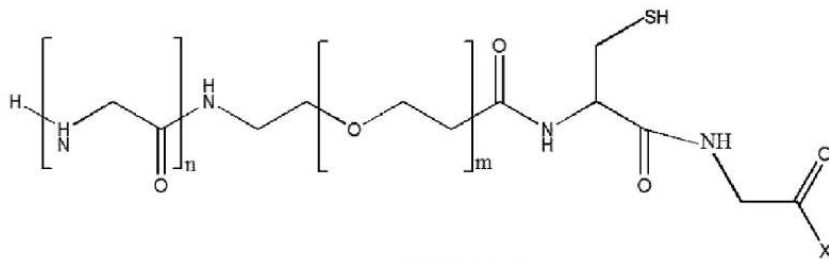


FIGURA 9

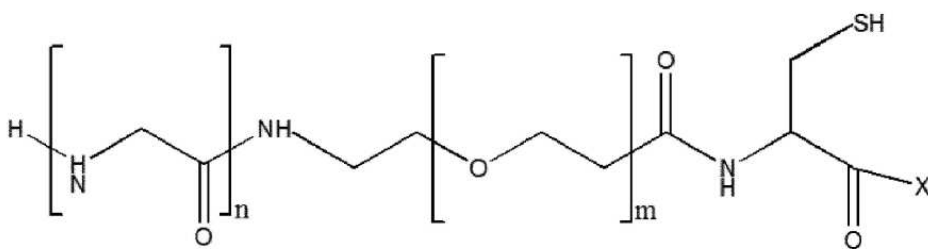


FIGURA 10

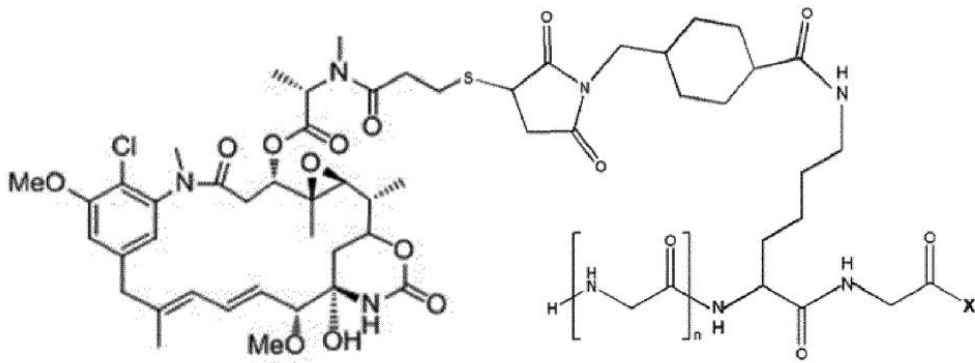


FIGURA 11

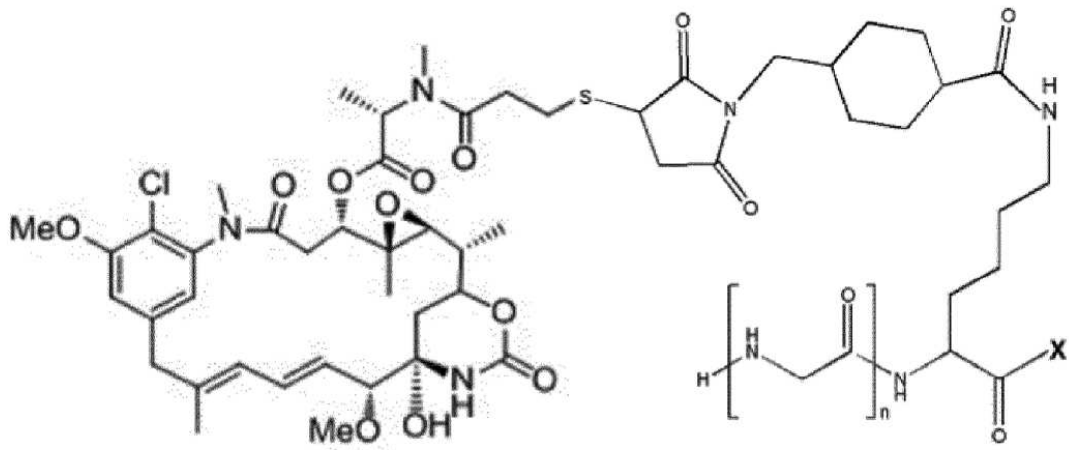


FIGURA 12

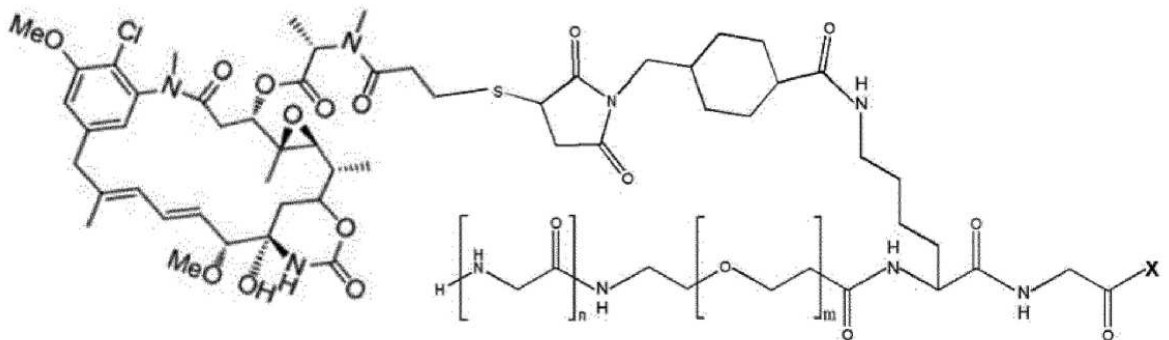


FIGURA 13

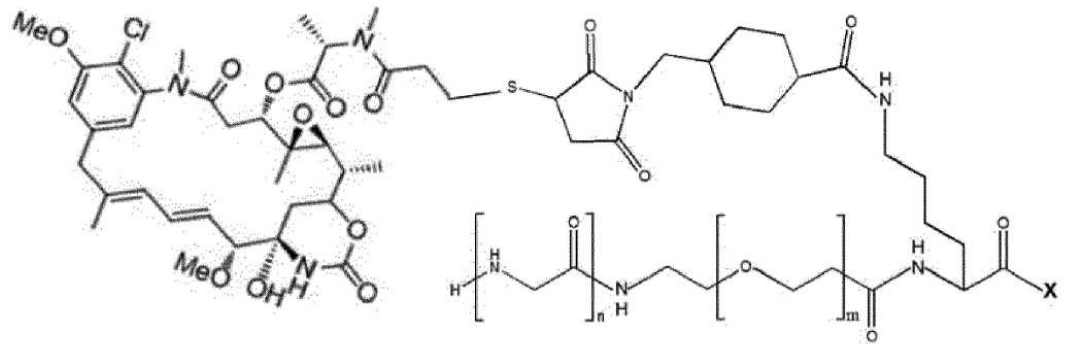
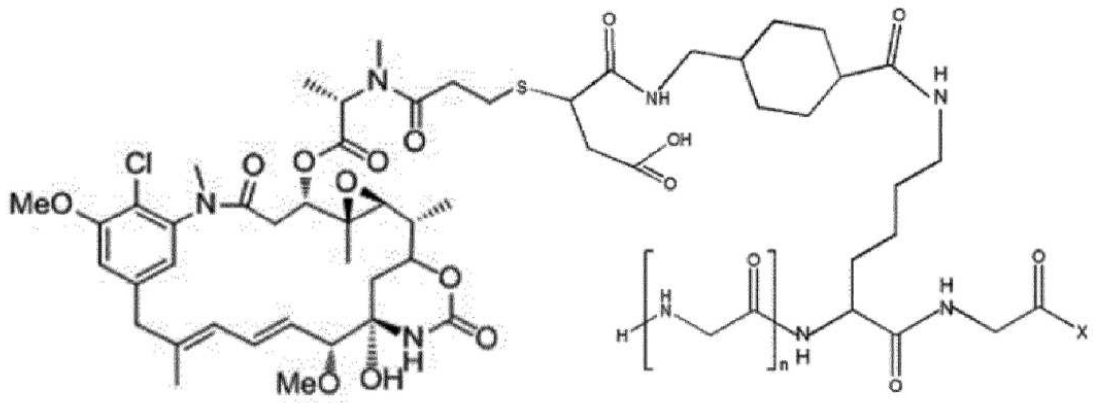


FIGURA 14

(A)



(B)

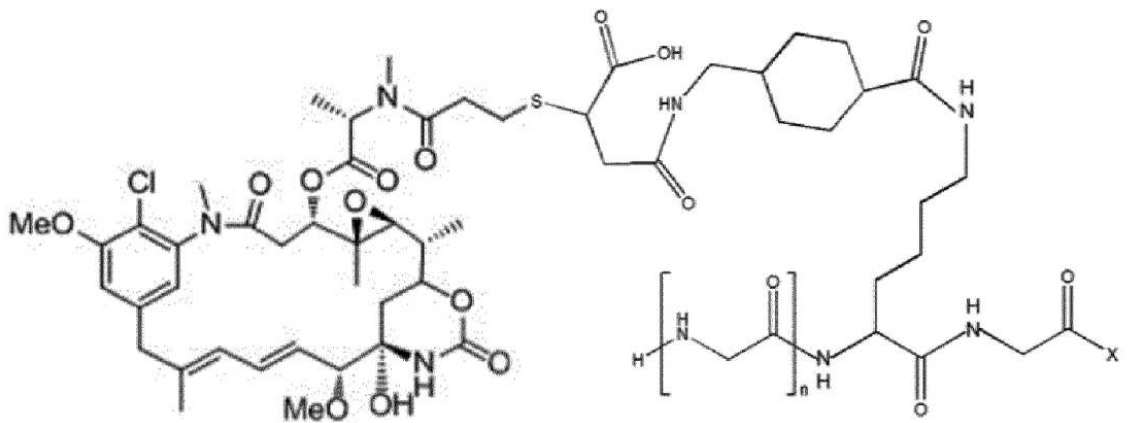
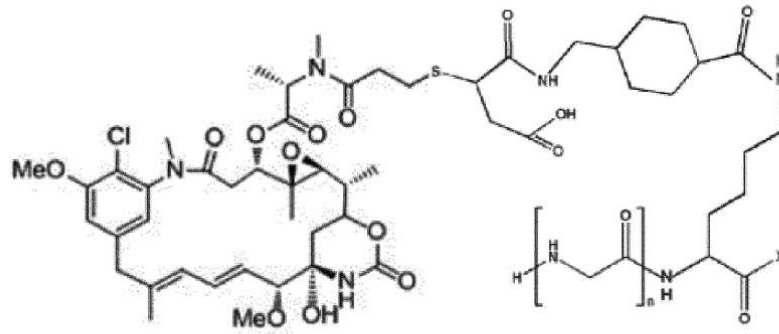


FIGURA 15

(A)



(B)

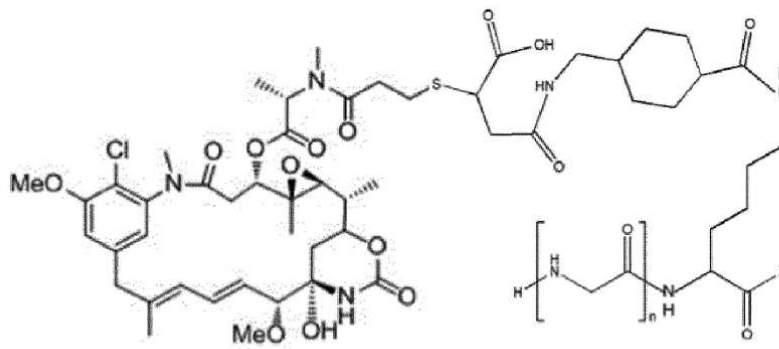
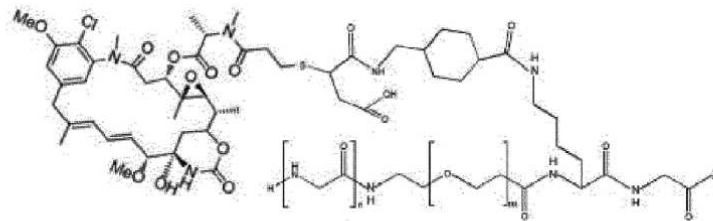


FIGURA 16

(A)



(B)

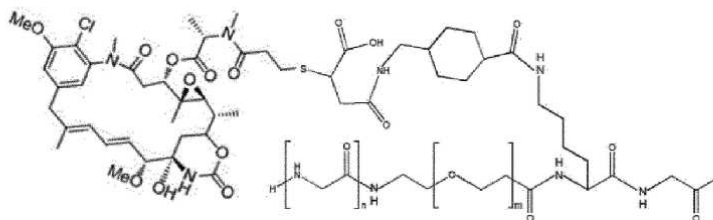
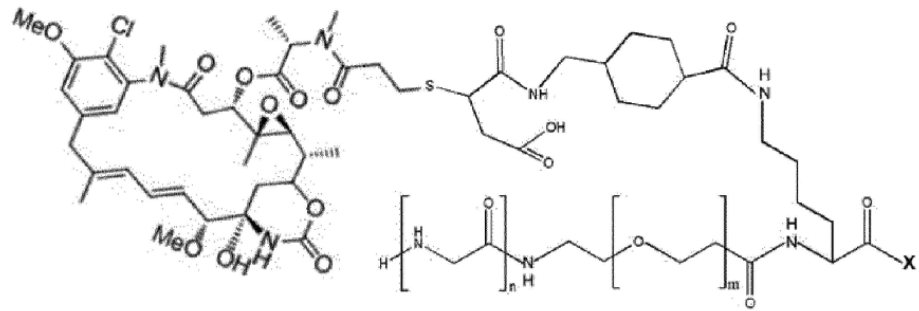


FIGURA 17

(A)



(B)

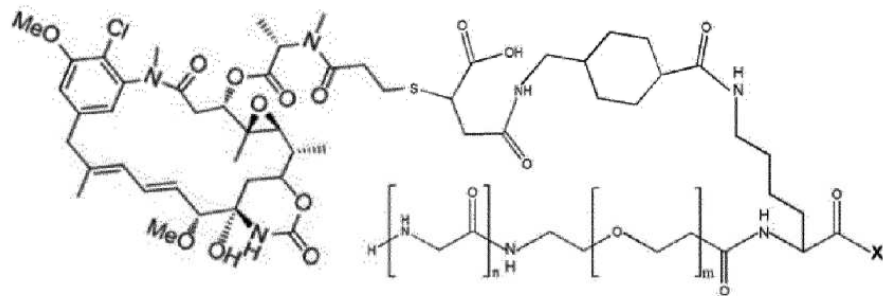


FIGURA 18

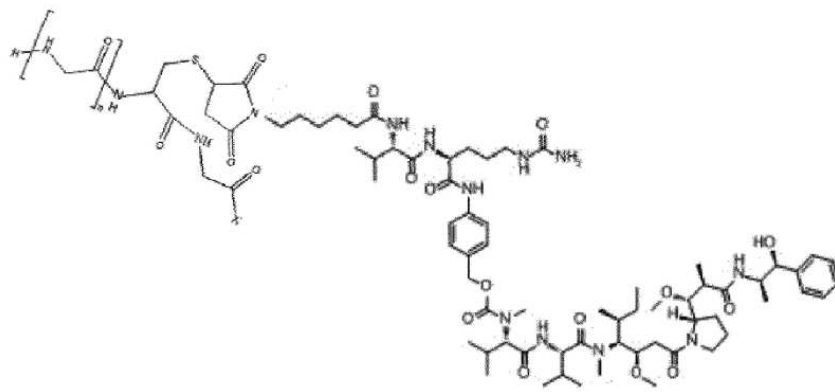


FIGURA 19

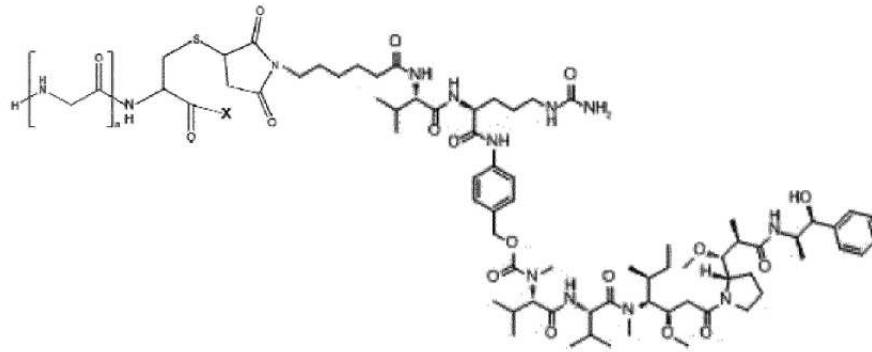


FIGURA 20

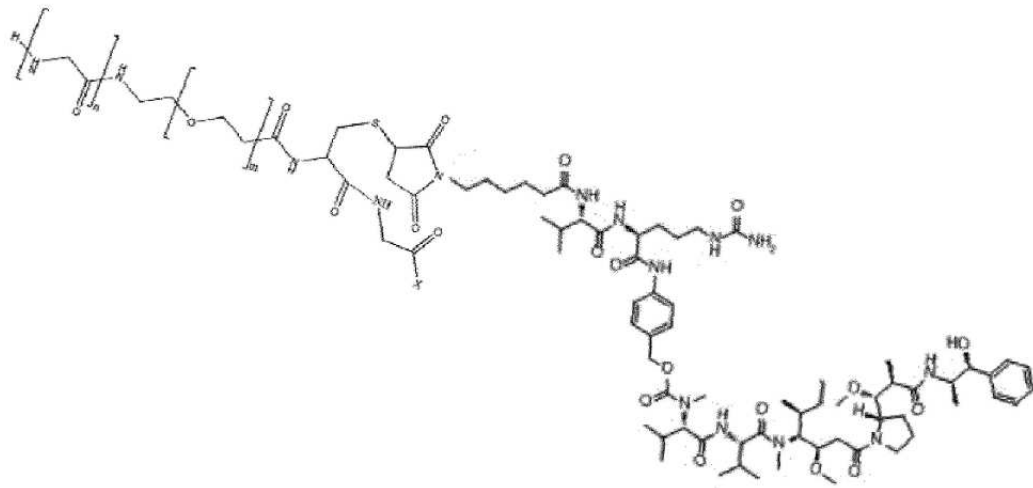


FIGURA 21

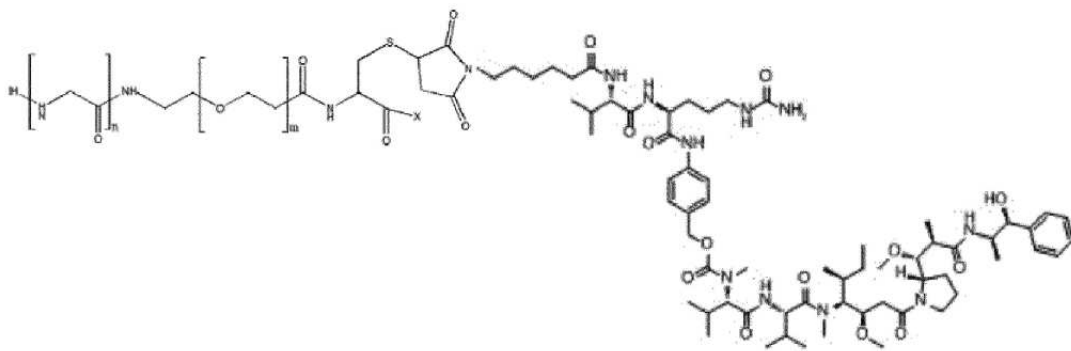
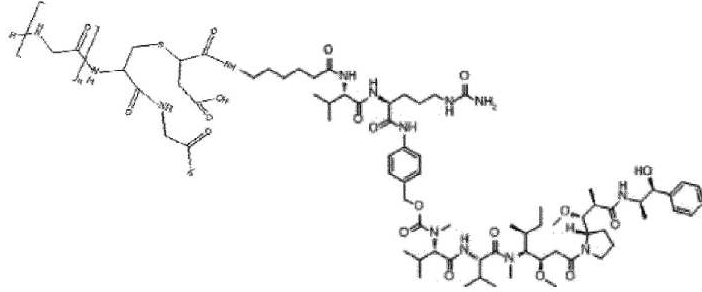


FIGURA 22

(A)



(B)

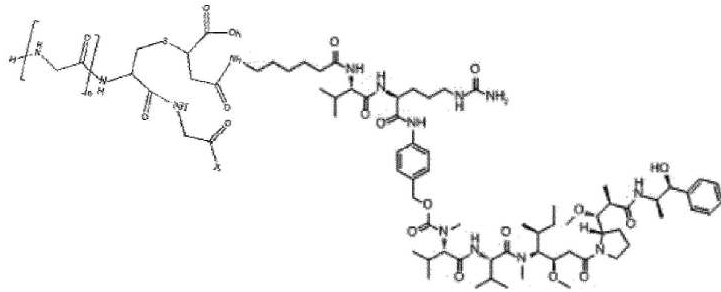
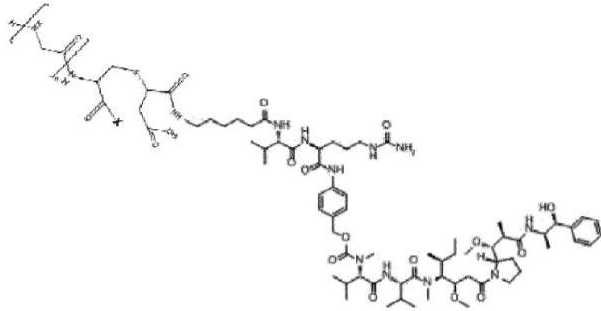


FIGURA 23

(A)



(B)

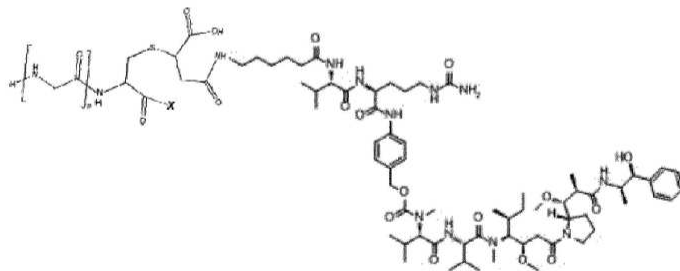
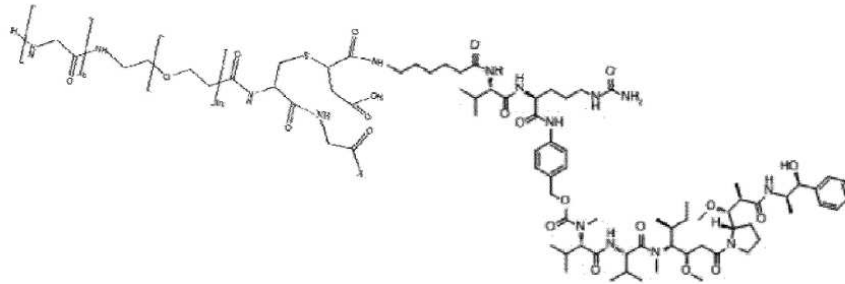


FIGURA 24

(A)



(B)

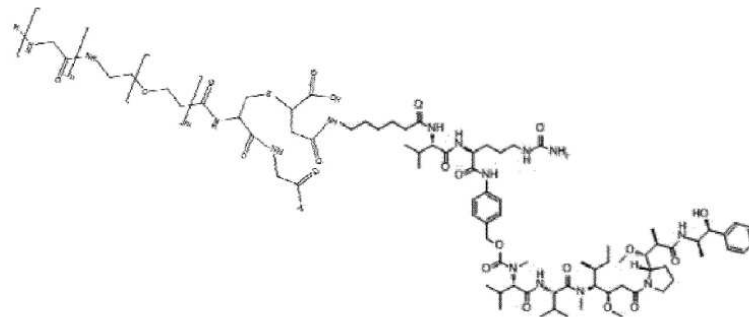
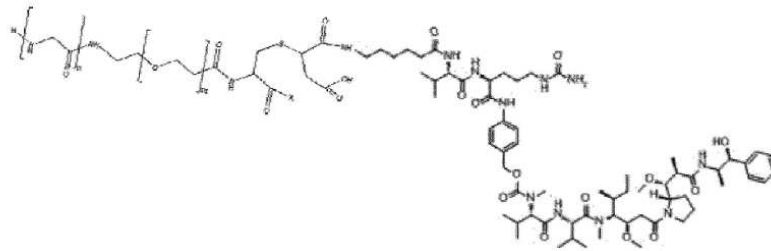


FIGURA 25

(A)



(B)

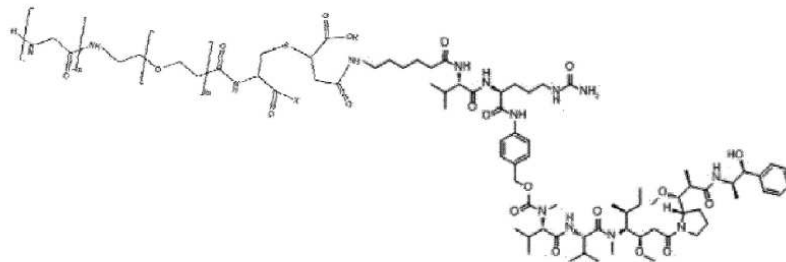


FIGURA 26

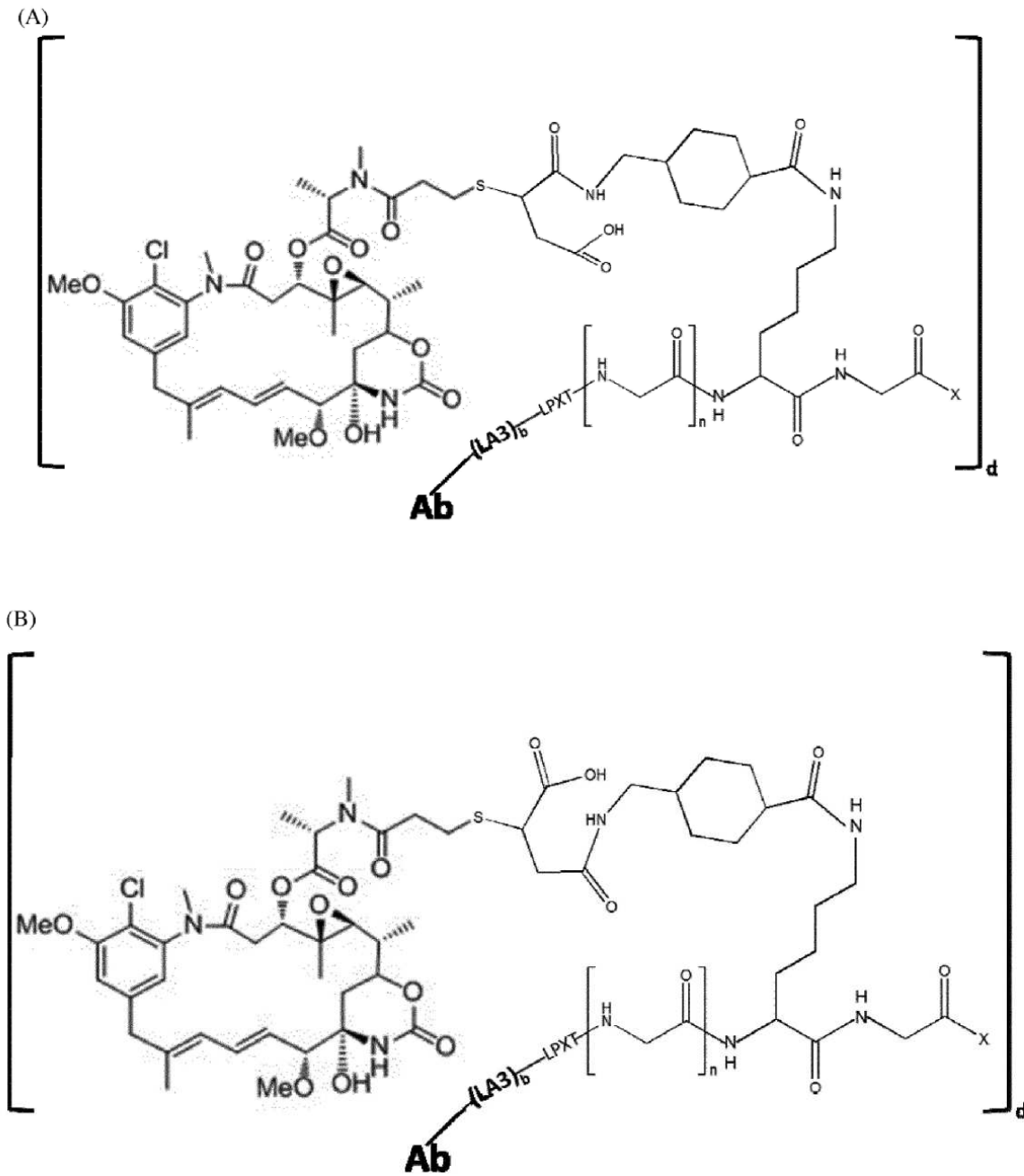
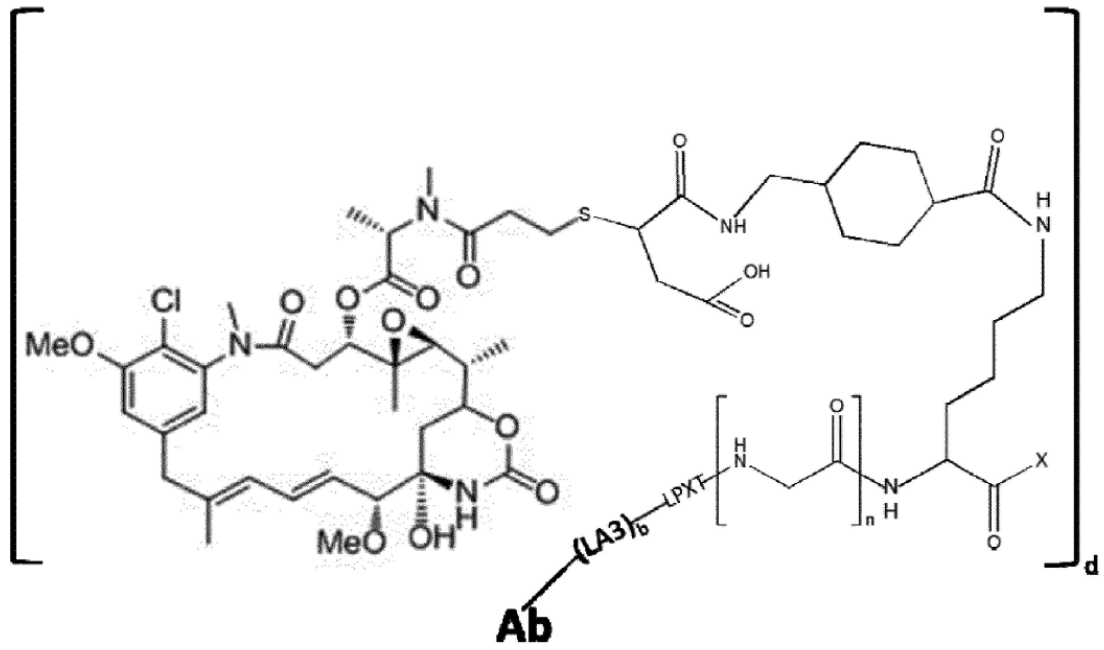


FIGURA 27

(A)



(B)

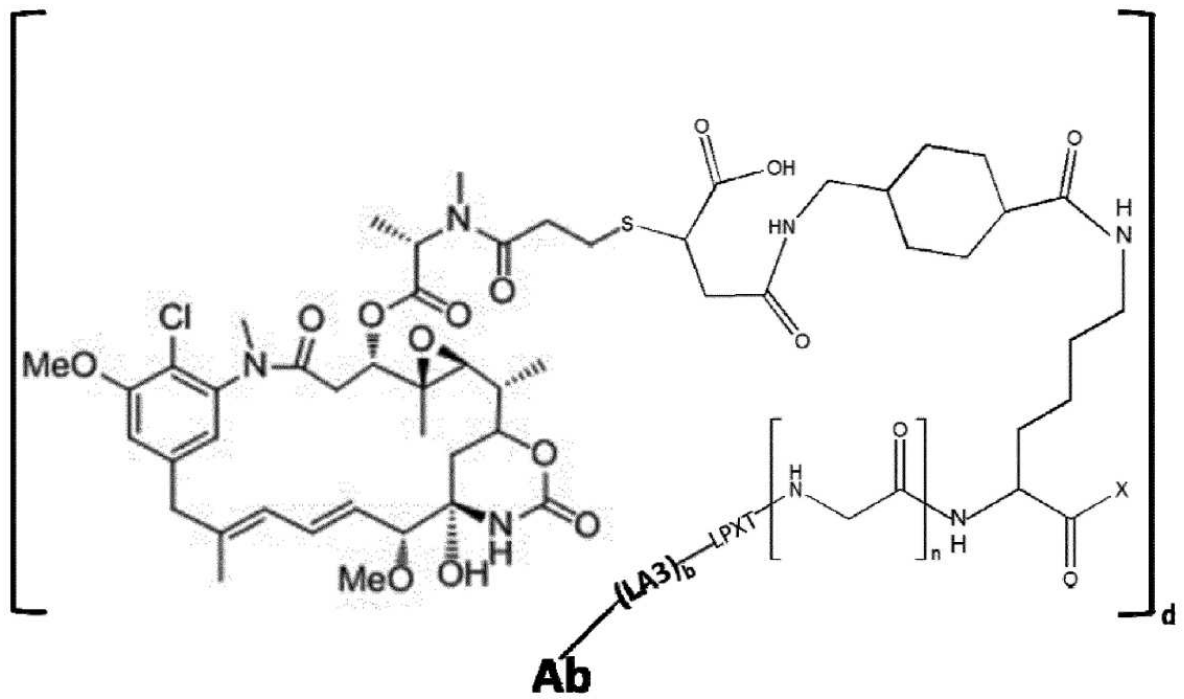
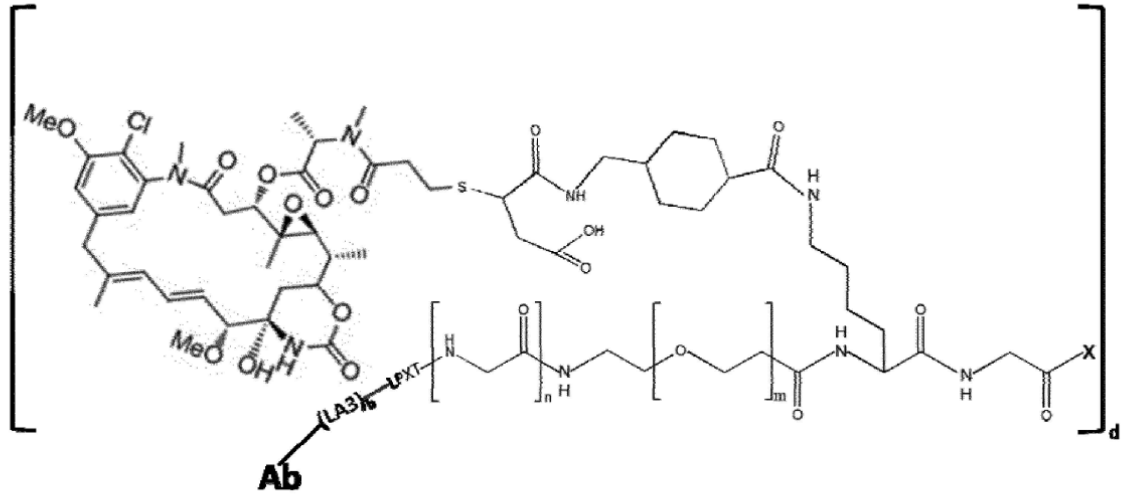


FIGURA 28

(A)



(B)

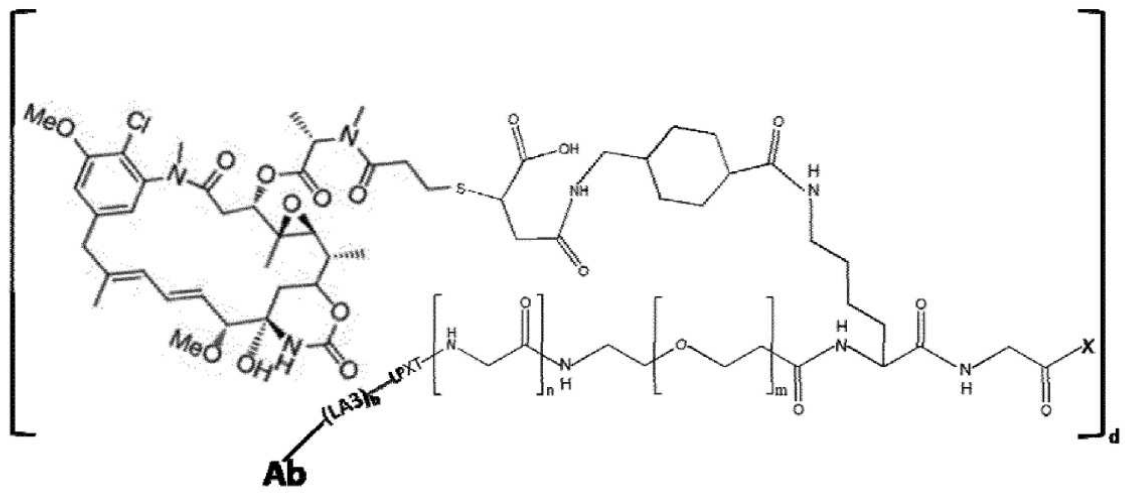
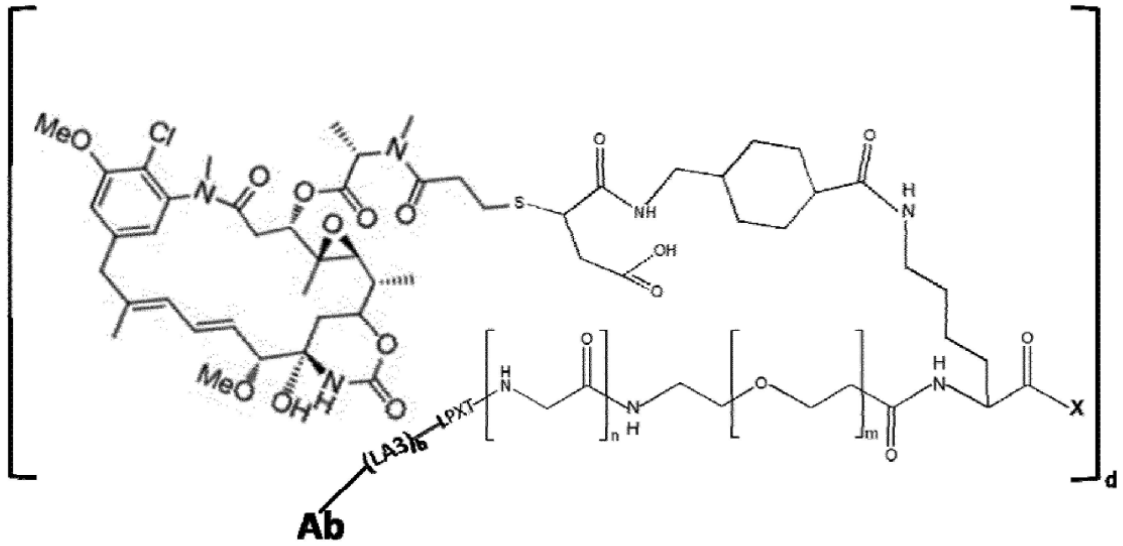


FIGURA 29

(A)



(B)

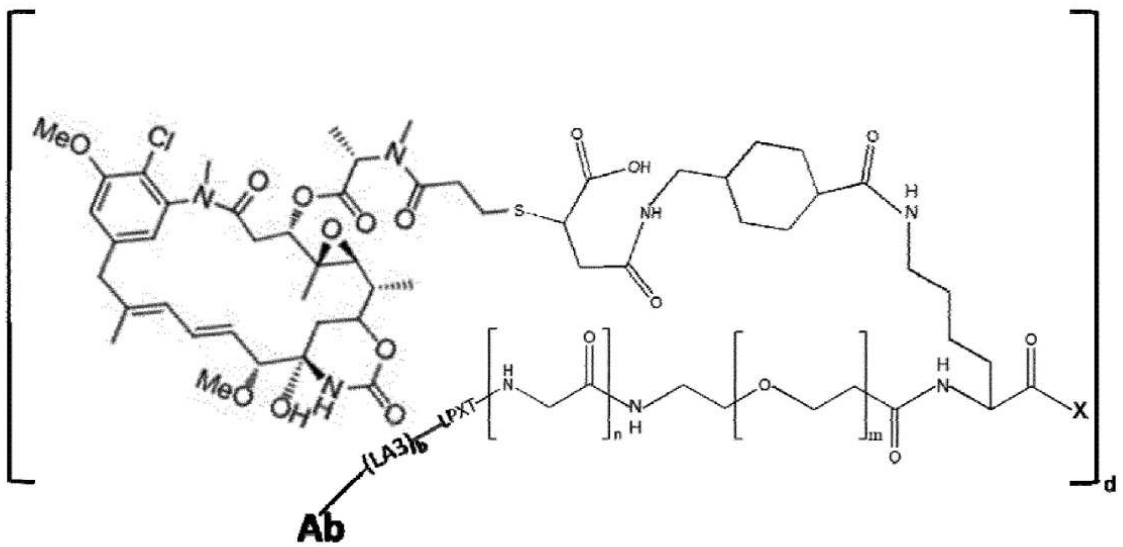
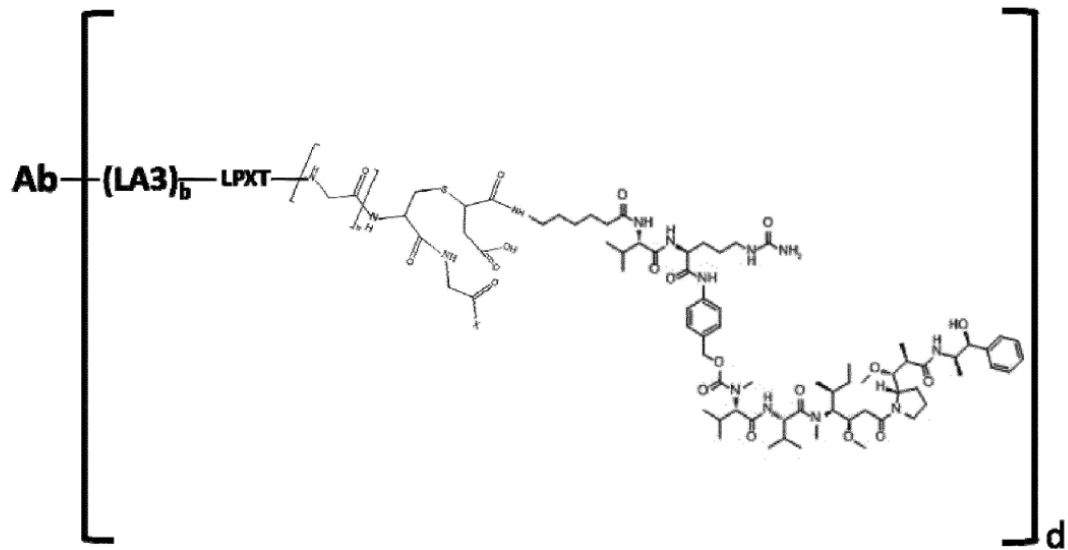


FIGURA 30

(A)



(B)

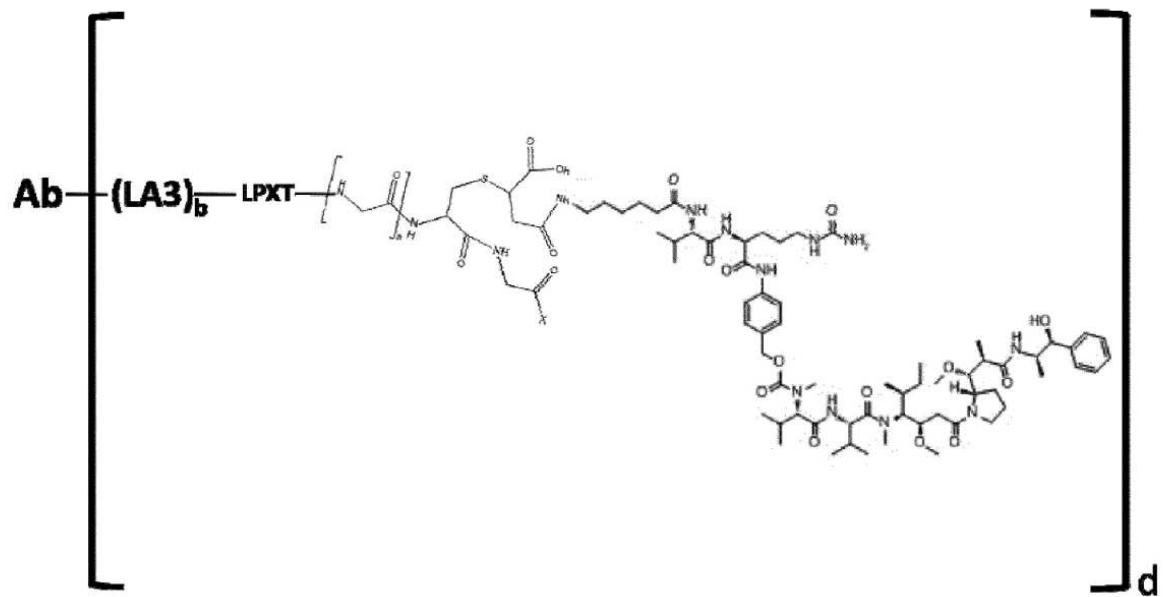


FIGURA 31

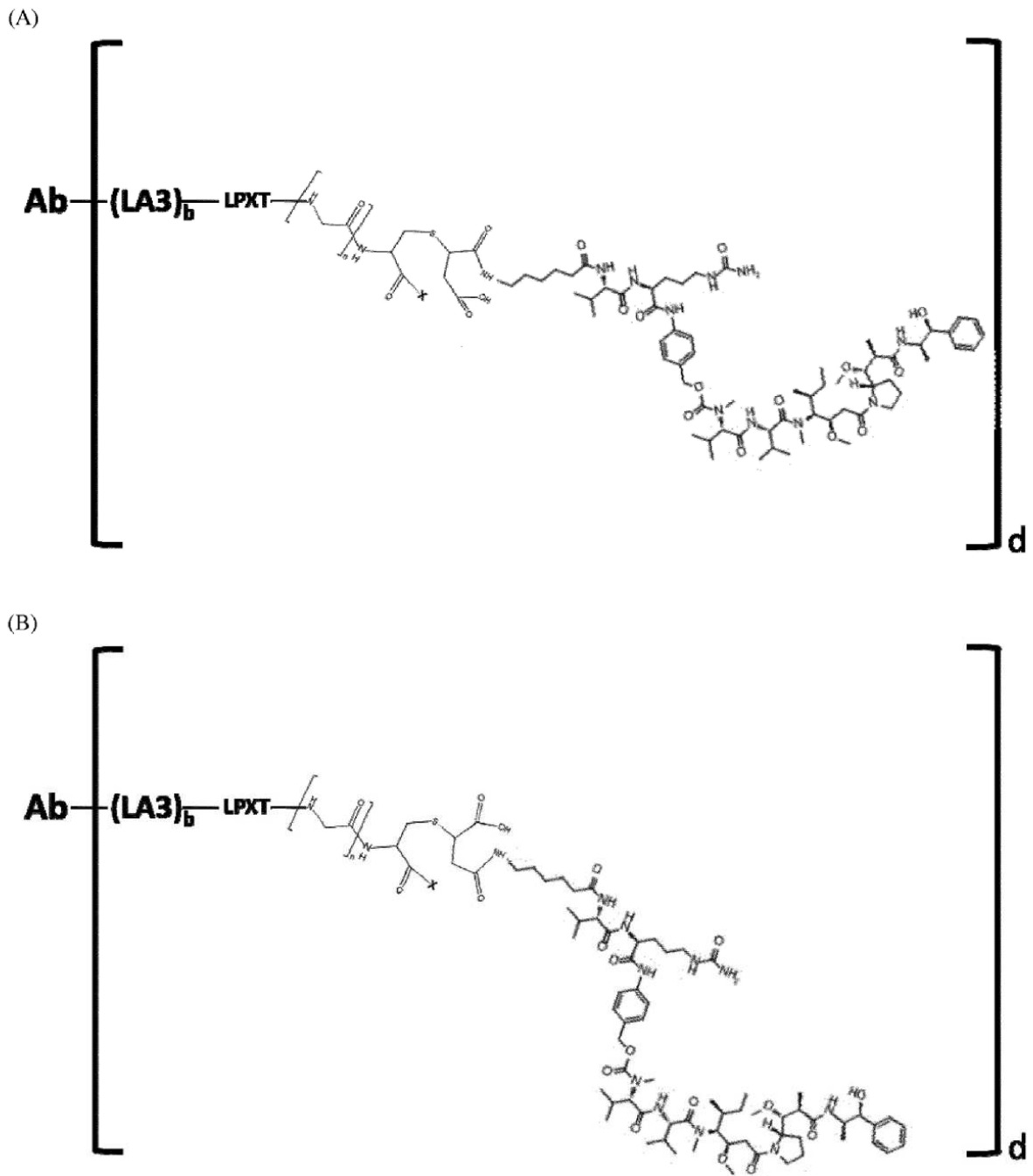


FIGURA 32

Detector de UV: TIC

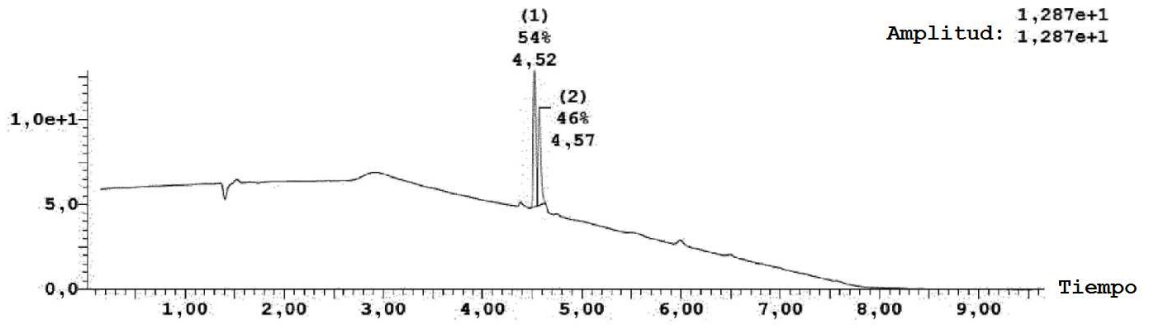


FIGURA 33

(Tiempo: 4,58)

3,6e+007

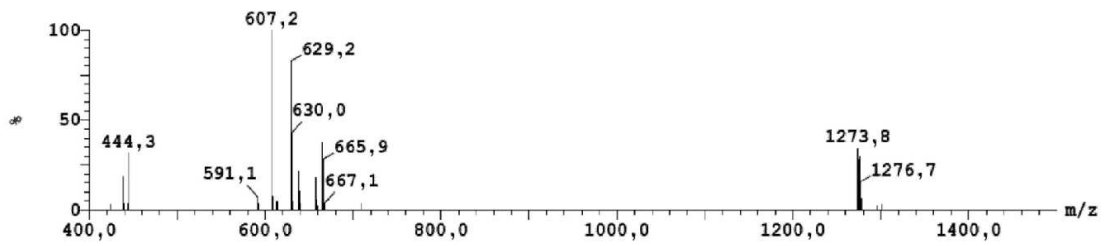
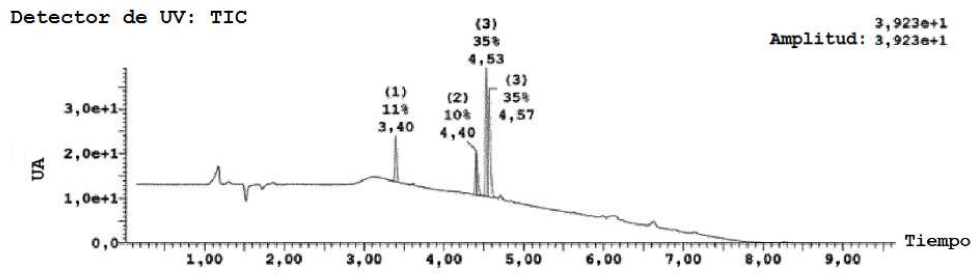


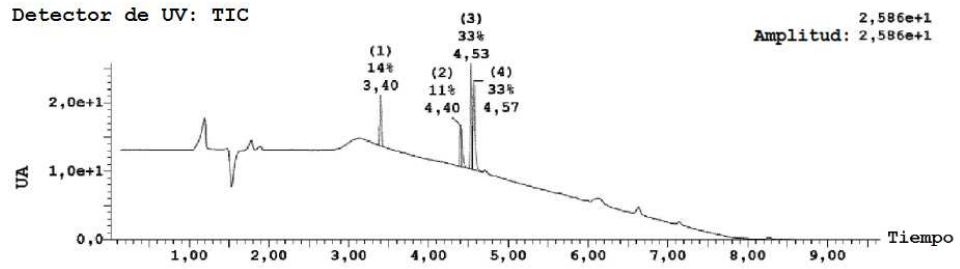
FIGURA 34

ES 2 736 505 T3

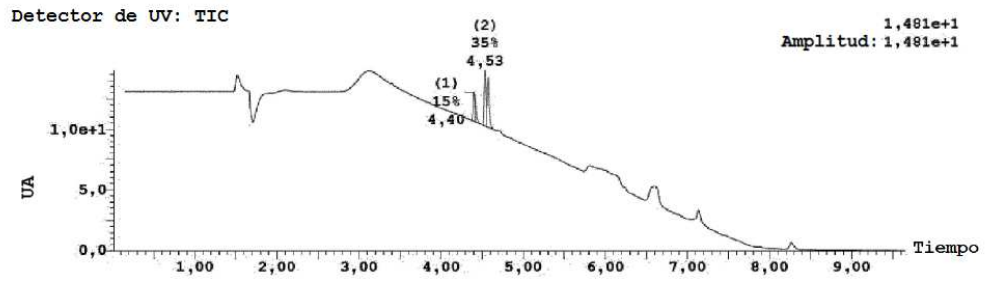
A



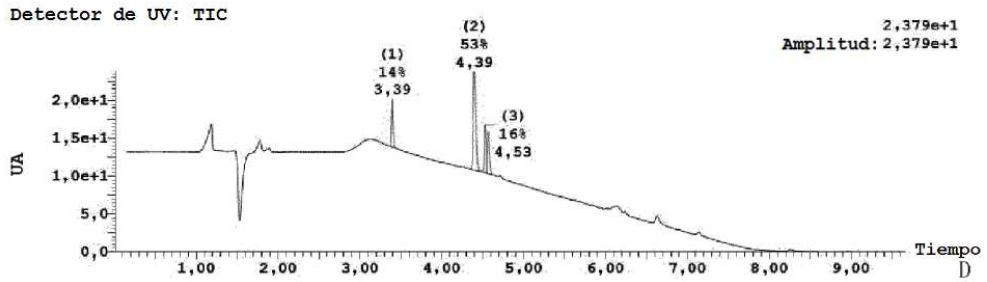
B



C



D



E

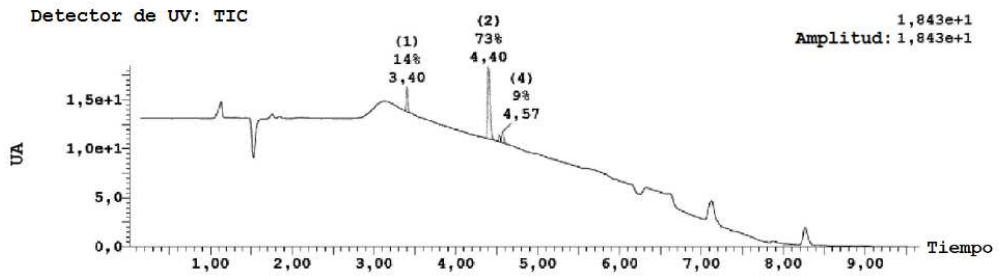


FIGURA 35

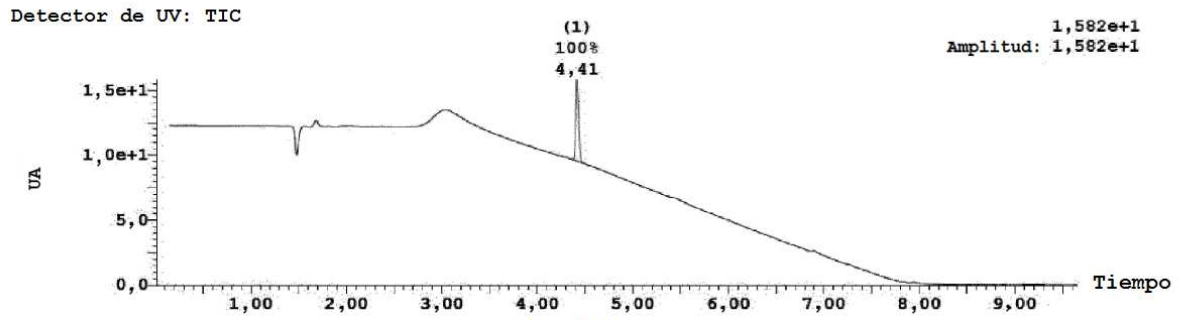


FIGURA 36

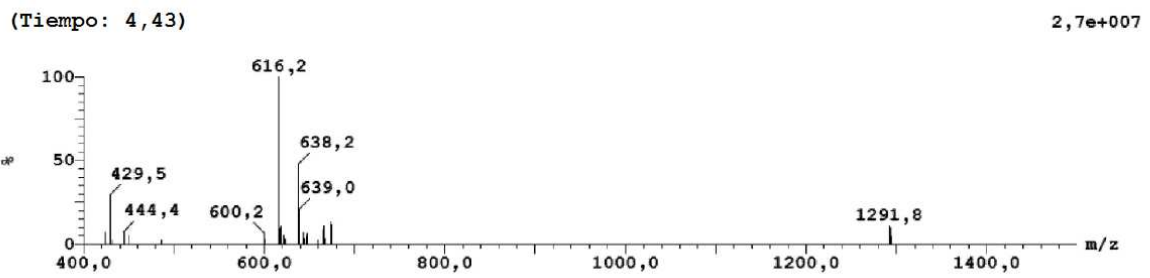


FIGURA 37

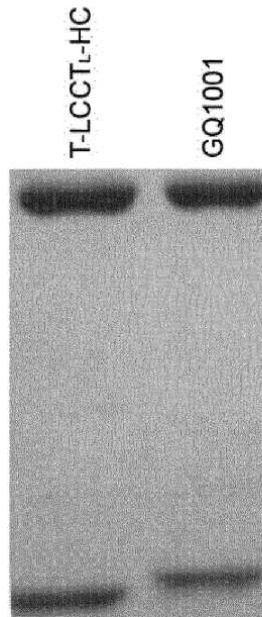
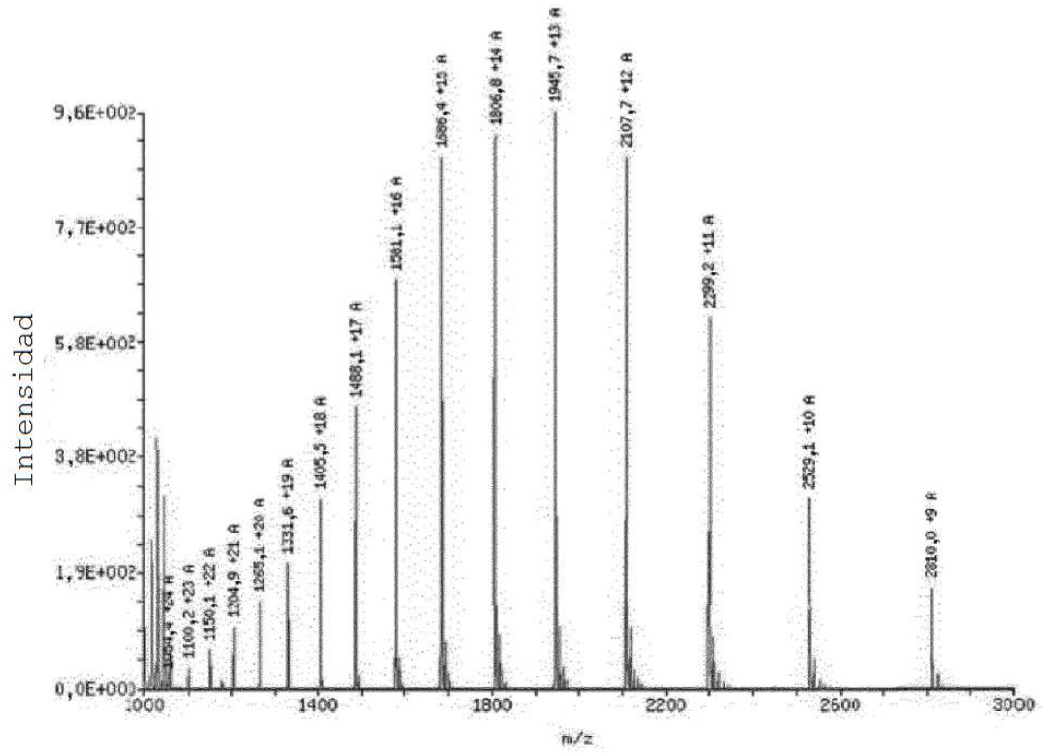


FIGURA 38

A



B

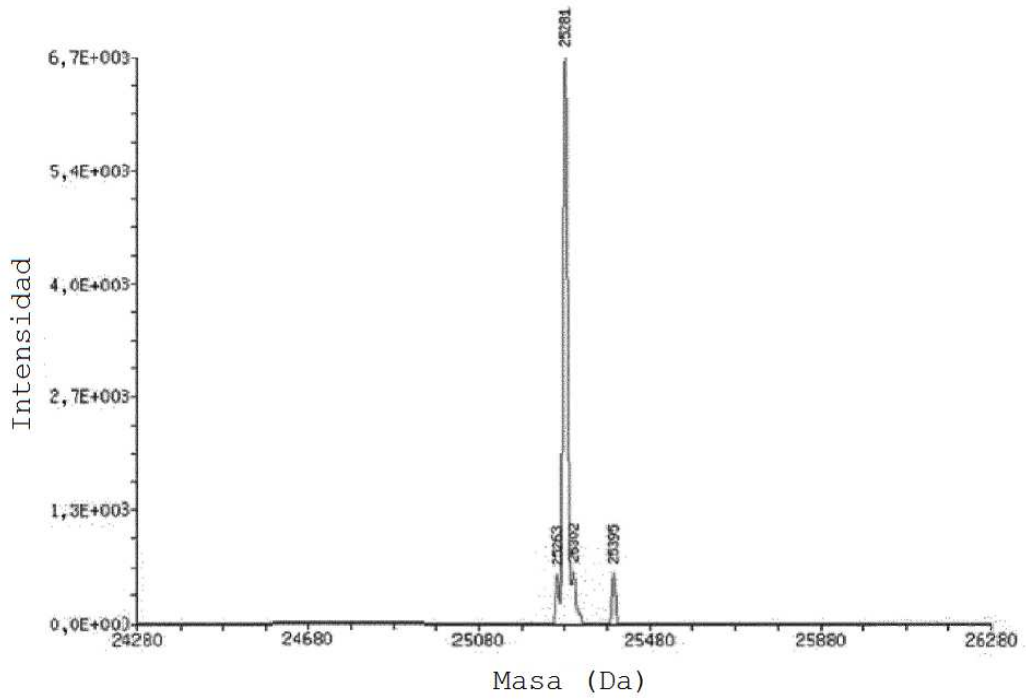


FIGURA 39

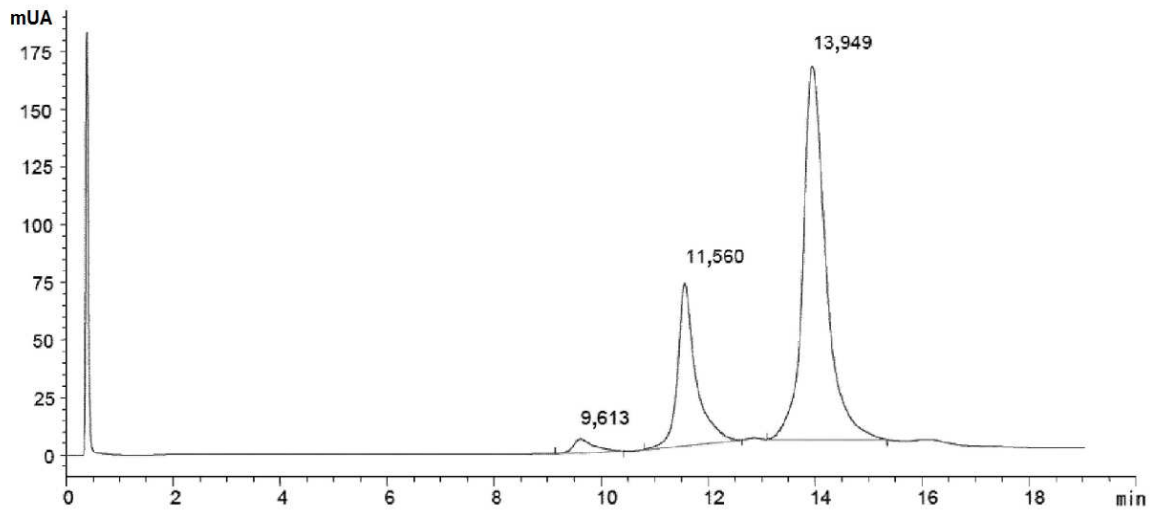


FIGURA 40

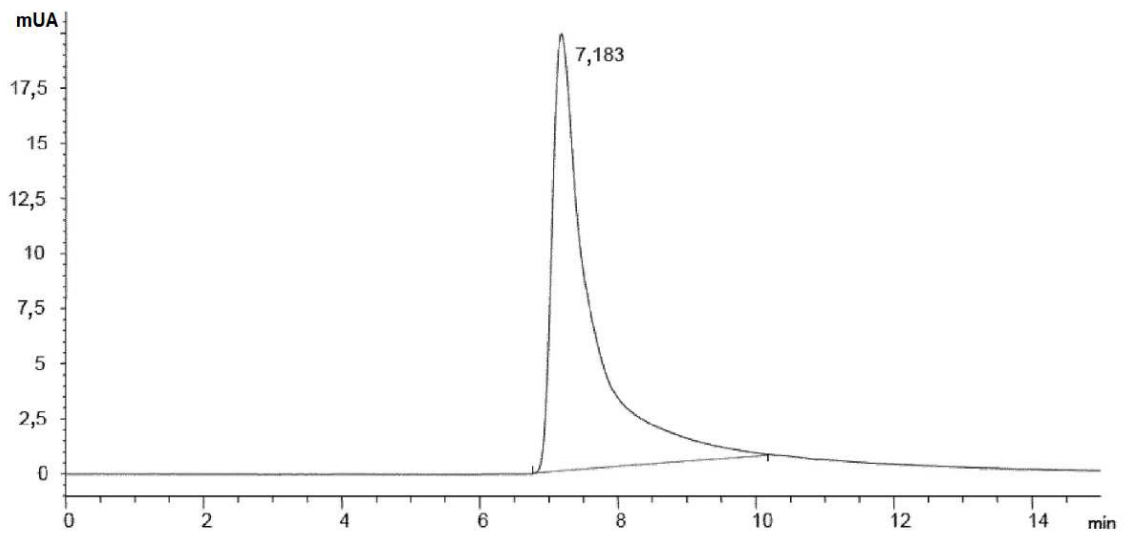


FIGURA 41

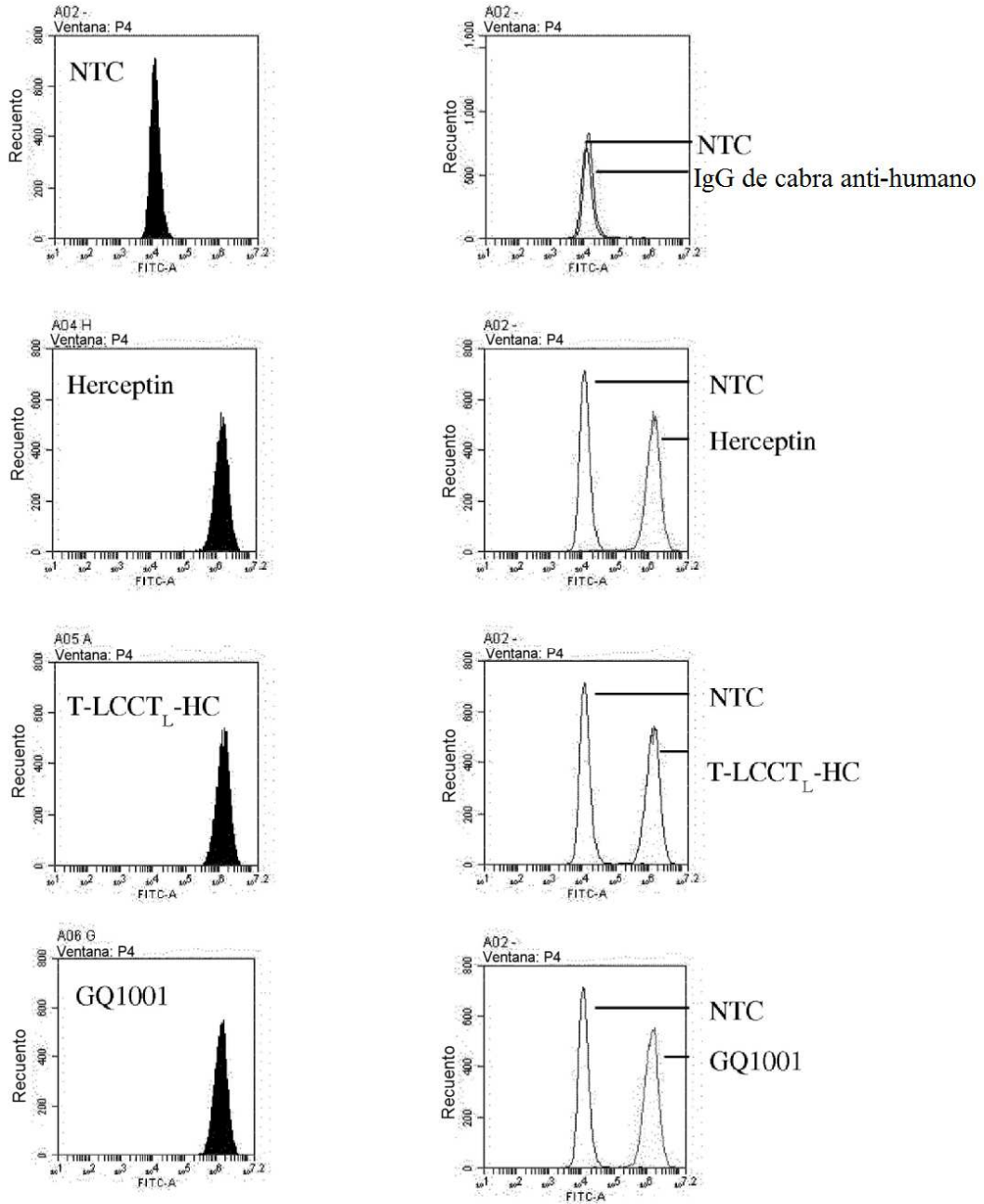


FIGURA 42

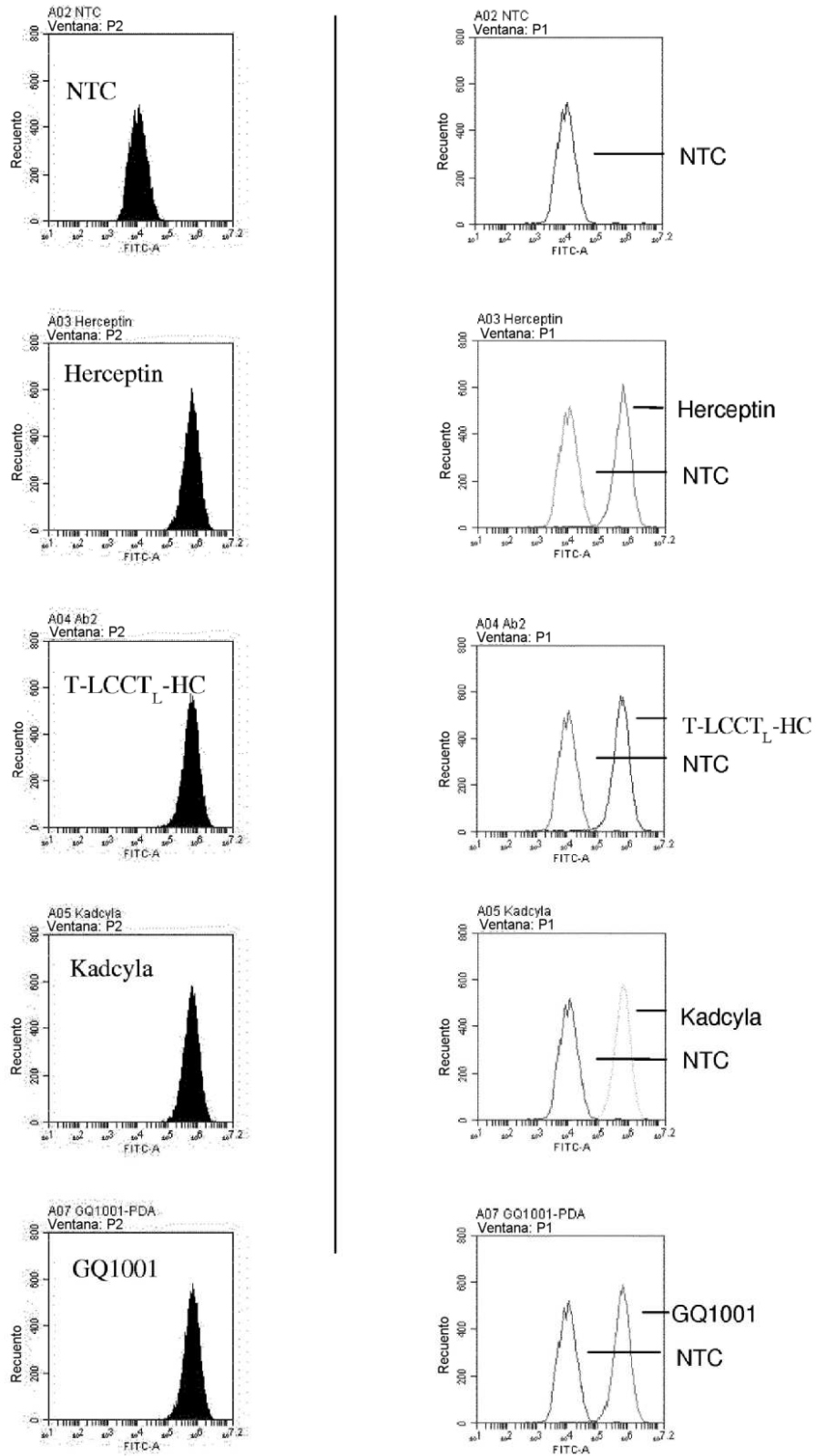


FIGURA 43

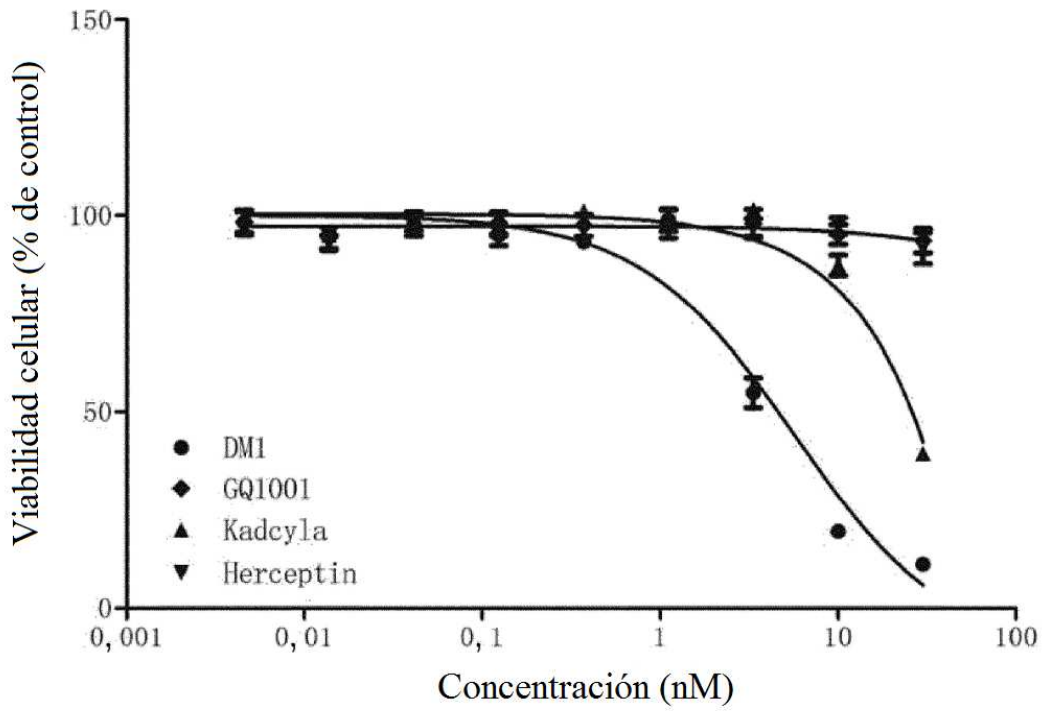


FIGURA 44

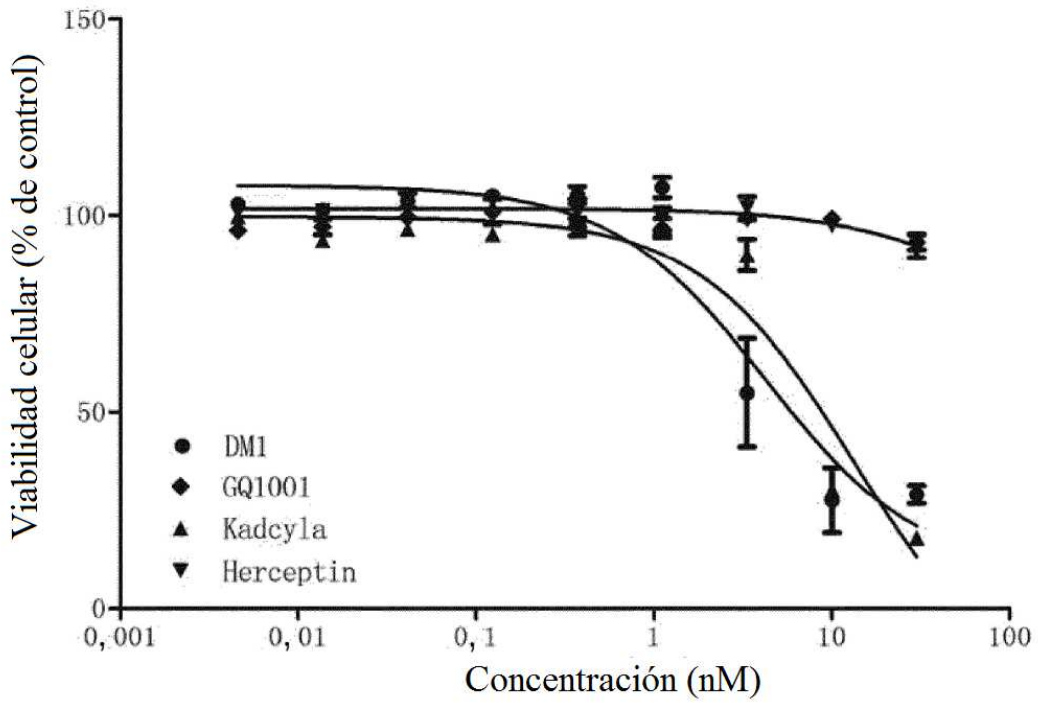


FIGURA 45

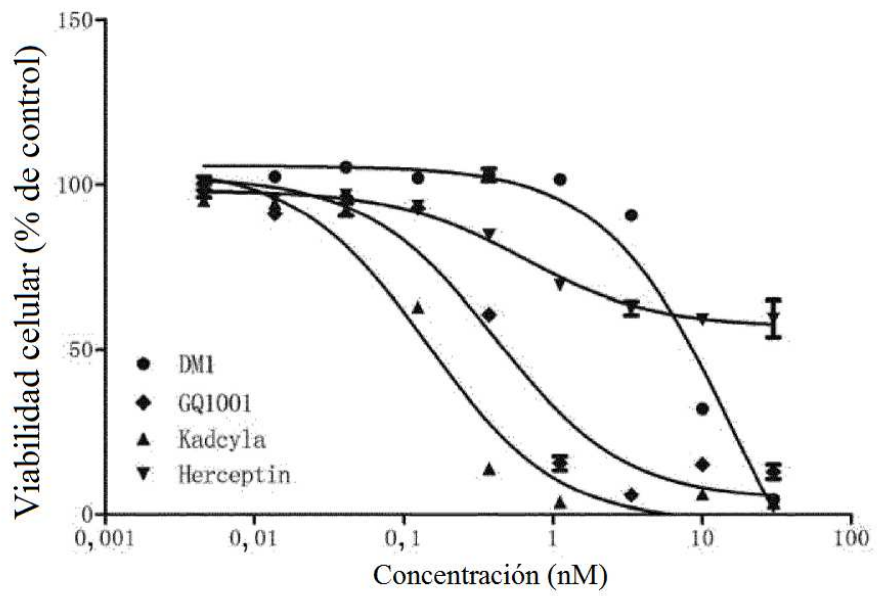


FIGURA 46

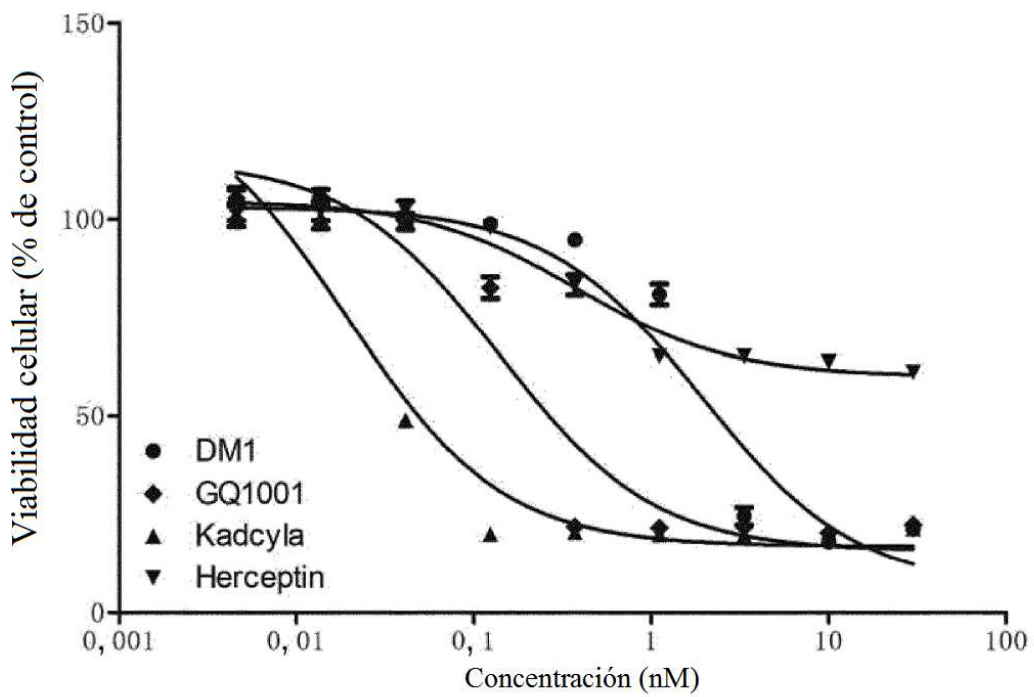


FIGURA 47

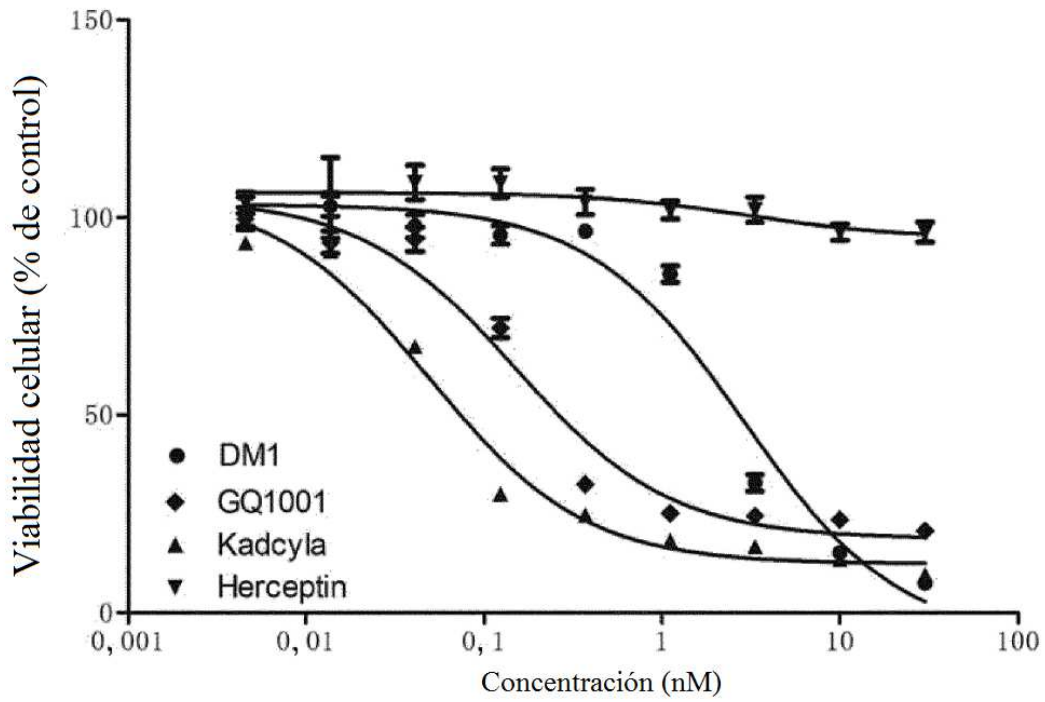


FIGURA 48

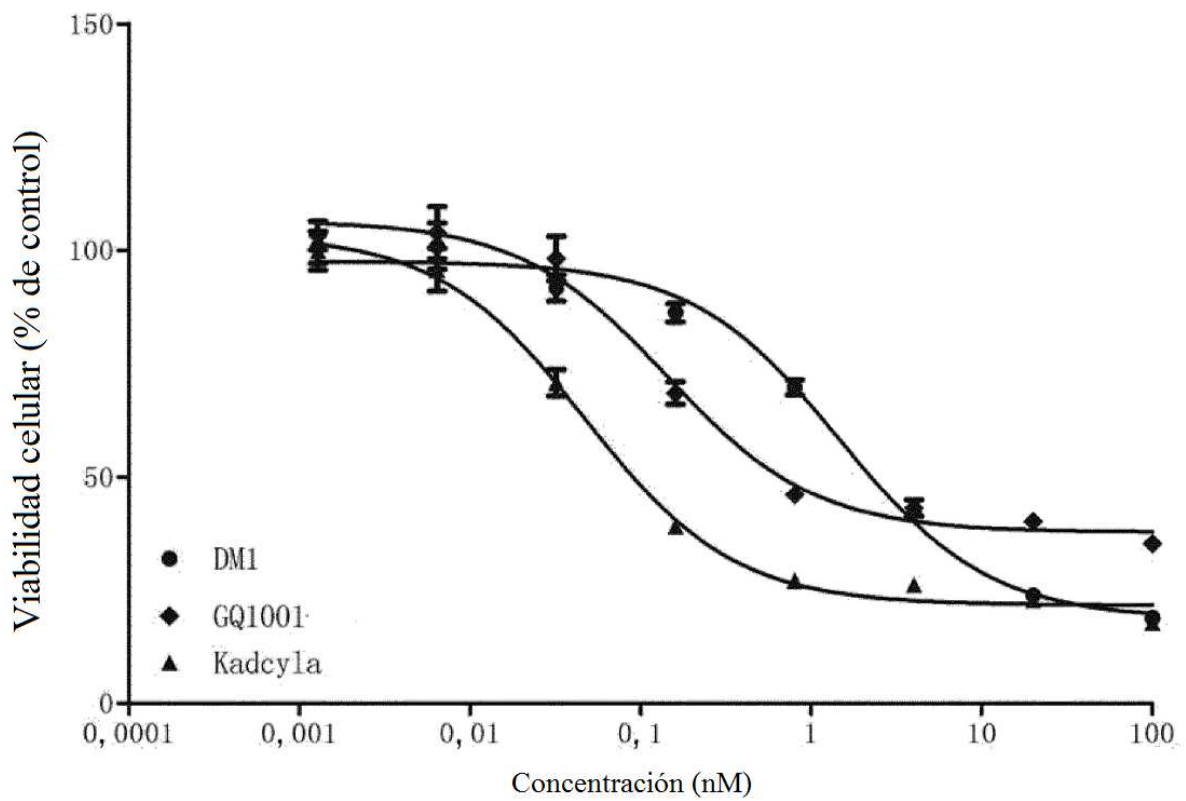


FIGURA 49

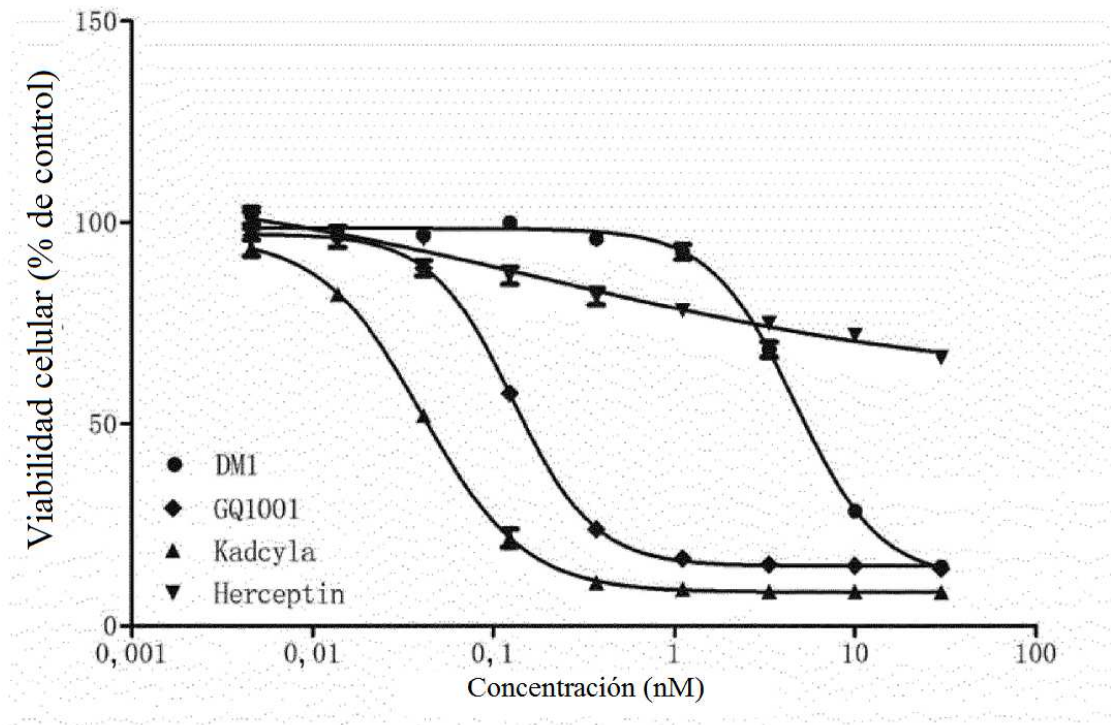


FIGURA 50

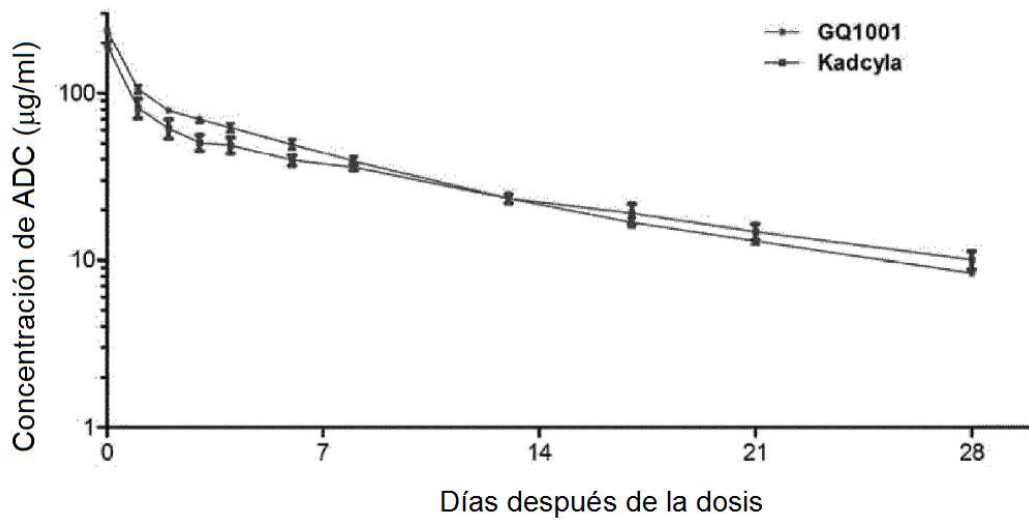


FIGURA 51

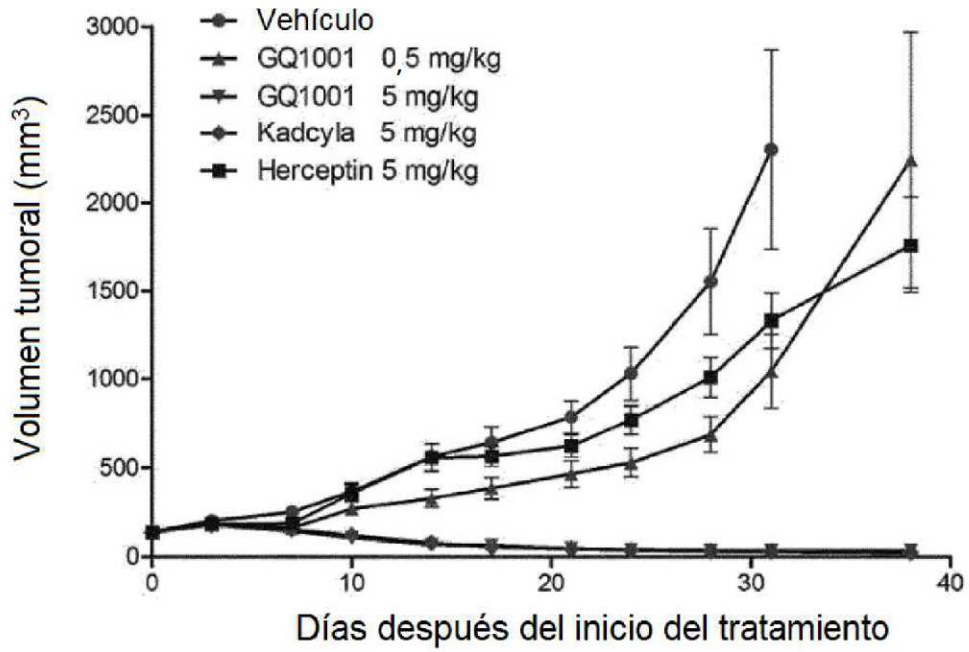


FIGURA 52

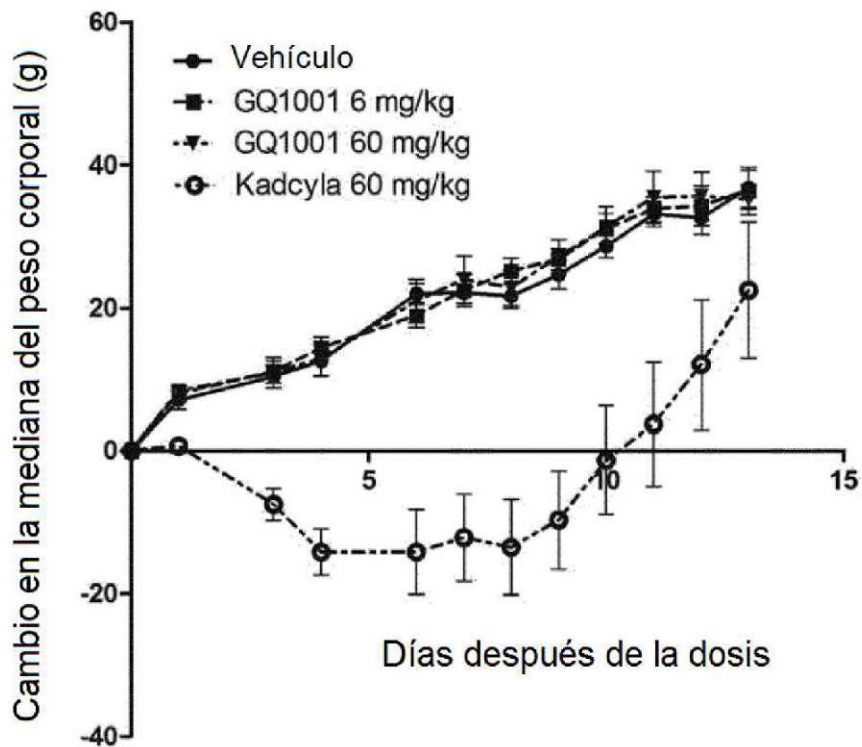


FIGURA 53

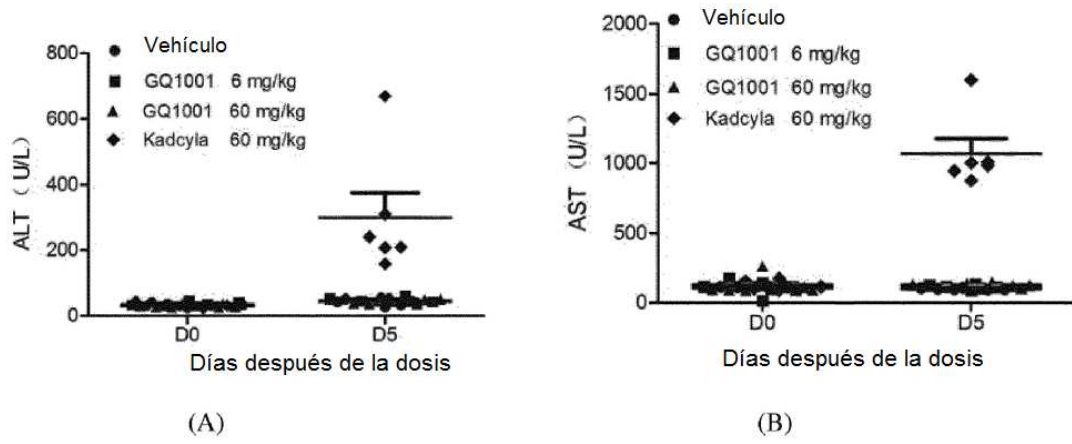


FIGURA 54

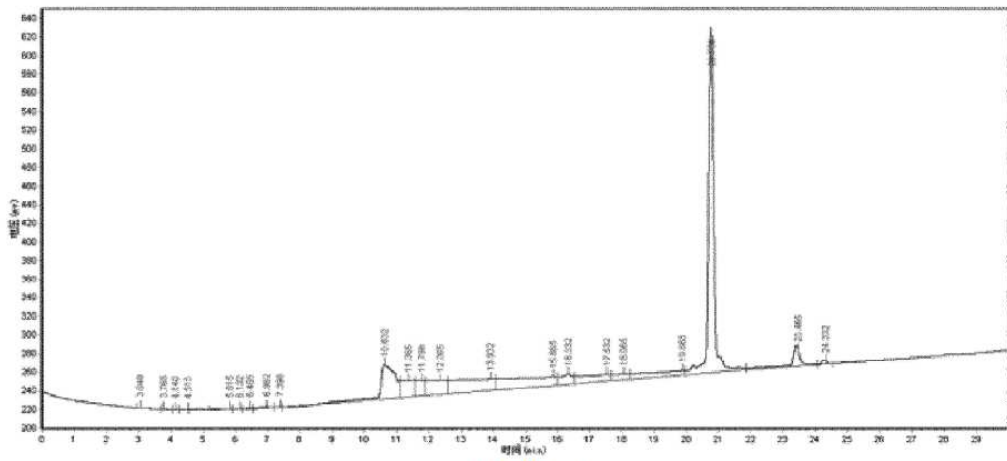


FIGURA 55

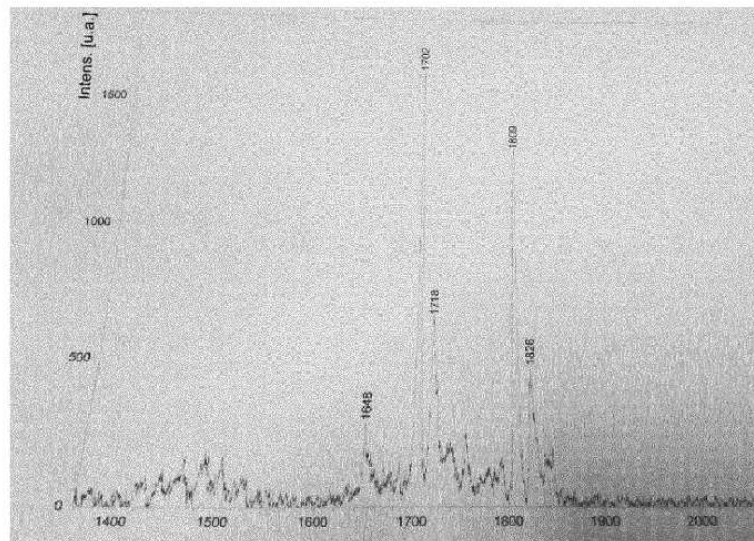


FIGURA 56