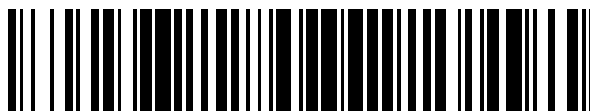


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 998**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68	(2007.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 45/00	(2006.01)
C07D 207/448	(2006.01)
C07D 207/452	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 37/02	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)
C07K 16/32	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2014 PCT/CN2014/070780**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14114207**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2014 E 14743793 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2949343**

54 Título: **Conexona tridentada y uso de la misma**

30 Prioridad:

23.01.2013 CN 201310025021

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

09.09.2020

73 Titular/es:

**NEWBIO THERAPEUTICS INC. (100.0%)
1011 Halei Road Pudong New District
Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:

**AN, DEQIANG;
HAN, NIANHE;
ZENG, DI;
YANG, HANG;
ZHU, PENG;
LI, MINGZHEN;
JIAN, LI y
YANG, CHUN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 781 998 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

Conexona tridentada y uso de la misma

Campo de la invención:

5 La invención se refiere a conjugados de anticuerpo fármaco (ADC) útiles en el tratamiento farmacéutico de tumores u otras enfermedades. La invención se refiere además a la preparación de ADC usando un enlazante tridentado específico para controlar la proporción fármaco/anticuerpo (DAR).

Técnicas antecedentes:

10 Como nuevos agentes terapéuticos dirigidos, los conjugados de anticuerpo fármaco (ADC) abren una nueva era para el tratamiento de tumores de diferentes tipos (Carter, et al. 2008, Cancer J. 14: 154-169; Chari, et al. 2008, Acc. Chem. Res. 41: 98-107; Senter, et al. 2009, Curr. Opin. Chem. Biol. 13: 235-244; Teicher, et al. 2009, Curr. Cancer Drug Targets, 9: 982-1004; Ducry, et al. 2010, Bioconjugate Chem. 21: 5-13; Lash, et al. 2010, In vivo: The Business & Medicine Report 32-38; Casi, et al. 2012, J. Control. Rel. 161: 422-428). Iniciado por Seattle Genetics, Inc. and ImmunoGen Inc., muchas compañías farmacéuticas multinacionales y nuevas están implicados en los programas de ADC.

15 Según lo descrito por informes de Wall Street en mayo de 2011, un total de 36 programas de ADC estaban en ensayos ya sea preclínicos o clínicos. En agosto de 2011, Adcetris™, desarrollado por Seattle Genetics, Inc., fue aprobado por la FDA para el tratamiento del linfoma de Hodgkin (HL) y el linfoma anaplásico sistémico recurrente de células grandes (sALCL) (Katz, et al. 2011, Clin. Cancer Res. 17: 6428-6436). Otro fármaco ADC de Genentech para el tratamiento del cáncer de mama, T-DM1, obtuvo buenos resultados en ensayos clínicos de fase 3 y, con suerte, será aprobado por la FDA a principios de 2013 (Mathew et al. 2011, Curr. Opin. Oncol. 23: 594-600).

20 Un fármaco ADC se compone de tres partes independientes: un anticuerpo o ligando similar a un anticuerpo, fármacos moleculares pequeños y enlazantes que conjugan los fármacos con el ligando. El mecanismo de acción (MOA) de un conjugado anticuerpo fármaco se describe a continuación.

25 Un anticuerpo o ligando similar a un anticuerpo se dirige a receptores específicos de proteínas de la superficie celular (antígenos). Una vez que se une a los antígenos, el complejo de unión se internalizará y, de este modo, entregará los fármacos unidos a la célula. El anticuerpo o el ligando similar al anticuerpo será digerido por enzimas, o los enlazantes se escindirán, de cualquier manera los pequeños fármacos citotóxicos podrían liberarse en forma activa y matar las células. Se requiere que los fármacos citotóxicos pequeños usados en los ADC sean muy potentes, normalmente de 10-1000 veces más que los fármacos de quimioterapia de primera línea en uso. Los fármacos citotóxicos usados actualmente para los ADC incluyen principalmente maytansinoides (EP 0425235; US 5208020, 5416064; 7276497, 7473796, 7851432; US 2007/0269447, 2011/0158991; WO 2004/103272, 2012/061590), auristatinas (US 6884869, 7498298), calicheamicinas (US 5606040, 5770710), doxorubicinas (Dubowchik, et. al. 2002, Bioconjugate Chem. 13: 855-869), duocarmicinas y CC-1065 (US 7129261), y dímeros de pirrolo-[2,1-c][1,4] benzodiazepina (PBD) (WO 2005/040170), etc. Los enlazantes usados en los ADC deben cumplir varios requisitos previos: los enlazantes deben ser estables cuando circulan en el plasma humano para evitar la liberación temprana de fármacos citotóxicos; después de ser internalizados en la célula tumoral, los enlazantes escindibles se podrían escindir bajo ciertas condiciones para liberar los fármacos citotóxicos, mientras que para los enlazantes no escindibles, las unidades estructurales del fármaco se liberan en una forma activa que contiene fármaco citotóxico, enlazante y residuo de aminoácidos derivado del ligando degradado con proteasa.

30 40 En la mayoría de las estructuras clínicas de ADC, los fármacos citotóxicos altamente potentes normalmente están unidos, a través de diferentes enlazantes, al grupo ϵ -amino de los residuos de lisina o los residuos de cisteína de la región bisagra (después de la reducción total/parcial de los enlaces disulfuro intercadena). Se prefiere que los DAR optimizados sean 2~4. El gran número de grupos ϵ -amino de los residuos de lisina (~80/mAb) en la superficie de los anticuerpos y el modo de conjugación no selectiva conducen a la incertidumbre de los sitios de conjugación y los números de fármacos conjugados, y de este modo proporcionan un producto ADC con alta heterogeneidad. Por ejemplo, T-DM1 (DAR promedio ~ 3.5) tiene una distribución de valor DAR de 0-8 (Lazar, et al. 2005, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19: 1806-1814). De manera similar, aunque un anticuerpo contiene solo cuatro enlaces disulfuro entre cadenas reducibles en el área de la bisagra, se debe reducir parcialmente y conjugarse para proporcionar ADC con un promedio óptimo de DAR 2 ~ 4 (Sun, et al. 2005, Bioconjugate Chem. 16: 1282-1290). Como los agentes reductores generalmente usados (DTT, TCEP, etc.) no pudieron reducir selectivamente los enlaces disulfuro de la región bisagra, los productos de conjugación de este modo obtenidos tampoco son homogéneos, contienen conjugados con DAR de 0, 2, 4, 6 y 8. Incluso para una fracción con un valor DAR específico, es una mezcla que contiene conjugados con fármacos acoplados en diferentes sitios de conjugación. La heterogeneidad de los productos de ADC en última instancia puede conducir a diferentes propiedades de PK, eficacia y toxicidad para diferentes fracciones. Por ejemplo, se ha informado que las fracciones con DAR más alto, en algunos casos, se eliminan más rápidamente y contribuyen a una toxicidad más severa (Boswell, et. al. 2011, Bioconjugate Chem. 22: 1994-2004).

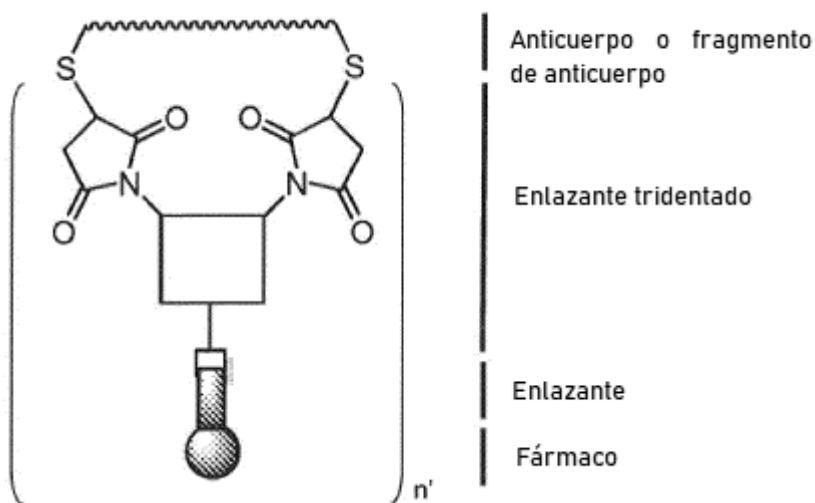
Para superar el problema de la alta heterogeneidad de los productos de ADC, las tecnologías de conjugación específicas del sitio han sido los puntos calientes recientemente, que controlan tanto los sitios de conjugación como las estequiometrías de carga de fármacos. Seattle Genetics Inc. informó el reemplazo parcial de cisteínas que forman los enlaces disulfuro intercadena en cAC10 con serina, para reducir los ocho sitios potenciales de conjugación a 4 o 2 (WO 2006/065533; Mcdonagh, et al. 2006, Protein Eng. Des. Sel. 19: 299-307). Los ADC con sitios definidos y estequiometrías de la carga del fármaco muestran propiedades in vitro e in vivo similares a las de la fracción de ADC purificada correspondiente de los ADC heterogéneos parentales, que incluyen actividad antitumoral, farmacocinética y dosis máxima tolerada. Usando el método basado en la expresión de fagos como derivaciones para predecir los sitios de conjugación apropiados, Genentech diseñó sustituciones de cisteína en las posiciones en cadenas ligeras y pesadas que proporcionan grupos tiol reactivos y no perturban el plegamiento y ensamblaje de inmunoglobulinas, o alteran la unión al antígeno (US 7855275; US 2011/0301334; WO 2008/141044, 2009/052249; Junutula, et al. 2008, Nat. Biotechnol. 26: 925-933; Junutula, et al. 2010, Clin. Cancer Res. 16: 4769-4778). Los ADC producidos en base a esta tecnología mostraron propiedades in vivo favorables de la composición casi homogénea. A diferencia de las tecnologías mencionadas anteriormente, Ambrx (WO 2006/069246, 2007/059312), Allozyne (US 2008/0096819; WO 2007/130453, 2009/026393), Sutro (WO 2010/081110) y Redwood (US 2010/0210543) todas las tecnologías de anticuerpos/proteínas recombinantes desarrolladas, que incorporan aminoácidos no naturales en ciertos sitios de anticuerpos o proteínas, y de este modo permiten la modificación específica del sitio, incluida la pegilación, glicosilación o conjugación de fármacos-anticuerpos. A pesar de las ventajas de los sitios de conjugación controlables y las estequiometrías de la carga del fármaco, los anticuerpos o proteínas en estas tecnologías están diseñados genéticamente. Tales mutagénesis pueden llevar mucho tiempo y no ser rentable, ya que es necesario realizar un trabajo sustancial y un cuidado especial para cribar los anticuerpos con sitios de mutación favorables para una mayor conjugación o pegilación del fármaco.

Teniendo en cuenta estos problemas, la conjugación específica del sitio mediante métodos químicos simples puede ser más rentable y, de este modo, más atractiva. Se informó de una clase de reactivos de enlace cruzado alquilante de transferencia de equilibrio (ETAC) que reaccionaron con anticuerpo reducido/parcialmente reducido para dar estructuras reticuladas (Liberatore, et al. 1990, Bioconjugate Chem. 1: 36-50; del Rosario, et al. 1990, Bioconjugate Chem. 1: 51-59). Los productos de reticulación entre cadenas tenían rendimientos modestos (~30%) y baja homogeneidad, que contenían mezclas de 0 a 4 componentes de reticulación. Korea-based LegoChem Biosciences (LCB), está trabajando en una tecnología que consiste en la funcionalización específica del sitio y la etapa de conjugación de fármacos ortogonales, pero no se describe información detallada (BioSpectrum, 2012, 39).

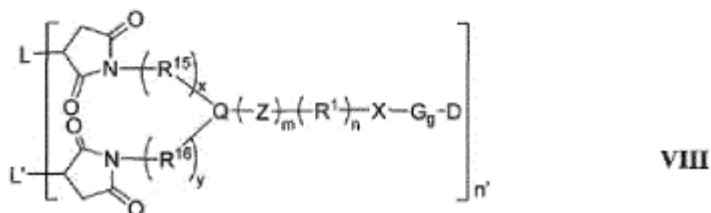
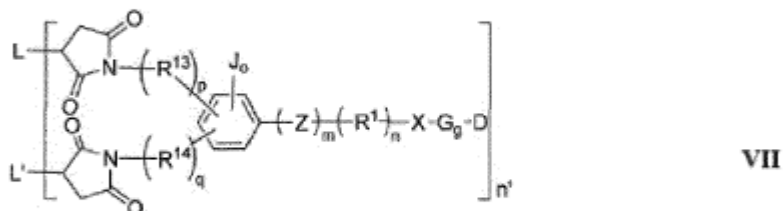
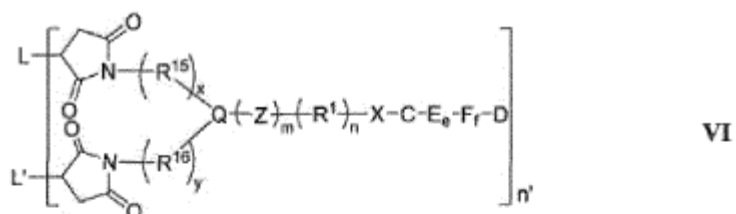
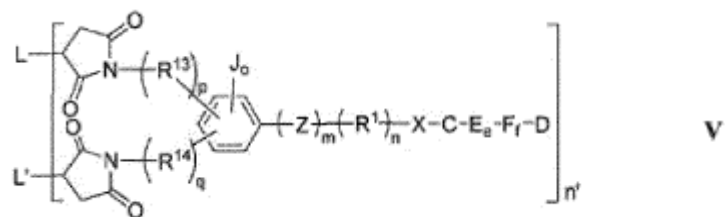
En base a los problemas anteriores, los métodos de acoplamiento químico altamente eficientes, simples y prácticos para la producción de ADC son muy necesarios en este campo.

Resumen de la invención

Este objeto de la invención es proporcionar un enlazante tridentado innovador que se podría usar para producir ADC mediante métodos de acoplamiento químico. Un primer aspecto de la invención es un conjugado de anticuerpo fármaco (ADC) compuesto por un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, enlazante tridentado, enlazante y fármaco del esquema general:



en el que dicho ADC es de fórmula V, VI, VII o VIII:

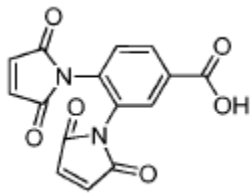


5 en el que D es una parte del fármaco; en el que C es un enlazante escindible; E es un enlazante autoinmolativo, F es un enlazante autoinmolativo opcional; e o f es un número entero de 0-5; G es un enlazante no escindible; g es un número entero de 0-5; n' es un número entero de 1-8; y en el que L' y L son parte del mismo anticuerpo o fragmento de anticuerpo; Z es O, S, NR², C(=O)O, C(=O)NR³, C(=S)O, C(=S)NR⁴, C(=S)S, NR⁵C(=O)NR⁶, NR⁷C(=S)NR⁸, OC(=O)NR⁹; m es 0 o 1; R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, y R⁹ se seleccionan independientemente de H, alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo; R¹ es alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo; X es -NR¹⁰-, -O-, -S-, -C(=O)-, -C(=S)-, -NR¹¹C(=O)-, -NR¹²C(=S)-, -OC(=O)-, -OC(=S)-; R¹⁰, R¹¹, y R¹² se seleccionan independientemente de H, alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo; J es un grupo de sustitución, que incluye, H, halógeno, nitro, ciano, hidroxilo, alcoxi, amino, amida, éster, sulfamida, urea, alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo; o es 0, 1, 2 o 3; R¹³, R¹⁴, R¹⁵ y R¹⁶ se seleccionan independientemente de alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y heteroarilo; Q es N o CR¹⁷; R¹⁷ se selecciona independientemente de H, alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y heteroarilo; p, q es un número entero de 0-8; x, y es un número entero de 0-8, y x + y ≥ 1.

En una realización preferida, el anticuerpo se refiere a un anticuerpo que se dirige a un receptor o antígeno relacionado con el tumor en la superficie celular.

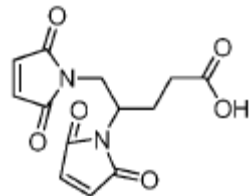
En una realización preferida, el fármaco se refiere a fármaco citotóxico, antiautoinmune o contra la inflamación.

20 En el segundo aspecto, la invención proporciona un enlazante tridentado de fórmula 1:



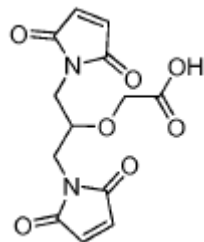
1

En el tercer aspecto, la invención proporciona un enlazante tridentado de fórmula 3:



3

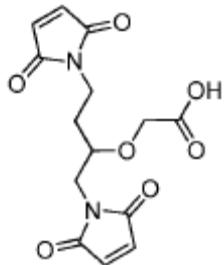
En el cuarto aspecto, la invención proporciona un enlazante tridentado de fórmula 4:



4

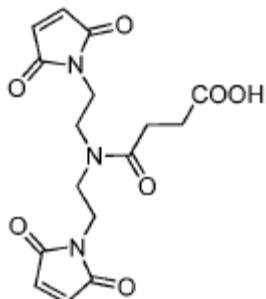
5

En el quinto aspecto, la invención proporciona un enlazante tridentado de fórmula 5:



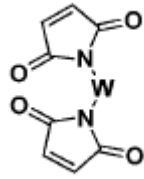
5

En el sexto aspecto, la invención proporciona un enlazante tridentado de fórmula 6:



6

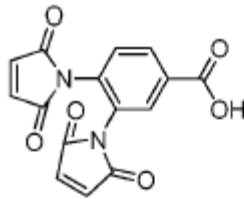
10 También se describe en este documento el uso de un enlazante tridentado de fórmula IX en la preparación de conjugados de anticuerpo fármaco:



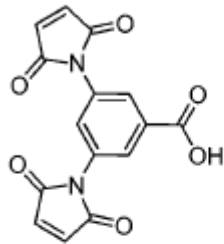
IX

en el que: W es arilo, heteroarilo, alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, o cualquier combinación de los mismos.

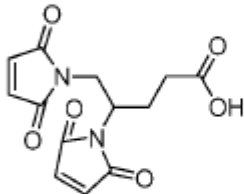
En una realización preferida, los enlazantes tridentados son como se representan por la fórmula 1, 2, 3, 4, 5 o 6:



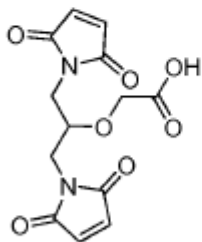
1



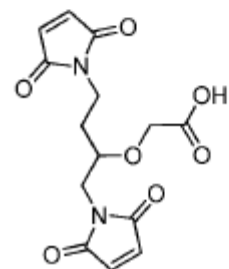
2



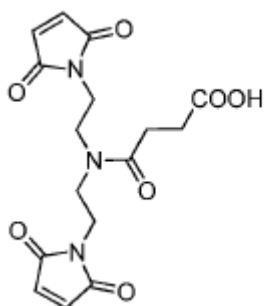
3



4



5



6

En resumen, la invención proporciona un método de acoplamiento químico altamente eficiente, simple y práctico.

Leyenda de las figuras

5 La figura 1 muestra las estructuras de los seis enlazantes tridentados específicos y tres enlazantes bidentados simplificados a los que se refiere la invención.

Las figuras 2a y 2b muestran los resultados de SDS-PAGE para los conjugados de anticuerpo-enlazante tridentado (bidentado).

La figura 3 muestra los resultados de HIC de conjugados de anticuerpo fármaco, en el que a es H-mc-vcMMAE, b es H-1-vcMMAE, c es H-3-vcMMAE, d es H-4-vcMMAE.

10 La figura 4 muestra los resultados SEC de conjugados de anticuerpo fármaco, en el que a es H-1-vcMMAE, b es H-1-MMAF, c es H-3-vcMMAE, d es H-3-MMAF, e es H-4-vcMMAE, f es H-4-MMAF.

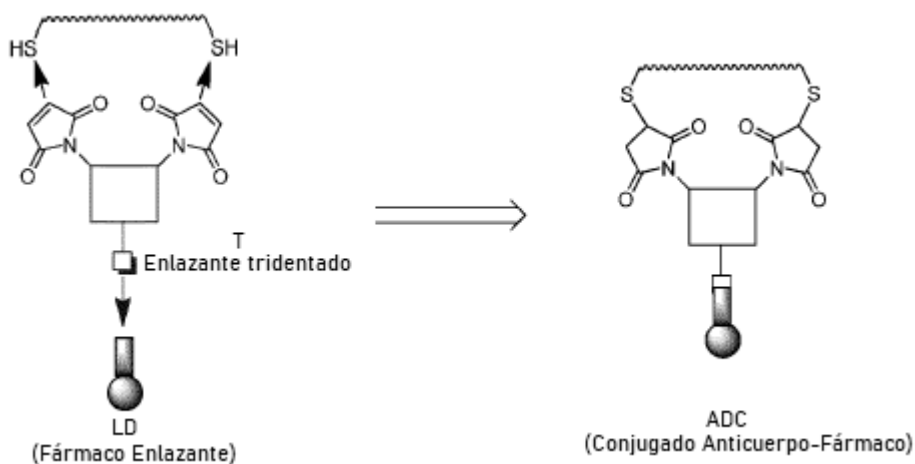
La figura 5 muestra los resultados de ELISA de conjugados de anticuerpo fármaco, en el que a es H-1-MMAF y H-1-vcMMAE, b es H-3-MMAF y H-3-vcMMAE, c es H-4-MMAF y H-4-vcMMAE.

15 La figura 6 muestra los resultados del ensayo de inhibición de la proliferación celular de conjugados de anticuerpo fármaco, en el que a es H-1-MMAF, H-3-MMAF y H-4-MMAF, b es H-1-vcMMAE, H-3-vcMMAE, y H-4-vcMMAE.

Descripción de la invención

20 A través de un extenso estudio, el inventor descubrió sorprendentemente que el enlazante tridentado podía reticular completa/parcialmente las cadenas pesada-pesada y pesada-ligera del anticuerpo. Adicionalmente, el inventor descubrió que los ADC obtenidos mediante el método de acoplamiento anterior tienen distribuciones DAR más estrechas, en comparación con las de los conjugados de anticuerpo fármaco tradicionales.

Específicamente, la presente invención proporciona enlazantes tridentados, que incluyen dos grupos maleimida y un tercer grupo de acoplamiento. Los dos grupos maleimida se usan para reticular los grupos tiol intercatenarios (después de la reducción del enlace disulfuro intercatenario), mientras que el tercer grupo se usa para acoplarse con un fármaco de molécula pequeña o una unidad fármaco-enlazante.



25

Los ADC preparados de este modo pueden usarse para administrar selectivamente fármacos a grupos de células diana, por ejemplo, células tumorales. Los conjugados de anticuerpo fármaco se unirán específicamente a las proteínas de la

superficie celular, y el complejo de unión será internalizado rápidamente por las células. Una vez internalizado, el fármaco citotóxico se liberará en cierta forma activa y tendrá efectos. El anticuerpo incluye anticuerpo quimérico, humanizado o humano; fragmento de anticuerpo que se puede unir al antígeno; o proteína fusionada con Fc; o proteína

5 El fármaco es un fármaco citotóxico altamente potente, que incluye maytansinoides, auristatinas, calicheamicinas, doxorubicinas, CC-1065 y derivados de duocarmicinas y dímeros de PBD, etc. En ciertas condiciones, el fármaco podría ser poli(etilenglicol). El fármaco en sí mismo, o las unidades fármaco-enlazante, se podrían acoplar al anticuerpo a través de enlazantes tridentados, produciendo conjugados reticulados parcialmente entre cadenas. En comparación con los tradicionales, los conjugados de anticuerpo fármaco en base a esta invención tienen una distribución DAR

10 mucho más estrecha y, de este modo, mejoran enormemente las homogeneidades tanto estructural como farmacológicamente.

Definición

15 Como se usa en este documento, los términos "anticuerpo" o "unidad de anticuerpo" incluyen cualquier unidad de un anticuerpo que se une o se asocia de forma reactiva o forma un complejo con un receptor, antígeno u otra unidad estructural receptora asociada con una población de células diana dada dentro de su alcance. Un anticuerpo puede ser cualquier proteína o molécula similar a una proteína que se una a complejos, o reaccione con una unidad estructural de una población celular que busca ser modificada terapéutica o biológicamente.

20 El anticuerpo que comprende los ADC de la invención retiene preferiblemente la capacidad de unión a antígeno de sus homólogos nativos de tipo salvaje. De este modo, los anticuerpos de la invención son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a antígenos. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a tumores (TAA), proteínas receptoras de la superficie celular y otras moléculas de la superficie celular, los factores reguladores de la supervivencia celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas asociadas con (por ejemplo, se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente a) desarrollo o diferenciación de tejidos, linfocinas, citocinas, moléculas implicados en la regulación del ciclo celular, moléculas implicadas en la vasculogénesis y moléculas asociadas con (por ejemplo, se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente a) la angiogénesis. El antígeno asociado al tumor

25 puede ser un factor de diferenciación de agrupación (esto es, una proteína CD). Un antígeno al que un anticuerpo de la invención es capaz de unirse puede ser uno o un subconjunto de las categorías mencionadas anteriormente, en el que el otro subconjunto(s) de dicha categoría comprende otras moléculas/antígenos que tienen una característica distinta (con respecto al antígeno de interés).

30 Los anticuerpos usados en ADC incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra receptores de la superficie celular y antígenos asociados a tumores (TAA). Tales antígenos asociados a tumores son conocidos en la técnica, y se pueden preparar para su uso en la generación de anticuerpos usando métodos e información que son bien conocidos en la técnica. En un intento por descubrir objetivos celulares eficaces para el diagnóstico y la terapia del cáncer, los investigadores han tratado de identificar polipéptidos transmembrana o de otra manera asociados a tumores que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación con uno o más células no cancerosas normales. A menudo, tales polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente en la superficie de las células cancerosas en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de tales polipéptidos de antígeno de superficie celular asociados a tumores ha dado lugar a la capacidad de atacar específicamente a las células cancerosas diana para su destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos.

40 Los ejemplos de TAA incluyen, pero no se limitan a, antígenos asociados a tumores (1)-(36) enumerados a continuación. Por conveniencia, la información relacionada con estos antígenos, todos los cuales se conocen en la técnica, se enumeran a continuación e incluye nombres, nombres alternativos, números de acceso a Genbank. Las secuencias de ácido nucleico y proteínas correspondientes a TAA (1)-(36) están disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank. Los antígenos asociados a tumores dirigidos por anticuerpos incluyen todas las variantes de secuencia de aminoácidos e isoformas que poseen al menos aproximadamente 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias identificadas en las referencias citadas, o que exhiben sustancialmente las mismas propiedades o características biológicas que un TAA que tiene una secuencia encontrada en las referencias citadas.

Antígenos asociados a tumores (1)-(36):

- 50 (1) BMPR1B (receptor de proteína ósea más fogenética tipo IB, No. de acceso Genbank NM_001203);
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5, No. de acceso Genbank NM_003486);
- (3) STEAP1 (seis antígenos epiteliales transmembrana de próstata, No. de acceso Genbank NM_012449);
- (4) 0772P (CA125, MUC16, No. de acceso Genbank AF361486);
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina, No. de acceso Genbank NM_005823);
- 55 (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, miembro 2 de la familia de portadores de solutos 34 (fosfato de sodio), transportador de fosfato dependiente de sodio tipo II 3b, No. de acceso Genbank NM_006424);

ES 2 781 998 T3

- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, No. de acceso Genbank AB040878);
- 5 (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008016Rik, ADNc de RIKEN 2700050C12, gen de ADNc de RIKEN 2700050C12, No. de acceso Genbank AY358628);
- (9) ETBR (receptor de endotelina tipo B, No. de acceso Genbank AY275463);
- (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, No. de acceso Genbank NM_017763);
- 10 (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales transmembrana de la próstata 2, seis proteínas de la próstata transmembrana, No. de acceso Genbank AF455138);
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal de catión potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, No. de acceso Genbank NM_017636);
- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, No. de acceso Genbank NP_003203 o NM_003212);
- 15 (14) CD21 (CR2 (Complemento receptor 2) o C3DR (receptor de virus C3d/Epstein Barr) o Hs. 73792, No. de acceso Genbank M26004);
- (15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (inmunoglobulina beta asociada), B29, No. de acceso Genbank NM_000626);
- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (dominio SH2 que contiene la proteína de anclaje de fosfatasa 1a), SPAP1B, SPAP1C, No. de acceso Genbank NM_030764);
- 20 (17) HER2 (ErbB2, No. de acceso Genbank M11730);
- (18) NCA (CEACAM6, No. de acceso Genbank M18728);
- (19) MDP (DPEP1, No. de acceso Genbank BC017023);
- (20) IL20R α (IL20Ra, ZCYTOR7, No. de acceso Genbank AF184971);
- (21) Brevican (BCAN, BEHAB, No. de acceso Genbank AF229053);
- 25 (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, No. de acceso Genbank NM_004442);
- (23) ASLG659 (B7h, No. de acceso Genbank AX092328);
- (24) PSCA (precursor de antígeno de células madre de próstata, No. de acceso Genbank AJ297436);
- (25) GEDA (No. de acceso Genbank AY260763);
- (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de células B, receptor BLys 3, BR3, No. de acceso Genbank AF116456);
- 30 (27) CD22 (forma del receptor de células B CD22- β , No. de acceso Genbank AK026467);
- (28) CD79a (CD79A, CD79 α , alfa asociada a inmunoglobulina, una proteína específica de células B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo en la superficie con moléculas de Ig M, transduce una señal implicada en la diferenciación de células B, No. de acceso Genbank NP-001774.1);
- 35 (29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplado a la proteína G que se activa mediante la quimiocina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por HIV-2 y quizás en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia, No. de acceso Genbank NP_001707.1);
- (30) HLA-DOB (subunidad Beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a los péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+, No. de acceso Genbank NP_002111.1);
- 40 (31) P2X5 (canal iónico 5 activado por el ligando del receptor purinérgico P2X, un canal iónico activado por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la fisiopatología de la inestabilidad del detrusor idiopático, No. de acceso Genbank NP_002552.2);
- (32) CD72 (antígeno de diferenciación de células B CD72, Lyb-2, No. de acceso Genbank NP_001773.1);

(33) LY64 (antígeno linfocitario 64 (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de las células B, la pérdida de la función se asocia con una mayor actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematoso sistémico, No. de acceso Genbank NP_005573.1);

5 (34) FcRH1 (proteína 1 similar al receptor de Fc, un receptor putativo para el dominio Fc de inmunoglobulina que contiene dominios similares a C2 de tipo Ig e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B, No. de acceso Genbank NP_443170.1);

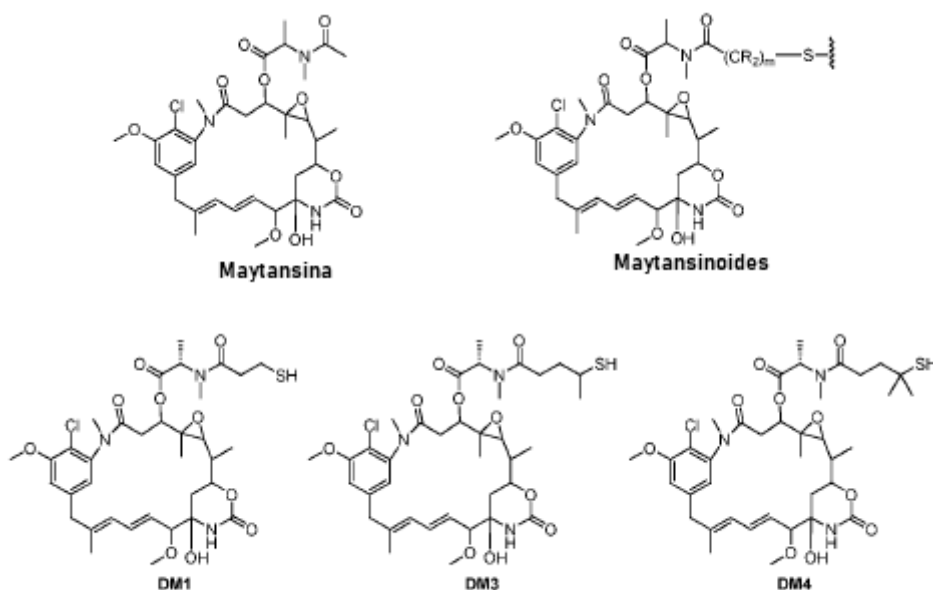
(35) IRTA2 (translocación del receptor de la superfamilia de inmunoglobulina asociada 2, un inmunorreceptor putativo con posibles papeles en el desarrollo de células B y la linfomagénesis; la disregulación del gen por translocación ocurre en algunas neoplasias de células B, No. de acceso Genbank NP_112571.1); y

10 (36) TENB2 (proteoglicano transmembrana putativo, relacionado con la familia de factores de crecimiento EGF/heredulina y folistatina, No. de acceso Genbank AF179274).

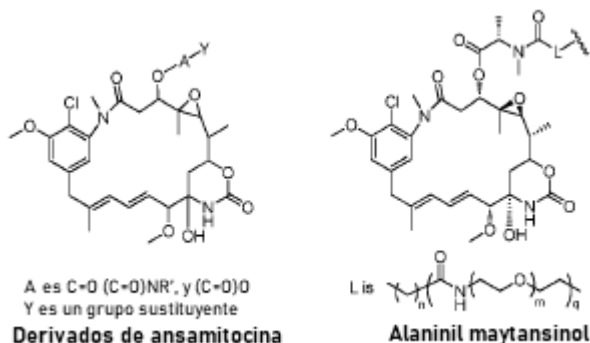
15 Como se usa en este documento, los términos "fármaco" o "D" se refieren a cualquier compuesto que posea una actividad biológica deseada y un grupo funcional reactivo que se pueda usar para incorporar el fármaco en el conjugado de la invención. La actividad biológica deseada incluye el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en el hombre u otros animales. De este modo, siempre que tenga el grupo funcional reactivo necesario, el término "fármaco" se refiere a los productos químicos reconocidos como fármacos en the official Chinese National Pharmacopeia, official United States Pharmacopeia, official Homeopathic Pharmacopeia of the United States, o official National Formulary, o cualquier suplemento de los mismos. Los fármacos de ejemplo se exponen en the Physician's Desk Reference (PDR) y en the Orange Book que mantiene the U.S. Food and Drug Administration (FDA).
20 Continúa se descubren y desarrollan nuevos fármacos, y la presente invención establece que estos nuevos fármacos también se pueden incorporar en una forma de profármaco de la presente invención.

25 Preferiblemente, el fármaco es: un fármaco citotóxico útil en terapia contra el cáncer; una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada, tal como una toxina, por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas y toxina de la difteria; otras proteínas apropiadas incluyen factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular y modificadores de la respuesta biológica, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina- 2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) u otros factores de crecimiento.

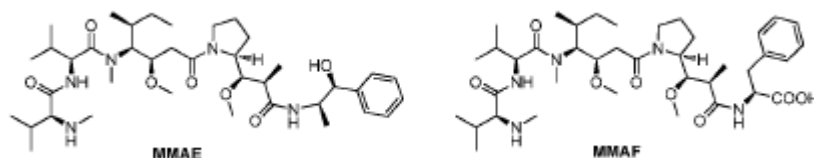
30 En un aspecto, los fármacos son maytansina y maytansinoides. Los compuestos de maytansina inhiben la proliferación celular al inhibir la formación de microtúbulos de la proteína microtubulina, tubulina (Temillard et al. 1975, Science 189: 1002-1005; US 5208020). Los maytansinoides son derivados de la maytansina. Tanto la maytansina como los maytansinoides son altamente citotóxicos, pero su uso clínico en la terapia contra el cáncer ha sido muy limitado debido a la escasa selectividad para los tumores. Sin embargo, la alta potencia citotóxica les permite ser unidades estructurales de fármacos atractivos en los ADC. Las estructuras que se muestran a continuación son maytansina, maytansinoides y tres maytansinoides representativos usados principalmente en fármacos ADC.
35



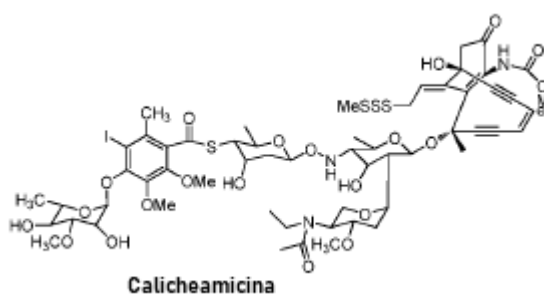
5 La materia prima clave para preparar maytansinoides es el maytansinol, que se obtiene de la hidrólisis de las ansamitocinas. Las ansamitocinas se podrían producir de manera accesible por fermentación. También se informa que los derivados de ansamitocina (Documento WO 2012/061590) y alanilil maytansinol (Documento US 2012/0121615) son buenos candidatos como ojivas de ADC (las estructuras de los dos tipos de moléculas están representadas por las siguientes fórmulas).



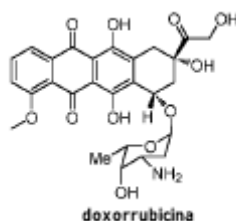
10 En un aspecto, los fármacos son auristatinas. Las auristatinas son análogos sintéticos de la dolastatina 10, que se aisló del molusco marino *Dolabella auricularia* y se descubrió que tenía actividad biológica (Documento US 7498298). La dolastatina 10 es un agente que inhibe la polimerización de la tubulina al unirse al mismo dominio en la tubulina que el fármaco contra el cáncer vincristina. La dolastatina 10, la auristatina PE y la auristatina E son péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, tres de los cuales son únicos para la clase de compuestos de dolastatina y una amida C-terminal. Dos auristatinas representativas, la monometil auristatina E (MMAE) y la monometil auristatina F (MMAF), son los candidatos preferidos para la unidad estructural de fármacos para los ADC.



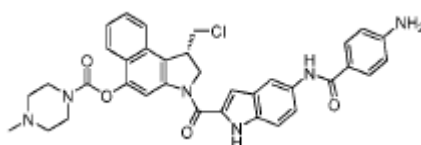
15 En un aspecto, los fármacos son calicheamicinas. Las calicheamicinas son antibióticos antitumorales que se unen al surco menor del ADN y producen roturas de ADN de doble cadena específicas del sitio, que causan la muerte celular. Las calicheamicinas son potentes a concentraciones subpicomolares in vitro, pero su bajo índice terapéutico impidió un mayor desarrollo clínico. Sin embargo, la alta potencia los convierte en buenos candidatos para ADC (por ejemplo, Gemtuzumab Ozogamicin e Inotuzumab Ozogamicin).



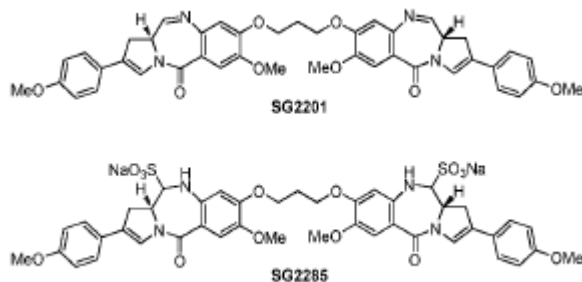
20 En un aspecto, los fármacos son doxorubicinas. La doxorubicina es un agente intercalante que bloquea la replicación del ADN y se usa como agente quimioterapéutico. Debido a la relativa baja potencia de doxorubicina (IC_{50} de 0.1-0.2 μ M para las líneas de carcinoma humano, mientras que las actividades subnanomolares ahora se ven por lo general para cargas útiles de ADC), la aplicación de doxorubicina como unidad estructural de fármaco de ADC no es popular.



En un aspecto, los fármacos son duocarmicinas, CC-1065 y otros derivados de ciclopropapirrolind-4-ona (CPI), que son potentes agentes alquilantes de ADN de unión a surcos menores. Los análogos de ciclopropabenzindol-4-ona (CBI) son químicamente más estables, biológicamente más potentes y sintéticamente más accesibles que sus compuestos originales que incorporan la subunidad alquilante de CPI natural. Un derivado de CBI representativo es el CBI protegido con grupos hidroxilo fenólicos (véase la siguiente fórmula), que tiene una toxicidad disminuida de profármacos y una solubilidad en agua mejorada.



En un aspecto, los fármacos son pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodi-azepinas (PBD) o dímeros de PBD. Las pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepinas (PBD) son una familia de productos naturales producidos por especies de *Streptomyces* con la característica única de formar aductos covalentes no distorsivos en el surco menor del ADN específicamente en secuencias purina-guanina-purina. Existe un creciente interés en el uso de PBD como parte de una estrategia de molécula pequeña para apuntar a secuencias de ADN y también como nuevos agentes anticancerígenos y antibacterianos. (Antonow et al. 2008, *Biochemistry* 47: 11818-11829). La actividad biológica de estas moléculas se puede potenciar uniendo dos unidades PBD juntas a través de sus funcionalidades C8/C8'-hidroxilo a través de un enlazante de alqueno flexible (documento WO 2011/130616). Se cree que los dímeros de PBD forman lesiones de ADN selectivas de secuencia, tales como el enlace cruzado intercadena palindrómico 5'-Pu-GATC-Py-3', que explica principalmente su actividad biológica. Se ha demostrado que estos compuestos son agentes citotóxicos muy útiles y buenos candidatos como ejivas de ADC.



En otro aspecto, los fármacos no se limitan a las categorías mencionadas anteriormente e incluyen todo lo que se podría usar en los ADC.

Según el mecanismo de liberación del fármaco en las células, como se usa en este documento, los términos "enlazantes" o "enlazantes de ADC" se podrían dividir en dos tipos: enlazantes no escindibles y escindibles.

Para los ADC con enlazantes no escindibles, se cree que el mecanismo de liberación se produce a través de la internalización del ADC seguido de la degradación del componente de mAb en el lisosoma, lo que da como resultado la liberación del fármaco molecular pequeño aún unido a través del enlazante a un residuo de aminoácido de anticuerpo. La modificación química del fármaco no disminuyó su potencial citotóxico. Sin embargo, esta forma del fármaco está cargada (residuo de aminoácido) y presumiblemente no se puede difundir a las células vecinas. Por consiguiente, no puede matar las células tumorales adyacentes (efectos espectadores) que no expresan el antígeno diana (células antigénicas negativas) (Ducry et al. 2010, *Bioconjugate Chem.* 21: 5-13).

Los enlazantes escindibles, como su nombre lo indica, se podrían escindir dentro de las células diana que liberan los fármacos activos (fármacos de molécula pequeña). Los enlazantes escindibles se pueden clasificar en dos grupos principales: enlazantes químicamente lábiles y enlazantes enzimáticamente lábiles.

Los enlazantes químicamente lábiles se podrían escindir selectivamente sobre las propiedades diferenciales entre el plasma y algunos compartimentos citoplasmáticos. Tales propiedades incluyen el valor de pH, la concentración de glutatión, etc.

5 Para los enlazantes sensibles al pH, generalmente llamados enlazantes escindibles con ácido, los enlazantes son relativamente estables en el entorno neutro de la sangre (pH 7.3-7.5), pero sufrirán hidrólisis en los endosomas ligeramente ácidos (pH 5.0-6.5) y lisosomas (pH 4.5-5.0). La primera generación de ADC usó principalmente este tipo de enlazantes, como hidrozonas, carbonato, acetal, cetal. Sin embargo, debido a la estabilidad plasmática limitada de los enlazantes escindibles con ácido, los ADC en base a estos enlazantes tienen una semivida relativamente corta (2-3 días). Las bajas semividas, hasta cierto punto, impiden la aplicación de enlazantes sensibles al pH en las nuevas generaciones de ADC.

10 Para los enlazantes sensibles al glutatión, generalmente llamados enlazantes de disulfuro, la liberación se atribuye a la alta concentración intracelular de glutatión en el citoplasma (intervalo milimolar) en comparación con la concentración relativamente baja en la sangre (intervalo micromolar). Esto es especialmente cierto para las células tumorales, donde el estado hipóxico produce una mayor actividad de las enzimas reductoras y, por lo tanto, concentraciones de glutatión aún más altas. Los enlaces disulfuro son termodinámicamente estables y, de este modo, proporcionan una buena estabilidad en plasma.

15 Los enlazantes lábiles a las enzimas, tales como los enlazantes peptídicos, son enfoques alternativos para lograr un mejor control de la liberación del fármaco. El enlace peptídico se escindiría eficazmente mediante proteasas lisosómicas, como la catepsina B o la plasmina, presentes a niveles elevados en ciertos tejidos tumorales. Los enlaces peptídicos se consideran estables cuando circulan en plasma, ya que las proteasas normalmente no son activas fuera de las células debido al pH desfavorable y la inhibición de los inhibidores de la proteasa sérica. Debido a la alta estabilidad plasmática y a la buena selectividad y eficacia de la escisión intracelular, los enlazantes lábiles a las enzimas se seleccionan ampliamente como candidatos de enlazante escindible en ADC. Los enlazantes lábiles a enzimas típicos incluyen Val-Cit (vc), Phe-Lys.

20 El enlazante autoinmolutivo generalmente está situado entre el enlazante escindible y el fármaco citotóxico, o es en sí mismo parte del enlazante escindible. El mecanismo de trabajo para el enlazante autoinmolutivo es que puede sufrir un reordenamiento autoestructural para liberar el fármaco activo cuando el enlazante escindible se corta por la proteasa. Los enlazantes autoinmolutivos generales incluyen alcohol p-aminobencílico (PAB) y β -glucurónido.

Conjugados de anticuerpo fármaco

30 Los conjugados de fármaco de anticuerpo proporcionados en esta invención están compuestos de anticuerpo, enlazante tridentado, enlazante y fármaco. El enlazante se refiere al enlazante escindible y al enlazante no escindible.

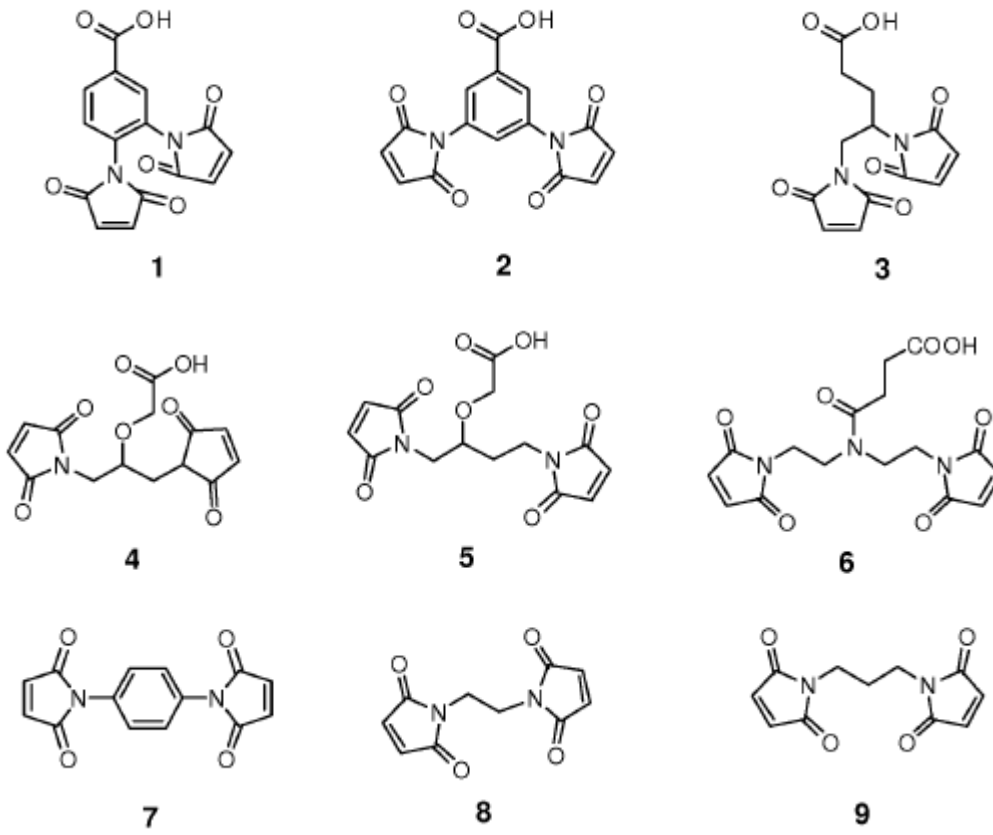
35 Los anticuerpos están compuestos por proteínas globulares, que tienen una serie de aminoácidos que tienen sitios de enlace potenciales para la conjugación de fármacos. Debido a su estructura terciaria y cuaternaria, solo los aminoácidos accesibles al disolvente serán conjugados. De hecho, las conjugaciones de alto rendimiento a los anticuerpos ocurren a través del grupo ϵ -amino de los residuos de lisina o a través del grupo sulfhidrilo de los residuos de cisteína.

La abundancia de cadenas laterales de lisina en la superficie de la proteína proporciona múltiples sitios de enlace para la conjugación de la carga útil, lo que conduce a una mezcla de ADC con diferentes números de carga útil (DAR) y sitios de conjugación.

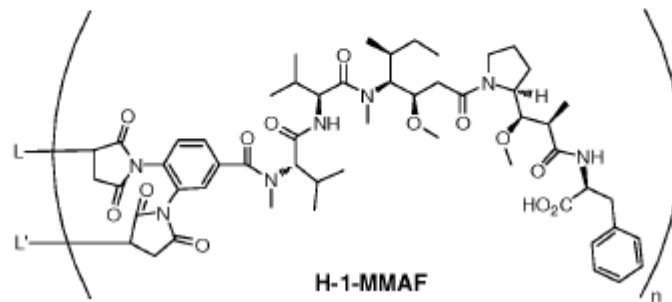
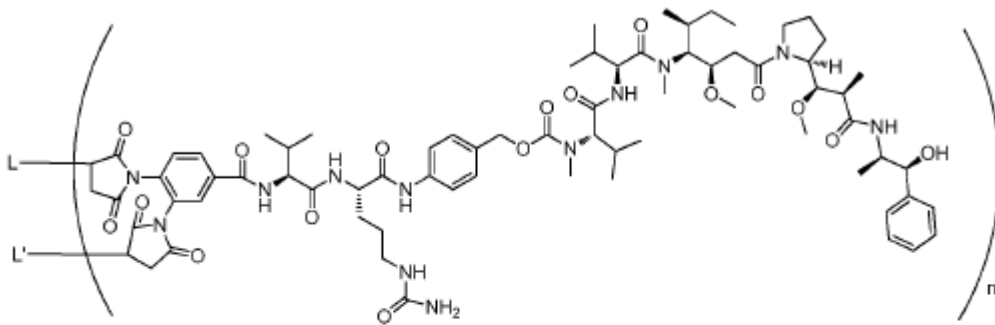
40 Los productos de conjugación proporcionados por la invención, aunque todavía son mezclas, contienen productos con una DAR mucho más estrecha, en comparación con los conjugados de anticuerpo fármaco producidos tradicionalmente. La DAR promedio obtenida de este modo es cercano a 4, dentro de un intervalo de DAR ADC optimizado de 2-4. Además, los productos de conjugación no contienen anticuerpos desnudos (DAR = 0), que tienen una carga útil cero y, de este modo, no son eficaces para la muerte celular. Además, los productos de conjugación no contienen anticuerpos muy conjugados (DAR = 8), que se borran más rápidamente que aquellos con bajos números de DAR. Como resultado, los productos ADC proporcionados en esta invención mostraron una homogeneidad mucho mejor.

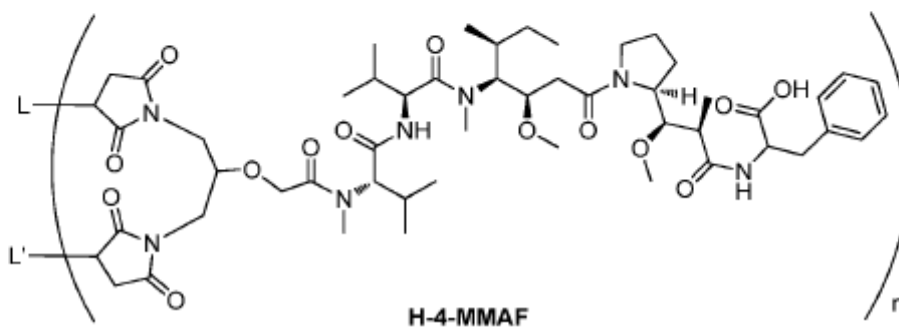
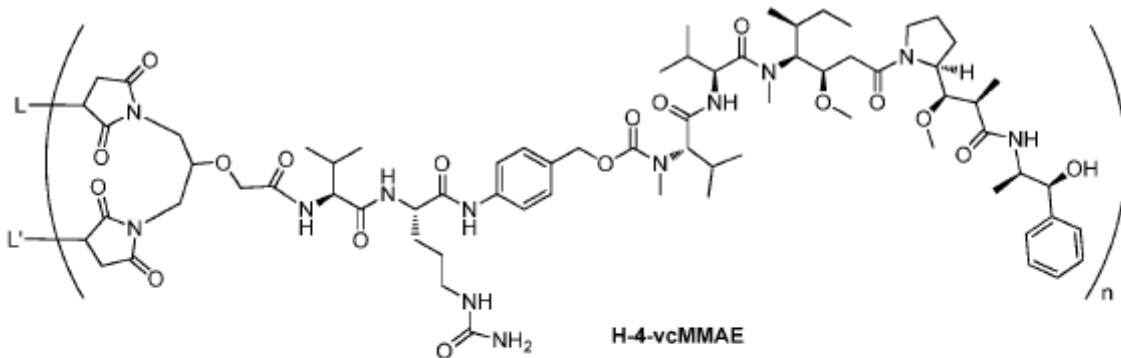
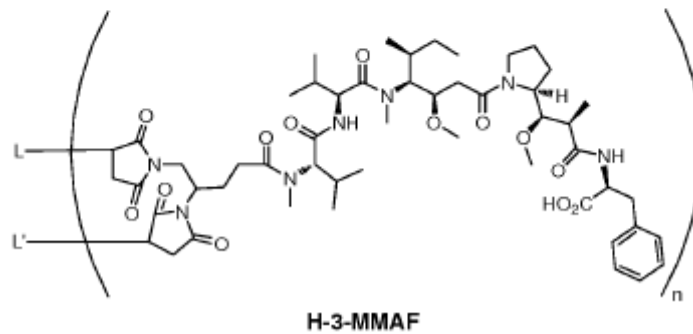
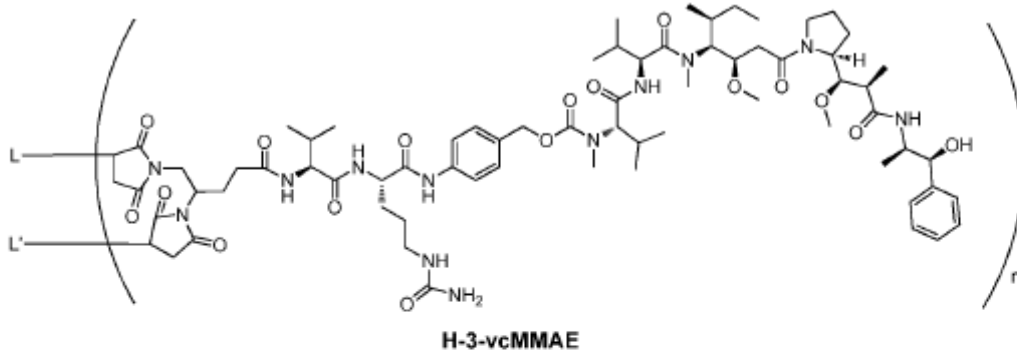
45 Para los enlazantes tridentados, la distancia entre dos grupos maleimida (tamaño del enlazante) puede afectar la reticulación entre cadenas entre los enlazantes tridentados y los anticuerpos. El inventor sintetizó una serie de enlazantes tridentados de diferente tamaño, junto con la forma simplificada de enlazantes tridentados (enlazantes bidentados que no contienen ramas de unión a fármacos). Para descubrir los efectos del tamaño del enlazante en la reticulación de la intercadena de anticuerpos, los productos de conjugación entre estos enlazantes y los anticuerpos reducidos se analizaron mediante SDS-PAGE e HIC.

Enlazantes tridentados y Enlazantes bidentados



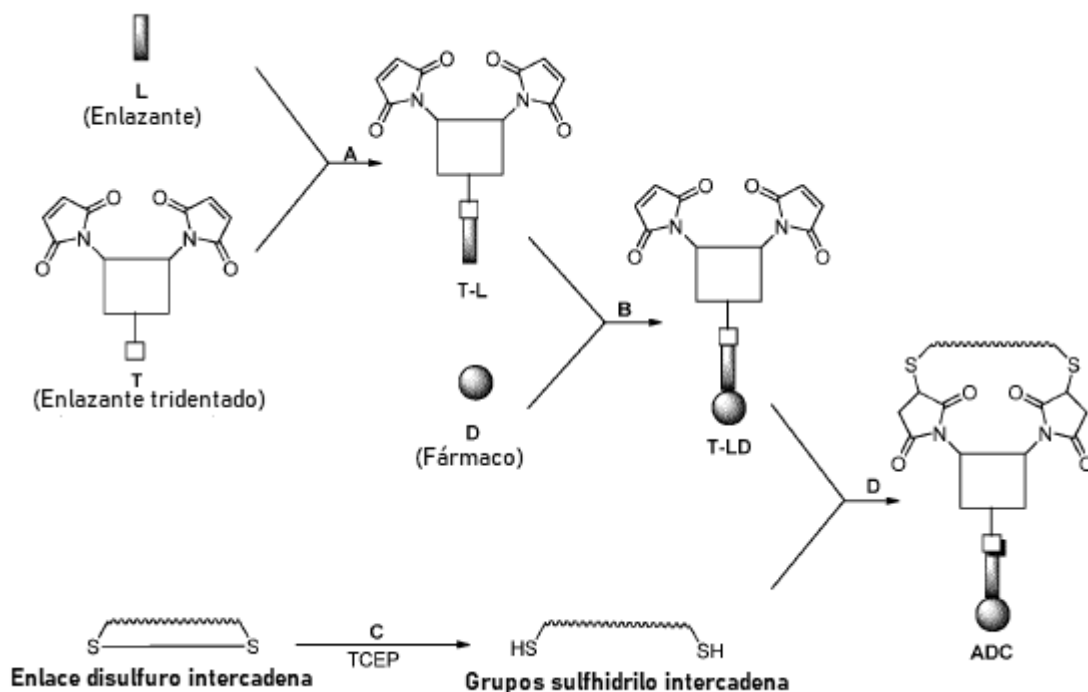
Conjugados de anticuerpo fármaco





Método de preparación

5 El procedimiento de conjugación se muestra en el siguiente esquema. En la etapa A, un enlazante (L) y un enlazante tridentado (T) se conjugaron para proporcionar un enlazante tridentado-enlazante (T-L). En la etapa B, T-L y un fármaco (D) se conjugaron para dar un enlazante tridentado-enlazante-fármaco (T-LD). En la etapa C, los enlaces disulfuro de intercadenas de anticuerpos se redujeron selectivamente para producir un total de ocho grupos sulfhidriilo. En la etapa D, T-LD reticuló los dos grupos sulfhidriilo adyacentes para proporcionar ADC reticulados intercadenas parciales/completas.



Usos

5 La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo fármaco que se dirigen a una población celular especial, se unen a las proteínas específicas de la superficie celular (antígenos), se internalizan con antígeno y liberan los fármacos en formas activas dentro de la célula.

La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo fármaco que se dirigen a una población celular especial, se unen a las proteínas específicas de la superficie celular (antígenos) y tienen efectos; o liberar fármacos fuera de la célula, seguido de la difusión de los fármacos en la célula y tomar efectos.

10 La presente invención proporciona composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un fármaco conjugado y un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona compuestos útiles en métodos para el tratamiento de cánceres u otros tumores en sujetos animales. Los métodos proporcionan una cantidad eficaz de una composición conjugada de fármacos a un sujeto animal con cánceres u otros tumores.

15 La presente invención proporciona compuestos útiles en métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o enfermedades infecciosas. Los métodos proporcionan una cantidad eficaz de una composición conjugada de fármacos a un sujeto animal con enfermedad autoinmune o enfermedad infecciosa.

La presente invención tiene las principales ventajas que se muestran a continuación.

20 1. La presente invención proporciona métodos de acoplamiento aplicables a la mayoría de los anticuerpos, que a su vez pueden evitar la complicada ingeniería de anticuerpos usada para introducir sitios específicos para el acoplamiento. Los métodos de acoplamiento pueden tener una perspectiva de aplicación muy amplia.

25 2. La presente invención proporciona enlazantes tridentados innovadores que pueden acoplar anticuerpos mediante un método químico simple. Aunque los conjugados de anticuerpo fármaco preparados mediante este método no son completamente homogéneos, los conjugados tienen una distribución DAR mucho más estrecha, en comparación con los preparados mediante métodos de acoplamiento tradicionales. Como resultado, la homogeneidad de los productos ADC se mejora considerablemente.

La presente invención se elabora adicionalmente mediante ejemplos.

Las condiciones experimentales no declaradas generalmente están según las condiciones de rutina o las condiciones sugeridas por los fabricantes. A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes, proporciones, proporción o cantidades se calculan en peso.

La unidad % p/v usada en la presente invención es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, significa el peso del soluto en 100 mL de solución.

5 A menos que se defina lo contrario, todos los profesionales y términos científicos usados en la presente invención tienen el mismo significado que los conocidos por los expertos en la materia. Adicionalmente, cualquier método o material similar o igual a los usados en la presente invención se puede aplicar en este documento. Los métodos y materiales optimizados usados en la presente invención solo se usan para ilustración, pero no para limitación.

Los procedimientos generales usados en la presente invención se describen a continuación.

Procedimiento general A

Síntesis de enlazantes tridentados

10 La síntesis de enlazantes tridentados podría referirse a la síntesis de bismaleimidias (Girouard et al. 2005, J. Am. Chem. Soc. 127: 559-566).

Procedimiento general B

Preparación de conjugados anticuerpo enlazante y conjugados de anticuerpo fármaco

15 Se agregó TCEP (10 eq, solución madre 10 mM) a una solución de herceptina (2-10 mg/mL, solución reguladora de borato 25 mM, que contiene NaCl 25 mM y DTPA 1 mM, pH 8.0). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C en un agitador durante 1 h, y luego se enfrió a ~ 10 °C.

A la solución anterior de herceptina reducida enfriada a 10 °C se le agregó DMSO y 5-100 equivalentes enlazante bidentado/tridentado o enlazante tridentado-(enlazante)-fármaco (solución madre en DMSO), y el % v/v de DMSO se controló a ~ 15%. La reacción de conjugación se incubó a 10 °C, durante 1 h.

20 Se agregó un exceso de solución de cisteína a la mezcla de reacción para inactivar el enlazante bidentado/tridentado o enlazante tridentado-(enlazante)-fármaco sin reaccionar. La reacción de inactivación se mantuvo a 10 °C, durante 30 min. La mezcla de reacción se ultrafiltró para eliminar el exceso de cisteína, aductos de enlazante bidentado/tridentado-cisteína o aductos enlazante tridentado-(enlazante)-fármaco-cisteína. La solución residual se filtró estéril a través de un filtro de 0.2 µm y se mantuvo a 4 °C.

25 Procedimiento general C

Análisis de SDS-PAGE

30 Se midió SDS-PAGE en un instrumento de electroforesis Bio-Rad 165-8001. Se combinó una muestra (≥ 10 µg en peso) con la solución reguladora de muestreo correspondiente, y la mezcla se calentó en un baño de agua hirviendo durante 1 minuto. La muestra y la proteína estándar (5 µL/agujero) se agregaron a los agujeros del peine de gel espaciador secuencialmente, y la electroforesis se realizó a 220 V durante 45 minutos. El gel se enjuagó con agua desionizada, y se tiñó con solución azul claro coomassie G250 en un agitador durante 16 h. El gel teñido se enjuagó con agua desionizada tres veces y se destiñó en un agitador durante 2 h. El gel desteñido se transfirió a un generador de imágenes para registrar la imagen del gel.

Procedimiento general D

35 Análisis de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

40 Se midió la HIC en un instrumento Agilent 1100. La columna es columna TSKgel butil-NPR (4.6 X 35 mm, 2.5 µm, Tosoh Bioscience, Shanghai). El método consistió en un gradiente lineal de 100% de solución reguladora A [fosfato de potasio 50 mM, sulfato de amonio 1.5 M, pH 7.0] a 100% de solución reguladora B [80% v/v de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0, 20% v/v de isopropanol] en 25 minutos. La velocidad de flujo se ajustó a 0.8 mL/min, la temperatura se ajustó a 30 °C y se siguió la detección tanto a 230 como a 280 nm.

Procedimiento general E

Ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA)

45 Se usó ELISA indirecto para analizar la capacidad de unión del anticuerpo o el conjugado anticuerpo fármaco con el antígeno correspondiente. El antígeno Her2 se inmovilizó en un soporte de fase sólida (microplaca de 96 pocillos) mediante recubrimiento, y luego el antígeno no unido se eliminó mediante lavado. Se agregaron diluciones en serie del anticuerpo o el conjugado anticuerpo fármaco de prueba, en el que el anticuerpo o el conjugado anticuerpo fármaco específico unido al antígeno y formó complejos antígeno-anticuerpo en fase sólida. El anticuerpo o el conjugado anticuerpo fármaco no unido se eliminó mediante lavado. El anticuerpo marcado con enzima se agregó para unirse al anticuerpo o al conjugado anticuerpo fármaco unido al antígeno. El anti-anticuerpo no unido se eliminó mediante

lavado. Después del lavado, se agregó solución de sustrato para desarrollar color, y la densidad óptica fue leída por un lector de microplacas a 450 nm/630 nm, en base al cual se calculó la EC₅₀.

Procedimiento general F

Ensayo de proliferación celular

5 En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado anticuerpo fármaco se mide: exponiendo las células de mamífero que tienen antígenos asociados a tumores o proteínas receptoras al anticuerpo o al ADC en un medio de cultivo celular; cultivo de las células durante un período de aproximadamente 2 a 5 días; y medir la viabilidad celular. Se usaron ensayos *in vitro* basados en células para medir la viabilidad, esto es, la proliferación (IC₅₀), la citotoxicidad (EC₅₀) y la inducción de apoptosis (activación de caspasa) del ADC.

10 A menos que se indique lo contrario, todos los disolventes anhidros se compraron a los proveedores y se mantuvieron bajo nitrógeno. Todos los demás reactivos y disolventes se compraron con alta pureza y no se purificaron antes de su uso.

El espectro de ¹H RMN se recogió en un instrumento Bruker Avance III de 500 MHz. La unidad de desplazamiento químico (δ) es ppm, y el reactivo de referencia es TMS (δ = 0). La unidad de constante de acoplamiento (J) es Hz.

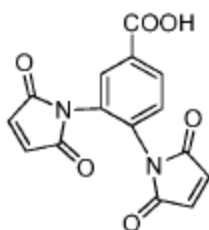
15 El espectro de masas de baja resolución se recogió en espectrómetros de masas Agilent 6110 (método ácido) y 6120B (método base) acoplados con HPLC Agilent 1200. El método de HPLC ácido usa la columna de fase inversa Waters Sunfire C18 (4.60 X 50 mm, 3.5 μm) para la separación, y el gradiente de elución es 5%-95% de B (acetonitrilo, que contiene 0.01% de TFA) en A (agua, que contiene 0.01% de TFA) en 1.4 min. El método de HPLC base usó la columna de fase inversa Waters Xbridge C18 (4.60 X 50 mm, 3.5 μm), y el gradiente de elución es 5% -95% de B (acetonitrilo) en A (agua, que contiene bicarbonato de amonio 10 mM) en 1.5 min. La velocidad de flujo es de 2.0 mL/min, y la temperatura de la columna es de 40 °C.

La purificación por HPLC preparativa se realizó en un instrumento Gilson. Se usó la columna de fase inversa Waters Sunfire C18 (250 X 19 mm, 10 μm) para la separación, y la muestra se eluyó con eluyente en gradiente de agua (que contenía 0.1% de TFA)-acetonitrilo.

25 La célula de cáncer de mama humano SK-BR-3 se adquirió de ATCC. El antígeno Her2 se adquirió de Sino Biological Inc.. El anti-anticuerpo marcado con enzima se adquirió de Sigma (Shanghai). La solución de sustrato se adquirió de Decent Biotech (Shanghai). Kit de recuento celular (CCK-8), el kit de ensayo de proliferación celular y citotoxicidad se adquirió en Dojindo (Shanghai).

Ejemplo 1

30 Preparación del compuesto 1



35 Una solución de ácido 3,4-diaminobenzoico (1.5 g, 9.87 mmol) y anhídrido maleico (2.9 g, 29.6 mmol) en cloroformo (90 mL) se calentó a reflujo durante 20 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, el precipitado de color amarillo se recogió por filtración. El sólido se volvió a suspender en anhídrido acético (75 mL), al que se agregó acetato de sodio (324 mg, 3.95 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C, durante 2 h, y luego se vertió en hielo, seguido de la adición de 150 mL de agua fría. La mezcla se agitó intensamente durante 30 minutos y el disolvente volátil se eliminó mediante rotavapor. El residuo se extrajo con acetato de etilo, y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. La recristalización en acetonitrilo proporcionó un sólido de color blanco (280 mg). LC-MS *m/z* (ES⁺), 313.1 (M+H)⁺; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 8.11 (dd, 1 H), 8.02 (d, 1 H), 7.59 (d, 1 H), 7.19 (s, 2 H), 7.16 (s, 2 H).

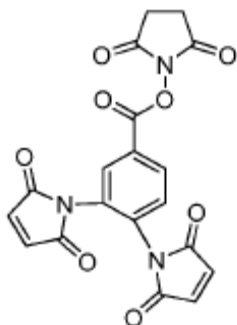
40 Ejemplo 2

Preparación de los compuestos 2, 7, 8 y 9.

La preparación de los compuestos 2, 7, 8 y 9 siguió los métodos en la literatura (procedimiento general A).

Ejemplo 3

Preparación del compuesto 10

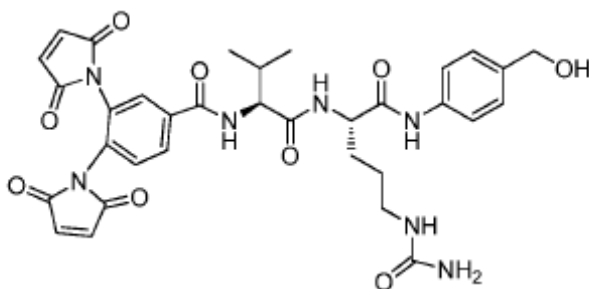


5

A una suspensión del compuesto 1 (62 mg, 0.20 mmol) en THF seco (10 mL) enfriado a 0 °C se agregó N-hidroxisuccinimida (24 mg, 0.21 mmol) y una solución de DCC (50 mg, 0.24 mmol) en THF (2 mL). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C, durante 2 h, y luego se calentó a 25 °C y se agitó durante 12 h. La mezcla se filtró a 0 °C para eliminar el sólido, y el filtrado se concentró para dar un sólido de color blanco (60 mg). El producto en bruto se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS m/z (ES^+), 427.2 ($M+NH_4$)⁺.

Ejemplo 4

Preparación del compuesto 11



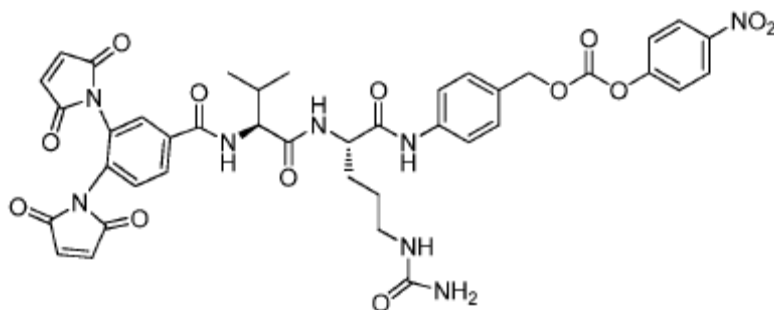
10

A la solución s del compuesto 10 (50 mg, 0.12 mmol) en DMF (2 mL) se le agregó Val-Cit-PABOH (sal de TFA, 80 mg, 0.16 mmol; Bioconjugate Chem. 2002, 13, 855-869) y N, N-diisopropiletilamina (DIEA, 28 μ L, 0.16 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El disolvente se eliminó mediante rotavapor, y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa para dar un tiempo sólido (37 mg). LC-MS m/z (ES^+), 674.3 ($M+H$)⁺.

15

Ejemplo 5

Preparación del compuesto 12

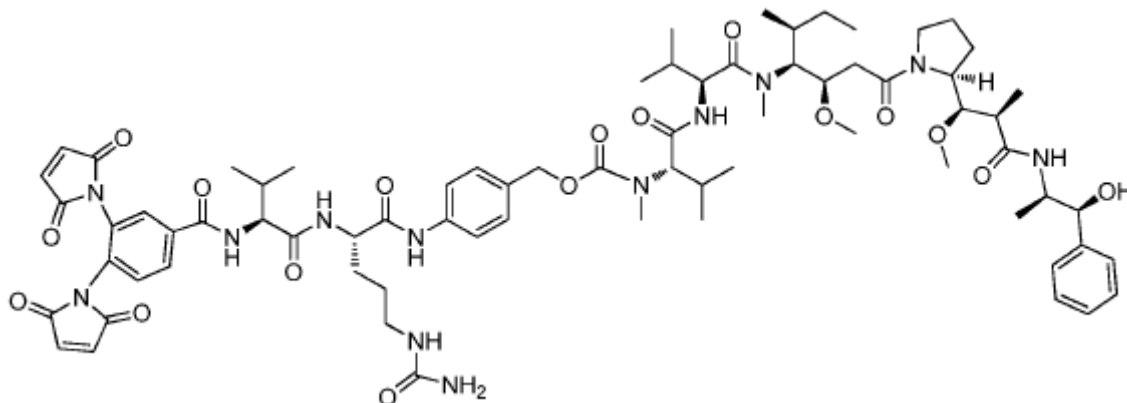


20

A una solución del compuesto 11 (37 mg, 55 μ mol) en DMF (2 mL) se le agregó carbonato de bis (4-nitrofenilo) (33 mg, 110 μ mol) y DIEA (14 μ L, 82 μ mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h, y el disolvente se eliminó mediante rotavapor. El residuo oleoso se trituroó con acetato de etilo (2 mL) para dar un precipitado, y se trituroó adicionalmente con éter dietílico (10 mL). El precipitado se recogió por filtración y se secó para dar un sólido de color amarillo pálido (43 mg). LC-MS m/z (ES^+), 839.3 ($M+H$)⁺.

Ejemplo 6

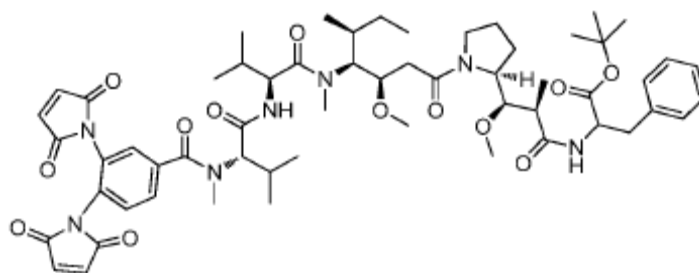
Preparación del compuesto 13



- 5 El compuesto 12 (35 mg, 42 μmol), MMAE (30 mg, 42 μmol ; US 6884869) y N-hidroxibenzotriazol (HOBT, 1.2 mg, 8.0 μmol) se agregaron sucesivamente a DMF seco (2 mL) y piridina (0.4 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se purificó por HPLC preparativa para dar un polvo blanco (12 mg). LC-MS m/z (ES^+), 1417.7 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Ejemplo 7

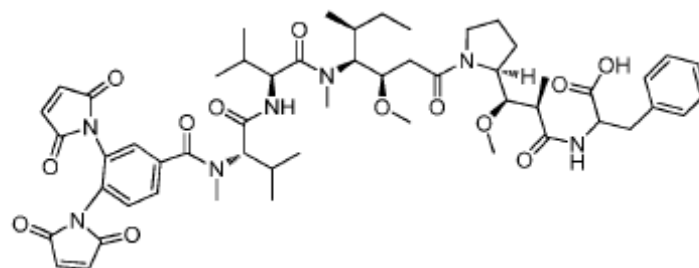
Preparación del compuesto 14



- 10 Se agregó a una solución del compuesto 1 (28 mg, 90 μmol), MMAF-Ot-Bu (45 mg, 57 μmol , US 7964567) y DIEA (31 μL , 0.18 mmol) en DCM (3 mL) hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU, 34 mg, 90 μmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo N_2 durante 3 h. El disolvente se eliminó al vacío, y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, DCM/MeOH 40/1) para dar un aceite incoloro (50 mg). LC-MS m/z (ES^+), 1083.7 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Ejemplo 8

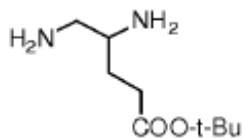
Preparación del compuesto 15



- 20 Se agregó ácido trifluoroacético (TFA, 1 mL) a una solución del compuesto 14 (50 mg, 46 μmol) en DCM (3 mL) enfriado a 0 $^{\circ}\text{C}$. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 h. El disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se purificó por HPLC preparativa para dar un sólido de color blanco (13 mg). LC-MS m/z (ES^+), 1026.5 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Ejemplo 9

Preparación del compuesto 16

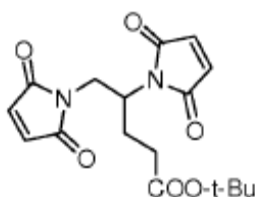


5

Se agregó ácido perclórico (0.22 mL) a una solución de diclorhidrato del ácido (S)-4,5-diaminopentanoico (205 mg, 1 mmol) en acetato de tert-butilo (16 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 22 h. Se agregó bicarbonato de sodio (0.84 g, 10 mmol) para inactivar la reacción, y el disolvente se eliminó a alto vacío (evitar altas temperaturas). El residuo oleoso se trituró con cloroformo y éter dietílico para dar un precipitado. El sólido se recogió por filtración y se secó a alto vacío para dar un sólido de color gris sensible a la humedad (75 mg).

Ejemplo 10

Preparación del compuesto 17



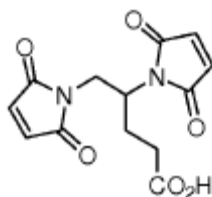
10

El compuesto 16 (75 mg, 0.4 mmol) y anhídrido maleico (86 mg, 0.88 mmol) se agregaron sucesivamente a DMF (5 mL), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se agregaron anhídrido acético (5 mL), trietilamina (TEA, 167 μ L, 1.2 mmol) y tetrahidrato de acetato de níquel (catalítico), y la mezcla de reacción se agitó a 90 $^{\circ}$ C, durante 2 h. El disolvente volátil se eliminó al vacío y el producto se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con carbonato de sodio saturado, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo 4/1) para dar un aceite incoloro (33 mg). LC-MS m/z (ES^+), 366.3 ($M+NH_4^+$); 1H RMN ($CDCl_3$) δ 6.65 (s, 2 H), 6.64 (s, 2 H), 4.21-4.18 (m, 1 H), 4.05 (dd, 1 H), 3.67 (dd, 1 H), 2.41-2.37 (m, 1 H), 2.24-2.13 (m, 2 H), 2.11-2.05 (m, 1 H), 1.43 (s, 9 H).

15

Ejemplo 11

Preparación del compuesto 3



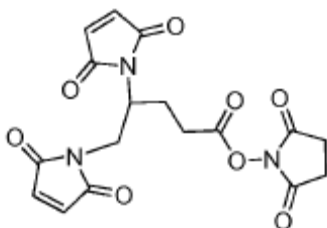
20

A una solución del compuesto 17 (80 mg, 0.43 mmol) en DCM (6 mL) se le agregó TFA (3 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se concentró. El residuo se purificó por HPLC preparativa para dar un sólido de color blanco (41 mg). LC-MS m/z (ES^+), 291.0 ($M-H^+$); 1H RMN ($CDCl_3$) δ 6.67 (s, 4 H), 4.23-4.18 (m, 1 H), 4.04 (dd, 1 H), 3.69 (dd, 1 H), 2.49-2.42 (m, 1 H), 2.34 (t, 2 H), 2.15-2.09 (m, 1 H).

25

Ejemplo 12

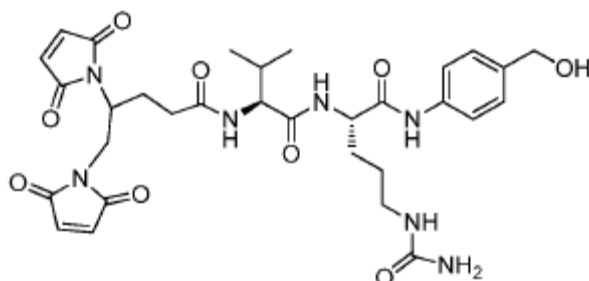
Preparación del compuesto 18



El compuesto 18 se preparó a partir del compuesto 3, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 3. LC-MS m/z (ES⁺), 389.8 (M+H)⁺.

Ejemplo 13

Preparación del compuesto 19

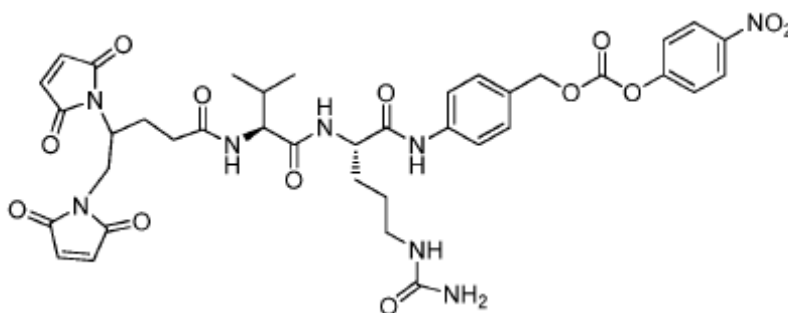


5

El compuesto 19 se preparó a partir del compuesto 18, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 4. LC-MS m/z (ES⁺), 654.8 (M+H)⁺.

Ejemplo 14

Preparación del compuesto 20

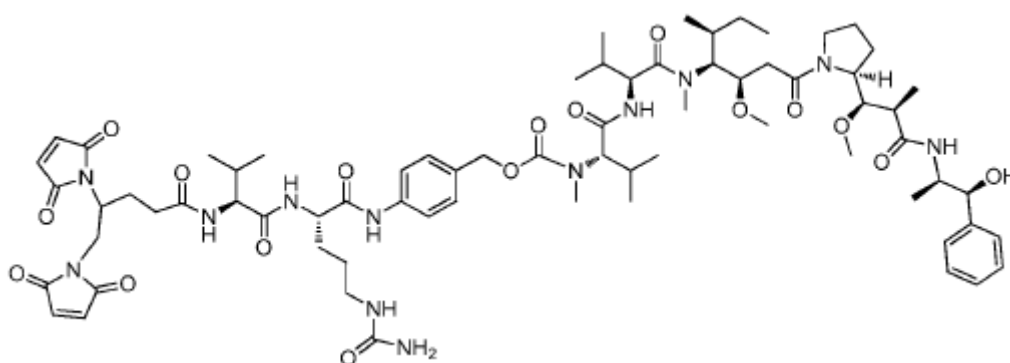


10

El compuesto 20 se preparó a partir del compuesto 19, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 5. LC-MS m/z (ES⁺), 819.3 (M+H)⁺.

Ejemplo 15

Preparación del compuesto 21

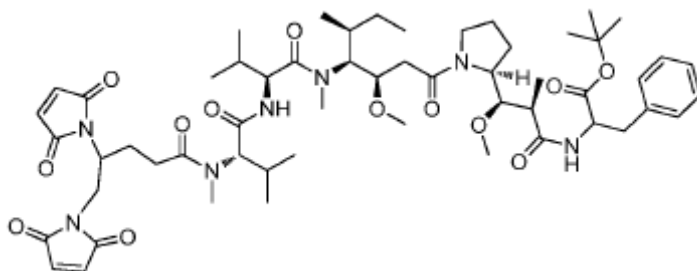


15

El compuesto 21 se preparó a partir del compuesto 20, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 6. LC-MS m/z (ES⁺), 1397.7 (M+H)⁺.

Ejemplo 16

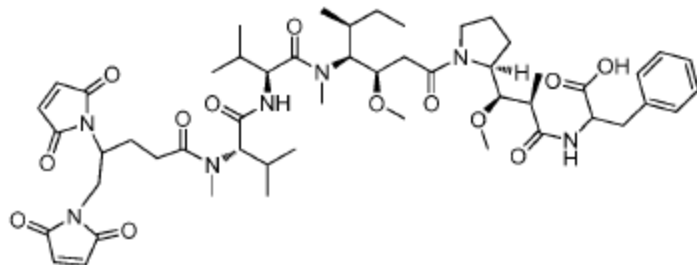
Preparación del compuesto 22



El compuesto 22 se preparó a partir del compuesto 3, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 7. LC-MS m/z (ES^+), 1063.7 ($M+H$)⁺.

Ejemplo 17

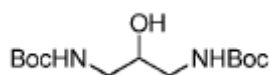
5 Preparación del compuesto 23



El compuesto 23 se preparó a partir del compuesto 22, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 8. LC-MS m/z (ES^+), 1006.4 ($M+H$)⁺.

Ejemplo 18

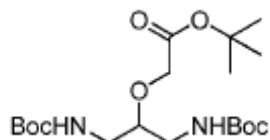
10 Preparación del compuesto 24



El compuesto 24 se preparó según el método de la literatura (Chem. Eur. J. 2004, 10, 1215-1226).

Ejemplo 19

Preparación del compuesto 25



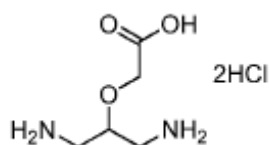
15

Se agregó acetato de bromo tert-butilo (5.4 mL, 33.5 mmol) a una solución del compuesto 24 (3.9 g, 13.4 mmol) en THF seco (4 mL). Se agregó hidruro de sodio (60% en peso en aceite mineral, 2.42 g, 60.5 mmol) en porciones en 1 h. La mezcla de reacción se agitó durante 5 h y se filtró a través de celite. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo 10/1 a 5/1) para dar un sólido de color blanco (3.9 g). LC-MS m/z (ES^+), 315.1 ($M+H$)⁺.

20

Ejemplo 20

Preparación del compuesto 26

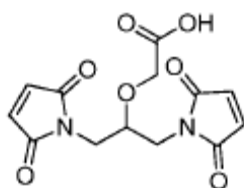


5

A una solución del compuesto 25 (1.0 g, 2.5 mmol) en 1,4-dioxano (10 mL) se agregó HCl conc. (5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El disolvente se eliminó a vacío para proporcionar un sólido de color blanco (570 mg). El producto en bruto se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS m/z (ES^+), 149.2 ($M+H$)⁺.

Ejemplo 21

Preparación del compuesto 4



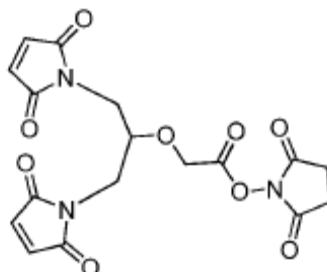
10

A una solución del compuesto 26 (250 mg, 1.1 mmol) en bicarbonato de sodio saturado/THF (1: 1 v/v, 20 mL) enfriado a 0 °C se le agregó N-metoxicarbonil-maleimida (526 mg, 3.4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C, durante 10 min, se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 3 h. La solución se acidificó con HCl conc. a pH 2-3, y se extrae con acetato de etilo (50 mL X 2). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (20 mL), se secó y se concentró. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el producto (91 mg). LC-MS m/z (ES^+), 149.2 ($M+H$)⁺. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 7.04 (s, 4 H), 3.97 (s, 2 H), 3.76-3.73 (m, 1 H), 3.49-3.47 (m, 4H).

15

Ejemplo 22

Preparación del compuesto 27

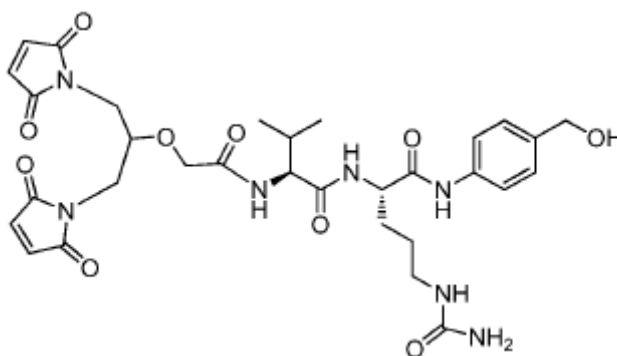


El compuesto 27 se preparó a partir del compuesto 4, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 3.

Ejemplo 23

20

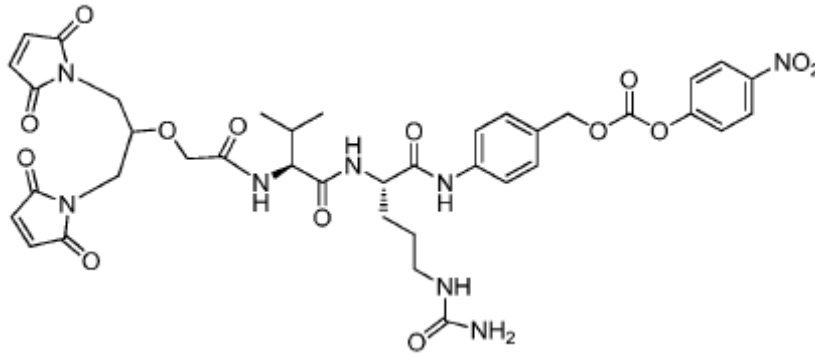
Preparación del Compuesto 28



El compuesto 28 se preparó a partir del compuesto 27, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 4. LC-MS m/z (ES⁺), 670.3 (M+H)⁺.

Ejemplo 24

Preparación del Compuesto 29

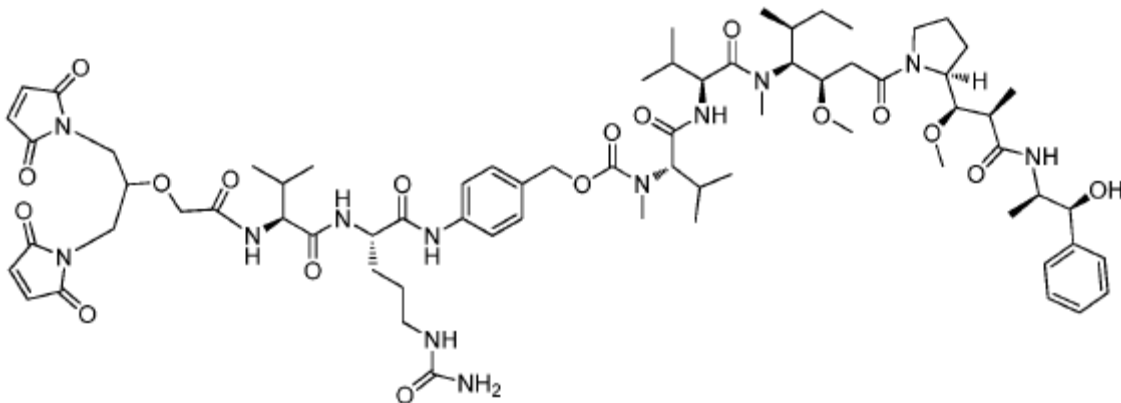


5

El compuesto 29 se preparó a partir del compuesto 28, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 5. LC-MS m/z (ES⁺), 835.2 (M+H)⁺.

Ejemplo 25

Preparación del compuesto 30

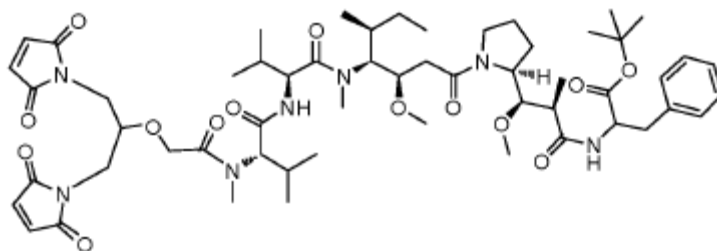


10

El compuesto 30 se preparó a partir del compuesto 29, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 6. LC-MS m/z (ES⁺), 707.5 1/2(M+H)⁺.

Ejemplo 26

Preparación del compuesto 31

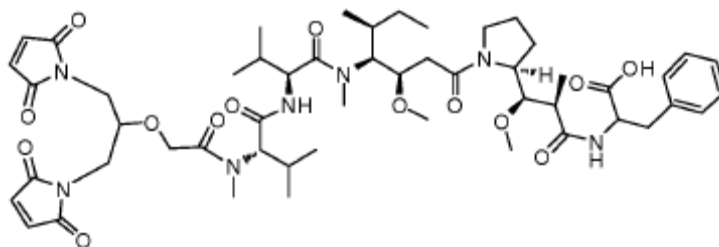


15

El compuesto 31 se preparó a partir del compuesto 4, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 7. LC-MS m/z (ES⁺), 1078.3 (M+H)⁺.

Ejemplo 27

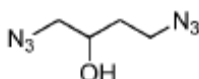
Preparación del compuesto 32



El compuesto 32 se preparó a partir del compuesto 31, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 8. LC-MS m/z (ES⁺), 1022.3 (M+H)⁺.

5 Ejemplo 28

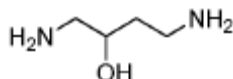
Preparación del compuesto 33



El compuesto 33 se preparó según el método de la literatura (Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003, 13, 3267-3271).

Ejemplo 29

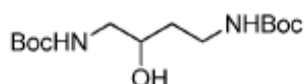
10 Preparación del compuesto 34



Una solución del compuesto 33 (1.0 g, 6.4 mmol) y trifetilfosfina (4.0 g, 15.4 mmol) en THF (20 mL) y agua (0.4 mL) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se filtró para eliminar el sólido, y el filtrado se repartió entre éter dietílico y agua. La fase acuosa se liofilizó para proporcionar un gel incoloro (580 mg).

15 Ejemplo 30

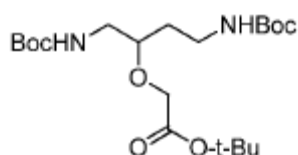
Preparación del compuesto 35



El compuesto 35 se preparó a partir del compuesto 34, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 18. LC-MS m/z (ES⁺), 327.2 (M+Na)⁺.

20 Ejemplo 31

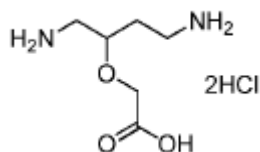
Preparación del compuesto 36



El compuesto 36 se preparó a partir del compuesto 35, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 19.

Ejemplo 32

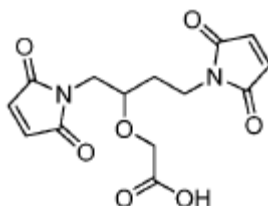
Preparación del compuesto 37



El compuesto 37 se preparó a partir del compuesto 36, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 20

Ejemplo 33

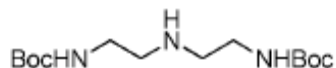
5 Preparación del compuesto 5



El compuesto 5 se preparó a partir del compuesto 37, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 21. LC-MS m/z (ES^+), 323.1 ($M+H$) $^+$. 1H RMN ($CDCl_3$) δ 6.75 (s, 2 H), 6.71(s, 2 H), 4.23 (s, 2 H), 3.72-3.68 (m, 4 H), 3.64-3.60 (m, 1 H), 1.81-1.76 (m, 2 H).

10 Ejemplo 34

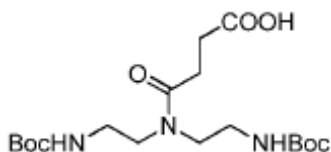
Preparación del compuesto 38



El compuesto 38 se preparó según el método de la literatura (Org. Lett. 2000, 2, 14.)

Ejemplo 35

15 Preparación del compuesto 39

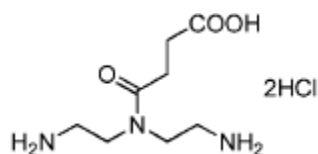


Se agregó anhídrido succínico (0.66 g, 6.6 mmol) a una solución del compuesto 38 (2.0 g, 6.6 mmol) en DCM (30 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El disolvente se eliminó al vacío, y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, DCM/MeOH 20/1) para proporcionar un sólido de color blanco (1.9 g). LC-MS m/z (ES^+), 426.2 ($M+Na$) $^+$.

20

Ejemplo 36

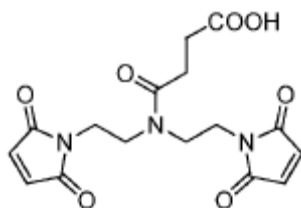
Preparación del compuesto 40



El compuesto 40 se preparó a partir del compuesto 39, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 20.

Ejemplo 37

Preparación del compuesto 6



- 5 El compuesto 6 se preparó a partir del compuesto 40, mediante el procedimiento de síntesis similar al del ejemplo 21. ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ 7.04 (s, 2 H), 6.96 (s, 2 H), 3.59 (t, 2 H), 3.53 (t, 2 H), 3.42-3.39 (m, 4 H), 2.33 (s, 4 H).

Ejemplo 38

La conjugación del anticuerpo con el enlazante 1, 7, 8 y 9 se llevó a cabo según el procedimiento general B. La figura 2 muestra los efectos del tamaño y la flexibilidad del enlazante en la conjugación anticuerpo-enlazante.

Ejemplo 39

- 10 Preparación del conjugado anticuerpo fármaco H-1-vcMMAE

La preparación de ADC H-1-vcMMAE se realizó según el procedimiento general B.

Ejemplo 40

Preparación del conjugado anticuerpo fármaco H-1-MMAF

La preparación de H-1-MMAF se realizó según el procedimiento general B.

- 15 Ejemplo 41

Preparación del conjugado anticuerpo fármaco H-3-vcMMAE

La preparación de ADC H-1-vcMMAE se realizó según el procedimiento general B.

Ejemplo 42

Preparación del conjugado anticuerpo fármaco H-3-MMAF

- 20 La preparación de H-3-MMAF se realizó según el procedimiento general B.

Ejemplo 43

Preparación del conjugado anticuerpo fármaco H-4-vcMMAE

La preparación de ADC H-4-vcMMAE se realizó según el procedimiento general B.

Ejemplo 44

- 25 Preparación del conjugado anticuerpo fármaco H-4-MMAF

La preparación de H-4-MMAF se realizó según el procedimiento general B.

Ejemplo 45

ELISA

- 30 La unión de herceptina y conjugados anticuerpo fármaco en base a herceptina con el antígeno Her2 se midió por ELISA según el procedimiento general E (Tabla 1). En comparación con la herceptina, los ADC en base a H mostraron una capacidad de unión a antígeno comparable.

Tabla 1

Muestra	Afinidad de unión (EC_{50} , ng/mL)
Herceptina	32.5

H-1-vcMMAE	65.1
H-1-MMAF	37.7
H-3-vcMMAE	95.5
H-3-MMAF	32.3
H-4-vcMMAE	35.9
H-4-MMAF	23.3

Ejemplo 46

Ensayo de proliferación celular

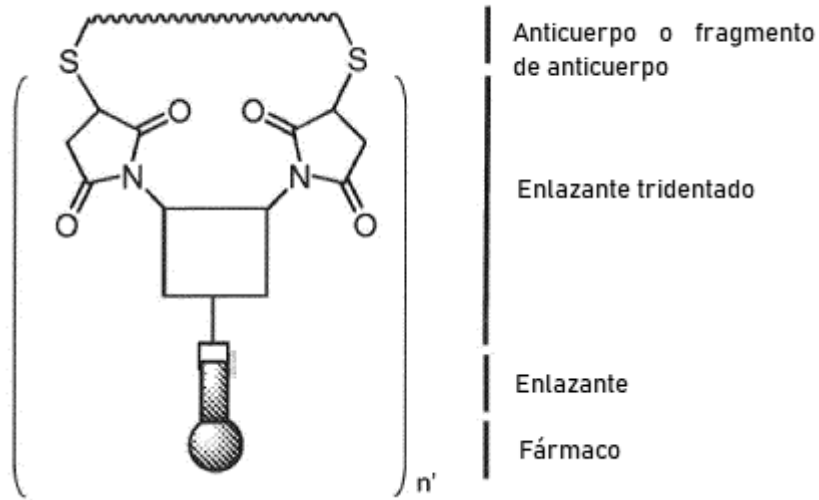
5 La potencia de los ADC en base a herceptina y herceptina se midió mediante un ensayo de inhibición de la proliferación celular en la línea celular de cáncer de mama humano (SK-BR-3) según el procedimiento general F (Tabla 2).

Tabla 2

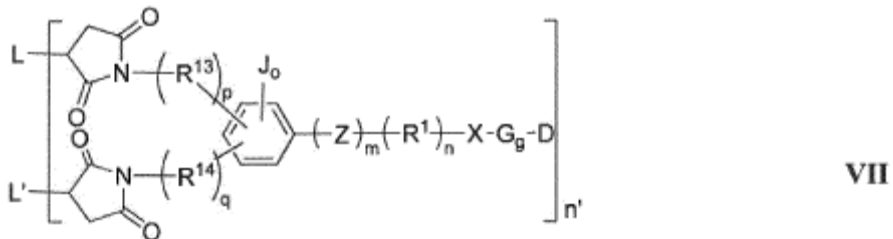
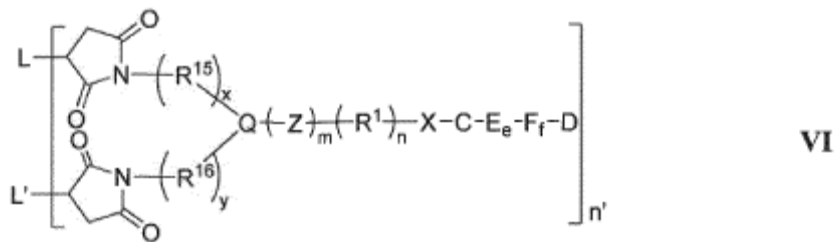
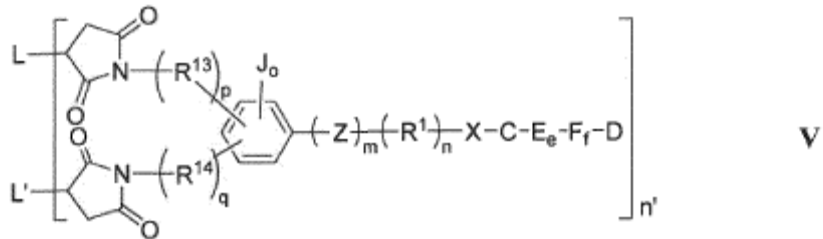
Muestra	Citotoxicidad (IC ₅₀ , ng/mL)
Herceptina	128
H-1-vcMMAE	6.7
H-1-MMAF	81.1
H-3-vcMMAE	7.1
H-3-MMAF	10.0
H-4-vcMMAE	10.1
H-4-MMAF	15.2

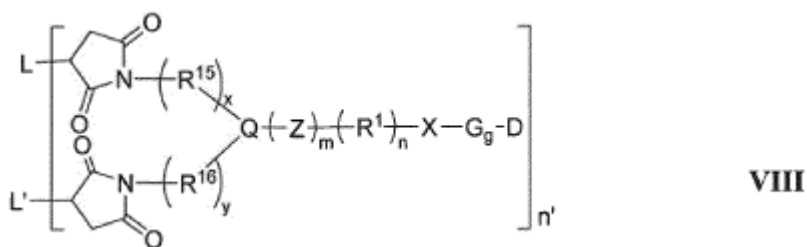
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de anticuerpo fármaco (ADC) compuesto por un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, enlazante tridentado, enlazante y fármaco del esquema general



5 en el que dicho ADC es de fórmula V, VI, VII o VIII:





5 en el que D es una parte del fármaco; en el que C es un enlazante escindible; E es un enlazante autoinmolativo, F es un enlazante autoinmolativo opcional; e o f es un número entero de 0-5; G es un enlazante no escindible; g es un número entero de 0-5; n' es un número entero de 1-8; y en el que L' y L son parte del mismo anticuerpo o fragmento de anticuerpo;

Z es O, S, NR², C(=O)O, C(=O)NR³, C(=S)O, C(=S)NR⁴, C(=S)S, NR⁵C(=O)NR⁶, NR⁷C(=S)NR⁸, o OC(=O)NR⁹; en el que m es 0 o 1;

R¹ es una cadena de alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, poli(etilenglicol), o cualquier combinación de los mismos; n es un número entero de 0-8;

10 R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo; X es -NR¹⁰-, -O-, -S-, -C(=O)-, -C(=S)-, -NR¹¹C(=O)-, -NR¹²C(=S)-, -OC(=O)-, o

-OC(=S)-; en el que R¹⁰, R¹¹ y R¹² se seleccionan independientemente

de H, alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo;

15 J es un grupo de sustitución, que incluye H, halógeno, nitro, ciano, hidroxilo, alcoxi, amino, amida, éster, sulfamida, urea, alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo;

o es 0, 1, 2 o 3;

R¹³, R¹⁴, R¹⁵ y R¹⁶ se seleccionan independientemente de alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, o cualquier combinación de los mismos;

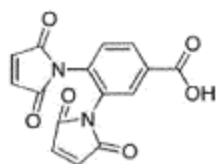
20 Q es N o CR¹⁷; R¹⁷ se selecciona independientemente de H, alquilo lineal, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alqueno, alquino, arilo y heteroarilo;

p, q es un número entero de 0-8; x, y es un número entero de 0-8, y x + y ≥ 1.

2. El conjugado del fármaco de anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se dirige a receptores de superficie celular o antígenos relacionados con tumor.

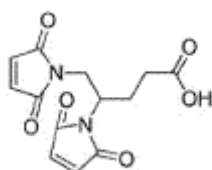
25 3. El conjugado de anticuerpo fármaco de la reivindicación 1 o 2, en el que el fármaco es fármaco citotóxico, fármaco de enfermedad autoinmune o fármaco contra la inflamación.

4. Un enlazante tridentado de fórmula 1:



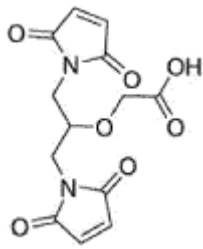
1

5. Un enlazante tridentado de fórmula 3:



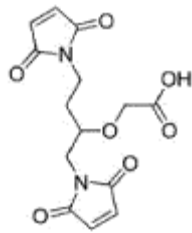
3

30 6. Un enlazante tridentado de fórmula 4:



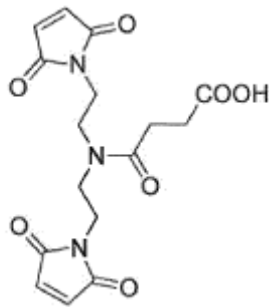
4

7. Un enlazante tridentado de fórmula 5:



5

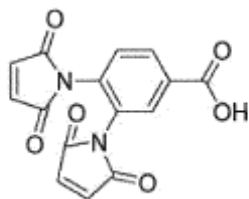
8. Un enlazante tridentado de fórmula 6:



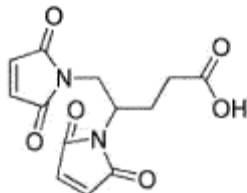
6

5

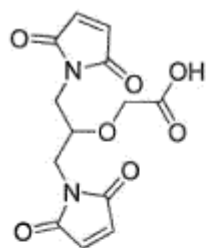
9. El uso de un enlazante tridentado en la preparación de un conjugado anticuerpo fármaco, en el que el enlazante tridentado es como se representa por las fórmulas 1, 3, 4, 5 o 6:



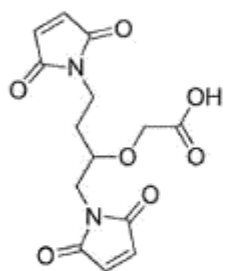
1



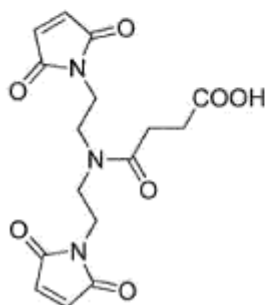
3



4



5



6

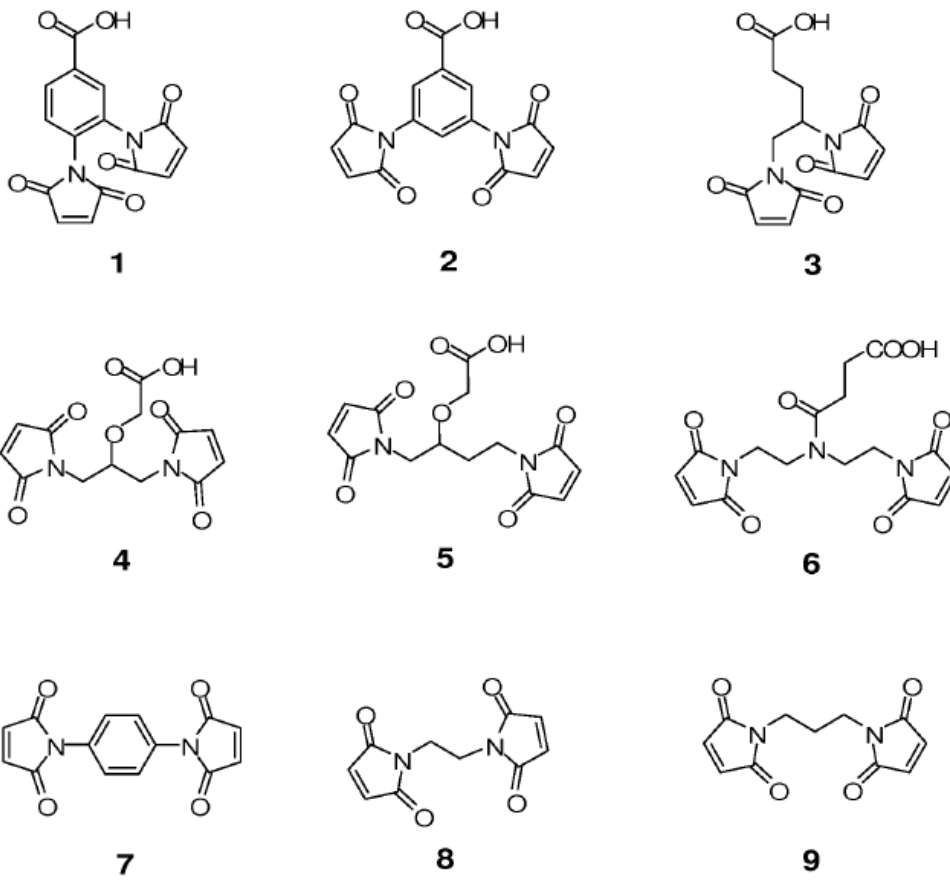


Fig. 1

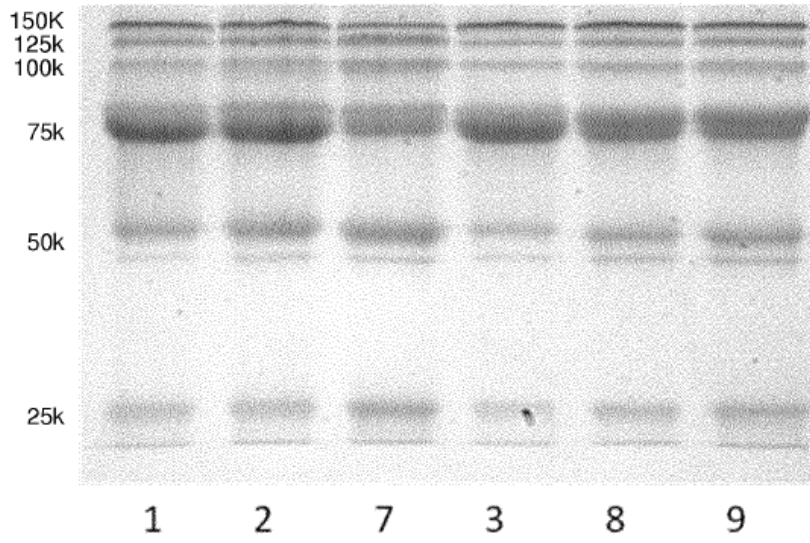


Fig. 2A

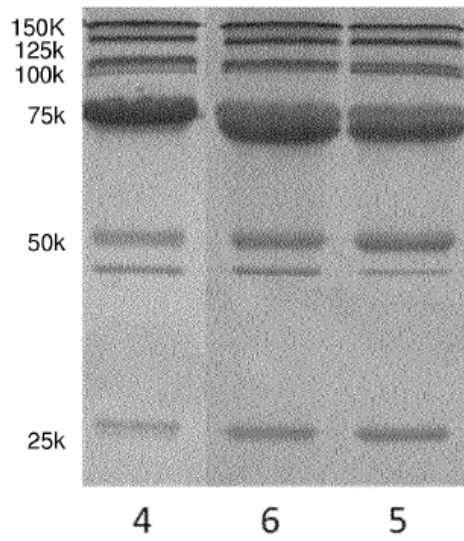


Fig. 2B

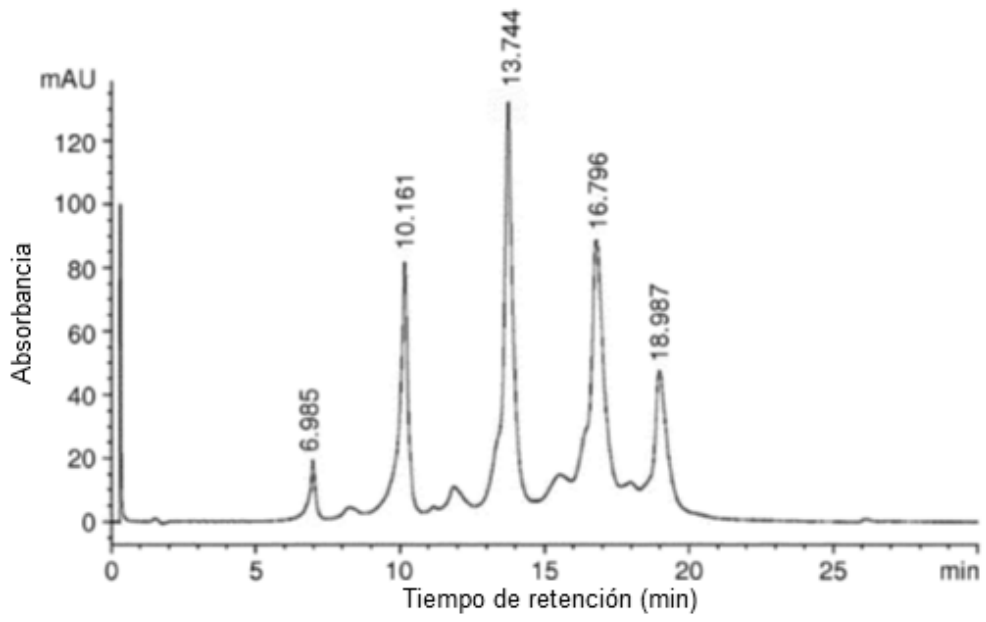


Fig. 3A

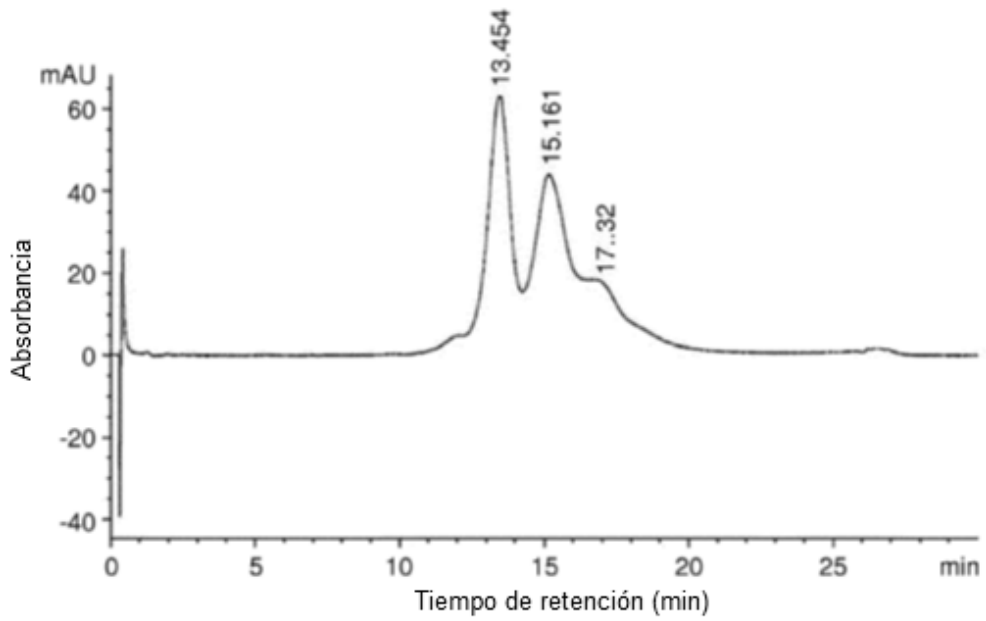


Fig. 3B

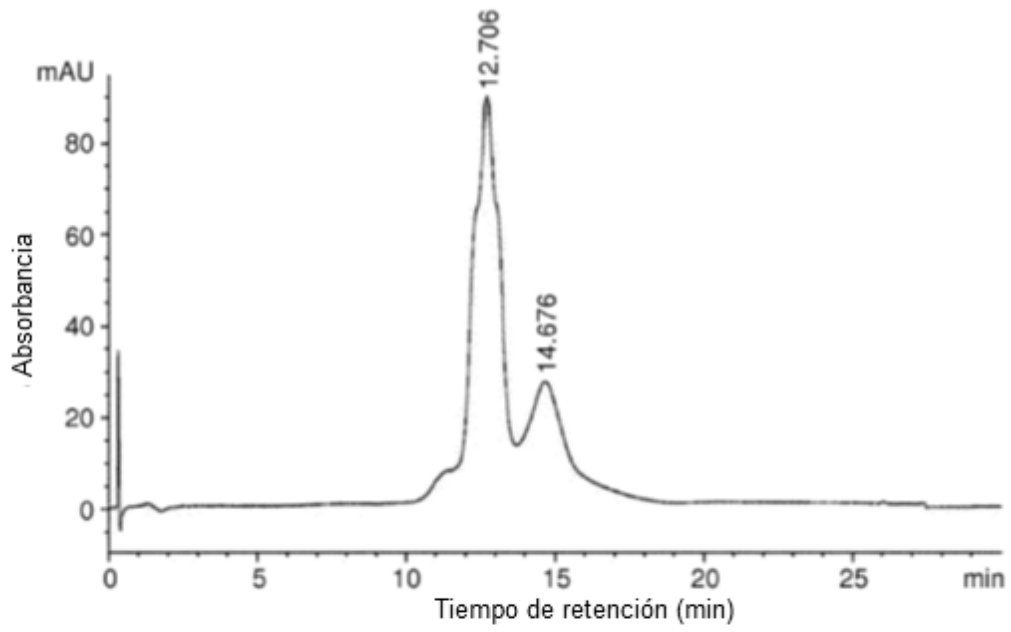


Fig. 3C

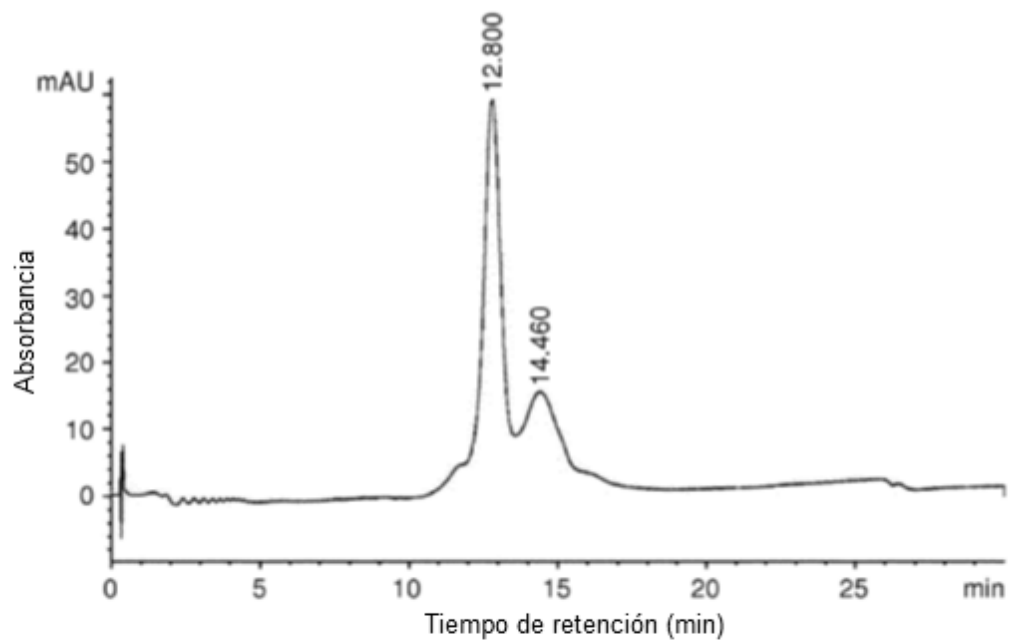


Fig. 3D

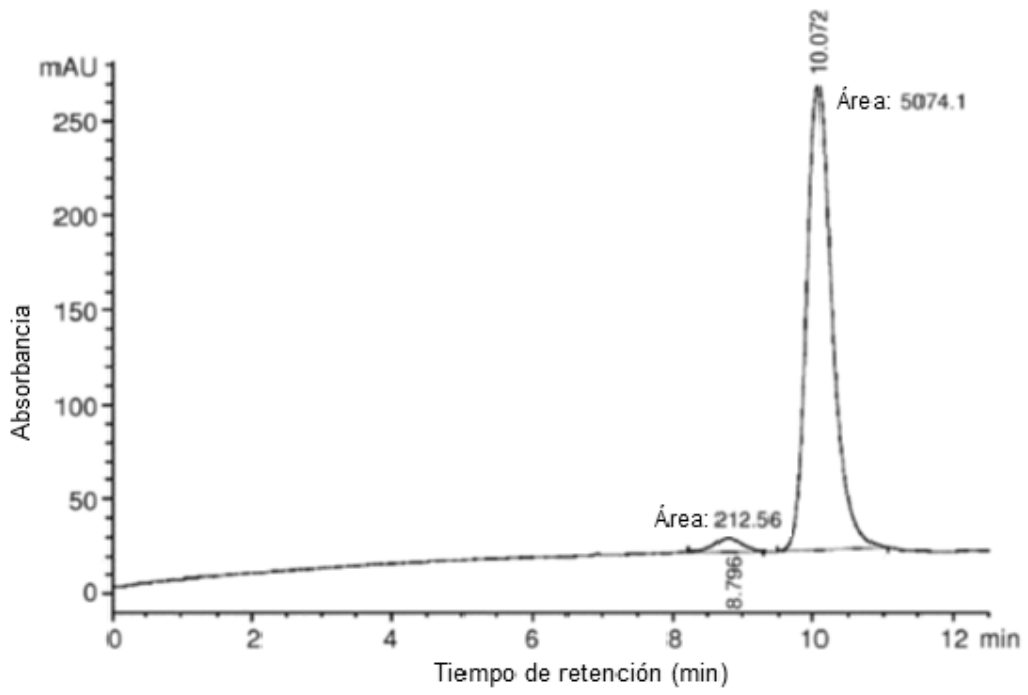


Fig. 4A

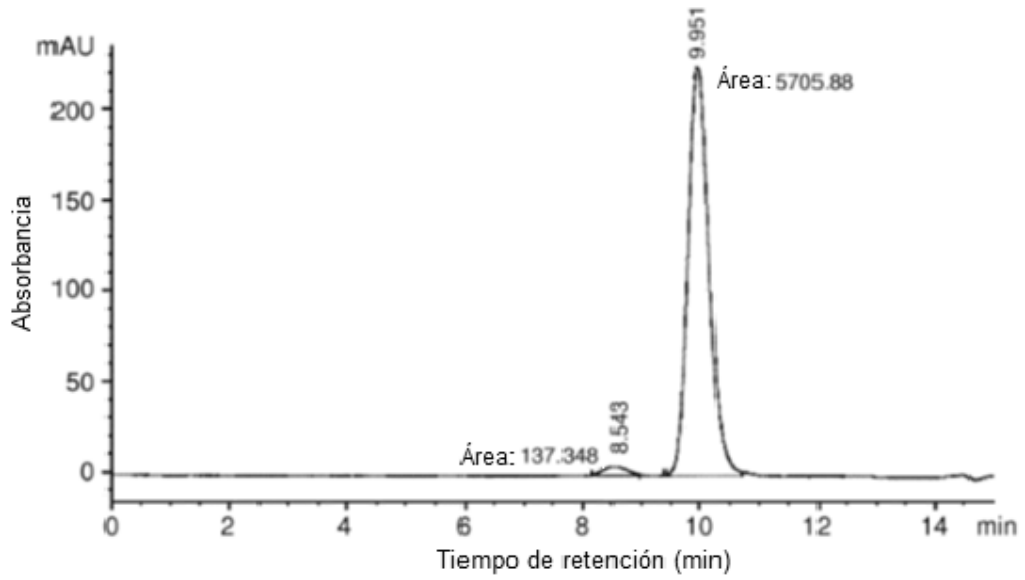


Fig. 4B

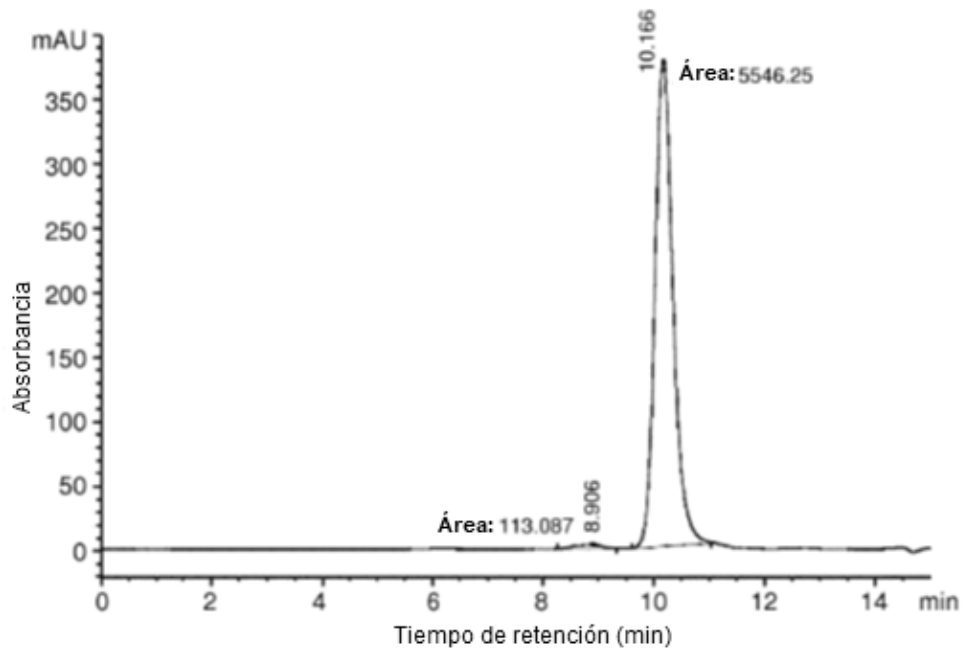


Fig. 4C

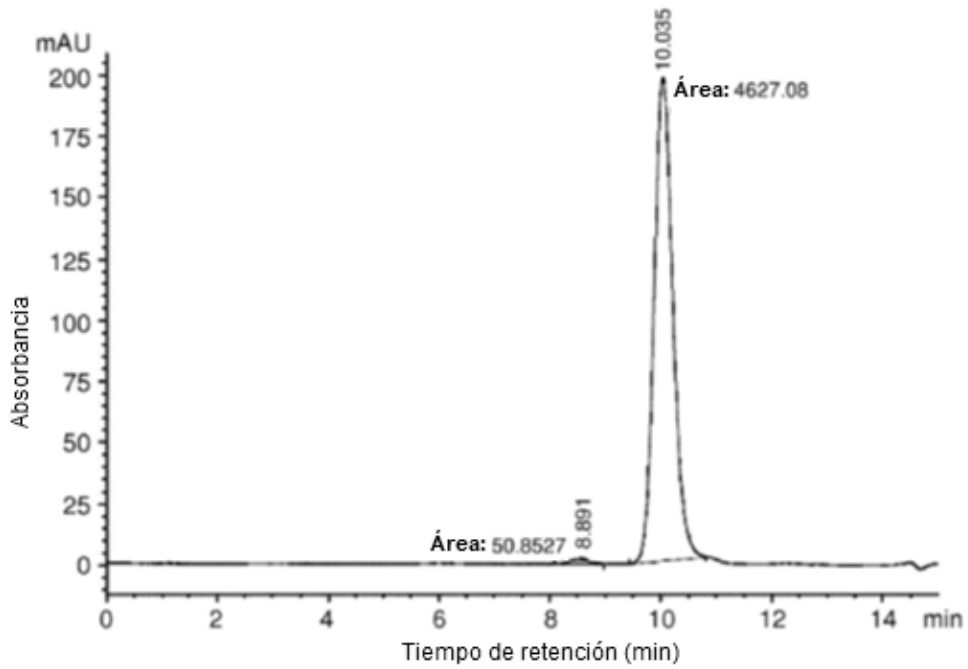


Fig. 4D

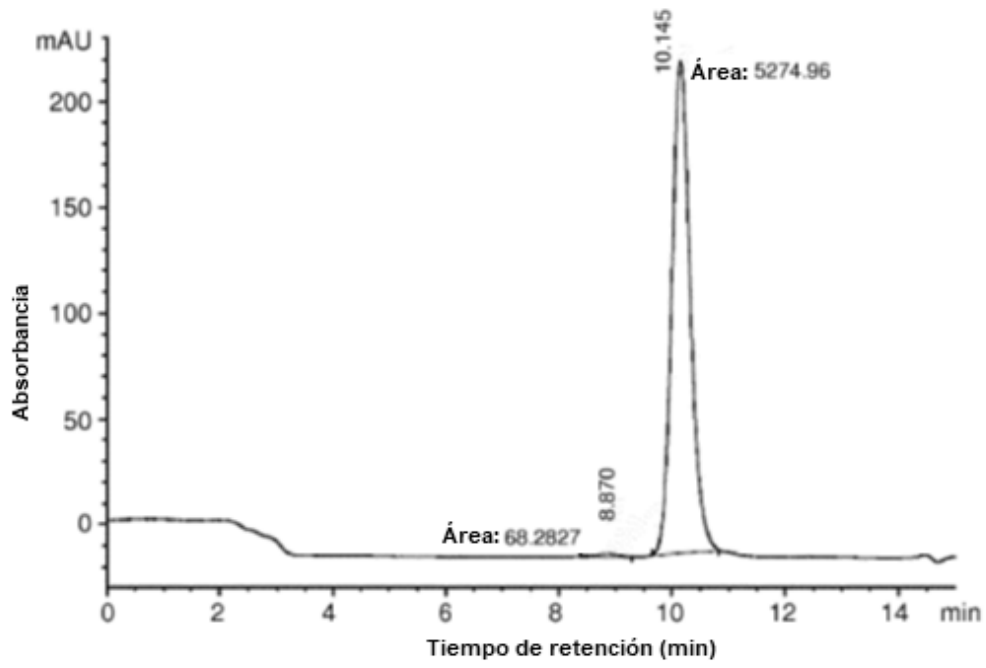


Fig. 4E

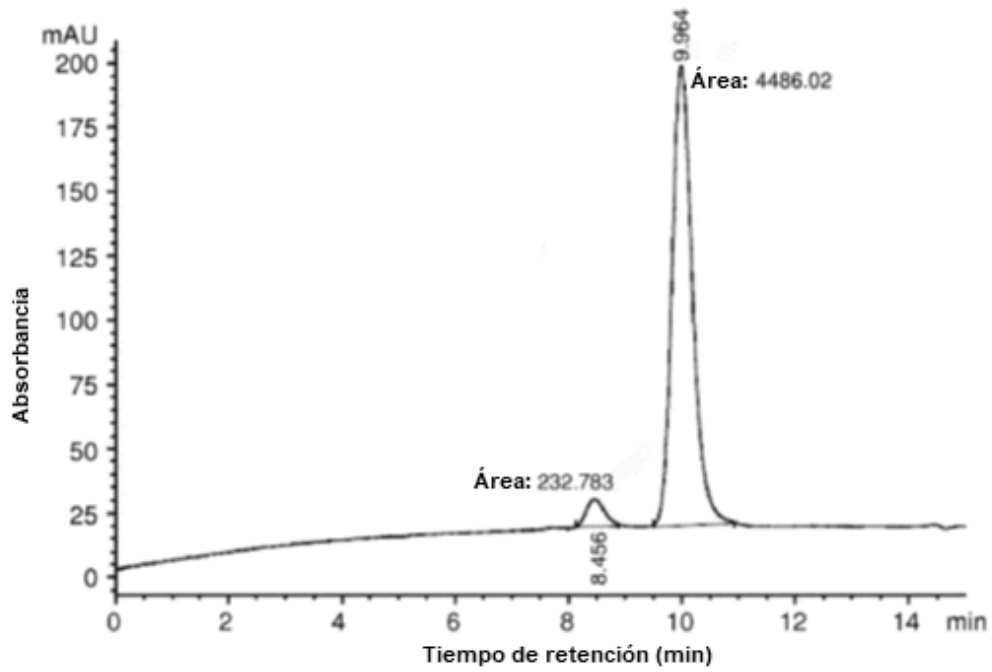


Fig. 4F

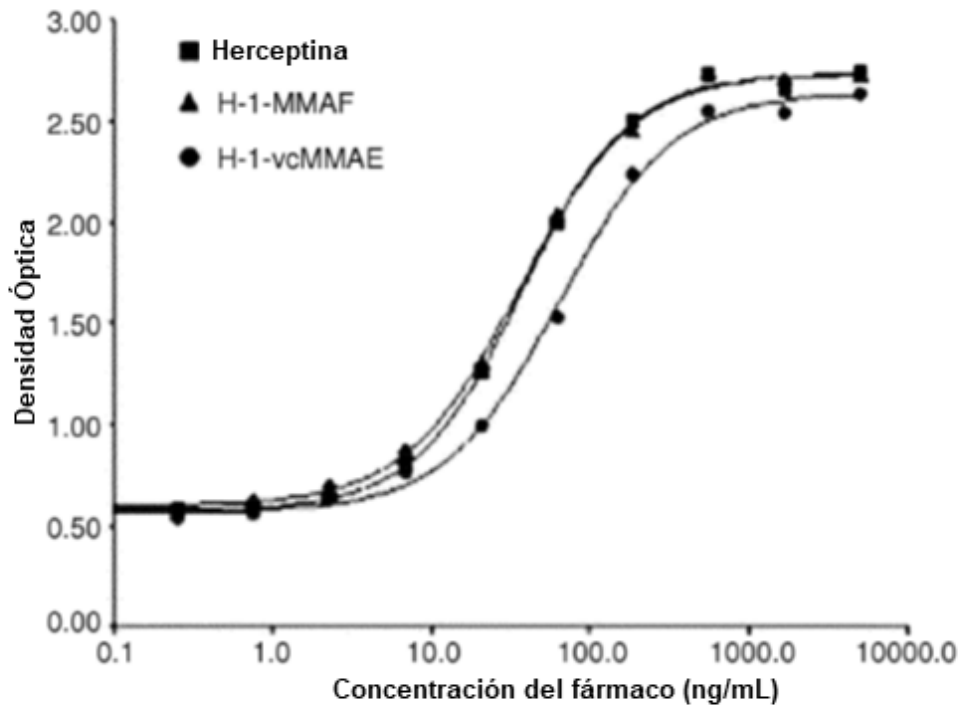


Fig. 5A

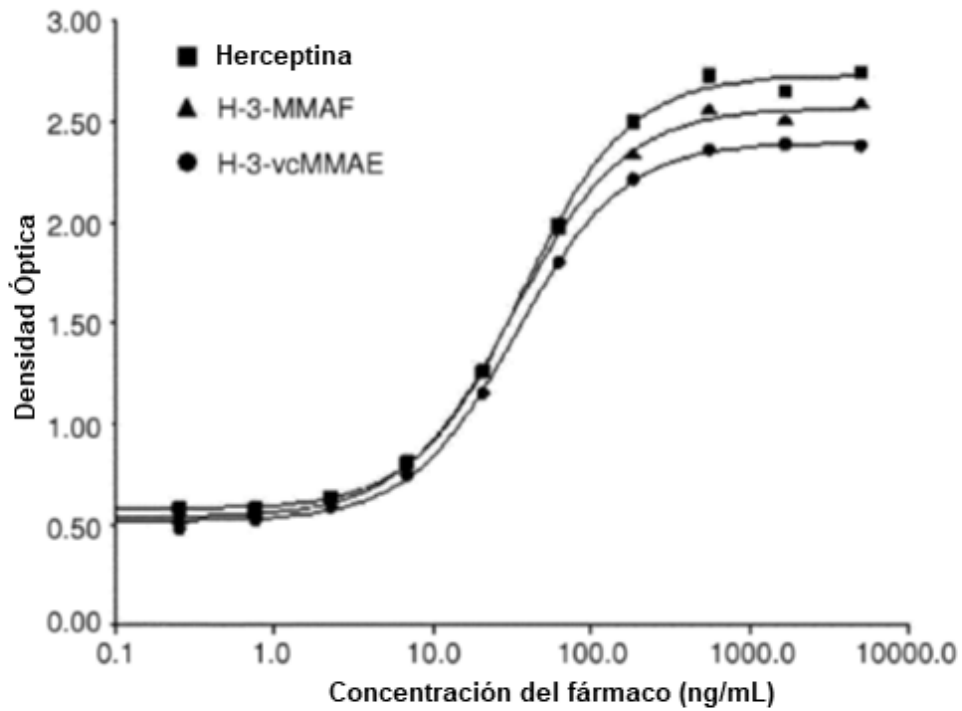


Fig. 5B

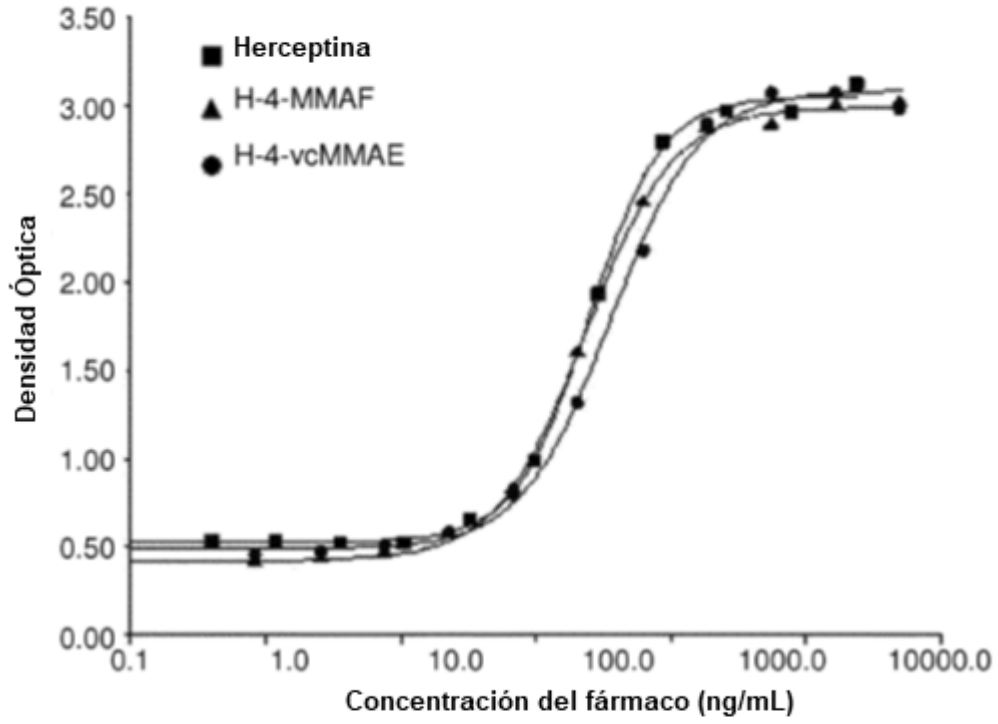


Fig. 5C

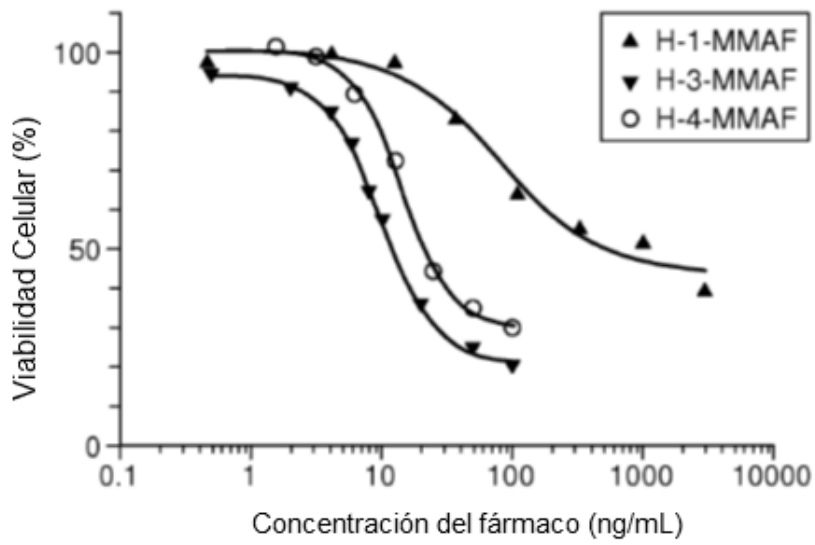


Fig. 6A

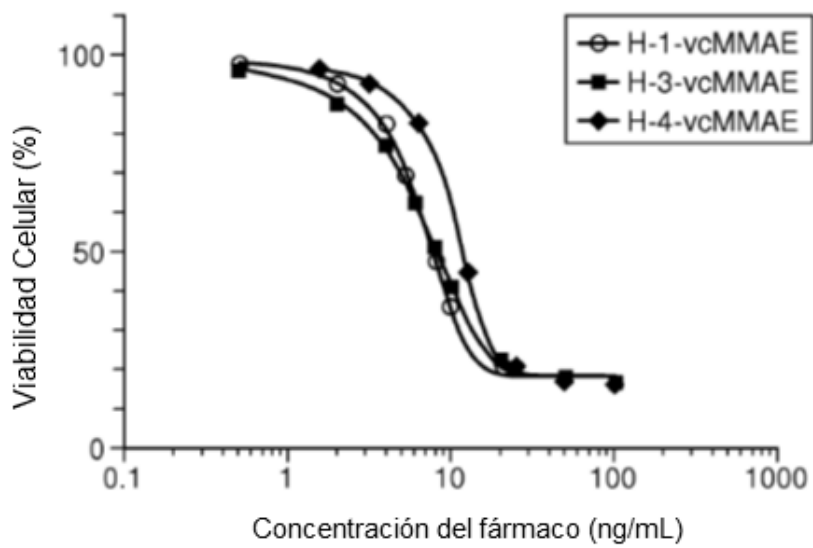


Fig. 6B