

CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO ANTI-C-MET

1. Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de América con Número de Serie 63/181,963, presentada el 29 de abril de 2021, la cual se incorpora por referencia en su totalidad.

2. Información sobre el Listado de Secuencias

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y que se incorpora a este documento a título de referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 28 de abril de 2022, se denomina como 632WO_SL_ST25.txt y tiene un tamaño de 22,918 bytes.

3. Campo de la Invención

La presente solicitud se refiere, entre otras cosas, a nuevos fármacos inhibidores de la topoisomerasa, a enlazadores de fármacos, a conjugados de anticuerpo-fármaco anti-c-Met (ADC, por sus siglas en inglés) y a los métodos de elaboración de los mismos.

4. Discusión de Antecedentes

c-Met es un receptor de la cinasa de tirosina de señalización que se expresa en la superficie de las células epiteliales y endoteliales. Se ha demostrado que la activación de c-Met por medio del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés), su único ligando conocido, controla la proliferación celular, la angiogénesis, la supervivencia y la motilidad celular.

El cáncer de pulmón no microcelular (NSCLC, por sus siglas en inglés) representa el 85 por ciento de todos los cánceres de pulmón y es la principal causa de la muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo. La señalización aberrante de c-Met es común en el NSCLC y se cree que se presenta a través de múltiples mecanismos. La señalización desregulada de c-Met se ha asociado con un mal pronóstico, tumorigénesis, resistencia a la quimioterapia o a la terapia de radiación, y resistencia adquirida a los inhibidores de la cinasa de tirosina (TKI, por sus siglas en inglés) del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés).

Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) representan una clase relativamente nueva de terapias que comprenden un anticuerpo conjugado con un fármaco citotóxico a través de un enlazador químico. El concepto terapéutico de los ADC consiste en combinar las capacidades de enlace de un anticuerpo con un fármaco, en donde el anticuerpo se utiliza para administrar el fármaco a una célula tumoral por medio del enlace a un antígeno de superficie blanco, el que incluye los antígenos de superficie blanco que se sobreexpresan o se amplifican en las células tumorales.

Sin embargo, no se han aprobado los conjugados de anticuerpo-fármaco para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcelular. Sigue existiendo una necesidad en la técnica de conjugados de anticuerpo-fármaco que se puedan utilizar con fines terapéuticos, tal como en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcelular.

5. Breve Descripción de la Invención

La presente divulgación proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco que se enlazan de una forma específica al c-Met humano. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de ejemplo, así como la secuencia de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de los ADC anti-c-Met de ejemplo se proporcionan en la descripción detallada que se encuentra más adelante.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones que incluyen los ADC anti-c-Met que se describen en el presente documento. Las composiciones en términos generales comprenden uno o más ADC anti-c-Met como se describen en el presente documento, y uno o más excipientes, portadores o diluyentes.

La presente divulgación proporciona los métodos para el tratamiento de los sujetos, tales como los sujetos humanos, que tienen NSCLC, los cuales comprenden la administración de una cantidad eficaz de un ADC anti-c-Met como se da a conocer en el presente documento. Un ADC anti-c-Met se administra en términos generales como una infusión y/o inyección intravenosa.

6. Breve Descripción de los Dibujos

La figura 1 muestra una vía sintética para el inhibidor de la topoisomerasa I (TOP1) de la fórmula I.

Las figuras 2A y 2B muestran la proliferación celular después de la administración de los compuestos inhibidores de la TOP1 para Calu-6 (adenocarcinoma de pulmón; figura 2A) y A375 (melanoma maligno; figura 2B).

Las figuras 3A a 3J muestran la actividad *in vitro* de un ADC de la presente divulgación (ADC-1) en las líneas celulares, las que incluyen (A) SNU-5 (carcinoma gástrico humano), (B) Hs 746T (adenocarcinoma gástrico), (C) EBC1 (carcinoma de células escamosas de pulmón humano), (D) NCI-H441 (adenocarcinoma de pulmón humano), (E) NCI-H1573 (adenocarcinoma de pulmón), (F) HCC827 (adenocarcinoma de pulmón), (G) NCI-H820 (adenocarcinoma papilar de pulmón), (H) Calu-3 (adenocarcinoma de pulmón), (I) MIA PaCa-2 (adenocarcinoma ductal pancreático) y (J) HEK-293.

Las figuras 4A a 4B muestran la actividad *in vivo* de ADC-1 en los modelos tumorales de xenoinjerto NCI-H441 (adenocarcinoma humano, figura 4A) y Hs 746T (adenocarcinoma gástrico, figura 4B).

7. Descripción Detallada de la Invención

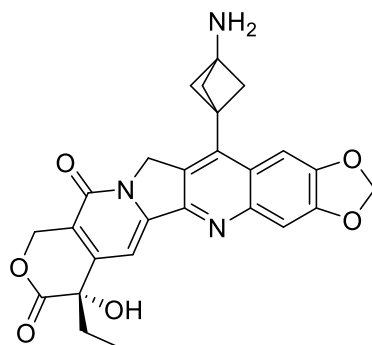
Varios aspectos de la invención se relacionan con los inhibidores de la topoisomerasa 1 (TOP1, por sus siglas en inglés) y los conjugados de anticuerpo anti-c-Met que comprenden dichos inhibidores de la TOP1.

En ciertas modalidades, la invención proporciona los ADC anti-c-Met, los que incluyen ADC anti-c-Met que comprenden inhibidores de la TOP1, sintones útiles para sintetizar los ADC, métodos de elaboración de los ADC, y varios métodos de uso de los ADC.

7.1. Inhibidores de la topoisomerasa 1 (TOP1i)

La topoisomerasa 1 (TOP1, por sus siglas en inglés) elimina las superbobinas que se forman durante la replicación del ADN. Los inhibidores de la TOP1 (TOP1i, por sus siglas en inglés) se pueden enlazar y pueden estabilizar los complejos de ADN-TOP1, por medio de la inducción de la rotura de la cadena de ADN y la apoptosis. En este trabajo se presenta un fármaco inhibidor de la topoisomerasa 1 ("fármaco de TOP1i") de acuerdo con la fórmula estructural (I), que puede ser destinado a la administración dirigida a

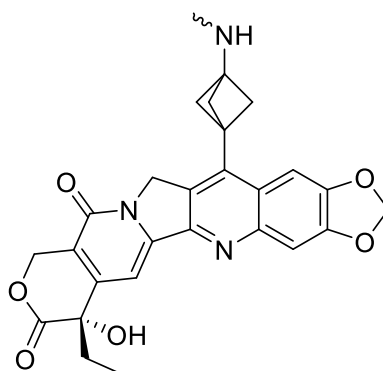
las células por medio de su conjugación con un anticuerpo.



(I)

En algunas modalidades, un fármaco de TOP1i es un compuesto de acuerdo con la fórmula (I). En algunas modalidades, el fármaco de TOP1i es la (7S)-14-(3-aminobicyclo[1.1.1]pentan-1-il)-7-etil-7-hidroxi-2H, 10H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-8, 11(7H, 13H)-diona, o una forma estructuralmente equivalente de la misma.

Los fármacos de TOP1i, tal y como se contemplan en el presente documento, se pueden conjugar con un anticuerpo en un ADC, tal como se muestra en la fórmula estructural (II):



(II)

en donde  representa el punto de unión de un enlazador al fármaco de TOP1i.

7.2 ADC anti-c-Met

Los inhibidores de la topoisomerasa, tal como se describen en el presente documento, se pueden conjugar con un anticuerpo anti-c-Met para formar un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) de TOP1i anti-c-Met. Los conjugados de anticuerpo-fármaco pueden aumentar la eficacia terapéutica de los anticuerpos en el tratamiento de las enfermedades debido a la capacidad de los ADC para administrar de una forma selectiva una o más fracciones del fármaco a los tejidos blanco, tal como un antígeno asociado a los tumores, por ejemplo, los tumores que expresan c-Met. Por lo tanto, en algunas modalidades, la presente divulgación proporciona los ADC de TOP1i anti-c-Met para el uso terapéutico, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcelular.

10

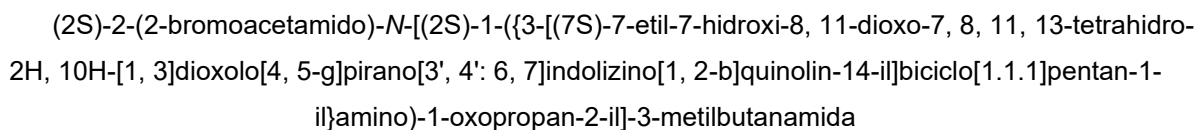


20

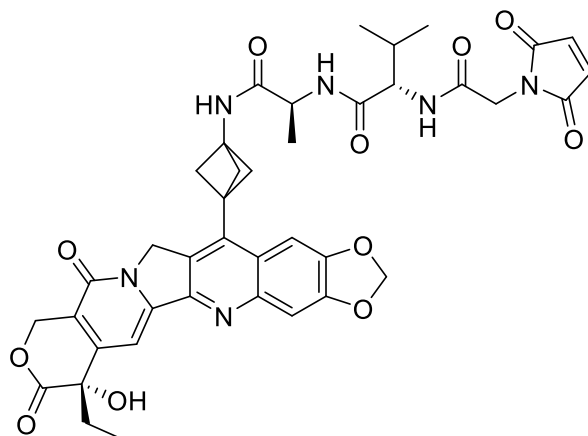
35

30

35



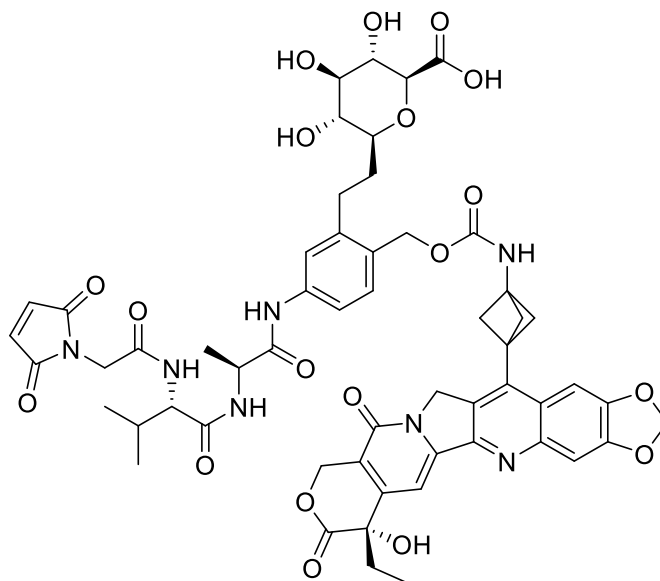
7.2.2. Fármaco enlazador LD2 (fórmula estructural (VI))



(VI)

(2S)-2-[2-(2, 5-dioxo-2, 5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido]-N-[(2S)-1-({3-[(7S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-7, 8, 11, 13-tetrahidro-2H, 10H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il)amino)-1-oxopropan-2-il]-3-metilbutanamida

7.2.3. Fármaco enlazador LD3 (fórmula estructural (VII))



(VII)

Ácido (2S, 3S, 4R, 5R, 6S)-6-[2-(5-[(2S)-2-((2S)-2-[2-(2, 5-dioxo-2, 5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido]-3-metilbutanoil)amino)propanoil]amino)-2-[(3-[(7S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-7, 8, 11, 13-tetrahidro-2H, 10H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il]carbamoil)oxi]metil]fenil]etil]-3, 4, 5-trihidroxioxan-2-carboxílico

7.2.4. Número de fármacos enlazados

Los ADC que se dan a conocer en el presente documento comprenden moléculas de fármaco enlazadas a las fracciones de los anticuerpos en varias proporciones molares estequiométricas dependiendo de la configuración del anticuerpo y, por lo menos en parte, del método que se utilice para

llevar a cabo la conjugación.

Los términos "carga de fármaco" o "cargado de fármaco" se refieren al número de las moléculas de fármaco por cada anticuerpo en una molécula individual de ADC. El número de los fármacos de TOP1i enlazados a un ADC anti-c-Met puede variar y estará limitado por el número de sitios de unión disponibles en el anticuerpo anti-c-Met. Tal y como se contempla para los ADC anti-c-Met de la invención, el enlazador enlazará un solo fármaco de TOP1i al ADC de anticuerpo anti-c-Met. En el entendido de que el ADC anti-c-Met no presente niveles inaceptables de agregación en las condiciones de uso y/o almacenamiento, se contemplan los ADC anti-c-Met (es decir, fórmula estructural (III)) que tengan un n de hasta 10. En algunas modalidades, los ADC anti-c-Met tienen un n que se encuentra en el intervalo de 1 a 10. En algunas modalidades, los ADC anti-c-Met tienen un n que se selecciona a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas modalidades, n es 2, 4, 6, 8 o 10. En algunas modalidades, n es 6. En algunas modalidades, la carga de fármaco puede comprender 1 molécula de fármaco, 2 moléculas de fármaco, 3 moléculas de fármaco, 4 moléculas de fármaco, 5 moléculas de fármaco, 6 moléculas de fármaco, 7 moléculas de fármaco, 8 moléculas de fármaco, 9 moléculas de fármaco o 10 moléculas de fármaco.

7.2.5. Anticuerpo AbA

AbA es una versión humanizada del anticuerpo monoclonal de ratón 224G11, que se dio a conocer y se incorporó por primera vez en la Patente de los Estados Unidos de América No. 8,329,173. El anticuerpo de murino m224G11 tiene un dominio pesado variable de acuerdo con lo que se estipula en la SEQ ID NO: 13 y un dominio ligero variable de acuerdo con lo que se estipula en la SEQ ID NO: 14:

Dominio variable de la cadena pesada m224G11 (CDR subrayadas y de acuerdo con lo que se estipula en las SEQ ID NO: 15, 16 y 17).

**EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHWVRQSLGESLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKGKA
TLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYC**ARSEITTEFDY**WGQGTALT VSS** (SEQ ID NO: 13)

Dominio variable de la cadena ligera m224G11 (CDR subrayadas y de acuerdo con lo que se estipula en las SEQ ID NO: 18, 19 y 20):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEESVDSYANSF**MHWYQQKPGQPPKLLIY**RASN**LESIGIPARFSGS
GSRTDFTLTINPVEADDVATYYC**QQSKEDPLTF**SGSGTKLEMK** (SEQ ID NO: 14)

AbA es una IgG1k recombinante humanizada (que se da a conocer como 224G11 [TH7 Hz3] en la Patente de los Estados Unidos de América No. 8,741,290) que se dirige a un epítipo único de c-Met que se ubica dentro del dominio 1 de homología del factor de transcripción de la inmunoglobulina-plexina (IPT, por sus siglas en inglés), lo que da como resultado el bloqueo de la señalización de c-Met dependiente de HGF e independiente de HGF.

Tal como se definen en la nomenclatura de IMGT, las secuencias de CDR de AbA comprenden las siguientes secuencias:

CDR-H1: GYIFTAYT (SEQ ID NO: 1)

CDR-H2: IKPNNGLA (SEQ ID NO: 2)

CDR-H3: ARSEITTEFDY (SEQ ID NO: 3)

CDR-L1: ESVDSYANSF (SEQ ID NO: 4)

CDR-L2: RAS (SEQ ID NO: 5)

CDR-L3: QQSKEDPLT (SEQ ID NO: 6)

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-c-Met que componen un ADC de esta divulgación comprenden una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 1, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 2; una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 3, una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 4, una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 5; y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-c-Met que componen un ADC de esta divulgación comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 7:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTMHWVRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSEITTEFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 7);

y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 8:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSSESVDSYANSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 8).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-c-Met que componen un ADC de esta divulgación comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 9 (las regiones constantes están en negrillas; las CDR están subrayadas (que se dan a conocer como las SEQ ID NO: 1 a 3, respectivamente, en orden de aparición)):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYIFT AYTMHWVRQA PGQGLEWMGW	050
IKPNNGLANY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCARSE	100
ITTEFDYWGQ GTLLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY	150
FPEPTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI	200
CNVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDCHCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL	250
MISRTPEVTC VVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR	300
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL	350
PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS	400
GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSPG	445

(secuencia de longitud completa que se da a conocer como la SEQ ID NO: 9)

y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 10 (secuencias de CDR que se dan a conocer como las SEQ ID NO: 4 a 6, respectivamente, en orden de aparición):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSSESVDSYANSFLHWY QQKPGQPPKL	050
LIYRASTRES GVPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQQSKEDPL	100
TFGGGKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV	150
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV	200
THQGLSSPVT KSFNRGEC	218

(secuencia de longitud completa que se da a conocer como la SEQ ID NO: 10).

En algunas modalidades, un anticuerpo de la presente divulgación comprende una cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 10.

En una modalidad, la cadena pesada de un anticuerpo anti-c-Met que compone un ADC de esta divulgación es codificada por la siguiente secuencia de nucleótidos (secuencia de longitud completa que se da a conocer como la SEQ ID NO: 21):

ATGGGATGGTCTTGGATCTTTCTGCTGTTTCTGTCTGGTACTGCTGCTGGTGTGCTGAGC caggtccagctgggtg
caatccggcgcagaggtgaagaagccaggcgcttccgtgaaggtgagctgtaaggcctctggctacatcttcacagcatacccatgcactgggtg
aggcaagctcctgggcagggactggagtggatggatggattaaacccaacaatgggctggccaactacgcccagaaattccagggtagggtca
ctatgacaagggataccagcatcagcaccgcataatggagctgagcaggctgaggtctgacgacactgtctgtattattgcgccaggagcgaaa
ttacaacagaattcgattactgggggcagggcaccctgggtgaccgtgtcctctgccagcaccaagggcccaagcgtgtccccctggccccc
gcagcaagagcaccagcggcggcacagccgcctgggctgcctggtgaaggactacttccccgagcccgtgaccgtgtcctggaac
agcggagccctcacttctggagttcataccttcccagcagatttcagagcagtgggcctgtattcactgtcttccgtcgtaacagttccatcc
tccagcctcgggacacagacttacatttgaacgtgaatcacaagcctagcaacaccaaggtcgacaagagagttgaacaaagagttg
tgattgccactgtctccttcccagctcctgagctgcttggcgggtccagtgcttcttctgttccccctaaacccaaagacaccctgatgat
ctcaaggactcccgaggtgacatgcgtgggtggatgtgtctcatgaggaccagaggtgaagttaactggtacgtggacggcgtg
gaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggagcagtaaacagcacctacaggtgggtgtccgtgctgaccgtgctgcacca
ggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgccagcccaatcgaaaagaccatcagcaaggcca
agggccagccaagagagcccagggtgtacacctgccaccagcagggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctg
gtgaagggcttctaccaagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccag
tgctggacagcgacggcagcttcttctgtacagcaagctgaccgtggacaagagcagatggcagcagggcaacgtgttcagctgctc
cgtgatgcagaggccctgcacaaccactacaccagagaagagcctgagcctgtccccagggtga (SEQ ID NO: 21)

El péptido de señal de secreción está en letras mayúsculas y en negrillas; incluye el codón de paro final (TGA); la región constante está en negrillas; las CDR están subrayadas (las secuencias de CDR se dan a conocer como las SEQ ID NO: 22 a 24, respectivamente, en orden de aparición).

En una modalidad, la cadena ligera de un anticuerpo anti-c-Met que compone un ADC de esta divulgación es codificada por la siguiente secuencia de nucleótidos (secuencia de longitud completa que se da a conocer como la SEQ ID NO: 25):

ATGGAAACTGATACACTGCTGCTGTGGGTCTGCTGCTGTGGGTCCCTGGAAGCACAGGGgacattgt
gatgaccagctctccgatagcctggccgtgtccctgggcgagagggtaccatcaactgtaaaagctccgaatctgtggactcttacgcaaacagc
ttctgcactggatcagcaaaagccaggccaacctccaaagctgctgattacagggcttctaccaggggagagcggcgtgccgatagggtcagcg
gatctggcagcggcaccgactttactgaccatctccagcctgcaggccgaagatgtggcagctctattactgccagcagctccaaggaggagcccc
tgactttcgggggtgtactaaagtgagatcaagcgtacgggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaa
gagcgggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccaggagggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgc
agagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagca
aggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgtgaggtgaccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacagg
ggcgagtgctga (SEQ ID NO: 25)

El péptido de señal de secreción está en letras mayúsculas y en negrillas; incluye el codón de paro final (TGA); la región constante está en negrillas; las CDR están subrayadas (las secuencias de CDR se

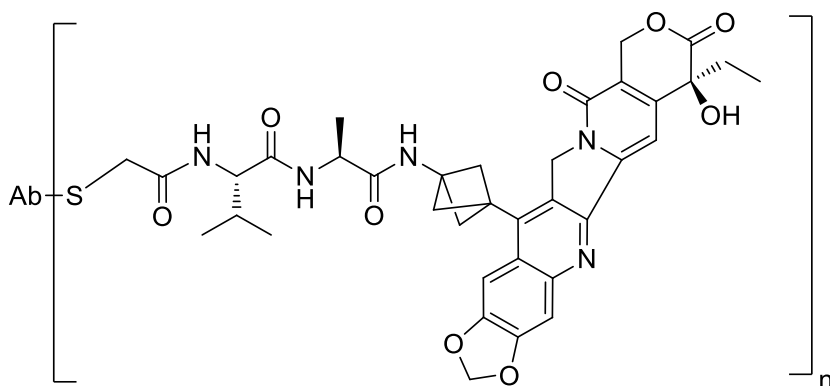
dan a conocer como las SEQ ID NO: 26 a 28, respectivamente, en orden de aparición).

7.2.6. ADC anti-c-Met de ejemplo

En algunas modalidades particulares, los ADC anti-c-Met de la invención comprenden un anticuerpo anti-c-Met que comprende seis regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) que corresponden a las CDR del anticuerpo AbA, que se conjuga con un fármaco de TOP1i a través de un enlazador de valina alanina (va) escindible. En ciertas modalidades, el enlazador comprende un grupo funcional bromoacetamida para la conjugación a un sulfhidrilo de una cisteína reducida del anticuerpo anti-c-Met del ADC. En otras modalidades, el enlazador comprende un grupo funcional de maleimida para su conjugación a un sulfhidrilo de una cisteína reducida a partir del anticuerpo anti-c-Met del ADC. En algunas modalidades, el enlazador comprende además un espaciador autoinmolante, preferiblemente un p-aminobencilcarbonilo (PABC) o un análogo del mismo.

En algunas modalidades, un ADC anti-c-Met comprende un anticuerpo anti-c-Met que comprende seis regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) que corresponden a las CDR del anticuerpo AbA, que se conjuga con el fármaco enlazador LD1 (fórmula estructural (V)) a través de un enlace que se forma con un grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína del anticuerpo anti-c-Met. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-c-Met comprende las secuencias de la región de la cadena pesada variable (VH) y de la región de la cadena ligera variable (VL) del anticuerpo AbA. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-c-Met comprende las secuencias de la cadena pesada (HC) y de la cadena ligera (LC) del anticuerpo AbA.

En algunas modalidades, un ADC anti-c-Met tiene la siguiente fórmula estructural (VIII):



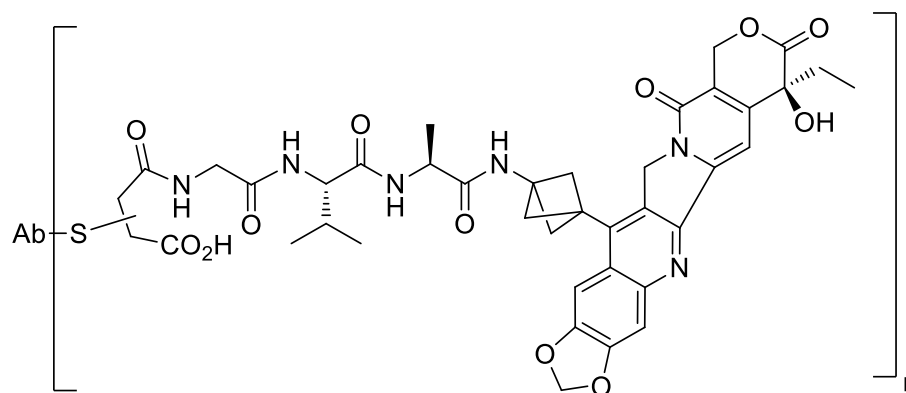
(VIII)

en donde n es un número entero de 1 a 10, y en donde Ab es un anticuerpo de la IgG1 anti-c-Met que comprende una CDR1 de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de la cadena ligera que se muestra como la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de la cadena ligera que se muestra como la SEQ ID NO: 5, y una CDR3 de la cadena ligera que se muestra como la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el anticuerpo Ab es un anticuerpo de la IgG1 anti-c-Met que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 7 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia

de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo Ab es un anticuerpo anti-c-Met que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, la conjugación del fármaco enlazador con el anticuerpo se lleva a cabo a través de un enlace que se forma con un grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína del anticuerpo. En algunas modalidades, n tiene un valor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas modalidades, n tiene un valor de 2, 4, 6, 8 o 10. En algunas modalidades, n es 6. En una modalidad, el ADC anti-c-Met de la fórmula estructural (VIII) comprende un anticuerpo Ab que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 10 y n tiene un valor de 2, 4, 6, 8 o 10. En una modalidad, el ADC anti-c-Met de la fórmula estructural (VIII) comprende un anticuerpo Ab que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 10 y n tiene un valor de 6.

En ciertas modalidades, un ADC anti-c-Met comprende un anticuerpo anti-c-Met que comprende seis regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) que corresponden a las CDR del anticuerpo AbA, que se conjuga con el fármaco enlazador LD2 (fórmula estructural (VI)) a través de un enlace que se forma con un grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína del anticuerpo anti-c-Met. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-c-Met comprende las secuencias de la región de la cadena pesada variable (VH) y de la región de la cadena ligera variable (VL) del anticuerpo AbA. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-c-Met comprende las secuencias de la cadena pesada (HC) y de la cadena ligera (LC) del anticuerpo AbA.

En algunas modalidades, un ADC anti-c-Met tiene la siguiente fórmula estructural (IX):



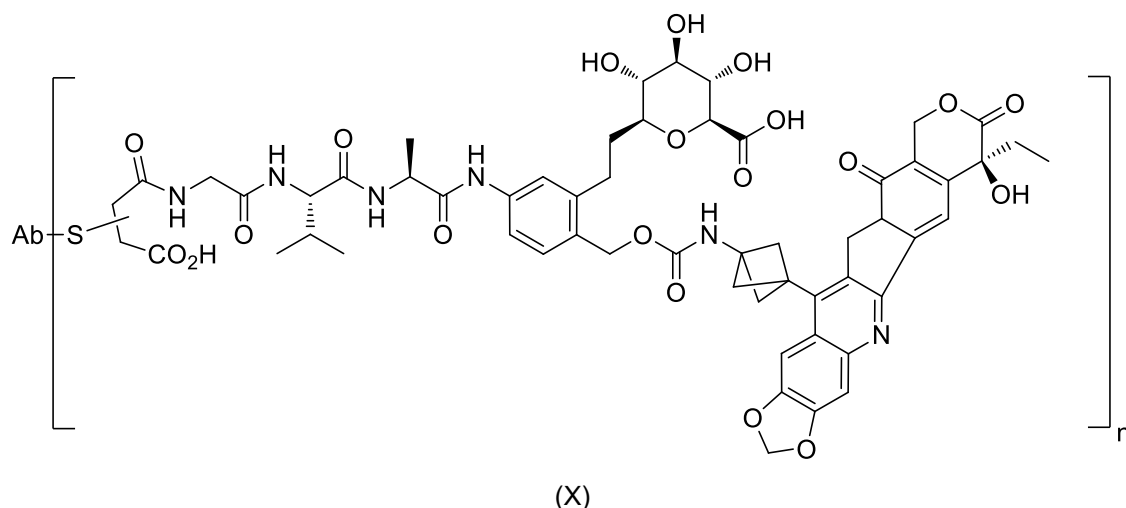
(IX)

en donde n es un número entero de 1 a 10, y en donde Ab es un anticuerpo de la IgG1 anti-c-Met que comprende una CDR1 de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de la cadena ligera que se muestra como la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de la cadena ligera que se muestra como la SEQ ID NO: 5, y una CDR3 de la cadena ligera que se muestra

como la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el anticuerpo Ab es un anticuerpo de la IgG1 anti-c-Met que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 7 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo Ab es un anticuerpo anti-c-Met que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, la conjugación del fármaco enlazador con el anticuerpo se lleva a cabo a través de un enlace que se forma con un grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína del anticuerpo. En algunas modalidades, n tiene un valor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas modalidades, n tiene un valor de 2, 4, 6, 8 o 10. En algunas modalidades, n es 6. En una modalidad, el ADC anti-c-Met de la fórmula estructural (IX) comprende un anticuerpo Ab que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 10, y n tiene un valor de 2, 4, 6, 8 o 10. En una modalidad, el ADC anti-c-Met de la fórmula estructural (IX) comprende un anticuerpo Ab que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 10 y n tiene un valor de 6.

En ciertas modalidades, un ADC anti-c-Met comprende un anticuerpo anti-c-Met que comprende seis regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) que corresponden a las CDR del anticuerpo AbA, que se conjuga con el fármaco enlazador LD3 (fórmula estructural (VII)) a través de un enlace que se forma con un grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína del anticuerpo anti-c-Met. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-c-Met comprende las secuencias de la región de la cadena pesada variable (VH) y de la región de la cadena ligera variable (VL) del anticuerpo AbA. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-c-Met comprende las secuencias de la cadena pesada (HC) y de la cadena ligera (LC) del anticuerpo AbA.

En algunas modalidades, un ADC anti-c-Met tiene la siguiente fórmula estructural (X):



en donde n es un número entero de 1 a 10, y en donde Ab es un anticuerpo de la IgG1 anti-c-Met que comprende una CDR1 de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de la cadena ligera que se muestra como la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de la cadena ligera que se muestra como la SEQ ID NO: 5, y una CDR3 de la cadena ligera que se muestra como la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el anticuerpo Ab es un anticuerpo de la IgG1 anti-c-Met que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 7 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo Ab es un anticuerpo anti-c-Met que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, la conjugación del fármaco enlazador con el anticuerpo se lleva a cabo a través de un enlace que se forma con un grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína del anticuerpo. En algunas modalidades, n tiene un valor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas modalidades, n tiene un valor de 2, 4, 6, 8 o 10. En algunas modalidades, n es 6. En una modalidad, el ADC anti-c-Met de la fórmula estructural (X) comprende un anticuerpo Ab que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 10 y n tiene un valor de 2, 4, 6, 8 o 10. En una modalidad, el ADC anti-c-Met de la fórmula estructural (X) comprende un anticuerpo Ab que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO: 10 y n tiene un valor de 6.

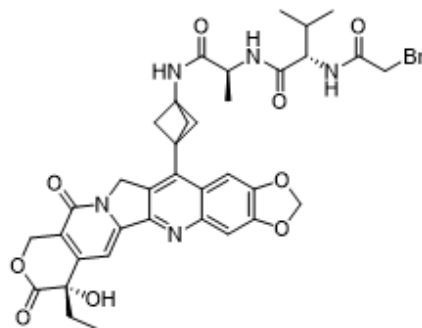
Los ADC de esta divulgación se pueden proporcionar como una composición adecuada para su administración a un sujeto. En algunas modalidades, la composición del ADC es una composición farmacéutica, la cual comprende un ADC de esta divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable. Una formulación dada de los ADC que se dan a conocer en el presente documento puede comprender una distribución de los anticuerpos que tengan una carga de fármaco diferente, es decir, valores diferentes de n .

7.3 Métodos de uso

En algunas modalidades, los métodos que se describen en el presente documento implican el tratamiento de los pacientes que tienen un NSCLC no escamoso con los ADC anti-c-Met de la invención.

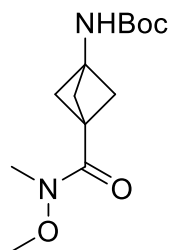
8. Ejemplos

Los siguientes ejemplos, que resaltan ciertas características y propiedades de las modalidades de ejemplo de los anticuerpos y de los fragmentos de enlace que se describen en el presente documento, se proporcionan con fines ilustrativos.



Ejemplo 1

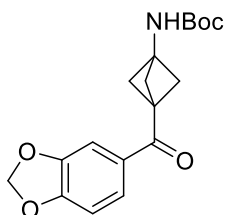
(2S)-2-(2-bromoacetamido)-N-[(2S)-1-((3-[(7S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-7, 8, 11, 13-tetrahidro-2H, 10H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il)amino)-1-oxopropan-2-il]-3-metilbutanamida



Ejemplo 1A

(3-(metoxi(metil)carbamoil)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)carbamato de terbutilo

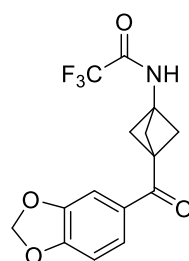
A una solución del ácido 3-((terbutoxicarbonil)amino)biciclo[1.1.1]pentan-1-carboxílico (4.9 g), clorhidrato de N, O-dimetilhidroxilamina (2.2 g) y N, N-diisopropiletilamina (11.30 mL) en diclorometano (10 mL) se le añadió el hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1, 2, 3-triazolo [4, 5-b] piridinio (8.61 g) en porciones a 10 °C. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 12 horas. Se prepararon dos reacciones adicionales y se dejaron en agitación a 20 °C durante 12 horas, tal como se describe. Las tres reacciones se combinaron. La reacción se diluyó con diclorometano (200 mL) y se añadió al HCl acuoso 1 N (50 mL). El precipitado formado se filtró y se dejó que el filtrado se separara. La capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (50 mL) y salmuera (50 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por medio de una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo del 1 al 50 por ciento en éter de petróleo para dar el compuesto del título. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.97 (br s, 1 H), 3.66 (s, 3 H), 3.18 (s, 3 H), 2.34 (s, 6 H), 1.45 (s, 9 H). MS (ESI+) m/z 271.2 (M + H) $^+$.



Ejemplo 1B

(3-(benzo[D] [1, 3]dioxol-5-carbonil)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)carbamato de terbutilo

A una solución de 5-bromobenzo[d] [1, 3]dioxol (8.83 g) en tetrahidrofurano (100 mL) se le añadió n-butil-litio (17.57 mL, 2.5 M en hexano) con lentitud a -65 °C bajo un gas de nitrógeno. La mezcla se agitó a -65 °C durante 30 minutos. Se añadió con lentitud una solución del ejemplo 1A (4.75 g) en tetrahidrofurano (40 mL). La mezcla se agitó a -65 °C durante 3 horas. Se prepararon tres reacciones adicionales y se dejaron en agitación a -65 °C durante 3 horas. Se combinaron las cuatro reacciones. La mezcla se enfrió con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (500 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 × 500 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (500 mL), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por medio de una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo del 1 al 50 por ciento en éter de petróleo para dar el compuesto del título. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.63 (dd, 1 H), 7.45 (d, 1 H), 6.82 (d, 1 H), 6.03 (s, 2 H), 5.04 (br s, 1 H), 2.50 (s, 6 H), 1.46 (s, 9 H). MS (ESI+) *m/z* 354.2 (M + Na)⁺.

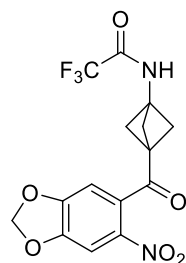


Ejemplo 1C

N-(3-(benzo[d] [1, 3]dioxol-5-carbonil)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)-2, 2, 2-trifluoroacetamida

Paso 1: A una solución del ejemplo 1B (6.2 g) en diclorometano (62 mL) se le añadió ácido trifluoroacético (62 mL) con lentitud a 0 °C. La reacción se agitó a 25 °C durante 4 horas. Se prepararon dos reacciones adicionales y se agitaron a 25 °C durante 4 horas. Cada mezcla se concentró a presión reducida. Cada residuo se utilizó en el siguiente paso sin más purificación.

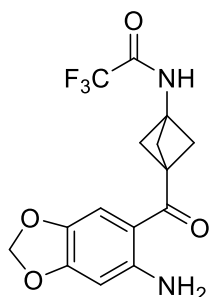
Paso 2: A una solución de producto crudo anterior en diclorometano (62 mL) se le agregaron N, N-diisopropiletilamina (16.34 mL) y anhídrido trifluoroacético (3.96 mL) gota a gota a 0 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 2 horas. Se prepararon dos reacciones adicionales como se describe y se agitaron a 25 °C durante 2 horas. Las tres reacciones se combinaron y se vertieron en agua (200 mL), y se extrajeron con diclorometano (2 × 200 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera (200 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por medio de una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyéndolo con acetato de etilo al 25 por ciento en éter de petróleo para dar el compuesto del título. RMN de ¹H (501 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.61 (dd, 1 H), 7.43 (d, 1 H), 7.00 (s, 1 H), 6.85 (d, 1 H), 6.05 (s, 2 H), 2.62 (s, 6 H). MS (ESI+) *m/z* 328, 2 (M + H)⁺.



Ejemplo 1D

2, 2, 2-trifluoro-N-(3-(6-nitrobenzo[d] [1, 3]dioxol-5-carbonil)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)acetamida

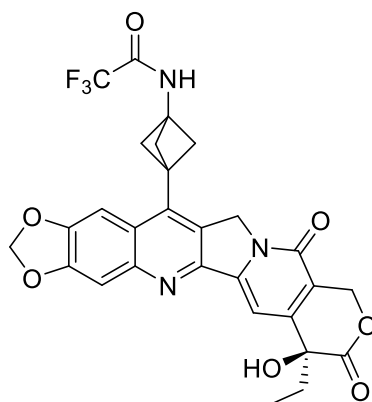
A una solución del ejemplo 1C (4.3 g) en anhídrido acético (25 mL) se le añadió trihidrato de nitrato de cobre (II) (4.76 g) en porciones a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 3 horas. Se prepararon tres reacciones adicionales y se agitaron a 0 °C durante 3 horas, tal como se describe. Se combinaron las cuatro reacciones. La mezcla se vertió en agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (5 × 100 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por medio de una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 75 por ciento en éter de petróleo para dar el compuesto del título. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.61 (s, 1 H), 6.77 (br s, 1 H), 6.64 (s, 1 H), 6.21 (s, 2 H), 2.43 (s, 6 H). MS (APCI+) *m/z* 373, 1 (M + H)⁺.



Ejemplo 1E

N-(3-(6-aminobenzo[d] [1, 3]dioxol-5-carbonil)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)-2, 2, 2-trifluoroacetamida

A una solución del ejemplo 1D (4 g) en etanol (40 mL) y agua (8 mL) se le añadieron hierro (5.4 g) y cloruro de amonio (5.17 g) bajo nitrógeno. La mezcla se agitó a 100 °C durante 3 horas. Se prepararon tres reacciones adicionales y se agitaron a 100 °C durante 3 horas, tal como se describe. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, se combinaron las cuatro reacciones. La mezcla se vertió en agua (1 L) y se extrajo con acetato de etilo (5 × 500 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por medio de una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyéndolo con acetato de etilo del 10 al 75 por ciento en éter de petróleo para dar el compuesto del título. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.22 (s, 1 H), 6.70 (s, 1 H), 6.50 (s, 2 H), 6.14 (s, 1 H), 5.92 (s, 2 H), 2.63 (s, 6 H). MS (ESI+) *m/z* 343.2 (M + H)⁺.



Ejemplo 1F

10

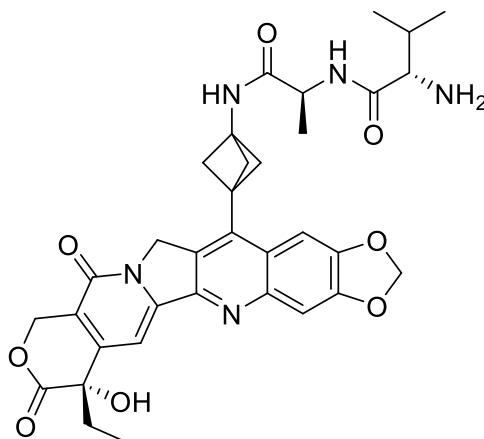
15

25

30

((S)-1-(((S)-1-((3-((S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-8, 10, 11, 13-tetrahidro-7H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de terbutilo

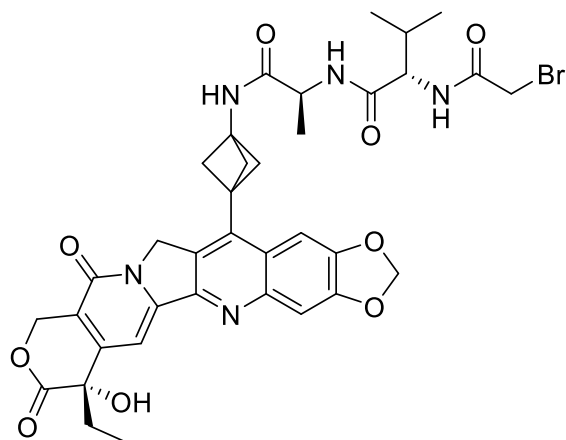
A una suspensión del ácido (S)-2-((S)-2-((terbutoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanoico (2.49 g), 1-óxido de 2-hidroxipiridina (1.31 g) y clorhidrato de N1-((etilimino)metilen)-N3, N3-dimetilpropan-1, 3-diamina (2.26 g) en acetonitrilo (40 mL) se le añadió 2, 6-lutidina (2.74 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. En un matraz separado, el ejemplo 1G (4 g) y la 2, 6-lutidina (2.74 mL) se combinaron en N, N-dimetilformamida (40 mL) y se añadió la solución anterior. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano (300 mL), se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (100 mL), salmuera (100 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por medio de una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con metanol del 0 al 10 por ciento en diclorometano para dar el compuesto del título. RMN de ¹H (400 MHz, sulfóxido de dimetilo -d₆) δ ppm 8.65 (s, 1 H), 7.89 (d, 1 H), 7.61 (s, 1 H), 7.49 (s, 1 H), 7.22 (s, 1 H), 6.77 (d, 1 H), 6.46 (s, 1 H), 6.29 (d, 2 H), 5.41 (s, 2 H), 5.32 (s, 2 H), 4.29 (q, 1 H), 3.87 - 3.77 (m, 1 H), 2.76 (s, 6 H), 1.99 (q, 1 H), 1.92 - 1.81 (m, 2 H), 1.41 (s, 9 H), 1.25 (d, 3 H), 0.92 - 0.80 (m, 9 H). MS (ESI+) *m/z* 744.4 (M + H)⁺.



Ejemplo 1I

(S)-2-amino-N-((S)-1-((3-((S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-8, 10, 11, 13-tetrahidro-7H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida

El ejemplo 1H (5.5 g) se trató con ácido trifluoroacético (30 mL) a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en acetonitrilo al 50 por ciento en agua (200 mL). La solución se liofilizó para dar el compuesto del título. RMN de ¹H (600 MHz, sulfóxido de dimetilo -d₆) δ ppm 8.80 (s, 1 H), 8.59 (d, 1 H), 8.10 (d, 3 H), 7.60 (s, 1 H), 7.48 (s, 1 H), 7.23 (s, 1 H), 6.33 - 6.26 (m, 2 H), 5.41 (d, 2 H), 5.35 - 5.23 (m, 2 H), 4.35 (p, 1 H), 3.66 - 3.63 (m, 1 H), 2.77 (s, 6 H), 2.17 - 2.06 (m, 1 H), 1.91 - 1.83 (m, 2 H), 1.31 (d, 3 H), 1.01 - 0.96 (dd, 6 H), 0.89 (t, 3 H). MS (ESI+) *m/z* 644.4 (M + H)⁺.

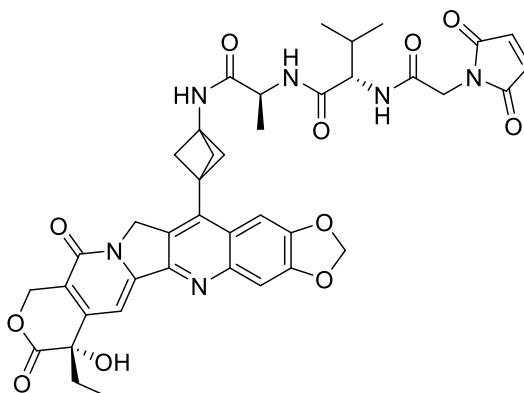


(V)

Ejemplo 1J

(2S)-2-(2-bromoacetamido)-N-[(2S)-1-({3-[(7S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-7, 8, 11, 13-tetrahidro-2H, 10H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il}amino)-1-oxopropan-2-il]-3-metilbutanamida

A una solución del ácido 2-bromoacético (1.435 g) en N, N-dimetilformamida (26 mL) se le añadió el 2-etoxiquinolin-1(2H)-carboxilato de etilo (2.55 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. En un matraz separado, el ejemplo 1I (4.5 g) y la 2, 6-lutidina (3.61 mL) se combinaron en N, N-dimetilformamida (26 mL) y se añadió la solución anterior. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se acidificó con ácido trifluoroacético (4 mL) y se purificó por medio de una HPLC en fase inversa en un sistema CombiFlash® Teledyne Isco a través del uso de una columna Luna (250 × 50 mm, 10 mm), eluyendo con acetonitrilo del 5 al 75 por ciento en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0.1 por ciento durante 30 minutos para dar el compuesto del título después de la liofilización. RMN de ^1H (600 MHz, sulfóxido de dimetilo- d_6) δ ppm 8.57 (s, 1 H), 8.32 (d, 1 H), 8.16 (d, 1 H), 7.67 (s, 1 H), 7.52 (s, 1 H), 7.24 (s, 1 H), 6.30 (dd, 2 H), 5.42 (s, 2 H), 5.38 (d, 2 H), 4.28 - 4.19 (m, 2 H), 4.03 - 3.91 (m, 2 H), 2.76 (s, 6 H), 2.02 (h, 1 H), 1.86 (ddp, 2 H), 1.25 (d, 3 H), 0.93 - 0.84 (m, 9 H). MS (ESI+) m/z 764.46 (M + H) $^+$.



(VI)

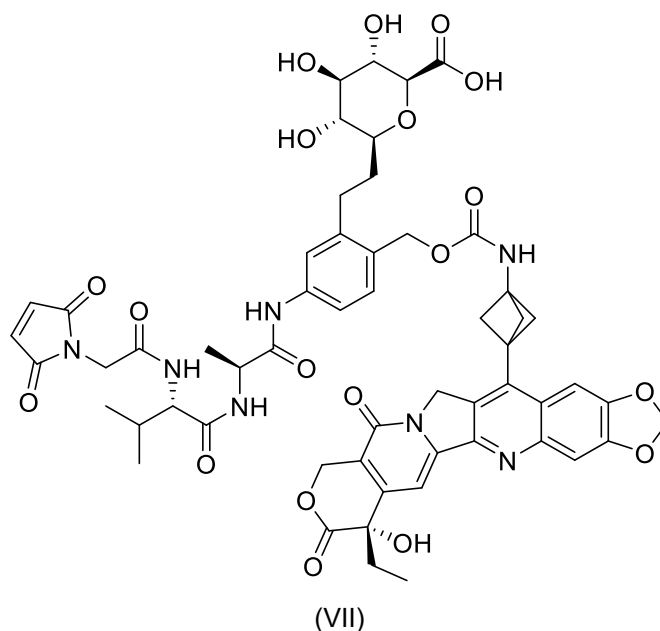
Ejemplo 2

(2S)-2-[2-(2, 5-dioxo-2, 5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido]-N-[(2S)-1-({3-[(7S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-7, 8, 11, 13-tetrahidro-2H, 10H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il}amino)-1-oxopropan-2-il]-3-metilbutanamida

5

A una solución del ejemplo 1I (2 g) en N, N-dimetilformamida (54 mL) se le añadió el 2-(2, 5-dioxo-2, 5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetato de 2, 5-dioxopirrolidin-1-ilo (0.7 g) seguido de la N, N-diisopropiletilamina (2.3 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se enfrió con ácido trifluoroacético (2 mL) y se purificó por medio de una HPLC en fase inversa en un sistema Gilson PLC 2020 a través del uso de una columna Luna (250 × 50 mm, 10 mm), eluyendo con acetonitrilo del 5 al 75 por ciento en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0.1 por ciento durante 30 minutos para proporcionar el compuesto del título después de la liofilización. RMN de ¹H (500 MHz, sulfóxido de dimetilo -d₆) δ ppm 8.50 (s, 1 H), 8.29 (d, 1 H), 8.13 (d, 1 H), 7.64 (s, 1 H), 7.51 (s, 1 H), 7.23 (s, 1 H), 7.12 (s, 2 H), 6.30 (d, 2 H), 5.42 (s, 2 H), 5.36 (d, 2 H), 4.24 (p, 1 H), 4.20 - 4.14 (m, 3 H), 2.75 (s, 6 H), 2.01 (h, 1 H), 1.86 (dp, 2 H), 1.26 (d, 3 H), 0.93 - 0.83 (m, 9 H). MS (ESI+) *m/z* 781.14 (M + H)⁺.

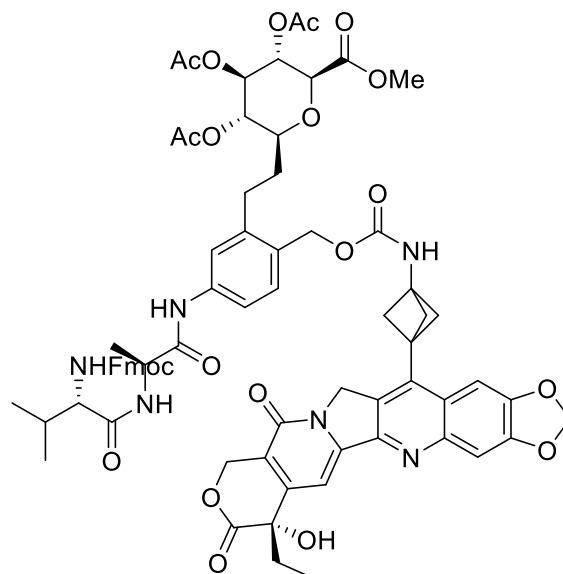
15



Ejemplo 3

Ácido (2S, 3S, 4R, 5R, 6S)-6-[2-(5-[(2S)-2-((2S)-2-[2-(2, 5-dioxo-2, 5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido]-3-metilbutanoil]amino)propanoil]amino)-2-[[[3-[(7S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-7, 8, 11, 13-tetrahidro-2H, 10H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il]carbamoil]oxi]metil]fenil]etil]-3, 4, 5-trihidroxioxan-2-carboxílico

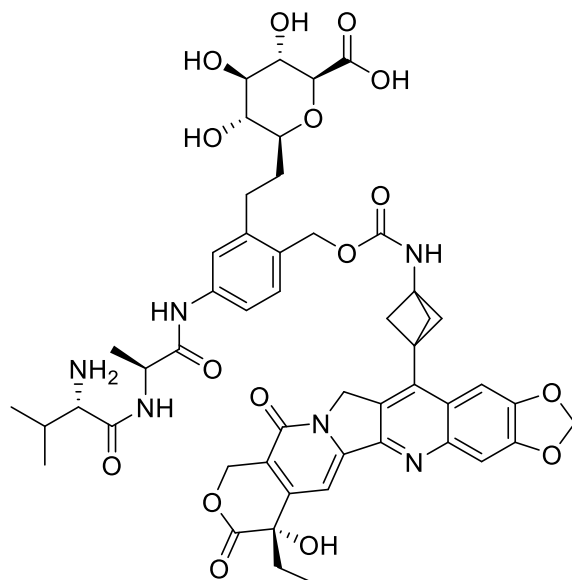
35



Ejemplo 3A

Triacetato de (2S, 3S, 4R, 5S, 6S)-2-(5-((S)-2-((S)-2-((9H-fluoren-9-yl)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)-2-(((3-((S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-8, 10, 11, 13-tetrahydro-7H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)carbamoil)oxi)metil)fenetil)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3, 4, 5-triilo

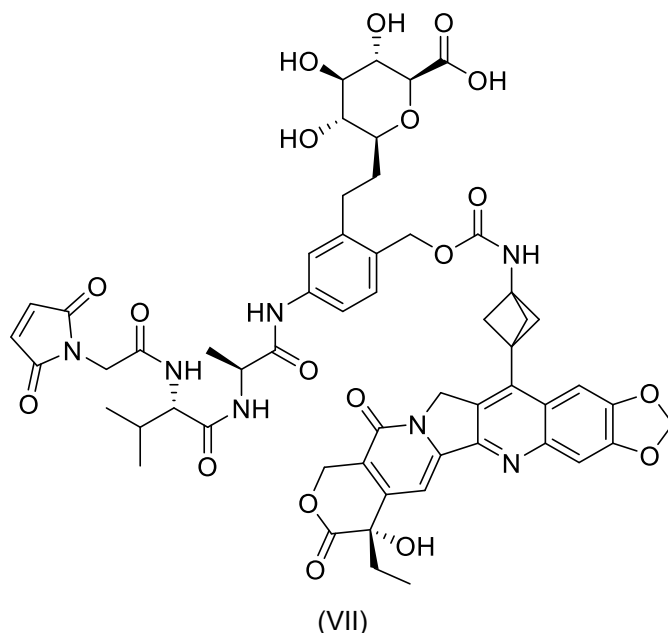
A una mezcla del triacetato de (2S, 3S, 4R, 5S, 6S)-2-(5-((S)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)-2-((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenetil)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3, 4, 5-triilo (que se prepara como se describe en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente No. WO2016094509, 2.99 g), el ejemplo 1G (1.35 g) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (0.361 g) en N, N-dimetilformamida (26.5 mL) se le añadió la N, N-diisopropiletilamina (1.39 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por medio de una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con metanol del 0 al 8 por ciento en diclorometano para dar el compuesto del título. RMN de ^1H (501 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.43 (br s, 1 H), 7.74 (d, 2 H), 7.61 (br s, 1 H), 7.57 - 7.46 (d, 4 H), 7.43 (s, 1 H), 7.38 (t, 3 H), 7.33 - 7.27 (m, 3 H), 6.43 (br s, 1 H), 6.17 (s, 2 H), 5.89 (br s, 1 H), 5.72 (d, 1 H), 5.37 - 5.02 (m, 8 H), 4.94 (t, 1 H), 4.67 - 4.56 (m, 1 H), 4.53 - 4.44 (t, 2 H), 4.19 (br s, 1 H), 4.00 (d, 2 H), 3.77 (s, 3 H), 3.48 (dt, 1 H), 2.94 (d, 1 H), 2.88 - 2.66 (m, 6 H), 2.16 (br s, 1 H), 2.08 - 1.97 (m, 9 H), 1.94 - 1.80 (ddt, 4 H), 1.45 (d, 3 H), 1.02 (t, 3 H), 0.98 - 0.90 (m, 6 H). MS (ESI+) m/z 1359.5 (M + H) $^+$.



Ejemplo 3B

Ácido (2S, 3S, 4R, 5R, 6S)-6-(5-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)-2-(((3-((S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-8, 10, 11, 13-tetrahydro-7H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)carbamoil)oxi)metil)fenetil)-3, 4, 5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico

A una solución del ejemplo 3A (3.2 g) en metanol (24 mL) y tetrahidrofurano (24 mL) se le añadió monohidrato de hidróxido de litio (846 mg) en agua (24 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se apagó con ácido trifluoroacético (3 mL) y se extrajo con heptano (5 × 30 mL). La capa acuosa se purificó por medio de una HPLC en fase inversa en un sistema CombiFlash® Teledyne Isco a través del uso de una columna Luna (250 × 50 mm, 10 mm), eluyendo con acetonitrilo del 5 al 75 por ciento en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0.1 por ciento durante 30 minutos para proporcionar el compuesto del título después de la liofilización. RMN de ¹H (400 MHz, sulfóxido de dimetilo -d₆) δ ppm 10.03 (s, 1 H), 8.62 (d, 1 H), 8.02 (br s, 4 H), 7.55 (s, 1 H), 7.43 (s, 1 H), 7.41 (d, 2 H), 7.35 (s, 1 H), 7.22 (d, 1 H), 7.16 (s, 1 H), 6.40 (br s, 1 H), 6.23 (s, 2 H), 5.35 (s, 2 H), 5.27 (s, 2 H), 4.97 (s, 2 H), 4.43 (p, 1 H), 3.60 - 3.47 (m, 3 H), 3.15 - 3.01 (m, 3 H), 2.90 (t, 1 H), 2.64 (s, 6 H), 2.00 (tq, 2 H), 1.79 (hept, 2 H), 1.60 - 1.46 (m, 1 H), 1.29 (d, 3 H), 0.89 (dd, 6 H), 0.80 (t, 3 H). MS (ESI+) *m/z* 997.3 (M + H)⁺.



Ejemplo 3C

Ácido (2S, 3S, 4R, 5R, 6S)-6-[2-(5-[(2S)-2-((2S)-2-[2-(2, 5-dioxo-2, 5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido]-3-metilbutanoil)amino)propanoil]amino)-2-[[[3-[(7S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-7, 8, 11, 13-tetrahidro-2H, 10H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il]carbamoi]oxi]metil]fenil)etil]-3, 4, 5-trihidroxioxan-2-carboxílico

A una solución del ejemplo 3B (1.02 g) en N, N-dimetilformamida (16 mL) se le añadió el 2-(2, 5-dioxo-2, 5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetato de 2, 5-dioxopirrolidin-1-ilo (0.28 g) seguido de la N, N-diisopropiletil amina (0.8 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se enfrió con ácido acético (0.8 mL) y se purificó por medio de una HPLC en fase inversa en un sistema Gilson PLC 2020 a través del uso de una columna Luna (250 × 50 mm, 10 mm), eluyendo con acetonitrilo del 5 al 75 por ciento en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0.1 por ciento durante 30 minutos para proporcionar el compuesto del título después de la liofilización. RMN de ¹H (501 MHz, sulfóxido de dimetilo -d₆) δ ppm 9.90 (s, 1 H), 8.29 - 8.25 (m, 2 H), 8.11 (s, 1 H), 7.64 (s, 1 H), 7.51 (s, 1 H), 7.47 (d, 1 H), 7.42 (d, 1 H), 7.27 (d, 1 H), 7.23 (s, 1 H), 7.08 (s, 2 H), 6.30 (s, 2 H), 5.42 (s, 2 H), 5.36 (s, 2 H), 5.03 (s, 2 H), 4.38 (p, 1 H), 4.22 (dd, 1 H), 4.13 (s, 2 H), 3.58 (d, 2 H), 3.15 (d, 4 H), 2.97 (t, 1 H), 2.71 (s, 6 H), 2.10 - 1.93 (m, 2 H), 1.86 (dp, 2 H), 1.64 - 1.52 (m, 1 H), 1.31 (d, 3 H), 0.91 - 0.79 (m, 9 H). MS (ESI+) m/z 1134.3 (M + H)⁺.

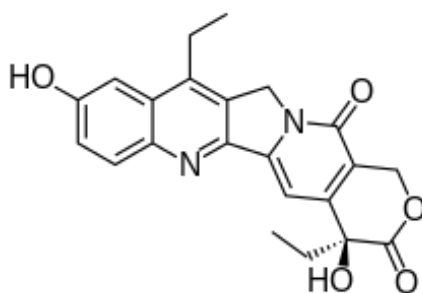
Ejemplo 4: Proliferación celular

El efecto de los fármacos de TOP1i sobre la viabilidad celular se evaluó por medio del monitoreo de la presencia de ATP en las células metabólicamente activas. La proliferación de las células Calu-6 (adenocarcinoma de pulmón) y de las células A375 (melanoma maligno) se cuantificó por medio de luminiscencia CellTiter-Glo®. Como se muestra en la figura 2A y en la tabla 1, el compuesto de la fórmula I (ejemplo 1G) exhibió una potencia subnanomolar para reducir la viabilidad de la proliferación de las células Calu-6 (0.57 nM, figura 2A) y A375 (0.50 nM, figura 2B). Esta potencia subnanomolar mejoró el rendimiento del fármaco de TOP1i SN-38 en el mismo ensayo, que demostró una EC₅₀ de 6.58 nM (Calu-6) y 2.30 nM

(A375).

Tabla 1: Potencia del compuesto de TOP1i

Compuesto	EC ₅₀ (nM)	
	Calu-6	A375
SN-38	6.58	2.30
Ejemplo 1G	0.57	0.50



(IV) SN-38

Ejemplo 5: Preparación y purificación de AbA

El AbA se expresó en las células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) con las secuencias de las cadenas pesada y ligera de las SEQ ID NO: 9 y 10, respectivamente. El AbA se aisló y se purificó antes de la conjugación.

Ejemplo 6: Procedimiento de conjugación (ADC-1)**Paso de conjugación 1**

Antes de la reducción, se incubó una solución del anticuerpo AbA anti-c-Met a 4 °C durante un mínimo de 12 horas. A continuación, se añadió una solución de la sal disódica del ácido etilendiaminotetra acético 0.5 M (EDTA, Sigma Aldrich), para una concentración final de 5 mM. Se añadió la tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP, 100 mM, 2.67 equivalentes molares, Bond Breaker^{MR}, Thermo Scientific^{MR}) a la solución (aproximadamente 10 mg por mL en 1X DPBS (solución salina regulada con fosfato de Dulbecco) con un mezclado suave de la placa de agitación (225 rpm) durante 5 minutos. Después de la incubación en el refrigerador a 4 °C durante 17 horas, la solución se llevó hasta 22 °C en una placa de agitación por medio del mezclado a 225 rpm. A continuación, se añadió un codisolvente de N, N-dimetilacetamida (DMA, Sigma Aldrich) al 10 por ciento v/v, seguido de un 20 por ciento v/v de ácido bórico 1 M preparado, pH de 8.0 (Sigma Aldrich) y luego 6 equivalentes molares del fármaco enlazador LD1 50 mM (fórmula estructural V, ejemplo 1J) en N, N-dimetilacetamida, gota a gota. El mezclado se interrumpió después de 20 minutos y la solución se incubó a 22 °C durante 3.3 horas. Después de la incubación, se añadieron a la solución 2 equivalentes molares de N-acetil-L-cisteína 50 mM (NAC, Sigma Aldrich) que se prepararon en 1X DPBS,

y se mezclaron con suavidad agitando manualmente el recipiente. Después de una incubación de 1 hora a 22 °C, la solución se desalinizó a través del uso de una columna de desalinización fina G25 (Cytiva^{MR}) de 691 mL, en 1X DPBS.

Paso de conjugación 2

Antes de la reducción, se incubó una solución del anticuerpo AbA anti-c-Met a 4 °C durante un mínimo de 12 horas. A continuación, se añadió una solución de sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético 0.5 M (EDTA, Sigma Aldrich), para una concentración final de 5 mM. Se añadió la tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP, 100 mM, 1.00 eq mol, Bond Breaker^{MR}, Thermo Scientific^{MR}) a una solución de los anticuerpos (aproximadamente 4 mg por mL en 1X DPBS) con un mezclado suave de la placa de agitación (225 rpm) durante 5 minutos. Después de la incubación en el refrigerador a 4 °C durante 17 horas, la solución se llevó hasta 22 °C en una placa de agitación por medio del mezclado a 225 rpm. A continuación, se añadió un codisolvente de N, N-dimetilacetamida (DMA, Sigma Aldrich) al 10 por ciento v/v, seguido de ácido bórico al 20 por ciento v/v 1 M, pH de 8.0 (Sigma Aldrich) y luego 4 equivalentes molares del fármaco enlazador LD1 50 mM (fórmula estructural V, ejemplo 1J) en N, N-dimetilacetamida, gota a gota. El mezclado se interrumpió después de 20 minutos y la solución se incubó a 22 °C durante 2.1 horas. Después de la incubación, se añadieron a la solución 2 equivalentes molares de N-acetil-L-cisteína 10 mM (NAC, Sigma Aldrich), que se preparan en 1X DPBS, y se mezclaron con suavidad agitando manualmente el recipiente. Después de una incubación de 5 horas a 22 °C, la solución se concentró y se intercambió el regulador por medio de ultrafiltración y diafiltración (UF/DF).

Paso de UF/DF

Se enjuagó un casete Pellicon® 3 de 0.22 m² (Millipore) con 2 L de agua estéril y luego con 0.5 L de regulador de formulación. La ultrafiltración (UF) se llevó a cabo a una velocidad de flujo de alimentación de 250 mL por minuto y a una presión transmembranal (TMP, por sus siglas en inglés) de 0.82 bar (12 a 13 psi), con un volumen inicial de 1.3 L. El volumen final del permeado fue de 1.1 L. La diafiltración (DF) se llevó a cabo con 25 diavolumenes (DV) de regulador de formulación final, a la misma velocidad de flujo de alimentación y TMP que en el paso de UF. Después de la DF, se llevó a cabo un segundo paso de UF para reducir aún más el volumen de la solución de ADC hasta 100 mL. Se retiró la solución de ADC y el casete se enjuagó dos veces y con 125 mL de regulador de formulación que luego se ultrafiltró hasta 20 mL cada una. Estos enjuagues se agregaron luego a la solución de ADC a granel. La solución final se filtró para esterilizarse con un filtro de 0.22 µm, antes de la caracterización.

Ejemplo 7: Procedimiento de conjugación (ADC-2)

Antes de la reducción, se incubó una solución de anticuerpo AbA anti-c-Met en hielo húmedo durante 35 minutos. A continuación, se añadió una solución de sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético 0.5 M (EDTA, Sigma Aldrich), para una concentración final de 5 mM. Se añadió la tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP, 25 mM, 3.50 equivalentes molares, Bond Breaker^{MR}, Thermo Scientific^{MR}) a la solución (aproximadamente 10 mg por mL en 1X DPBS) y se mezcló con suavidad invirtiendo con lentitud el tubo varias veces. A continuación, la solución se colocó en hielo húmedo y se colocó en el refrigerador a 4 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se añadió un codisolvente de N, N-dimetilacetamida al 10 por

ciento v/v seguido de 10 equivalentes molares del fármaco enlazador LD2 10 mM (fórmula estructural VI, ejemplo 2) en una solución de N, N-dimetilacetamida (DMA, Sigma Aldrich), y se mezcló con suavidad invirtiendo con lentitud el tubo varias veces. A continuación, la solución se colocó en hielo húmedo durante 30 minutos y se incubó a 22 °C durante 90 minutos. Después de la incubación, se añadieron a la solución 8 equivalentes molares de N-acetil-L-cisteína 10 mM (NAC, Sigma Aldrich) que se preparan en PBS, y se mezclaron con suavidad invirtiendo con lentitud el tubo varias veces. Después de una incubación de 60 minutos a 22 °C, la solución se desalinizó sobre una columna de desalinización HiPrep^{MR} 26/10 en 1X DPBS (Cytiva^{MR}). A continuación, los ADC desalinizados se hidrolizaron por medio de la adición de una solución preparada de ácido bórico 1 M al 10 por ciento v/v, pH de 8.0 (Sigma Aldrich) con una incubación a 22 °C, durante 96 horas. Los ADC hidrolizados se purificaron por medio de afinidad acoplada a la cromatografía desalinizante (2 x 1 mL HiTrap mAbselect SuRe, HiPrep^{MR} desalinización 26/10, Cytiva^{MR}) en una formulación final de 1X DPBS. Las fracciones recolectadas se agruparon y se filtraron para esterilizarse a través de un filtro de 0.22 µm antes de la caracterización.

Ejemplo 8: Procedimiento de conjugación (ADC-3)

Se añadió la sal disódica acuosa del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 0.5 M, 21, 3 µL, Sigma Aldrich) a 5.337 mL de una solución de anticuerpo anti-c-Met (AbA, 13.34 mg por mL en 1X DPBS, pH de 7.4). Se añadió la tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP, 10 mM, 3.0 eq molar, 142.4 µL, Bond Breaker^{MR}, Thermo Scientific^{MR}) a la solución, se agitó con suavidad y se mantuvo a 37 °C durante 75 minutos. La solución se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadió el fármaco enlazador LD3 (fórmula estructural VII, ejemplo 3C) (10 eq., 527 µL de una solución 10 mM del LD3 (fórmula estructural VII, ejemplo 3C en N, N-dimetil acetamida, 90 por ciento de pureza)). La conjugación se agitó con suavidad y se dejó reposar durante 1.2 horas a temperatura ambiente. La solución de ADC se purificó por medio de una desalinización. Después de la desalinización, la solución de ADC se filtró a través de un filtro de 0.22 µm y la muestra resultante se almacenó a 4 °C. El ADC resultante se hidrolizó añadiendo un 10 por ciento v/v de regulador de borato 1.0 M, pH de 8.0 y se incubó en un ambiente oscuro a temperatura ambiente durante 72 horas. Después de la hidrólisis, la solución de ADC resultante se purificó por medio de una adsorción en una columna de resina de proteína A (MabSelect^{MR} SuRe^{MR} LX, GE Healthcare); lavado con 4 vol. de columna de 1X DPBS, pH de 7.4; elución de la resina con 5 vol. de columna de regulador de elución de la IgG (Thermo Scientific^{MR}); y desalinización en 1X DPBS, pH de 7.4. Después de la desalinización, la solución de ADC se filtró a través de un filtro de 0.22 µm y la muestra resultante se almacenó a 4 °C.

Ejemplo 9: Procedimiento de conjugación (ADC-4)

Se añadió la sal disódica acuosa del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 0.5 M, 974 µL, Sigma Aldrich) a 243.3 mL de una solución purificada del anticuerpo MSL109-C6v1 (12.3 mg por mL en un regulador de Tris 20 mM, pH de 7.4). El MSL109-C6v1 es un anticuerpo monoclonal que se enlaza a la glicoproteína H del CMV. El MSL109-C6v1 comprende una cadena pesada que se estipula como la SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que se estipula como la SEQ ID NO: 12 y se utiliza como un anticuerpo de control no dirigido. Se añadió la tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP, 500 mM, 6.0 eq molar, 242.4 µL, Bond Breaker^{MR}, Thermo Scientific^{MR}) a la solución del MSL109-C6v1 con 2 mM de EDTA, y se agitó con

suavidad y se mantuvo a 4 °C durante 20 horas. Se añadió el regulador de Tris a 4 °C (1.0 M, pH de 8.0) a la solución (24.5 mL, 10 por ciento v/v). El fármaco enlazador LD1 (ejemplo 1J, (2S)-2-(2-bromo acetamido)-N-[(2S)-1-({3-[(7S)-7-etil-7-hidroxi-8, 11-dioxo-7, 8, 11, 13-tetrahidro-2H, 10H-[1, 3]dioxolo[4, 5-g]pirano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il}amino)-1-oxopropan-2-il]-3-metil butanamida) al anticuerpo reducido a un pH de 8.0 (10 equivalentes, 22.5 mL de una solución 10 mM del LD1, fórmula estructural V, ejemplo 1J, en N, N-dimetilacetamida, 90 por ciento de pureza). La conjugación se agitó con suavidad y se dejó reposar durante 1.5 horas en un baño de agua a temperatura ambiente. La conjugación se apagó con la adición de 4 equivalentes de una solución acuosa de N-acetil-L-cisteína (NAC, Sigma Aldrich, solución de 100 mM en 1X DPBS, 0.8 mL). La mezcla se agitó con suavidad y se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió un regulador de Tris (15 por ciento, Sigma, 1.0 M, pH de 7.4, 44 mL) para ajustar la solución de ADC a un pH de 7.5. La solución de ADC se almacenó a 4 °C durante la noche. La solución de ADC se concentró y el regulador se intercambió por medio de ultrafiltración y diafiltración (Casete Pellicon® 3 0.22 m² (Millipore)). La solución final de ADC se filtró a través de un filtro de 0.22 µm y la muestra de ADC resultante se almacenó a 4 °C. El volumen final de ADC fue de 138 mL.

Ejemplo 10: Determinación de DAR (proporción del fármaco al anticuerpo)

La DAR se determinó por medio de LC-MS. El análisis de LC-MS se llevó a cabo a través del uso de un sistema de HPLC Agilent 1100 interconectado a un espectrómetro de masas Agilent LC/MSD TOF 6220 ESI. El ADC se redujo con una solución de TCEP Bond-Breaker^{MR} 5 mM (concentración final) (Thermo Scientific^{MR}, Rockford, IL), se cargó en un cartucho de desalinización Protein Microtrap (Michrom Bioresources, Auburn, CA) y se eluyó con un gradiente del 10 por ciento de B al 75 por ciento de B en 0.2 minutos a temperatura ambiente. La fase móvil A fue de H₂O con ácido fórmico (AF) al 0.1 por ciento, la fase móvil B fue acetonitrilo con FA al 0.1 por ciento, y la velocidad de flujo fue de 0.2 mL por minuto. Los espectros de masas de tiempo de vuelo de ionización por electroaspersión de las cadenas ligeras y pesadas en elución conjunta se adquirieron a través del uso del software de adquisición Agilent Mass Hunter^{MR}. La intensidad extraída frente al espectro de *m/z* se desconvolucionó a través del uso de la función de máxima entropía del software MassHunter^{MR} con el fin de determinar la masa de cada fragmento de anticuerpo reducido. La DAR se calculó a partir del espectro desconvolucionado por medio de la suma de las intensidades de los picos desnudos y modificados para la cadena ligera y la cadena pesada, normalizadas por medio de la multiplicación de la intensidad por el número de fármacos adheridos. Las intensidades sumadas normalizadas se dividieron por la suma de las intensidades, y los resultados de la suma para dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas produjeron un valor de DAR promedio final para el ADC completo. La hidrólisis con tiosuccinimida de un bioconjugado se puede monitorear por medio de una espectrometría de masas por electroaspersión, debido a que la adición de agua al conjugado da como resultado un aumento de 18 Dáltones en el peso molecular observable del conjugado.

Ejemplo 11: Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Las células tumorales se sembraron en 2000 a 5000 células por pozo en 180 µL de un medio de crecimiento que contenía FBS al 10 por ciento (suero bovino fetal) en placas de 96 pozos y se cultivaron a

37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 por ciento. Después de 18 a 24 horas, se agregaron los títulos de los anticuerpos o de los ADC en 20 µL y las células se incubaron durante 6 días, con la excepción de HCC827, NCI-H820 y HEK-293 (5 días) y MIA PaCa2 (4 días). La viabilidad celular se determinó por medio del uso de un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. También se incluyó en todos los ensayos un ADC de control negativo irrelevante y no enlazante (ADC-4, fórmula estructural VIII, en donde Ab es MSL109-C6v1) para confirmar que la destrucción celular dependía del antígeno. Todos los ADC tuvieron una DAR promedio aproximadamente equivalente.

Tabla 2: Conjugados de anticuerpo-fármaco

	Anticuerpo	Cadena pesada de anticuerpo (SEQ ID NO)	Cadena ligera de anticuerpo (SEQ ID NO)	Fórmula estructural de ADC	Ejemplo de conjugación
ADC-1	ABA	9	10	VIII	Ej. 6
ADC-2	ABA	9	10	IX	Ej. 7
ADC-3	ABA	9	10	X	Ej. 8
ADC-4	MSL109-C6v1	11	12	VIII	Ej. 9

Ejemplo 12: Determinación de la densidad del receptor

La densidad de superficie celular de c-Met (capacidad de enlace a los antígenos por célula) se determinó por medio de una tinción de inmunofluorescencia indirecta de los antígenos de superficie celular en las células cultivadas a través del uso de QIFIKIT® (Dako/Agilent). Dicho de una manera breve, las células se recolectaron a partir de un matraz de cultivo como se describe en los párrafos anteriores para el análisis de FACS (clasificación celular activada por fluorescencia), se agregaron a una placa del fondo redondo de 96 pozos en 100 µL por pozo y se incubaron a 4 °C con 3 µg por mL del anticuerpo de c-Met m224G11. Los pozos, tratados con un anticuerpo monoclonal de ratón irrelevante del mismo isotipo (mIgG1) en 3 µg por mL, se incluyeron como los controles. Después de una incubación de una hora con el anticuerpo primario, las células se centrifugaron durante 3 minutos a 300 x g y se lavaron dos veces con el regulador de FACS. Para la tinción de inmunofluorescencia indirecta de las perlas QIFIKIT®, se añadieron 100 µL de perlas resuspendidas del vial 1 (perlas de preparación) y el vial 2 (perlas de calibración) a los pozos separados, se centrifugaron durante 3 minutos a 300 x g, y se lavaron una vez con regulador de FACS. Todos los pozos se incubaron durante una hora a 4 °C con 100 µL del anticuerpo conjugado Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, cat. # A-11029) diluido a 1: 250 en un regulador de FACS. Las células se centrifugaron durante 3 minutos a 300 x g, se lavaron dos veces con regulador de FACS y se fijaron con

100 μ L por pozo de formaldehído al 1 por ciento en PBS (solución salina regulada con fosfato). Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo BD^{MR} LSRII y se registraron los valores geomédios para las 5 poblaciones de perlas y se utilizaron para generar una curva estándar basada en las moléculas de los anticuerpos específicos del lote por perla. La curva estándar se utilizó para asignar la ABC (capacidad de enlace a los anticuerpos o número de receptores) a las muestras celulares teñidas.

Resultados

Con el fin de determinar una posible correlación entre el nivel de expresión de c-Met y la sensibilidad al ADC-1, se probó un panel de 9 líneas celulares en los ensayos de proliferación *in vitro*. El análisis de FACS demostró que estas líneas celulares poseen un intervalo de niveles de expresión de c-Met cuantificados a través de la capacidad de enlace a los anticuerpos de c-Met que representan el número de las moléculas de c-Met de superficie celular (tabla 3). La sensibilidad al ADC-1 en el ensayo de proliferación celular se cuantificó como la destrucción máxima y la IC₅₀ (tabla 3). El ADC-1 inhibió la proliferación de las células de cáncer que sobreexpresan c-Met, las que incluyen las líneas celulares amplificadas *MET* (tabla 3). A modo de comparación, el AbA no conjugado inhibió la proliferación de las células con amplificación *MET*, es decir, Hs 746T, SNU-5 y EBC-1 (figuras 3A a 3C), pero no las líneas celulares sin la amplificación *MET*, es decir, NCI-H441, NCI-H1573, HCC827, NCI-H820 y Calu-3, y en donde el ADC-1 también estaba activo (figuras 3D a 3H). Ni el AbA no conjugado ni el ADC-1 fueron activos en las células HEK-293 y MIA PaCa2 que expresaban un bajo contenido de c-Met (tabla 3, figura 3I y figura 3J), lo que sugiere que existe un nivel umbral de expresión de c-Met requerido para una destrucción significativa por medio del ADC-1.

Tabla 3: Potencia celular *in vitro*

Tejido	Receptores de c-Met/célula ^a	Citotoxicidad IC ₅₀ (nM)		
		ADC-3 (máx. ^b)	ADC-2 (máx.)	ADC-1 (máx.)
Adenocarcinoma de NSCLC				
NCI-H441	197,000	0.1 (60 %)	0.1 (70 %)	0.25 (70 %)
NCI-H441	170,000	0.2 (85 %)	0.25 (90 %)	0.3 (90 %)
NCI-H1573	116,000	1.1 (60 %)	1 ^c (40 %)	1 ^c (40 %)
HCC827	94,000	0.5 (80 %)	0.9 (70 %)	0.85 (70 %)
NCI-H820	70,000	0.06 (75 %)	0.16 (75 %)	0.17 (75 %)
Calu-3	60,000	Nd	Nd	20 (30 %)

Tejido	Receptores de c-Met/célula ^a	Citotoxicidad IC ₅₀ (nM)		
		ADC-3 (máx. ^b)	ADC-2 (máx.)	ADC-1 (máx.)
Gástrico				
Hs 746T	320,000	0.050 (40 %)	0.1 (50 %)	0.17 (50 %)
SNU-5	290,000	nd ^e	nd	0.19 (90 %)
Riñón embrionario				
HEK-293	27,000	nd	nd	> 60 ^d
Pancreático				
MIA PaCa-2	5000	> 60 ^d	> 60 ^d	> 60 ^d

^a Número aproximado de las moléculas de c-Met en la superficie celular determinado por medio del análisis de FACS como la capacidad de enlace a los anticuerpos por el enlace al m224GI I (el progenitor de AbA de murino) en 0.01 mg por mL.

^b Max es el porcentaje de disminución máximo en relación con el control no tratado en el ensayo de proliferación.

^c Estimado debido a los problemas de ajuste de la curva.

^d No es diferente del control.

^e nd significa no determinado.

Ejemplo 13: El ADC de TOP1i dirigido a c-Met inhibe el crecimiento de los xenoinjertos de cáncer *in vivo*

Las líneas celulares Hs 746T y NCI-H441 se obtuvieron a partir de ATCC (American Type Culture Collection). Las células se mantuvieron en un cultivo de una sola capa durante un máximo de 3 pasadas de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Se inyectó por la vía subcutánea una suspensión de 2×10^6 células en el medio de cultivo mezclado con Matrigel® (1: 1, volumen: volumen) en el flanco derecho de los ratones hembras C.B-17 SCID para generar los xenoinjertos a partir de la línea celular de carcinoma gástrico, Hs 746T. Con el fin de generar los xenoinjertos a partir de la línea celular de NSCLC, NCI-H441, se inyectó por la vía subcutánea una suspensión de 5×10^6 células en el medio de cultivo mezclado con Matrigel (1: 1, volumen: volumen) en los ratones hembras SCID/bg. El tratamiento se inició cuando el tamaño de los tumores del flanco era de aproximadamente 200 mm³.

Se administraron el vehículo (0 mg por kg) y cuatro niveles de dosis (dosis A a D, de menor a mayor). Cada animal recibió una sola dosis.

Las figuras 4A y 4B muestran que el ADC-1 inhibió el crecimiento del NSCLC humano cultivado como

xenoinjertos en los ratones inmunocomprometidos. Se observa una inhibición robusta del crecimiento después de la administración de una dosis del ADC-1 en la dosis C y la dosis D, con un retraso moderado del crecimiento del tumor después de la administración de la dosis B en los xenoinjertos Hs 746T y NCI-H441.

Ejemplo 14: Los ADC de TOP1i que se dirigen a c-MET inhiben el crecimiento de las células de cáncer derivadas del paciente *in vivo*

Los modelos de xenoinjertos derivados a partir del paciente (PDX, por sus siglas en inglés) de NSCLC, LU450, LU120, LU572, LU123 y LU413, se establecieron internamente por medio de la implantación subcutánea de fragmentos de tejido de biopsia del paciente en los ratones hembras inmunodeficientes NOD/SCID (Charles River Laboratories). Una vez que se establecieron los tumores, las células tumorales de los PDX se expandieron por medio de la disociación de los tumores hacia las suspensiones celulares, y se mezclaron en 5×10^4 células en el medio de cultivo con Matrigel® (1: 1, volumen: volumen) y se inyectaron por la vía subcutánea en la región de la almohadilla de grasa mamaria de los ratones hembras NOD/SCID. Para los estudios de eficacia, los ratones portadores de tumores se asignaron al azar en los grupos de tratamiento, y cada grupo tenía el mismo volumen tumoral promedio (de 130 a 200 mm³). Los ADC de c-Met se administraron como una sola dosis en seis niveles de dosis (dosis A a F, de menor a mayor) por medio de una inyección intraperitoneal. La eficacia dirigida a c-Met se comparó con una administración similar del vehículo. Los volúmenes tumorales se midieron de una a dos veces por semana, y la eficacia se evaluó por medio de la representación gráfica del volumen tumoral (mm³) frente al tiempo para calcular el tiempo hasta la progresión del tumor (TTP, por sus siglas en inglés). El TTP, expresado en días, es el tiempo después del tratamiento con una sola dosis cuando el tumor vuelve a crecer al doble del tamaño antes del tratamiento (en la asignación al azar). El TTP para las respuestas duraderas (curas) se indica como la duración del estudio con un signo de ">" delante del número.

TABLA 4. Actividad *in vivo* de ADC-1 y ADC-2 en modelos de PDX de NSCLC

Nombre de PDX	ADC-1 ¹	TTP (días)
LU450	0	3
	3	15
	10	23
LU572	0	9
	0.1	26
	0.25	> 78

Nombre de PDX	ADC-1 ¹	TTP (días)
	1	> 91
5	3	> 91
	0	4
10	3	41
Nombre de PDX	ADC-2	TTP (días)
15	0	4
	5	34
	10	45
20	0	8
	5	> 106
	10	> 113
25	0	23
	5	> 94
	10	> 112
30	0	11
	5	40
	10	71

¹ 0 = Control de vehículo.

Un ADC que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula estructural (VIII) demostró una mejora de la toxicidad *in vivo*.

Tabla de Información del Listado de Secuencias

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	AbA CDR-H1	GYIFTAYT
2	AbA CDR-H2	IKPNNGLA
3	AbA CDR-H3	ARSEITTEFDY
4	AbA CDR-L1	ESVDSYANSF
5	AbA CDR-L2	RAS
6	AbA CDR-L3	QQSKEDPLT
7	Dominio variable de la cadena pesada de AbA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTMH WVRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANAYAQKFQGRVT MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSEITTEFD YWGQGTLLTVSS
8	Dominio variable de la cadena ligera de AbA	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVDYANSFL HWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGGTKV EIK
9	Cadena pesada de AbA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTMH WVRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANAYAQKFQGRVT MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSEITTEFD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDCHCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
5 10	10 Cadena ligera de AbA	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVDSYANSFL HWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVDPDRFSGSGSG TDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
15 20 25	11 Cadena pesada de MSL109-C6v1	EEQVLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSPYSVF WVRQAPGKGLEWVSSINSDESTYKYYADSVKGRFTIS RDNAENSIFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRSYYAFSS GSLSDYYYGLDVWGQGTIVVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHCTPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	12 Cadena ligera de MSL109-C6v1	DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLHTNGYNY LDWYVQKPGQSPQLLIYLASNRASGVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVETEDVGYYCMQALQIPRTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEA
35	13 Dominio variable de la cadena pesada de m224G11	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHW VRQSLGESLDWIGGIKPNNGLANYNQFKGKATLTV DKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCARSEITTEFDYW GQGTALTIVSS

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
5	14	Dominio variable de la cadena ligera de m224G11
		DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSFM HWYQQKPGQPPLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRT DFTLTINPVEADDVATYYCQQSKEDPLTFGSGTKLE MK
	15	m224G11 HC CDR1
		GYIFTAYT
10	16	m224G11 HC CDR2
		IKPNNGLA
	17	m224G11 HC CDR3
		ARSEITTEFDY
	18	m224G11 LC CDR1
		ESVDSYANSF
15	19	m224G11 LC CDR2
		RAS
	20	m224G11 LC CDR3
		QQSKEDPLT
20	21	ADN que codifica la cadena pesada de AbA
		atgggatggctcttgatcttctgctgtttctgtctggtactgctggtgtgctgag ccaggccagctggtgcaatccggcgagaggtgaagaagccaggcg cttcggtgaaggtagctgtaaggcctctggctacatctcacagcataca ccatgcactgggtgaggcaagctcctgggcagggactggagtgatgg gatggattaaacccaacaatgggctggccaactacgcccagaaattcca gggtagggtcactatgacaagggataccagcatcagcaccgcataatg gagctgagcaggctgaggtctgacgacactgctgtctattattgcgccagg agcgaaattacaacagaattcgattactgggggcagggcaccctggtga ccgtgtcctctgccagcaccaagggcccaagcgtgttccccctggcccc agcagcaagagcaccagcggcgccacagccgctgggctgcctggt gaaggactactccccgagcccgtgaccgtgtcctggaacagcggagcc ctcacttctggagttcatacctcccagcagtattgcagagcagtggcctgt attcactgtctccgtcgtaacagttccatcctccagcctcgggacacagac ttacatttgaacgtgaatcacaagcctagcaacaccaaggtcgacaaga gagttgaaccaaagagttgtgattgccactgtcctcctgccagctcctga gctgcttgccggtccagtgcttctgttccccctaaaccaaagacacc ctgatgatctcaaggactcccgaggtagatgcgtggtggtgagtggtctc atgaggaccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcggtgaggt gcacaacgccaagaccaagcccagagaggagcagtagacaacagcacc

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		tacaggggtggtgccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacgg caaggagtacaagtgttaaggtgtccaacaaggccctgccagccccaat cgaaaagaccatcagcaaggccaagggccagccaagagagcccca gggttacacctgccaccagcagggaggagatgaccaagaaccagg tgtccctgacctgtctggtgaagggttctaccaagcgacatgccgtgg agtgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccc cccagtgtggacagcgacggcagcttcttctgtacagcaagctgaccg tggacaagagcagatggcagcagggcaacgtgttcagctgctccgtgat gcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagagcctgagcctgtc cccaggctga
22	ADN que codifica CDR-H1 de AbA	ggctacatcttcacagcatacacc
23	ADN que codifica CDR-H2 de AbA	attaaaccaacaatgggctggcc
24	ADN que codifica CDR-H3 de AbA	gccaggagcgaaattacaacagaattcgattac
25	ADN que codifica cadena ligera de AbA	atggaaactgatactgctgctgtgggtcctgctgctgtgggtccctggaa gcacagggggacattgtgatgaccagctctcccgatagcctggccgtgtcc ctgggcgagagggctaccatcaactgtaaaagctccgaatctgtggactc ttacgcaaacagcttctgcactggatcagcaaaagccaggccaacctc caaagctgctgatttacagggtcttaccaggagagcggcgtgcccgat aggttcagcggatctggcagcggcaccgactttacactgaccatctccag cctgcaggccgaagatgtggcagctctattactgccagcagtcgaaggag gaccccctgacttctgggggtgtactaaagtggagatcaagcgtacggt ggccgctcccagcgtgttcattctcccccaagcgacgagcagctgaag agcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctacccaggga ggccaaggtgcagtgaaggtggacaacgccctgcagagcgggaaca gccaggagagcgtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagc ctgagcagcaccctgacctgagcaaggccgactacgagaagcaca ggtgtacgcctgtgaggtgaccaccagggcctgtccagccccgtgacc aagagcttcaacaggggagtgctga

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
26	ADN que codifica CDR-L1 de AbA	gaatctgtggactcttacgcaaacagcttt
27	ADN que codifica CDR-L2 de AbA	agggttct
28	ADN que codifica CDR-L3 de AbA	cagcagtccaaggaggaccccctgact