



(51) International Patent Classification:

C07K 16/28 (2006.01) A61K 47/65 (2017.01)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2024/052569

(22) International Filing Date:

16 March 2024 (16.03.2024)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

202321018198 17 March 2023 (17.03.2023) IN

(71) Applicant: ZYDUS LIFESCIENCES LIMITED

[IN/IN]; Zydus Corporate Park, Scheme No. 63, Survey No. 536, Khoraj (Gandhinagar), Nr. Vaishnodevi Circle, Ahmedabad, Gandhinagar, Gujarat 382481 (IN).

(72) Inventors: MENDIRATTA, Sanjeev Kumar; Zydus

Lifesciences Limited, Zydus Corporate Park, Scheme No. 63, Survey No. 536, Khoraj (Gandhinagar), Nr. Vaishnodevi Circle, Ahmedabad, Gandhinagar, Gujarat 382481 (IN). BANDYOPADHYAY, Sanjay; Zydus Lifesciences Limited, Zydus Corporate Park, Scheme No. 63, Survey No. 536, Khoraj (Gandhinagar), Nr. Vaishnodevi Circle, Ahmedabad, Gandhinagar, Gujarat 382481 (IN). SINGH, Avanish; Zydus Lifesciences Limited, Zydus Corporate Park, Scheme No. 63, Survey No. 536, Khoraj (Gandhinagar), Nr. Vaishnodevi Circle, Ahmedabad, Gandhinagar, Gujarat 382481 (IN). KALITA, Pankaj; Zydus Lifesciences Limited, Zydus Corporate Park, Scheme No. 63, Survey No. 536, Khoraj (Gandhinagar), Nr. Vaishnodevi Circle, Ahmedabad, Gandhinagar, Gujarat 382481 (IN). SONI, Swagat; Zydus Lifesciences Limited, Zydus Corporate Park, Scheme No. 63, Survey No. 536, Khoraj (Gandhinagar), Nr. Vaishnodevi Circle, Ahmedabad, Gandhinagar, Gujarat 382481 (IN).

(74) Agent: MAHLA, Aaysu et al.; Subramaniam & Associates,

7th Floor, M3M Cosmopolitan, Sector 66, Golf Course Extension Road, Gurugram, National Capital Region 122001 (IN).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,

KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of regional protection available): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))
— in black and white; the international application as filed contained color or greyscale and is available for download from PATENTSCOPE

(54) Title: SACITUZUMAB DRUG CONJUGATES AND PREPARATION THEREOF

(57) Abstract: The invention provides antibody-linker-drug conjugates wherein antibody is sacituzumab and drug is auristatin analogues or a pharmaceutically acceptable salt thereof. The invention also provides a process of preparing antibody-linker-conjugates of the present invention.



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference ZLL-PCT0889		FOR FURTHER ACTION See Form PCT/IPEA/416	
International application No. PCT/IB2024/052569	International filing date (day/month/year) 16-03-2024	Priority date (day/month/year) 17-03-2023	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K16/28 Version=2025.01			
Applicant ZYDUS LIFESCIENCES LIMITED			

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.	
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:	
a. ☒ a total of <u>148</u> sheets, as follows:	
☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions).	
☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2).	
☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)).	
b. ☐ a separate electronic file containing a sequence listing (sent to the International Bureau only).	
4. This report contains indications relating to the following items: _____	
☒ Box No. I Basis of the report	
☐ Box No. II Priority	
☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	
☐ Box No. IV Lack of unity of invention	
☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	
☐ Box No. VI Certain documents cited	
☐ Box No. VII Certain defects in the international application	
☐ Box No. VIII Certain observations on the international application	

Date of submission of the demand 17-01-2025	Date of completion of this report 18-07-2025
Name and mailing address of the IPEA/ Indian Patent Office Plot No. 32, Sector 14, Dwarka, New Delhi-110075 Facsimile No.	Authorized officer Anjana Haridas Telephone No. +91-1125300200

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/IB2024/052569

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
- ☐ publication of the international application (Rule 12.4(a)).
- ☐ international preliminary examination (Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b)).

2. With regard to the **elements** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

- ☐ the international application as originally filed/furnished, or
- ☒ the description: pages _____ as originally filed/furnished.
 pages* 1-38 received by this Authority on 17-01-2025
 pages* _____ received by this Authority on _____
- ☐ the claims: Nos. _____ as originally filed/furnished.
 Nos.* _____ as amended (together with any statement) under Article 19
 Nos.* 1-16 received by this Authority on 17-01-2025
- ☒ the drawings: pages 1-5 as originally filed/furnished.
 pages* _____ received by this Authority on _____
 pages* _____ received by this Authority on _____
- ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____

5. ☐ This report has been established:

- ☐ taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
- ☐ without taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4bis and 70.2(e)).

6. With regard to top-up searches (Rules 66.1ter and 70.2(f)):

- ☐ A top-up search was carried out by this Authority on _____
- ☐ Additional relevant documents have been discovered during the top-up search.
- ☒ No top-up search was carried out by this Authority because it would serve no useful purpose.

7. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) _____ has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/IB2024/052569

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-16	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

The applicant's response dated 18 July 2025 to the written opinion of the International Preliminary Examination Authority (issued for the amended claims filed by the applicant under Article 34 via. demand for International Preliminary Examination dated 17.01.2025) has been duly considered.

Upon re-evaluation of the claims 1-16 under Article 33 of PCT, it is concluded by this IPEA that they do not meet the requirements of PCT Articles 33(2) and 33(3) as explained herein. Reference is made to the following prior art documents cited in the international search report:

D1: CN108066772B [SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES], 13 July 2021 [13-07-2021]

D2: WO2021027851A1 [XDCEXPLORER SHANGHAI CO., LTD], 18 February 2021 [18-02-2021]

D1 discloses Antibody and Drug Conjugate (ADC) molecules targeting TACTD 2 (TROP2), comprising hRS7 antibody (sacituzumab) bound to MMAE by the linker MC-VC-PABC, wherein mc is (maleimidocaproyl), vc is (valine-citrulline), PABC is (para-aminobenzyloxycarbonyl) (see D1, formula II, paragraph [0018]-[0022], [0091], [0092]; SEQ ID NO:1 & 2; figures).

D2 discloses antibody drug conjugate comprising TROP2 antibody conjugated to drug toxin such as MMAE or MMAF by linker maleimidocaproyl-L-valine-L-citrulline-aminobenzyl alcohol (MC-VC-PAB). The antibody hRS7 is used as control antibody and have been linked to MMAF and other toxins (see D2, table 10; example 9; figs.15 & 16; formula 5; claims)

ARTICLE 33(2) OF THE PCT - NOVELTY

Supplemental Box Relating to Sequence Listing

Continuation of Box No. 1, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report has been established on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search and/or examination,
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
 - c. ☐ furnished to this Authority as an amendment* under PCT Article 34 on _____.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report has been established to the extent that a meaningful opinion referred to in Article 33(1) could be formed without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

* If item 4 in Box No. 1 applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Continuation of Citation and Explanation (Box5)

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT because the subject matter of the claims 1-16 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

The claims are directed towards (1) antibody-linker-drug conjugate (ADC) wherein antibody is a monoclonal antibody comprising light chain variable region complementarity determining region (CDR) sequences CDR1 (KASQDVSIAVA), CDR2 (SASYRYT) and CDR3 (QQHYITPLT) and heavy chain variable region CDR sequences CDR1 (NYGMN), CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG) and CDR3 (GGFGSSYWFYFDV); linker is enzymatically cleavable linker unit mc-vc-PABC and drug is a suitable auristatin analogue MMAE; wherein said monoclonal antibody (mAb) is attached to between 4.2 and 4.4 drug moieties; (2) pharmaceutical composition comprising the said ADC; and (3) process for preparing the said ADC.

D1 discloses antibody-drug conjugate (ADC) molecules, specifically hRS7-mc-vc-PABC-MMAE (also referred to as hRS7-vc-MMAE), targeting TACSTD2 (Trop-2). The ADC comprises the hRS7 antibody-characterized by SEQ ID No. 1 and 2 for its light and heavy chain variable regions-conjugated to the MMAE payload via an mc-vc-PABC linker. The CDRs of the light and heavy chains claimed in claims 1 and 2 are fully contained within SEQ ID No. 1 and 2 disclosed in D1. Further, the document reports that the average drug-to-antibody ratio (DAR) ranges from 1 to 8, and includes the preparation of an ADC with a DAR of about 4 (Example 1). The document further discloses therapeutic use of the ADC in tumor treatment, with administration doses ranging from 0.3 to 10 mg/kg. Thus, the claims 1-16 are anticipated by the disclosure of D1.

ARTICLE 33(3) OF THE PCT - INVENTIVE STEP

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject matter of claims 1-16 does not involve an inventive step in sense of Article 33(3) PCT.

The claim 1-16 not novel over the prior art disclosure as discussed above cannot be considered inventive. Further, even if the claims are established novel over the prior art disclosure in view of DAR 4.2-4.4 not been explicitly suggested in the prior art, the same cannot be considered inventive.

The applicant's arguments regarding the inventive step of the claims have been duly considered. The applicant contends that prior arts do not disclose an ADC comprising a mAb with specific light and heavy chain CDRs, an enzymatically cleavable mc-vc-PABC linker, and a suitable auristatin analogue MMAE, where the mAb is conjugated to between 4.2 and 4.4 drug moieties. It is also stated

that present invention claims a narrow DAR window of 4.2 to 4.4, which is outside the $\pm 1\%$ range of DAR 4.0 disclosed in D1. Further, it is stated that D1 is primarily directed towards antibody-drug conjugates comprising the hRS7 antibody, a pegylated linker, and the drug MMAE. Pegylation in D1 is said to contribute to for improved stability and efficacy. Furthermore, the claimed ADC is asserted to be more efficacious and stable than those disclosed in D1. To support this, additional data on Sacituzumab vedotin with DAR values of approximately 4.0, 4.3, and 6.0 were provided. Testing revealed that the DAR 6.0 molecule exhibited higher impurities and lower thermal stability compared to DAR 4.0 and 4.3. Subsequently, the more stable DAR 4.0 and 4.3 conjugates were evaluated in vitro for cytotoxicity, with DAR 4.3 showing consistently lower IC₅₀ values (81.49, 868.7, and 234.0 ng/mL) than DAR 4.0 (98.43, 1059, and 276.7 ng/mL) across JIMT-1, BxPC3, and NCI-N87 cell lines, respectively. Further, a PLA data for ADC with DAR 4 and 4.3 is provided.

The arguments were not found persuasive for the reasons stated below.

D1 discloses antibody-drug conjugate (ADC) molecules comprising the hRS7 antibody conjugated to the cytotoxic payload MMAE via an mc-vc-PABC linker, forming hRS7-mc-vc-PABC-MMAE (also referred to as hRS7-vc-MMAE). The hRS7 antibody is characterized by SEQ ID NOs: 1 and 2, which correspond to its light and heavy chain variable regions, respectively. D1 describes both non-pegylated and pegylated versions of the ADC and explicitly reports ADCs with drug-to-antibody ratios (DARs) ranging from 1 to 8. Among these, D1 includes preparation and characterization of an ADC with a DAR of approximately 4.

Accordingly, D1's disclosure is not limited to pegylated ADCs; it encompasses non-pegylated hRS7-vc-MMAE ADCs across a DAR range of 1 to 8. As such, the ADCs disclosed in D1 are equivalent in structure and composition to those recited in claims 1-16 of the present application.

Furthermore, D1 reports that ADCs with a DAR of 6.0 exhibit significantly higher levels of degradation and aggregation compared to those with a DAR of 4.0. This observation underscores the inferior stability of higher-DAR ADCs, thereby reinforcing the relevance of DAR 4.0 as a more favorable and stable configuration within the disclosed range.

The additional data regarding IC₅₀ values correspond to an approximate 15-18% enhancement in efficacy at the higher DAR of 4.3. While these results suggest a modest improvement in the anti-tumor activity of the conjugate with increased DAR, the data indicate that fine-tuning the DAR within this range may contribute to optimizing the therapeutic potential of the ADC. D1 describes

the preparation of ADCs with DAR values ranging from approximately 0.5 to 6, including an ADC with a DAR of about 4. D1 explicitly states that by modifying reduction and coupling conditions, ADC molecules with a range of DAR values can be produced. Specifically, hRS7-mc-vc-PABC-MMAE ADCs with controlled drug-to-antibody ratios can be generated, enabling precise tuning of DAR to optimize ADC properties and efficacy. Thus, D1 clearly suggests that reaction conditions can be optimized to produce ADCs with desired DAR values, making DAR optimization a known and established approach. A mere distinction from D1 by way of a minor improvement—while measurable (15–18%)—is not significant enough to establish an inventive step, particularly when D1 discloses or suggests means to achieve the same outcome and provides pertinent examples. The technical advancement should not be limited to a mere incremental improvement, as D1 demonstrates the performance of DAR 4.0 and explicitly suggests further optimization is possible. It would be obvious to a person skilled in the art to fine-tune DAR values, leading to incremental improvements through routine experimentation. The improvement claimed here appears borderline and could reasonably be achieved by routine optimization in light of D1's disclosure. Furthermore, while even modest efficacy improvements (15–18%) may be clinically meaningful and supported by regulatory precedents, referencing Nivolumab is inappropriate here because that case involved overall survival benefits in cancer patients—not in vitro potency differences. Regulatory approval standards for life-saving cancer therapies, where even modest improvements in patient survival can justify approval, do not correspond to the criteria required to establish an inventive step.

Further, regarding the PLA data, statistical significance in bioassay results does not equate to an inventive step assessment, which focuses on the obviousness of achieving the claimed invention. The prior art is not required to explicitly disclose or suggest the exact claimed features but is expected to provide a clear roadmap toward the intended outcome. Document D1 provides such a roadmap by disclosing the identical antibody (Sacituzumab), linker (mc-vc-PABC), and payload (MMAE), along with explicit guidance on DAR optimization across a broad range of 0.5 to 6.0, including the specific preparation of conjugates with a DAR of approximately 4.0. Moreover, D1 explicitly states that reaction conditions can be modified to produce ADCs with controlled drug-to-antibody ratios, making the optimization to achieve the claimed DAR range of 4.2 to 4.4 an obvious step. The observation in D1 that DAR 6.0 conjugates exhibit stability issues further supports this obviousness argument, as it logically directs a skilled person to optimize DAR values around 4.0 for improved stability. Therefore, developing an ADC with a DAR in the range of 4.2 to 4.4 would have been obvious to a person skilled in the art, given the clear motivation and guidance provided by D1. Thus, the claim 1 lacks inventive step. The same argument also applies *mutatis mutandis* to the claims 8 and 9. Further, the dependent do not contain any features which in combination with features of the claims they refer meet the requirements of inventive step as the

relevant subject matter is either disclosed in cited prior art or falls within the knowledge and ability of the person skilled in art.

Thus the claims 1-16 lack inventive step.

ARTICLE 33(4) OF PCT - INDUSTRIAL APPLICABILITY

The subject matter of claims 1-16 is considered to have industrial applicability and therefore complies with the requirements of Article 33(4) of PCT.

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES
PCT

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes)

(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

Referencia de archivo del solicitante o agente ZLL-PCT0889	PARA ACCIÓN ADICIONAL	Ver Forma PCT/IPEA/416
No. de solicitud internacional PCT/IB2024/052569	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 16-03-2024	(Fecha de prioridad) (día/mes/año) 17-03-2023
Clasificación de Patente Internacional (IPC) o clasificación nacional e IPC C07K16/28 Versión=2025.01		
Solicitante ZYDUS LIFESCIENCES LIMITED		

1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad de Examen Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de acuerdo con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consiste en un total de 8 hojas, incluida esta hoja de portada. 3. Este reporte también se acompaña de ANEXOS, que comprenden: a. ☒ un total de 148 hojas, como sigue: ☒ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos que se han enmendado y/u hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad, a menos que aquellas hojas fueran reemplazadas o canceladas, y cualquier carta adjunta (ver Reglas 46.5, 66.8, 70.16, 91.2 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas). ☐ hojas que contienen rectificaciones, donde la decisión se tomó por esta Autoridad de no tenerlas en cuenta debido a que no estaban autorizadas por o notificadas a esta Autoridad en el momento cuando esta Autoridad comenzó a redactar este reporte, y cualquier carta adjunta (Reglas 66.4bis, 70.2(e), 70.16 y 91.2). ☐ hojas reemplazadas y cualquier carta adjunta, donde esta Autoridad considere que las hojas reemplazantes contienen una enmienda que va más allá de la divulgación en la solicitud internacional como se presentó, o las hojas reemplazantes no se acompañaron por una carta que indique la base de las enmiendas en la solicitud como se presentó, como se indica en el punto 4 del Cuadro No. I y el Cuadro Complementario (ver Regla 70.16(b)). b. ☐ un archivo electrónico separado que contiene un listado de secuencias (enviado a la Oficina Internacional únicamente)																	
4. Este reporte contiene indicaciones con respecto a los siguientes puntos: _____ <table><tr><td>☒ Cuadro No. I</td><td>Base del reporte</td></tr><tr><td>☐ Cuadro No. II</td><td>Prioridad</td></tr><tr><td>☐ Cuadro No. III</td><td>No establecimiento de la opinión con respecto a la novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial</td></tr><tr><td>☐ Cuadro No. IV</td><td>Carencia de unidad de invención</td></tr><tr><td>☒ Cuadro No. V</td><td>Declaración razonada bajo Artículo 35(2) con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que respaldan esta declaración</td></tr><tr><td>☐ Cuadro No. VI</td><td>Ciertos documentos citados</td></tr><tr><td>☐ Cuadro No. VII</td><td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td></tr><tr><td>☐ Cuadro No. VIII</td><td>Ciertas observaciones en la solicitud internacional</td></tr></table>		☒ Cuadro No. I	Base del reporte	☐ Cuadro No. II	Prioridad	☐ Cuadro No. III	No establecimiento de la opinión con respecto a la novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial	☐ Cuadro No. IV	Carencia de unidad de invención	☒ Cuadro No. V	Declaración razonada bajo Artículo 35(2) con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que respaldan esta declaración	☐ Cuadro No. VI	Ciertos documentos citados	☐ Cuadro No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐ Cuadro No. VIII	Ciertas observaciones en la solicitud internacional
☒ Cuadro No. I	Base del reporte																
☐ Cuadro No. II	Prioridad																
☐ Cuadro No. III	No establecimiento de la opinión con respecto a la novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial																
☐ Cuadro No. IV	Carencia de unidad de invención																
☒ Cuadro No. V	Declaración razonada bajo Artículo 35(2) con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que respaldan esta declaración																
☐ Cuadro No. VI	Ciertos documentos citados																
☐ Cuadro No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																
☐ Cuadro No. VIII	Ciertas observaciones en la solicitud internacional																
Datos de presentación de la demanda 17-01-2025	Datos de finalización de este reporte 18-07-2025																
Nombre y dirección postal de la autoridad de examen preliminar internacional: Oficina de Patentes de la India, Lote No. 32, Sector 14, Dwarka, Nueva Delhi-110075 Facsímil No.	Oficial Autorizado Anjana Haridas No. de Teléfono +91-1125300200																

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD**

 Solicitud internacional No.
PCT/IB2024/052569

Cuadro No. I Base del reporte

1. Con respecto al **idioma**, este reporte se basa en:
 - ☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó
 - ☐ una traducción de la solicitud internacional al _____, que es el idioma de una traducción proporcionada para los propósitos de:
 - ☐ búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3(a) y 23.1 (b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (bajo la Regla 12.4.a))
 - ☐ examen preliminar internacional (bajo las Reglas 55.2(a) y/o 55.3(a) y (b))
2. Con respecto a los **elementos*** de la solicitud internacional, este reporte se basa en (*hojas de reemplazo que se han proporcionado a la Oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el Artículo 14 se refieren en este reporte como "originalmente presentadas" y no se anexan a este reporte*):
 - ☐ la solicitud internacional como se presentó/terminó originalmente, o
 - ☒ la descripción: páginas _____, como se presentaron/terminaron originalmente
 páginas* 1-38 recibidas por esta Autoridad el 17-01-2025
 páginas* _____ recibidas por esta Autoridad el _____
 - ☐ las reivindicaciones: No. _____, como se presentaron/terminaron originalmente
 No.* _____ como se enmiendan (junto con esta declaración) bajo el artículo 19
 No.* 1-16 recibidas por esta Autoridad el 17-01-2025
 - ☒ los dibujos: páginas 1-5, como se presentaron/terminaron originalmente
 páginas* _____ recibidas por esta Autoridad el _____
 páginas* _____ recibidas por esta Autoridad el _____
 - ☒ un listado de secuencias – ver Cuadro Complementario con respecto al Listado de Secuencias
3. ☐ Las enmiendas han dado por resultado la cancelación de:
 - ☐ la descripción, páginas _____
 - ☐ las reivindicaciones, No. _____
 - ☐ los dibujos, hojas/figuras _____
 - ☐ el listado de secuencias (*especificar*): _____
4. ☐ Este reporte se ha establecido como si (algunas de) las enmiendas adjuntas a este reporte y que se listan más adelante no se hubieran realizado, puesto que se considera que van más allá de la divulgación como se presentó, o no se acompañaron por una carta que indique la base de las enmiendas en la solicitud como se presentó, como se indica en el Cuadro Complementario (Reglas 70.2(c) y (c-bis)):
 - ☐ la descripción, páginas _____
 - ☐ las reivindicaciones, No. _____
 - ☐ los dibujos, hojas/figuras _____
 - ☐ el listado de secuencias (*especificar*): _____
5. Este reporte se ha establecido:
 - ☐ tomando en cuenta la **rectificación de un error obvio** autorizado por o notificado por esta Autoridad bajo la Regla 91 (Reglas 66.1(d-bis) y 70.2(e)).
 - ☐ sin tomar en cuenta la **rectificación de un error obvio** autorizado por o notificado por esta Autoridad bajo la Regla 91 (Reglas 66.4bis y 70.2(e)).
6. Con respecto a las búsquedas complementarias (Reglas 66.1ter y 70.2f)):
 - ☐ Se llevó a cabo una búsqueda complementaria por esta Autoridad el _____
 - ☐ Se han descubierto documentos relevantes adicionales durante la búsqueda complementaria.
 - ☒ No se llevó a cabo ninguna búsqueda complementaria por esta Autoridad debido a que no serviría para ningún propósito útil.
7. ☐ Reportes complementarios de búsqueda internacional de la o las Autoridades _____, y se han tomado en cuenta al establecer este reporte (Regla 45 bis.8 (b) y (c)).

**Si aplica el punto 4, algunas o todas de aquellas hojas se pueden marcar como "reemplazadas"*

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud Internacional No.
 PCT/IB2024/052569

Cuadro No. V. Declaración razonada conforme al Artículo 35(2) con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que respaldan esta declaración

1. Declaración

Novedad (N)	Reivindicaciones _____	SÍ
	Reivindicaciones <u>1-16</u>	NO
Actividad	Reivindicaciones _____	SÍ
	Reivindicaciones <u>1-16</u>	NO
Aplicabilidad Industrial	Reivindicaciones <u>1-16</u>	SÍ
	Reivindicaciones _____	NO

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7):

La respuesta del solicitante de fecha 18 de julio de 2025 a la opinión escrita de la Administración de Examen Preliminar Internacional (emitida para las reivindicaciones enmendadas presentadas por el solicitante en virtud del Artículo 34 mediante la solicitud de Examen Preliminar Internacional de fecha 17.01.2025) se ha considerado debidamente.

Tras la reevaluación de las reivindicaciones 1-16 en virtud del Artículo 33 del PCT, esto se concluye por esta IPEA que no cumplen con los requerimientos de los Artículos 33(2) y 33(3) del PCT como se explica en la presente. Se hace referencia a los siguientes documentos de la técnica anterior citados en el reporte de búsqueda internacional:

D1: CN108066772B [SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES], 13 de julio de 2021 [13-07-2021]

D2: WO2021027851A1 [XDCEXPLORER SHANGHAI CO., LTD], 18 de febrero de 2021 [18-02-2021]

D1 divulga moléculas de conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) que se dirigen a TACTD 2 (TROP2), que comprenden anticuerpo hRS7 (sacituzumab) unido a MMAE por el ligador MC-VC-PABC, en donde mc es (maleimidocaproilo), vc es (valina-citrulina), PABC es (para-aminobenciloxicarbonilo) (ver D1, fórmula II, párrafo [0018]- [0022], [0091], [0092]; SEQ ID NO: 1 y 2; figuras).

D2 divulga el conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende el anticuerpo TROP2 conjugado con la toxina de fármaco tal como MMAE o MMAF por el ligador maleimidocaproil-L-valina-L-citrulina-alcohol aminobencílico (MC-VC-PAB). El anticuerpo hRS7 se usa como anticuerpo de control y se ha enlazado a MMAF y otras toxinas (ver D2, tabla 10; ejemplo 9; figuras 15 y 16; fórmula 5; reivindicaciones)

ARTÍCULO 33(2) DEL PCT - NOVEDAD

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD**

Solicitud Internacional No.
PCT/IB2024/052569

Cuadro complementario con respecto al Listado de secuencias

Continuación de Cuadro I, inciso 2:

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos divulgada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido sobre la base de un listado de secuencias:

- a. ☒ que forma parte de la solicitud internacional como se presentó.
- b. ☐ proporcionado con posterioridad a la fecha de presentación internacional a los efectos de la búsqueda y/o examen internacional,
 - ☐ acompañado de una declaración en el sentido de que el listado de secuencias no va más allá de la divulgación contenida en la solicitud internacional tal como fue presentada.
- c. ☐ presentado a esta Autoridad como una enmienda* conforme al Artículo 34 del PCT el _____

2. ☐ Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos divulgada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, este reporte se estableció en la medida de que una opinión significativa referida en el artículo 33(1) se puede formar sin un listado de secuencias compatible con la norma ST.26 de la WIPO.

3. Comentarios adicionales:

** Si se aplica el punto 4 del cuadro No. I, el listado de secuencias, que forma parte de la base del reporte, podrá marcarse como “reemplazado”.*

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD**

 Solicitud Internacional No.
PCT/IB2024/052569

Cuadro Complementario

En caso de que el espacio en los cuadros anteriores no sea suficiente.

Continuación de:

Continuación de citación y explicación (Cuadro 5)

La presente solicitud no cumple con los criterios del Artículo 33(1) del PCT, debido a que la materia de las reivindicaciones 1-16 no es nueva en el sentido del Artículo 33(2) del PCT.

Las reivindicaciones se dirigen a (1) conjugado de anticuerpo-ligador-fármaco (ADC) en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA), CDR2 (SASYRYT) y CDR3 (QQHYITPLT) y las secuencias de CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (NYGMN), CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV); el ligador es la unidad de ligador enzimáticamente escindible mc-vc-PABC y el fármaco es un análogo de auristatina adecuado MMAE; en donde el anticuerpo monoclonal (mAb) se une a entre 4,2 y 4,4 porciones de fármaco; (2) composición farmacéutica que comprende el ADC; y (3) proceso para preparar el ADC.

D1 divulga moléculas de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), específicamente hRS7-me-vc-PABC-MMAE (también referida como hRS7-vc-MMAE), dirigida a TACSTD2 (Trop-2). El ADC comprende el anticuerpo hRS7 caracterizado por SEQ ID NO. 1 y 2 para sus regiones variables de cadena ligera y pesada conjugadas a la carga útil de MMAE mediante un ligador mc-vc-PABC. Las CDR de las cadenas ligera y pesada reivindicadas en las reivindicaciones 1 y 2 están completamente contenidas dentro de la SEQ ID No. 1 y 2 divulgada en D1. Además, el documento reporta que la relación promedio de fármaco a anticuerpo (DAR) varía de 1 a 8, e incluye la preparación de un ADC con una DAR de aproximadamente 4 (Ejemplo 1). El documento divulga además el uso terapéutico del ADC en el tratamiento de tumores, con dosis de administración que varían de 0,3 a 10 mg/kg. Por lo tanto, las reivindicaciones 1-16 se anticipan por la divulgación de D1.

ARTÍCULO 33(3) DEL PCT - ACTIVIDAD INVENTIVA

La presente solicitud no cumple con los criterios del Artículo 33(1) del PCT, debido a que la materia de las reivindicaciones 1-16 no implica una actividad inventiva en el sentido del Artículo 33(3) del PCT.

Las reivindicaciones 1-16 que no son novedosas con respecto a la divulgación de la técnica anterior como se analizó anteriormente no se pueden considerar inventivas. Además, incluso si las reivindicaciones se establecen novedosas sobre la divulgación de la técnica anterior en vista de que DAR 4,2-4,4 no se ha sugerido explícitamente en la técnica anterior, la misma no se puede considerar inventiva.

Los argumentos del solicitante con respecto a la actividad inventiva de las reivindicaciones se han considerado debidamente. El solicitante sostiene que las técnicas anteriores no divulgan un ADC que comprende un mAb con CDR de cadena ligera y pesada específicas, un ligador mc-vc-PABC enzimáticamente escindible y un análogo de auristatina adecuado MMAE, donde el mAb se conjuga con entre 4,2 y 4,4 porciones de fármaco. También se afirma

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

que la presente invención reivindica una ventana de DAR estrecha de 4,2 a 4,4, que está fuera del intervalo de $\pm 1\%$ de DAR 4,0 divulgado en D1. Además, se afirma que D1 se dirige principalmente a conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden el anticuerpo hRS7, un ligador pegilado y el fármaco MMAE. Se dice que la pegilación en D1 contribuye a mejorar la estabilidad y eficacia. Además, se afirma que el ADC reivindicado es más eficaz y estable que aquellos divulgados en D1. Para respaldar esto, se proporcionaron datos adicionales sobre Sacituzumab vedotin con valores de DAR de aproximadamente 4,0, 4,3 y 6,0. Las pruebas revelaron que la molécula de DAR 6,0 exhibió mayores impurezas y menor estabilidad térmica en comparación con DAR 4,0 y 4,3. Posteriormente, los conjugados de DAR 4,0 y 4,3 más estables se evaluaron in vitro para determinar la citotoxicidad, con DAR 4,3 que muestra valores de IC50 consistentemente más bajos (81,49, 868,7 y 234,0 ng/ml) que DAR 4,0 (98,43, 1059 y 276,7 ng/ml) a través de las líneas de células JIMT-1, BxPC3 y NCI-N87, respectivamente. Además, se proporcionan datos de PLA para ADC con DAR 4 y 4,3.

Los argumentos no se encontraron persuasivos por las razones que se indican más adelante.

D1 divulga moléculas de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden el anticuerpo hRS7 conjugado con la carga útil citotóxica MMAE mediante un ligador mc-vc-PABC, formando hRS7-mc-vc-PABC-MMAE (también referido como hRS7-vc-MMAE). El anticuerpo de hRS7 se caracteriza por SEQ ID NO: 1 y 2, que corresponden a sus regiones variables de cadena ligera y pesada, respectivamente. D1 describe versiones no pegiladas y pegiladas del ADC y reporta explícitamente ADC con relaciones de fármaco a anticuerpo (DAR) que varían de 1 a 8. Entre estos, D1 incluye la preparación y caracterización de un ADC con una DAR de aproximadamente 4.

Por consiguiente, la divulgación de D1 no se limita a ADC pegilados; abarca ADC de hRS7-vc-MMAE no pegilados en un intervalo de DAR de 1 a 8. Como tal, los ADC divulgados en D1 son equivalentes en estructura y composición a aquellos mencionados en las reivindicaciones 1-16 de la presente solicitud.

Además, D1 reporta que los ADC con una DAR de 6,0 exhiben niveles significativamente más altos de degradación y agregación en comparación con aquellos con una DAR de 4,0. Esta observación subraya la estabilidad inferior de los ADC de mayor DAR, lo que refuerza la relevancia de DAR 4,0 como una configuración más favorable y estable dentro del intervalo divulgado.

Los datos adicionales con respecto a los valores de IC50 corresponden a una mejora aproximada de 15-18% en la eficacia a la DAR más alta de 4,3. En tanto que estos resultados sugieren una mejora modesta en la actividad antitumoral del conjugado con DAR incrementada, los datos indican que ajustar la DAR dentro de este intervalo puede contribuir a optimizar el potencial terapéutico del ADC. D1 describe

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

la preparación de ADC con valores de DAR que varían de aproximadamente 0,5 a 6, incluido un ADC con una DAR de aproximadamente 4. D1 establece explícitamente que al modificar las condiciones de reducción y acoplamiento, se pueden producir moléculas de ADC con un intervalo de valores de DAR. Específicamente, se pueden generar ADC de hRS7-mc-vc-PABC-MMAE con relaciones controladas de fármaco a anticuerpo, lo que permite un ajuste preciso de DAR para optimizar las propiedades y eficacia de ADC. Por lo tanto, D1 sugiere claramente que las condiciones de reacción se pueden optimizar para producir ADC con valores de DAR deseados, lo que hace que la optimización de DAR sea un enfoque conocido y establecido. Una mera distinción de D1 por medio de una mejora menor, aunque medible (15-18%), no es suficientemente significativa para establecer una actividad inventiva, particularmente cuando D1 divulga o sugiere medios para lograr el mismo resultado y proporciona ejemplos pertinentes. El avance técnico no se debe limitar a una mera mejora incremental, ya que D1 demuestra el rendimiento de DAR 4,0 y sugiere explícitamente que es posible una mayor optimización. Sería obvio para una persona experta en la técnica ajustar los valores de DAR, lo que lleva a mejoras incrementales a través de la experimentación de rutina. La mejora reivindicada aquí parece estar en el límite y se puede lograr razonablemente por optimización de rutina a la luz de la divulgación de D1. Además, en tanto que incluso mejoras modestas de eficacia (15-18%) pueden ser clínicamente significativas y estar respaldadas por precedentes regulatorios, hacer referencia a Nivolumab es inapropiado aquí debido a que ese caso implicó beneficios de supervivencia general en pacientes con cáncer, no diferencias de potencia in vitro. Las normas de aprobación regulatoria para terapias contra cáncer que salvan vidas, donde incluso mejoras modestas en la supervivencia del paciente pueden justificar la aprobación, no corresponden a los criterios requeridos para establecer una actividad inventiva.

Además, con respecto a los datos de PLA, la significancia estadística en los resultados del bioensayo no equivale a una valoración de actividad inventiva, que se centra en la obviedad de lograr la invención reivindicada. No se requiere que la técnica anterior divulgue o sugiera explícitamente las características exactas reivindicadas, pero se espera que proporcione una hoja de ruta clara hacia el resultado deseado. El documento D1 proporciona esta hoja de ruta al divulgar el anticuerpo idéntico (Sacituzumab), ligador (mc-vc-PABC) y carga útil (MMAE), junto con una orientación explícita sobre la optimización de DAR en un amplio intervalo de 0,5 a 6,0, incluida la preparación específica de conjugados con una DAR de aproximadamente 4,0. Además, D1 establece explícitamente que las condiciones de reacción se pueden modificar para producir ADC con relaciones controladas de fármaco a anticuerpo, lo que hace que la optimización para lograr el intervalo de DAR reivindicado de 4,2 a 4,4 sea un paso obvio. La observación en D1 de que los conjugados de DAR 6,0 exhiben problemas de estabilidad respalda aún más este argumento de obviedad, ya que lógicamente dirige a un experto en la técnica a optimizar los valores de DAR alrededor de 4,0 para una estabilidad mejorada. Por lo tanto, desarrollar un ADC con una DAR en el rango de 4,2 a 4,4 habría sido obvio para una persona experta en la técnica, dada la clara motivación y orientación proporcionada por D1. Por lo tanto, la reivindicación 1 carece de actividad inventiva. El mismo argumento también se aplica muta mutandis a las reivindicaciones 8 y 9. Además, el dependiente no contiene ninguna característica que en combinación con las características de las reivindicaciones a las que se refieren cumpla con los requerimientos de la actividad inventiva ya que la

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

materia relevante se divulga en la técnica anterior citada o cae dentro del conocimiento y capacidad del experto en la técnica.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-16 carecen de actividad inventiva.

ARTÍCULO 33(4) DEL PCT - APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Se considera que la materia de las reivindicaciones 1-16 tiene aplicabilidad industrial y por lo tanto cumple con los requerimientos del Artículo 33(4) del PCT.

MODIFICACIONES POR ARTICULO 34

CONJUGADOS DE SACITUZUMAB-FÁRMACO Y PREPARACIÓN DE LOS MISMOS

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención proporciona un conjugado de anticuerpo-ligador-fármaco en donde el anticuerpo se dirige al antígeno Trop-2, preferentemente, el anticuerpo es Sacituzumab y el fármaco son análogos de auristatina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés), compuestos por un anticuerpo, un ligador y un agente citotóxico (fármaco), son una de las plataformas farmacológicas más complejas del arsenal oncológico [1]. Son un sistema de administración de carga útil en el que influyen variables importantes como: (i) la tasa de internalización de la carga útil; (ii) la expresión del antígeno objetivo en el tumor y en los tejidos normales, con implicaciones tanto para la selección de pacientes como para el índice terapéutico; (iii) la química del ligador y, de forma implícita en la elección de la química, la estabilidad extracelular e intracelular; y (iv) la selección de la carga útil para la indicación tumoral [2]. Los mecanismos de acción de los ADC incluyen la unión directa entre el anticuerpo y su antígeno de superficie celular objetivo, y la liberación intracelular o extracelular de fármacos citotóxicos [3]. La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco derivados de sacituzumab para permitir la administración específica de fármaco (auristatina y / o sus análogos) para dirigirse a antígeno en células cancerosas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-ligador-fármaco en donde el anticuerpo es anticuerpo de direccionamiento a antígeno trop-2, preferentemente sacituzumab y el fármaco es análogos de auristatina adecuados. La presente invención proporciona mayor eficacia que la terapia aprobada en el área de cánceres que expresan trop-2. La invención también proporciona un proceso para preparar conjugados de anticuerpo-ligador-fármaco de la presente invención. La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo-ligador-fármaco en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad infecciosa.

Abreviaturas:

Ab: Anticuerpo

ADC: Conjugado de anticuerpo-fármaco o conjugado de anticuerpo-ligador-fármaco

HP-SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento

5 HP-HIC: Cromatografía de interacción hidrófoba de alto rendimiento

HMW: Alto peso molecular

IRS: Estándar de referencia interno

LMW: Bajo peso molecular

MMAE: Monometilauristatina E

10 MMAF: Monometilauristatina F

mc-vc-PABC: maleimido caproil valina citrulina para amino bencil carbamato

PAB: Para-amino bencilo

PABC: Para amino bencil carbamato

SDS PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

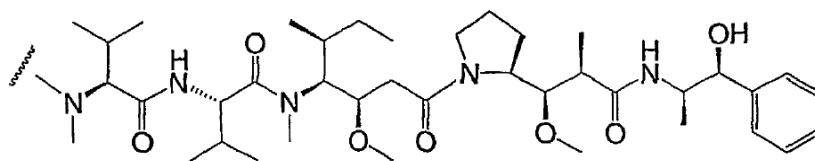
15 TCEP: Tris(2-carboxietil)fosfina

Modalidades de la invención:

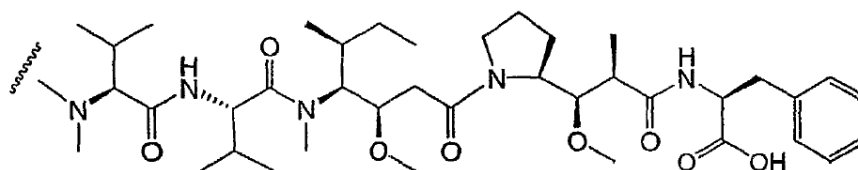
Modalidad 1:

En una modalidad, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-ligador-fármaco (ADC) de la fórmula (I): $Ab-(Aa-Ww-Yy-D)_p$ en donde el anticuerpo (Ab) es
20 un anticuerpo de direccionamiento a trop-2, preferentemente, sacituzumab; -Aa-Ww-Yy- es una unidad ligadora enzimáticamente escindible que enlaza la unidad de fármaco y el anticuerpo, en donde: -A- es una unidad extensora; a es 1; cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido; -Y- es una unidad separadora; w es un número entero en el intervalo de 2 a 12, y es 1 o 2; p en el intervalo de 1 a aproximadamente 20; y el fármaco (D)
25 es un análogo adecuado de la auristatina seleccionado de MMAE y MMAF como se define

en las siguientes estructuras;



MMAE

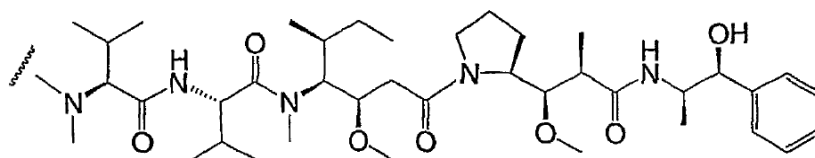


5

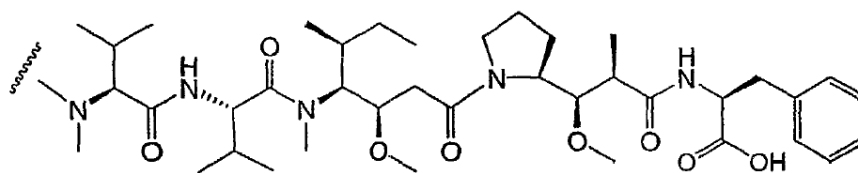
MMAF

En donde la línea ondulada representa el punto de conexión con el ligador.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-ligador-fármaco de la fórmula (I) $Ab-(Aa-Ww-Yy-D)_p$ en donde el anticuerpo (Ab) es sacituzumab; -Aa-Ww-Yy- es una unidad ligadora enzimáticamente escindible que enlaza la unidad de fármaco y el anticuerpo, en donde: -A- es una unidad extensora; a es 1; cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido seleccionada de -fenilalanina-lisina- o -valina-citrulina-; -Y- es una unidad separadora seleccionada de -glicina-glicina- o alcohol p-amino bencílico (PAB) o p-aminobencil carbamato (PABC); w es un número entero que varía de 2 a 12, y es 1 o 2; p varía de 1 a aproximadamente 20; y el fármaco (D) se selecciona de MMAE y MMAF como se define por las siguientes estructuras:



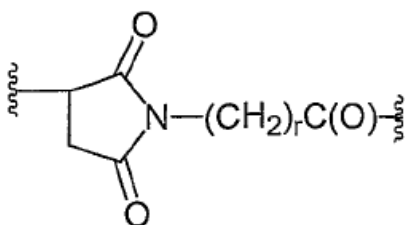
MMAE



MMAF

En donde la línea ondulada representa el punto de conexión al ligador,

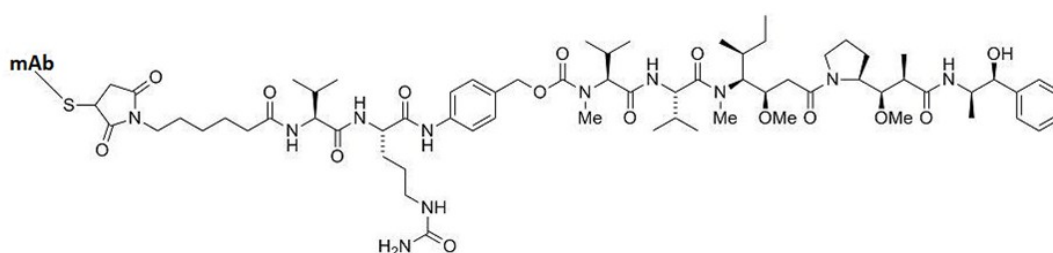
En donde A se define por la siguiente estructura;



5

r es un número entero en un intervalo de 1 a 10; en donde el terminal carbonilo de -A- forma una unión con una unidad de aminoácidos (W) y el terminal succinimido de -A- forma unión con un anticuerpo (Ab).

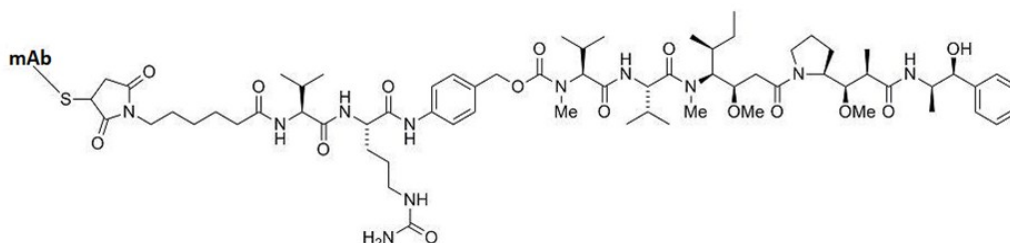
En una modalidad preferida, la presente invención proporciona una estructura de
10 conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) representada por;



en donde el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de
región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera
CDR1 (KASQDVSIAVA), CDR2 (SASYRYT) y CDR3 (QQHYITPLT) y las secuencias de
15 CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (NYGMN), CDR2
(WINTYTGEPTYTDDFKG) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV). En esta modalidad, el anticuerpo
es Sacituzumab.

En la modalidad preferida, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-ligador-fármaco (ADC) en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIIVA), CDR2 (SASYRYT) y CDR3 (QQHYITPLT) y las secuencias de CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (NYGMN), CDR2(WINTYTGEPTYTDDFKG) y CDR3 (GGFGSSYWFYFDV); el ligador es la unidad de ligador enzimáticamente escindible mc-vc-PABC y el fármaco (D) es un análogo de auristatina adecuado MMAE; en donde el anticuerpo monoclonal (mAb) se une a entre 4,2 y 4,4 porciones de fármaco.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona los conjugados de anticuerpo-ligador-fármaco (ADC), en donde la estructura de ADC se representa por;



En donde el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIIVA), CDR2 (SASYRYT) y CDR3 (QQHYITPLT) y las secuencias de CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (NYGMN), CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG) y CDR3 (GGFGSSYWFYFDV) en donde el anticuerpo monoclonal (mAb) se une a entre 4,2 y 4,4 porciones de fármaco.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el anticuerpo (mAb) se une a 4,2 porciones de fármaco (es decir, DAR 4,2), aproximadamente 4,3 porciones de fármaco (es decir, DAR aproximadamente 4,3) o 4,4 porciones de fármaco (es decir, DAR 4,4).

Otras modalidades:

En una segunda modalidad, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende conjugado de anticuerpo-fármaco, preferentemente conjugado de sacituzumab-fármaco como se incorpora en la modalidad 1 y un portador aceptable. El portador aceptable se define como cualquier excipiente farmacéutico adecuado conocido en

la técnica ^{5,6} y que es compatible con el principio activo farmacéutico (API), es decir, conjugado de anticuerpo-fármaco, en la presente de la presente invención.

En una tercera modalidad, la presente invención proporciona un proceso para preparar el conjugado de anticuerpo-fármaco, preferentemente el conjugado de
5 sacituzumab-fármaco como se incorpora en la modalidad 1 en donde el proceso comprende a) purificación del anticuerpo Sacituzumab, b) reducción parcial de sacituzumab c) conjugación del sacituzumab parcialmente reducido con el ligador de fármaco vc-MMAE.

En una modalidad adicional, el conjugado de acuerdo con la presente invención, en donde el anticuerpo monoclonal es reactivo con un antígeno o epítipo de un antígeno,
10 preferentemente trop-2, asociado con un cáncer, una célula maligna, una enfermedad autoinmunitaria o un organismo infeccioso que expresa un epítipo de reacción cruzada de Trop-2 para la unión a los conjugados de anticuerpo-ligador-fármaco de la presente invención.

En una modalidad adicional, el conjugado de sacituzumab-fármaco de acuerdo con la
15 presente invención se puede usar en el tratamiento de cáncer.

En una modalidad adicional, el conjugado de sacituzumab-fármaco de acuerdo con la presente invención se puede usar en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad infecciosa.

En una modalidad adicional, el conjugado de sacituzumab-fármaco de acuerdo con la
20 presente invención se puede usar solo como una monoterapia en el tratamiento de cáncer.

En aun una modalidad adicional, el conjugado de sacituzumab-fármaco de acuerdo con la presente invención se puede usar solo como una monoterapia en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad infecciosa.

En una modalidad adicional, el conjugado de sacituzumab-fármaco de acuerdo con la
25 presente invención se puede usar en combinación con otros productos de fármaco en el tratamiento de cáncer, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad infecciosa.

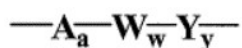
En otra modalidad, el conjugado de la presente invención puede administrarse por vía intravenosa (i.v), intramuscular (i.m), subcutánea (s.c), intraperitoneal (i.p) o por cualquier otra vía de administración adecuada.

30 En otra modalidad, la dosis del conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo

con la presente invención puede estar en el intervalo de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg.

Definiciones:

El término "ligador" es cualquier porción química que es capaz de enlazar un compuesto, usualmente un fármaco, tal como auristatina, a un agente de unión celular tal como sacituzumab de manera covalente. El ligador incluye una unidad extensora (-A-), una
5 unidad de aminoácidos (-W-) y una unidad separadora (-Y-) de acuerdo con la fórmula;



Los ligadores pueden ser susceptibles o sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, a la escisión inducida por luz, a la escisión inducida por peptidasa, a la
10 escisión inducida por esterasa y a la escisión por unión disulfuro, en condiciones en las que el compuesto o el anticuerpo permanecen activos. Los ligadores adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a los ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a las peptidasas y grupos lábiles a las esterasas. Los ligadores también incluyen ligadores cargados y formas hidrófilas de los
15 mismos como se describen en la presente y se conocen en la técnica.

El término "composición farmacéutica" se refiere a preparados cuya forma permite que la actividad biológica de los principios activos sea inequívocamente efectiva, y que no contienen componentes adicionales que sean significativamente tóxicos para los sujetos a los que se administraría la formulación. Los términos "formulación farmacéutica",
20 "formulación", "composición farmacéutica" o "composición" pueden usarse indistintamente en la presente.

Los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente y se emplean en su sentido convencional para referirse a un organismo vivo que padece o es propenso a padecer una condición que puede prevenirse o tratarse mediante la administración de una
25 composición de la presente invención, e incluye a los animales. El término "animal" se refiere a un animal humano o no humano, incluidos, pero no se limitan a, animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos como perros y gatos; animales de laboratorio incluidos roedores como ratones, ratas y cobayas; aves, incluidas aves domésticas, salvajes y de caza como pollos, pavos y otras aves
30 gallináceas, patos, gansos y primates no humanos, incluidos, tal como, pero no se limitan a, monos, chimpancés y otras especies de simios y monos. Este término no denota una edad

particular. Así, interesan los individuos adultos, juveniles y recién nacidos.

En el contexto de cáncer, el término “que trata” incluye cualquiera o todos de: aniquilación de células tumorales o células cancerosas, prevención del crecimiento de células tumorales o células cancerosas, regresión de células tumorales o células cancerosas, prevención de replicación de células tumorales o células cancerosas, disminución de la carga tumoral total y mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

En el contexto de una enfermedad autoinmunitaria, el término “que tratar” incluye cualquiera o todos de: aniquilar células que producen anticuerpo directamente o aquellas células que ayudan a las células que producen anticuerpo en su acción, prevenir la replicación de células asociadas con un estado de enfermedad autoinmunitaria que incluye, pero no se limita a, células capaces de producir un anticuerpo autoinmunitario, reducir la carga de anticuerpo autoinmunitario y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmunitaria.

En el contexto de una enfermedad infecciosa, el término "tratar" incluye una o todas las siguientes acciones: prevenir el crecimiento, la multiplicación o la replicación del patógeno que causa la enfermedad infecciosa y/o de las células del hospedero infectadas por el patógeno y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa.

La frase "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un fármaco (carga útil) de la presente invención. Las sales preferidas incluyen, pero no se limitan a, sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, sales de bencenosulfonato.

A menos que se especifique lo contrario, un o uno significa "uno o más".

Un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) se define como un componente de anticuerpo o fragmento del mismo conjugado con un agente terapéutico. Como se usa en la presente, los términos "conjugado de anticuerpo-fármaco", "anticuerpo-ligador-fármaco" "conjugado" e "inmunoconjugado" se usan indistintamente en la presente invención. El conjugado de anticuerpo-fármaco preferido de la presente invención es conjugado de

sacituzumab-MMAE. El “conjugado de sacituzumab-MMAE” y “sacituzumab vedotina” se usan indistintamente.

Como se usa en la presente, el término “aproximadamente” cuando se usa con referencia a un valor mencionado específicamente significa que el valor puede variar en $\pm$ 0,1 del valor mencionado. Por ejemplo, la expresión “aproximadamente 4,3” incluye 4,2 a 4,4 y todos los valores enteros y no enteros intermedios. Los valores específicos dentro del intervalo entre 4,2 y 4,4 incluyen, pero no se limitan a 4,20, 4,21, 4,22, 4,23, 4,24, 4,25, 4,26, 4,27, 4,28, 4,29, 4,30, 4,31, 4,32, 4,33, 4,34, 4,35, 4,36, 4,37, 4,38, 4,39 o 4,40.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS ANEXAS

10 Figura 1: La figura 1 demuestra el perfil de variantes de pureza y tamaño del conjugado de Sacituzumab-MMAE evaluado por HP-SEC

Figura 2: La figura 2 demuestra la relación de anticuerpo a fármaco (DAR) de los conjugados de Sacituzumab-MMAE analizados por HP-HIC

15 Figura 3: La figura 3 demuestra el perfil de polipéptidos del conjugado de sacituzumab-MMAE de la presente invención por análisis de SDS-PAGE.

Figura 4: La figura 4 demuestra el ensayo de citotoxicidad *in vitro* del conjugado de sacituzumab-MMAE usando células BxPC3.

Figura 5: La figura 5 demuestra el ensayo de citotoxicidad *in vitro* del conjugado de sacituzumab-MMAE usando células NCI-N87.

20 Figura 6: La figura 6 demuestra el ensayo de citotoxicidad *in vitro* del conjugado de sacituzumab-MMAE usando células HCC1806.

Figura 7: La figura 7 demuestra el ensayo de citotoxicidad *in vitro* del conjugado de sacituzumab-MMAE usando células MDA-MB-468.

25 Figura 8: La figura 8 demuestra la eficacia *in vivo* del conjugado de Sacituzumab-MMAE en el modelo de enfermedad de xenoinjerto de carcinoma gástrico en ratones SCID

Figura 9: La figura 9 demuestra la eficacia *in vivo* del conjugado de Sacituzumab-MMAE en el modelo de enfermedad de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo mutado con BRCA en ratones SCID

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-ligador-fármaco de Ab —(Aa-Ww-Yy-D)_p en donde el anticuerpo (Ab) es anticuerpo de direccionamiento a antígeno trop-2, preferentemente sacituzumab; -Aa-Ww-Yy- es una unidad ligadora enzimáticamente escindible que enlaza la unidad de fármaco y el anticuerpo, en donde: -A- es una unidad extensora; a es 1; cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido; -Y- es una unidad separadora; w es un número entero en el intervalo de 2 a 12, y es 1 o 2; p está en el intervalo de 1 a aproximadamente 20; y el fármaco (D) es un análogo de la auristatina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Anticuerpo (Ab):

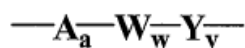
El anticuerpo de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención es anticuerpo de direccionamiento a trop-2, preferentemente sacituzumab o cualquier modificación postraducciona de un anticuerpo o variante de anticuerpo del mismo. La modificación postraducciona del anticuerpo incluye, pero no se limita a, variantes desamidadas, ácidas, básicas u oxidadas o cualquier otra variante de un anticuerpo que no afecte a la función biológica o a la eficacia del anticuerpo. En una modalidad, el anticuerpo de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención son variantes de sacituzumab. Las variantes de sacituzumab de la presente invención incluyen una sustitución, inserción y / o deleción de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos del anticuerpo sacituzumab. En una modalidad, el anticuerpo de direccionamiento a trop-2 de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo que comprende las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIABA, SEQ ID NO: 1), CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO: 2) y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO: 3), y secuencias CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO: 4), CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO: 5) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO: 6). En una modalidad preferida, el anticuerpo de direccionamiento a trop-2 de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena ligera SEQ ID NO: 7 (DIQLTQSPSS LSASVGDRVS ITCKASQDVS IAWAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPD RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFAVYYCQQ HYITPLTFGA GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC) y cadena pesada SEQ ID NO: 8 (QVQLQQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVKQA PGQGLKWMGW INTYTGEPTY

TDDFKGRFAF SLDTSVSTAY LQISSLKADD TAVYFCARGG FGSSYWYFDV
 WGQGS�VTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV
 SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP
 SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV
 5 SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS
 VMHEALHNY TQKSLSLSPG K) que representan el anticuerpo sacituzumab. Estas

secuencias se han divulgado en International Nonproprietary Names for Pharmaceutical
 10 Substances (INN, Vol. 29, No. 2, 2015^[4]) para el producto sacituzumab. El sacituzumab es un
 anticuerpo monoclonal humanizado de inmunoglobulina G1 kappa (IgG1κ) contra el
 antígeno Trop-2, producido en una línea de células de mamífero (ovario de hámster chino
 [CHO]) usando tecnología de ADN recombinante. En una modalidad, el anticuerpo de los
 conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención es sacituzumab o sus
 15 variantes que pueden mejorar la afinidad de unión de ADC al antígeno trop-2. En una
 modalidad más, el anticuerpo de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la
 presente invención es sacituzumab o sus variantes que pueden mejorar la afinidad de unión
 de ADC al antígeno trop-2 a pH adecuado. El pH preferido puede ser un pH de 6,0 o un pH
 de 7,0. En otra modalidad, el anticuerpo de la presente invención es sacituzumab o sus
 20 variantes que se pueden usar para incrementar la semivida de ADC. La semivida de un ADC
 de la presente invención se puede modificar en sangre por mutación en el dominio Fc del
 anticuerpo. La mutación en el dominio Fc incluye, de modo no taxativo, una o más
 sustituciones, inserciones y / o deleciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos
 del anticuerpo.

25 **Unidad ligadora:**

La unidad ligadora del conjugado de anticuerpo-ligador-fármaco enlaza la unidad del
 fármaco y la unidad del anticuerpo y tiene la fórmula:



En donde:

30 -A- es una unidad extensora que se enlaza con anticuerpo;

a es 0 o 1;

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

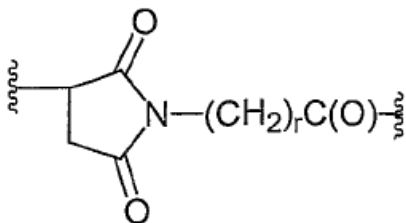
w es independientemente un número entero en un intervalo de 0 a 12;

-Y- es una unidad separadora que se enlaza con fármaco / carga útil; y

Y es 0, 1 o 2.

- 5 **Unidad extensora:** La unidad extensora (-A-), cuando está presente, enlaza una unidad del anticuerpo con una unidad de aminoácidos (-W-). A este respecto, el anticuerpo (Ab) tiene un grupo funcional que puede formar una unión con un grupo funcional de la unidad extensora. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un anticuerpo, ya sea de forma natural o mediante manipulación química, incluyen, pero no se
10 limitan a, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. Los grupos funcionales de anticuerpos preferidos son sulfhidrilo y amino.

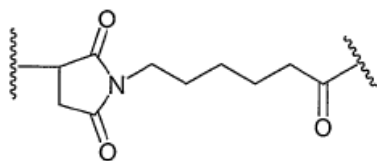
La unidad extensora (-A-) de la presente invención se define por la siguiente estructura;



15

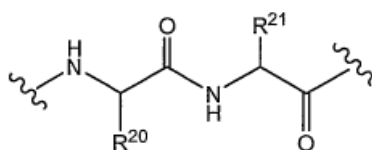
r es un número entero en un intervalo de 1 a 10; en donde el terminal carbonilo de -A- forma una unión con una unidad de aminoácidos (W) y el terminal succinimido de -A- forma unión con un anticuerpo (Ab).

- 20 En una modalidad, la unidad extensora forma una unión con un átomo de azufre de la unidad del anticuerpo. El átomo de azufre puede derivarse de un grupo sulfhidrilo del anticuerpo. A continuación se muestran unidades extensoras representativas de esta modalidad;



Unidad de aminoácidos (-W-): La unidad de aminoácidos (-W-), cuando está presente, enlaza la unidad extensora con la unidad separadora si la unidad separadora está presente, enlaza la unidad extensora con la unidad del fármaco si la unidad separadora está ausente, y enlaza la unidad del anticuerpo con la unidad del fármaco si la unidad extensora y la unidad separadora están ausentes. La línea ondulada representa el punto de conexión.

-Ww- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapeptido, undecapéptido o dodecapéptido. La unidad de aminoácidos del ADC de la invención puede ser escindida enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada al tumor, para liberar la unidad del fármaco (-D). Las unidades Ww ilustrativas se representan por la fórmula;

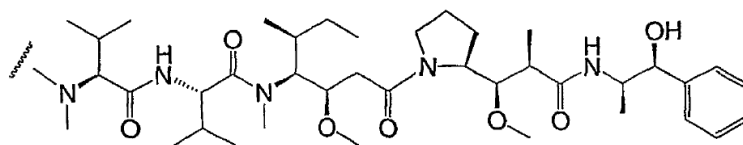


En donde R^{20} es isopropilo y R^{21} es $(CH_2)_3NHCONH_2$.

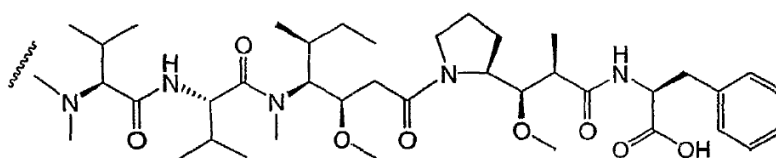
Unidad separadora: La unidad separadora (-Y-), cuando está presente, enlaza una unidad de aminoácidos con la unidad del fármaco cuando hay una unidad de aminoácidos presente. Alternativamente, la unidad separadora enlaza la unidad extensora con la unidad del fármaco cuando la unidad de aminoácidos está ausente. La unidad separadora también enlaza la unidad del fármaco con la unidad del anticuerpo cuando faltan tanto la unidad de aminoácidos como la unidad extensora. Las unidades separadoras son de dos tipos generales: autoinmolables y no autoinmolables. En una modalidad, la unidad separadora (-Y-) de la presente invención puede ser autoinmolable o no autoinmolable. Una unidad separadora no autoinmolable es una en la que parte o la totalidad de la unidad separadora permanece unida a la unidad de fármaco después de la escisión, particularmente la escisión enzimática de una unidad de aminoácido del conjugado de anticuerpo-ligador-fármaco. Los ejemplos de una unidad separadora no autoinmolable incluyen, pero no se limitan a, una unidad separadora (glicina-glicina) y una unidad separadora de glicina. Cuando un

compuesto de la invención que contiene una unidad separadora de glicina-glicina o una unidad separadora de glicina se escinde enzimáticamente mediante una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos, se escinde un resto de glicina-glicina-fármaco o un resto de glicina-fármaco de Ab-
 5 Aa-Ww-. En una modalidad, -Y- es una unidad de alcohol *p*-aminobencílico (PAB). En una modalidad, la invención proporciona un compuesto fármaco-ligador o conjugado de fármaco anticuerpo-ligador en el que la unidad separadora está ausente (= 0). En una modalidad, -Y- es un grupo alcohol *p*-aminobencílico (PAB) que está enlazado a -Ww - mediante el átomo de nitrógeno amino del grupo PAB, y conectado directamente a -D mediante un grupo
 10 carbonato, carbamato o éter.

Unidad del fármaco: La presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco en donde el anticuerpo es sacituzumab y el fármaco son análogos de auristatina seleccionados de MMAE y MMAF como se define por las siguientes fórmulas:



15 **MMAE**



MMAF

En donde la línea ondulada representa el punto de conexión con el ligador.

Conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención

20 La presente invención proporciona conjugado de anticuerpo-fármaco en donde el anticuerpo es sacituzumab o su variante que se dirige al antígeno trop-2 y el fármaco o carga útil es un análogo de auristatina preferentemente MMAE. El conjugado de anticuerpo-fármaco preferido de la presente invención es conjugado de sacituzumab-MMAE también nombrado sacituzumab vedotina. El conjugado de sacituzumab-MMAE de la presente

invención comprende sacituzumab o sus variantes como un anticuerpo, mc-vc-PABC como un ligador y MMAE como una toxina o fármaco o carga útil. El conjugado de la presente invención también incluye la sal farmacéutica de la carga útil, es decir, MMAE. Los inventores de la presente invención han encontrado que los conjugados de sacituzumab-MMAE de la presente invención producen una actividad biológica significativamente mejor en estudios *in vitro* así como *in vivo* en modelos animales de xenoinjerto en comparación con una terapia de conjugado de fármaco aprobada (Trodelvy®) en cáncer que expresa trop-2. Se espera que la actividad biológica de sacituzumab-MMAE de la presente invención se extrapolará al uso clínico en humanos. El conjugado de fármaco novedoso de la presente invención es mejor que el conjugado de fármaco aprobado, Trodelvy®, ya que puede tratar los tumores que portan la mutación BRCA por sí solo (ejemplo 8) sin la necesidad de un segundo cotratamiento, por ejemplo, inhibidores de PARP que se van a dar junto con el tratamiento primario como en Trodelvy®⁷. El conjugado de fármaco novedoso de la presente invención también es mejor que el conjugado de fármaco aprobado debido a que es eficaz a concentraciones de fármaco significativamente más bajas, lo que hace que el fármaco sea más barato para los pacientes y posiblemente menos tóxico, en tanto que es igual o mejor eficaz que el conjugado de fármaco aprobado, es decir, Trodelvy®.

Proceso de preparación del conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención

El anticuerpo de la presente invención, preferentemente sacituzumab, se expresó en células CHO (ovario de hámster chino) usando tecnología recombinante. Las células se cultivaron en medios de cultivo celular a pH y temperatura adecuados por un periodo específico. Una vez finalizada la incubación celular, se cosecharon los cultivos celulares y se aisló y purificó el anticuerpo por la técnica cromatográfica adecuada. El anticuerpo, preferentemente sacituzumab, de la presente invención se redujo con agentes reductores tal como Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) en amortiguador de fosfato a pH en el intervalo de 5-8,5 a temperatura de aproximadamente 37 °C durante 120 minutos. De manera alternativa, el sacituzumab de la presente invención se puede reducir con ditioneitol (DTT). El sacituzumab reducido se hizo reaccionar con un exceso molar de aproximadamente 5 a 10 de conjugado de ligador-fármaco de la presente invención. El conjugado de fármaco-ligador de la presente invención es la vedotina, que está disponible comercialmente en el mercado. La vedotina de la presente invención comprende un ligador mc-vc-PABC conjugado con una carga útil de monometilauristatina (MMAE), también conocida como vc-MMAE o mc-vc-PABC-MMAE. El conjugado se purificó por ultrafiltración-diafiltración. Las

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el anticuerpo (mAb) se une a 4,2 porciones de fármaco, aproximadamente 4,3 porciones de fármaco o 4,4 porciones de fármaco. En la modalidad preferida, la relación de anticuerpo-fármaco (DAR) del ADC de la presente invención es
5 4,20, 4,21, 4,22, 4,23, 4,24, 4,25, 4,26, 4,27, 4,28, 4,29, 4,30, 4,31, 4,32, 4,33, 4,34, 4,35, 4,36, 4,37, 4,38, 4,39 o 4,40.

En una modalidad, la presente invención proporciona el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el anticuerpo (mAb) se une a 4,20, 4,21, 4,22, 4,23, 4,24, 4,25, 4,26, 4,27, 4,28, 4,29, 4,30, 4,31, 4,32, 4,33, 4,34, 4,35, 4,36, 4,37, 4,38, 4,39 o 4,40
10 porciones de fármaco.

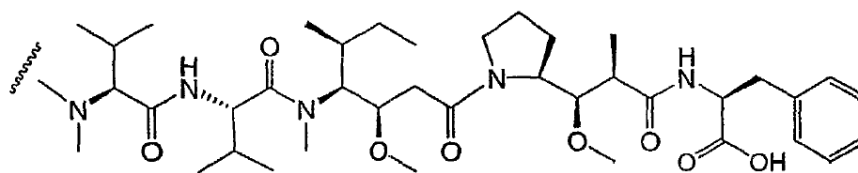
Para el almacenamiento a largo plazo, las alícuotas del conjugado de fármaco purificado se han almacenado en condiciones de congelación, a $-25 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Uso del conjugado de la presente invención

En otro aspecto, el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención se
15 puede usar en el tratamiento de un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado terapéutico, preferentemente conjugado de sacituzumab-fármaco, como se describe en la presente a un sujeto. La dosis efectiva del conjugado puede estar en el intervalo de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg. Las enfermedades que se pueden tratar con el conjugado de sacituzumab-fármaco incluyen, pero no se limitan a,
20 cánceres, enfermedades autoinmunitarias y / o enfermedades infecciosas. En un aspecto, el conjugado de la presente invención se puede usar en el tratamiento de cáncer pancreático, cáncer de mama y / o cáncer gástrico. En un aspecto, el conjugado de la presente invención se puede usar en el tratamiento de cáncer de mama triple negativo mutado con BRCA, carcinoma, linfoma, glioblastoma, melanoma, sarcoma y leucemia, mieloma o neoplasias
25 malignas linfoides. Los ejemplos más particulares de estos cánceres se indican a continuación e incluyen: cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, astrocitomas, glioblastoma multiforme, cáncer cervical. Otros ejemplos de cánceres o neoplasias malignas incluyen, pero no se limitan a: Leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia linfoblástica aguda,
30 leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, leucemia linfocítica aguda en adultos (primaria), leucemia mieloide aguda en adultos, linfoma de Hodgkin en adultos, leucemia linfocítica en adultos, linfoma no de Hodgkin en adultos, linfoma relacionado con sida, neoplasias malignas relacionadas con sida, linfoma de sistema

nervioso central (primario), linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda infantil, glioma del tronco encefálico infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumores de células germinales extracraneales infantiles, enfermedad de hodgkin infantil, 5 linfoma de Hodgkin infantil, glioma hipotalámico y de las vías visuales infantil, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no de Hodgkin infantil, tumores neuroectodérmicos primitivos pineales y supratentoriales infantiles, rabdomiosarcoma infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, glioma hipotalámico y de las vías visuales infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, linfoma cutáneo de células T, 10 carcinoma de células de los islotes del páncreas endocrino, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer epitelial, sarcoma de Ewing y tumores relacionados, tumor de células germinales extracraneal, tumor de células germinales extragonadal, cáncer ocular, enfermedad de Gaucher, linfoma de hodgkin, hipergammaglobulinemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, sarcoma de kaposi, trastornos linfoproliferativos, 15 macroglobulinemia, mesotelioma maligno, timoma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal y senos paranasales, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer de piel no melanoma, sarcoma fibroso 20 osteomaligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno óseo, tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno, paraproteinemias, policitemia vera, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, tumor hipofisario, linfoma primario del sistema nervioso central, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcomas sarcoidosis, 25 síndrome de Sézary, cáncer de piel, cáncer testicular, timoma, cáncer de tiroides, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de neoplasia, ubicada en un sistema de órganos listado anteriormente. El ADC de la presente invención se puede administrar una vez o repetidamente, dependiendo del estado de enfermedad y tolerabilidad del conjugado, y se 30 puede usar solo como una monoterapia o en combinación con otras modalidades terapéuticas, tal como cirugía, radiación externa, radioinmunoterapia, inmunoterapia, quimioterapia, terapia antisentido, terapia de ARN de interferencia, terapia génica y similares. Cada combinación se adaptará al tipo de tumor, etapa, condición del paciente y terapia previa, y otros factores considerados por el médico responsable.

35 Formulación y administración

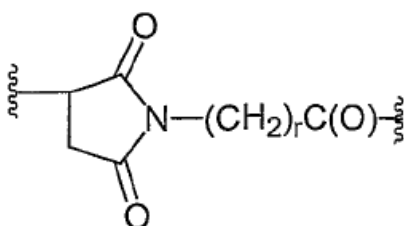


MMAF

en donde la línea ondulada representa el punto de conexión al ligador,

En otra modalidad, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-
 5 ligador-fármaco en donde: -A- es una unidad extensora; -W- es independientemente una
 unidad de aminoácidos seleccionada de -fenilalanina-lisina- o -valina-citrulina-; -Y- es una
 unidad separadora seleccionada de -glicina-glicina- o alcohol *p*-aminobencílico (PAB) o
 carbamato de *p*-aminobencilo (PABC).

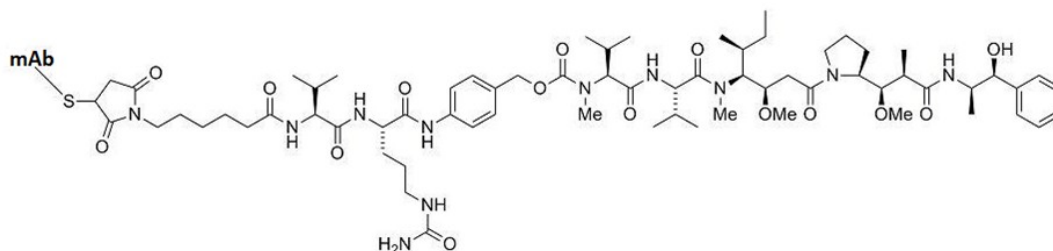
En otra modalidad, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-
 10 ligador-fármaco en donde: -A- es una unidad extensora definida por la siguiente estructura;



en donde *r* es un número entero que varía de 1 a 10; en donde el extremo carbonilo
 de -A- forma un enlace con una unidad de aminoácido (W) y el extremo succinimido de -A-
 forma un enlace con el anticuerpo (Ab).

En aun otra modalidad, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-
 15 ligador-fármaco (ADC) en donde el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende las
 secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de
 cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA), CDR2 (SASYRYT) y CDR3 (QQHYITPLT) y las
 secuencias de CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (NYGMN), CDR2
 20 (WINTYTGEPTYTDDFKG) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV); la unidad de ligador
 enzimáticamente escindible es mc-vc-PABC y el fármaco es el fármaco (D) es un análogo
 de auristatina adecuado MMAE.

En aun otra modalidad, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-ligador-fármaco (ADC) en donde la estructura de ADC se representa por;



en donde el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de
 5 región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA), CDR2 (SASYRYT) y CDR3 (QQHYITPLT) y las secuencias de CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (NYGMN), CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV).

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona conjugado de
 10 anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende dominios constantes y un dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano. En aun una modalidad adicional, la presente invención proporciona conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende dominios constantes y un dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano y en donde uno o más aminoácidos en la
 15 porción Fc están mutados.

En una modalidad, la presente invención proporciona conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el mAb es el anticuerpo monoclonal, sacituzumab o variantes del mismo.

En una modalidad, la presente invención proporciona conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), en donde el mAb se une a entre 1 y 8 porciones de fármaco, o 3 a 5 porciones de fármaco o en el intervalo de 3,5 a 4,5 porciones de fármaco preferentemente en el intervalo de 4,2 a 4,4.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) como se reivindica en cualquiera
 25 de las reivindicaciones anteriores y un portador aceptable.

En aun otra modalidad, la presente invención proporciona un proceso para preparar

el conjugado de anticuerpo-fármaco en donde el proceso comprende a) purificación del anticuerpo, sacituzumab b) reducción parcial de sacituzumab c) conjugación de sacituzumab reducido con el ligador de fármaco vc-MMAE.

En aun otra modalidad, la presente invención proporciona conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el conjugado está en una forma adecuada para administración parenteral tal como intravenosa (i.v), intramuscular (i.m), subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p) o cualquier otra vía de administración adecuada.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el ADC se usa para tratar cáncer.

En aun una modalidad adicional, la presente invención proporciona conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el ADC se usa para tratar una infección con un organismo patógeno.

En aun otra modalidad, la presente invención proporciona conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el ADC se usa para tratar una enfermedad autoinmunitaria.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el ADC se administra como monoterapia o en combinación con uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consiste en anticuerpos no conjugados, anticuerpos radioetiquetados, anticuerpos conjugados con fármaco, anticuerpos conjugados con toxina, terapia génica, quimioterapia, péptidos terapéuticos, oligonucleótidos, terapia de radiación localizada, cirugía y terapia de ARN de interferencia.

En una modalidad, la presente invención proporciona conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde la dosis del ADC es aproximadamente 0,1 mg / kg a 10 mg / kg.

En otra modalidad, la presente invención proporciona conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que es sacituzumab vedotina.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de conjugado de sacituzumab-ligador-fármaco

Sacituzumab se expresó en células CHO y se purificó por cromatografía en columna convencional que comprende cromatografía en columna de afinidad de proteína A. Se

encontró que la pureza de sacituzumab después de la purificación en columna de afinidad es > 98,5 %, como se valora por HP-SEC. La conjugación del fármaco a sacituzumab (a > 1 mg / ml) se realizó en el grupo tiol (-SH) bajo condiciones reductoras por exceso molar (con respecto a la proteína) de fármaco MMAE acoplado a valina-citrulina a temperatura entre 2 °C y 30 °C a pH entre 5,0 y pH 8,5. El complejo ligador-fármaco se disolvió en acetonitrilo al 5-20 % antes de mezclarlo con la solución proteica. El complejo ligador-fármaco también puede disolverse en otro solvente orgánico como acetato de dimetilo o sulfóxido de dimetilo. La reacción de conjugación se llevó a cabo por aproximadamente 60 minutos. Después de la conjugación, el conjugado de anticuerpo-fármaco (conjugado de sacituzumab-MMAE) se intercambiaba con amortiguador, se filtró a través de un filtro 0,2µ y se almacenó bajo condición congelada a - 25 ± 5 °C.

Tabla 1: Pureza del conjugado de sacituzumab-fármaco por análisis de HP-SEC			
Muestra	Análisis de HP-SEC		
	HMW (alto peso molecular)	Pico principal	LMW (bajo peso molecular)
Conjugado de sacituzumab-MMAE	2,58 %	94,67 %	2,75 %

Se observó que el conjugado de anticuerpo-fármaco muestra aproximadamente 94 % de pureza en el análisis de HP-SEC como se menciona en la tabla 1.

El conjugado de sacituzumab-MMAE también se puede preparar por el método como se describe en el ejemplo 2.

Ejemplo 2: Método para preparar conjugado de Sacituzumab-MMAE

El anticuerpo monoclonal sacituzumab se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO). La purificación se llevó a cabo usando pasos convencionales de cromatografía en columna, tales como cromatografía en columna de afinidad con r-proteína A, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía en columna de modo mixto. Tras la purificación, se determinó una pureza del anticuerpo mayor a 99 % usando cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC).

Conjugación del fármaco vcMMAE a sacituzumab:

El anticuerpo monoclonal de sacituzumab purificado se sometió a conjugación química con vc-MMAE. La matriz de vc-MMAE también se conoce como vedotina, que se compró en el mercado. A continuación se describen los pasos del proceso;

Descongelación del compuesto intermedio Crítico (CI, es decir, Sacituzumab)

- 5 El CI (por sus siglas en inglés) se almacenó congelado en bolsas criogénicas. La descongelación se realizó manualmente en las mismas criobolsas. Tras la descongelación, el material de CI (sacituzumab) se transfirió a un recipiente adecuado para el siguiente paso de reacción.

Reducción parcial del CI por TCEP

- 10 Sacituzumab se sometió a reducción parcial (reticulaciones S-S entre cadenas) en la presencia de una cantidad en exceso molar de tris (carboxietil) fosfina [TCEP] durante aproximadamente 300 min. La temperatura de incubación se mantuvo a o por debajo de 37 °C, bajo condición de agitación (200 rpm), para la reacción. Al final de la reacción, la mezcla de proteínas se hizo pasar a través de un filtro de 0,2µ y se recolectó en una botella de
15 vidrio despirogenada limpia (2 L) para realizar el siguiente paso de reacción.

Conjugación del ligador del fármaco con el CI

- El sacituzumab tratado con TCEP se incubó con una cantidad en exceso molar del fármaco-ligador, vc-MMAE (valina-citrulina monometil auristatina E). La incubación se llevó a cabo en condiciones de frío por no más de 120 min, con agitación suave (200 rpm). La
20 conjugación tiene lugar con la formación de un enlace tioéter covalente entre los grupos -SH libres (intercadenas) de la proteína sacituzumab parcialmente reducida y el grupo maleimida del fármaco-ligador, vcMMAE. Al final de la reacción de conjugación, la mezcla de reacción se pasó por un filtro de 0,2 µm y se sometió a UF/DF (por sus siglas en inglés) para eliminar las moléculas de ligador de fármaco que no habían reaccionado.

- 25 Eliminación del exceso de ligador de fármacos e intercambio de amortiguadores por UF/DF

- Después de la filtración, la mezcla de reacción cruda que contiene sacituzumab vedotina se sometió a UF / DF para la remoción del fármaco-ligador vcMMAE sin reaccionar, seguido por el intercambio de amortiguador final. Para UF/DF, se usaron filtros de
30 membrana de 30 kDa MWCO. La UF/DF se llevó a cabo a una presión transmembrana

máxima (TMP, por sus siglas en inglés) de 50 kPa [0,50 bar]. La diafiltración a volumen constante se realizó con amortiguador Na-citrato 20 mM de pH de $6,6 \pm 0,1$; conductividad de $4,5 \pm 0,5$ mS/cm, para un máximo de 30 diavolúmenes. La diafiltración se supervisó y controló para que el pH y la conductividad del retentado alcanzaran los valores objetivo.

- 5 Después de lograr el pH y conductividad objetivo, se recuperó sacituzumab vedotina a aproximadamente 7 mg / ml y se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 μ .

Preparación de formulados a granel

- La solución concentrada de proteínas se recolectó en un frasco de vidrio limpio y despirogenado. A esto, se adicionó trehalosa a partir de una solución madre al 30 % recién preparada (0,2 μ filtrada) para lograr una concentración final de 7 % (p / v). Posteriormente, se adicionó polisorbato 80 a una concentración final de 0,02 % y el volumen final de volumen se ajustó con la adición del amortiguador de sustancia de fármaco para lograr una concentración de proteína de 5 mg / mL para sacituzumab vedotina. El volumen formulado de sacituzumab vedotina se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 μ m, bajo una cabina de bioseguridad, y se recolectó en una botella de polietilentereftalato glicol (PETG) estéril, no pirógena y de un solo uso con cierre de tornillo de polietileno de alta densidad (HDPE) blanco. El volumen formulado filtrado se etiquetó como la sustancia activa de sacituzumab vedotina.
- 10
15

Ejemplo 3: Pureza de sacituzumab vedotina por análisis de HP-SEC

- Las muestras de sustancia activa de sacituzumab vedotina del ejemplo 2 se analizaron por HP-SEC analítica para valorar el nivel de pureza y presencia de variantes de tamaño relacionadas con el producto (especies de HMW y LMW), bajo condiciones naturales. Las muestras se inyectaron en una columna de sílice (7,8 mm x 30 cm; 3 μ m) para el análisis por HPLC. La matriz de sílice usada en esta columna se acopla con química de superficie unida de tipo diol hidrófilo. El análisis de HP-SEC se realizó en modo isocrático con amortiguador de fosfato de pH 6,8, que contenía sal 250 mM y un solvente polar (15 %), como fase móvil. La separación de variantes de tamaño de proteína se realizó a una velocidad de flujo de 0,5 ml / min, temperatura de columna de 25 °C y se registró con detección UV, a 214 nm.
- 20
25

- Se encontró que la pureza de sacituzumab vedotina en las muestras de sustancia activa sacituzumab es > 97,0 %. Se encontró que las muestras mostraban < 1,5 % de HMW y < 2 % de variantes de especies de LMW, como se ilustra en la siguiente tabla 2 y figura 1.
- 30

Tabla 2: % de pureza por HP-SEC			
Muestras	% HMW	% Pico principal	% LMW
Conjugado 01 de sacituzumab-MMAE	1,04	97,57	1,39
Conjugado 02 de sacituzumab-MMAE	0,86	97,81	1,33
Conjugado 03 de sacituzumab-MMAE	0,74	98,06	1,20

Ejemplo 4: Relación de anticuerpo a fármaco (DAR) del conjugado de Sacituzumab-MMAE

Las muestras de la sustancia activa de sacituzumab vedotina del ejemplo 3 se analizaron por cromatografía de interacción hidrófoba analítica (HIC) -HPLC para valorar la distribución del fármaco-ligador (DI) en sacituzumab. Los picos se separan mediante HIC en función de la hidrofobicidad relativa del anticuerpo conjugado con fármaco (ADC) que lleva de 0 a 8 cargas útiles (toxina del fármaco). Esta técnica también permite la determinación de la relación promedio de fármaco a anticuerpo (DAR) en sacituzumab vedotina. Los experimentos se realizaron al usar una columna de butilo (4,6 × 100 mm; 5 µm) acoplada con el sistema de HPLC. Las muestras que contienen sustancia activa de sacituzumab vedotina se inyectaron en la columna de HIC que estaba saturada con fase móvil A (fosfato 50 mM pH 7,0 y amortiguador de sulfato de amonio 1,2 M que contiene alcohol iso-propílico al 5 %), a 25 °C. Sacituzumab vedotina que lleva un número variable de cargas útiles se eluyó de la columna con fase móvil B (fosfato 50 mM de pH 7,0 que contiene alcohol iso-propílico al 20 %), en modo de concentración de sal decreciente, a 1,0 ml / min, y la elución se registró con detección UV, a 214 nm. La figura 2 ilustra la aparición de variantes de anticuerpos enlazados a fármacos obtenidas con tres lotes independientes de sacituzumab vedotina.

Se encontró que las tres muestras de sustancia activa de sacituzumab vedotina mostraban cinco picos prominentes, que corresponden a DAR0, DAR2, DAR4, DAR6 y DAR8, como se muestra en la figura 2. Se observó que los valores del tiempo de retención (RT, por sus siglas en inglés) de los picos individuales obtenidos con las muestras del lote eran casi idénticos entre sí. Sacituzumab vedotina obtenida de todos los lotes derivados mostró una DAR promedio de 4 ± 1 , preferentemente DAR de aproximadamente 4 a 4,5, o DAR de aproximadamente 3,5 a 4,5, preferentemente de 4,2 a 4,4, más preferentemente DAR de aproximadamente 4,3 en el análisis de HP-HIC como se proporciona en la siguiente tabla 3 y figura 2.

Tabla 3: % de relación de anticuerpo a fármaco (DAR) de conjugado de sacituzumab-MMAE

Muestras	% de DAR0	% de DAR2	% de DAR4	% de DAR6	% de DAR8	DAR promedio
Conjugado 01 de sacituzumab-MMAE	2,96	21,02	41,92	26,97	7,12	4,29
Conjugado 02 de sacituzumab-MMAE	2,93	20,45	41,10	26,96	8,56	4,36
Conjugado 03 de sacituzumab-MMAE	2,73	19,93	40,46	27,48	9,40	4,42

Ejemplo 5: Perfil de polipéptido del conjugado de sacituzumab-ligador-fármaco usando electroforesis SDS PAGE.

- 5 Preparación de conjugado de sacituzumab-ligador-fármaco El conjugado de sacituzumab-ligador-fármaco se preparó de acuerdo con los pasos descritos en el ejemplo 1.

Electroforesis SDS PAGE:

Instrumento: Sistema de electroforesis BIO-RAD.

- 10 Composición de amortiguador de electroforesis: Tris 0,0247 M, glicina 0,192 M, SDS al 0,1 %, pH 8,3 ± 0,1.

Preparación de la muestra: Cada muestra junto con el estándar de referencia interno se diluyó con agua Milli Q y amortiguador de muestra 5X de tal manera que, en tanto que se carga la muestra, cada pozo de gel se cargará con 10 µg de proteína.

- 15 Perfil de polipéptido del conjugado de sacituzumab-ligador-fármaco (sacituzumab ADC):

- 20 El perfil de polipéptidos de sacituzumab ADC se ha demostrado en la figura 3. Describe los resultados de los análisis de SDS-PAGE de diferentes muestras obtenidas durante la reacción de conjugación de sacituzumab ADC, incluido el sacituzumab purificado en el carril no 4, 5 y 6. Los análisis SDS-PAGE de las muestras se realizaron en condiciones no reductoras. El estándar de referencia interno, es decir, Brentuximab Vedotin (ADC),

también se analizó bajo las mismas condiciones, como control positivo (Carril No. 3). Después de los análisis de SDS-PAGE, se ha observado que sacituzumab está intacto en amortiguador de borato después del intercambio de amortiguador, ya que se observa una sola banda en el carril no. 6. Después de la reducción parcial con exceso molar de 2,7 de TCEP, se observan múltiples bandas de especies heterogéneas de sacituzumab en el carril no. 7. La muestra conjugada en el carril no 8, 9 y 10 significa la conjugación exitosa ya que cada banda con carga útil se desplaza hacia el lado superior, es decir, un peso molecular más alto en comparación con la muestra tratada con TCEP (carril no 7).

Ejemplo 6: Estudio de citotoxicidad *in vitro* de conjugado de sacituzumab-ligador-fármaco.

Ejemplo 6A: Ensayo de citotoxicidad *in vitro* del conjugado de Sacituzumab-MMAE usando células BxPC3.

El conjugado de sacituzumab-MMAE se preparó y purificó como se menciona en el ejemplo 1. El sacituzumab-MMAE se estudió en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* como se menciona en la presente más adelante.

Las células BxPC3 (ATCC CRL-1687, Carcinoma pancreático) se sembraron en una placa de fondo claro negra de 96 pozos (Costar 3603) y se incubaron en una incubadora de CO₂ para adherencia. Se eligió la línea de células BxPC3 ya que se conoce que expresa el antígeno trop-2. Las células adherentes se trataron con diferentes concentraciones de conjugado de Sacituzumab-MMAE y Trodelvy®, y se incubaron en una incubadora de CO₂ durante 2 horas. Después de la incubación, el exceso o los conjugados de fármaco no unidos se removieron, se adicionó medio fresco y la placa se incubó durante 4 días en CO₂ al 5 % a 37 °C. Al final de la incubación, se adicionó tinte azul de alamar (invitrogen, DAL-1100) a las células y se incubó durante 5 horas en una incubadora de CO₂. Después de la incubación, las células viables se cuantificaron al medir las señales de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm usando un lector de placa fluorescente SpectraMax M2E. La figura 4 muestra que la actividad citotóxica de BxPC3 del conjugado de Sacituzumab-MMAE probado es significativamente mejor que Trodelvy®.

Ejemplo 6B: Ensayo de citotoxicidad *in vitro* de Sacituzumab-MMAE usando células NCI-N87.

El conjugado de sacituzumab-MMAE se preparó y purificó como se menciona en el ejemplo 1. El sacituzumab-MMAE se estudió para el ensayo de citotoxicidad *in vitro* como se menciona en la presente más adelante. Las células NCI-N87 (ATCC CRL-5822, Carcinoma gástrico) se sembraron en una placa de fondo claro negra de 96 pozos (Costar 3603) y se incubaron en una incubadora de CO₂ para adherencia. Se eligió la línea de células NCI-N87, ya que se conoce que expresa el antígeno trop-2. Las células adherentes se trataron con diferentes concentraciones de sacituzumab-MMAE y Trodelvy®, y se incubaron en una incubadora de CO₂ durante 2 horas. Después de la incubación, se removió el exceso o los conjugados no unidos, se adicionó medio fresco y se incubó durante 4 días en CO₂ al 5 % a 37 °C. Al final de la incubación, se adicionó tinte azul alamar (invitrogen, DAL-1100) a las células y se incubó durante 5 horas en incubadora de CO₂. Después de la incubación, las células viables se cuantificaron al medir las señales de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm usando un lector de placa fluorescente SpectraMax M2E. La figura 5 muestra que la actividad citotóxica de NCI-N87 del conjugado de Sacituzumab-MMAE probado fue significativamente mejor que Trodelvy®.

Ejemplo 6C: Ensayo de citotoxicidad *in vitro* de Sacituzumab-MMAE usando células HCC1806.

El conjugado de sacituzumab-MMAE se preparó y purificó como se menciona en los ejemplos de la presente anteriormente. El sacituzumab-MMAE se estudió para el ensayo de citotoxicidad *in vitro* como se menciona en la presente más adelante.

Las células HCC1806 (ATCC CRL-2335, Carcinoma de células escamosas acantolítico de mama triple negativo) se sembraron en una placa de fondo claro negra de 96 pozos (Costar 3603) y se incubaron en una incubadora de CO₂ para adherencia. Se eligió la línea de células HCC1806, ya que se conoce que expresa el antígeno trop-2. Las células adherentes se trataron con diferentes concentraciones de sacituzumab-MMAE y Trodelvy®, y se incubaron en una incubadora de CO₂ durante 2 horas. Después de la incubación, se removió el exceso o los conjugados no unidos, se adicionó medio fresco y se incubó durante 4 días en CO₂ al 5 % a 37 °C. Al final de la incubación, se adicionó tinte azul alamar (invitrogen, DAL-1100) a las células y se incubó durante 5 horas en incubadora de CO₂. Después de la incubación, las células viables se cuantificaron al medir las señales de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm usando un lector de placa fluorescente SpectraMax M2E. La figura 6

muestra que la actividad citotóxica de HCC1806 del conjugado de Sacituzumab-MMAE probado fue significativamente mejor que Trodelvy®.

Ejemplo 6D: Ensayo de citotoxicidad *in vitro* de Sacituzumab-MMAE usando células MDA-MB-468.

5 El conjugado de sacituzumab-MMAE se preparó y purificó como se menciona en los ejemplos de la presente anteriormente. El sacituzumab-MMAE se estudió para el ensayo de citotoxicidad *in vitro* como se menciona en la presente más adelante.

Las células MDA-MB-468 (ATCC HTB-132, Adenocarcinoma de mama triple negativo) se sembraron en una placa de fondo claro negra de 96 pozos (Costar 3603) y se
10 incubaron en una incubadora de CO₂ para adherencia. Se eligió la línea de células MDA-MB-468, ya que se conoce que expresa el antígeno trop-2. Las células adherentes se trataron con diferentes concentraciones de sacituzumab-MMAE y Trodelvy®, y se incubaron en una incubadora de CO₂ durante 2 horas. Después de la incubación, se removió el exceso o los conjugados no unidos, se adicionó medio fresco y se incubó durante 4 días en CO₂ al 5
15 % a 37 °C. Al final de la incubación, se adicionó tinte azul alamar (invitrogen, DAL-1100) a las células y se incubó durante 5 horas en incubadora de CO₂. Después de la incubación, las células viables se cuantificaron al medir las señales de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm usando un lector de placa fluorescente SpectraMax M2E. La figura 7 muestra que la actividad citotóxica
20 de MDA-MB-468 del conjugado de Sacituzumab-MMAE probado fue significativamente mejor que Trodelvy®.

Ejemplo 7: Eficacia *in vivo* del conjugado de Sacituzumab-MMAE en el modelo de enfermedad de xenoinjerto de carcinoma gástrico en ratones SCID

En el presente estudio, se evaluó el potencial terapéutico del nuevo conjugado de
25 Sacituzumab-MMAE en comparación con la molécula de ADC anti-trop 2 comercialmente disponible, Sacituzumab govitecan-hziy (TRODELVY®). Específicamente para inducir el xenoinjerto de carcinoma gástrico, se inyectaron ratones SCID inmunodeficientes de manera subcutánea con células NCI-N87 (10 millones de células/animal/volumen de 200 µL en una relación 1:1 de suspensión celular y matrigel) en la región del flanco derecho de los
30 animales el día 0. Se observó a los animales para el desarrollo de tumores palpables y la administración de fármacos se realizó el día 10 cuando el volumen tumoral medio de los animales alcanzó aproximadamente 150-200 mm³. El conjugado de Sacituzumab-MMAE y

Trodelvy® se compararon cabeza a cabeza a un nivel de dosis de 15 mg/kg (vía I.V., administración individual) y se probó un grupo adicional de conjugado de Sacituzumab-MMAE a una dosis mucho más baja de 5 mg/kg (vía I.V., administración individual). La figura 8 demuestra la eficacia del conjugado de Sacituzumab-MMAE en comparación con Trodelvy® en la línea de células de carcinoma gástrico NCI-N87. Trodelvy® a una dosis de 15 mg/kg fue capaz de retrasar la progresión del tumor en comparación con el grupo de control de placebo, pero no fue capaz de hacer retroceder el tumor sustancialmente. Por otra parte, el conjugado de Sacituzumab-MMAE en ambas dosis probadas fue capaz de hacer retroceder la carga tumoral, lo que indica sustancialmente que incluso a una dosis un tercio más baja, el conjugado de Sacituzumab-MMAE tenía un mayor potencial para hacer retroceder los tumores de carcinoma gástrico que portan la sobreexpresión de TROP2 en comparación con el fármaco comercialmente disponible, Trodelvy®.

Ejemplo 8: Eficacia *in vivo* del conjugado de Sacituzumab-MMAE en el modelo de enfermedad de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo mutado con BRCA en ratones SCID

En este estudio, el potencial terapéutico del nuevo conjugado de Sacituzumab-MMAE se evaluó en comparación con el fármaco ADC antitrop2 comercialmente disponible, TRODELVY® en un modelo de enfermedad de cáncer de mama triple negativo (TNBC) mutado con BRCA. Específicamente para inducir el xenoinjerto de TNBC, se inyectaron ratones SCID inmunodeficientes de manera subcutánea con células HCC1806 (10 millones de células/animal/volumen de 200 µL en una relación 1:1 de suspensión celular y matrigel) en la región del flanco derecho de los animales el día 0. Se observó a los animales para el desarrollo de tumores palpables y la administración de fármacos se realizó el día 10 cuando el volumen tumoral medio de los animales alcanzó aproximadamente 200-250 mm³. El conjugado de Sacituzumab-MMAE y Trodelvy® se compararon cabeza a cabeza a dos niveles de dosis diferentes de 2 mg/kg y 3 mg/kg (vía I.V., administración individual). La figura 9 demuestra la eficacia del conjugado de Sacituzumab-MMAE en comparación con Trodelvy® en el modelo de cáncer de mama triple negativo mutado con BRCA (HCC1806). Trodelvy®, en ambas dosis probadas, solo fue capaz de retrasar ligeramente la progresión del tumor y no fue capaz de hacer retroceder el tumor. Por otro lado, el conjugado de Sacituzumab-MMAE a los niveles de dosis de 2 mg/kg y 3 mg/kg fue capaz de hacer retroceder el crecimiento tumoral hasta los días 17 y 24 respectivamente, lo que indica claramente que el conjugado de Sacituzumab-MMAE tiene un mayor potencial que Trodelvy® para hacer retroceder y retrasar la progresión tumoral como monoterapia EN

TROP2 sobreexpresando tumores TNBC mutados con BRCA.

Referencias incorporadas en la solicitud de patente actual

1. Diamantis N, Banerji U. Antibody-drug conjugate - an emerging class of cancer treatment. *Br J Cancer* 2015; 114: 362–367.
- 5 2. Bouchard H, Viskov C, Garcia-Echeverria C. Antibody-drug conjugates - a new wave of cancer drugs. *Bioorganic Med. Chem Lett* 2014; 24: 5357–5363.
3. Tolcher AW, *Ann Oncol.* 2016; 27: 2168-2172. 10.1093/annonc/mdw424. [PubMed: 27733376]
4. Información Farmacéutica de la OMS, Vol. 29, No. 2, 2015 DCI recomendada:
10 Lista 63 41 Denominaciones Comunes Internacionales de Sustancias Farmacéuticas (DCI).
5. Ansel et al, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), y
6. Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990), y ediciones revisadas de lo mismo.
- 15 7. Cardillo et al, Synthetic Lethality Exploitation by an Anti-Trop-2-SN-38 Antibody-Drug Conjugate, IMMU-132, Plus PARP Inhibitors in BRCA1/2-wild-type Triple-Negative Breast Cancer, *Clinical Cancer Research*; 23(13); 3405–15. 2017 AACR.

Incorporación por referencia

La divulgación completa de cada uno de los documentos de patentes y artículos
20 científicos mencionados en la presente se incorpora por referencia a todos los efectos.

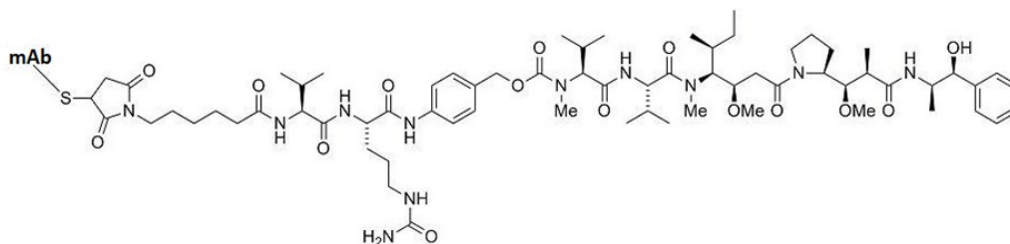
Equivalentes

La invención puede realizarse de otras formas específicas sin apartarse de su espíritu ni de sus características esenciales. Por lo tanto, las modalidades anteriores deben considerarse en todos los aspectos ilustrativas y no limitantes de la invención descrita en la presente. El
25 alcance de la invención queda así indicado por las reivindicaciones adjuntas más que por la descripción anterior, y todos los cambios que entren dentro del significado y intervalo de equivalencia de las reivindicaciones están contemplados en las mismas.

REIVINDICACIONES:

1. Un conjugado de anticuerpo-ligador-fármaco (ADC) caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA), CDR2 (SASYRYT) y CDR3 (QQHYITPLT) y las secuencias de CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (NYGMN), CDR2(WINTYTGEPTYTDDFKG) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV); el ligador es la unidad de ligador enzimáticamente escindible mc-vc-PABC y el fármaco es un análogo de auristatina adecuado MMAE; en donde el anticuerpo monoclonal (mAb) se une a entre 4,2 y 4,4 porciones de fármaco.

2. El conjugado de anticuerpo-ligador-fármaco (ADC) de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el ADC se representa por la siguiente estructura:



en donde el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA), CDR2 (SASYRYT) y CDR3 (QQHYITPLT) y las secuencias de CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (NYGMN), CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV) y en donde el anticuerpo monoclonal (mAb) se une a entre 4,2 y 4,4 porciones de fármaco.

3. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende dominios constantes y un dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano.

4. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende dominios constantes y un dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano y en donde uno o más aminoácidos en la porción Fc están mutados.

5. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con la

reivindicación 3 o 4, caracterizado porque el mAb es el anticuerpo monoclonal, sacituzumab o variantes del mismo.

6. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el mAb se une a 4,2 porciones de fármaco, aproximadamente 4,3 porciones de fármaco o 4,4 porciones de fármaco.

7. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el mAb se une a 4,20, 4,21, 4,22, 4,23, 4,24, 4,25, 4,26, 4,27, 4,28, 4,29, 4,30, 4,31, 4,32, 4,33, 4,34, 4,35, 4,36, 4,37, 4,38, 4,39 o 4,40 porciones de fármaco.

8. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador aceptable.

9. Un proceso para preparar el conjugado de anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el proceso comprende a) purificación del anticuerpo, sacituzumab b) reducción parcial de sacituzumab c) conjugación de sacituzumab reducido con el ligador de fármaco vc-MMAE.

10. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho conjugado está en una forma adecuada para administración parenteral tal como intravenosa (i.v), intramuscular (i.m), subcutánea (s.c), intraperitoneal (i.p) o cualquier otra vía de administración adecuada.

11. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ADC se usa para tratar el cáncer.

12. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ADC se usa para tratar una infección por un organismo patógeno.

13. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ADC se usa para tratar una enfermedad autoinmune.

14. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ADC se administra como

monoterapia o en combinación con uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consiste en anticuerpos no conjugados, anticuerpos radiomarcados, anticuerpos conjugados con fármacos, anticuerpos conjugados con toxinas, terapia génica, quimioterapia, péptidos terapéuticos, oligonucleótidos, radioterapia localizada, cirugía y
5 terapia de ARN de interferencia.

15. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la dosis del ADC es de aproximadamente 0,1 mg/kg a 10 mg/kg.

16. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de conformidad con cualquiera de
10 las reivindicaciones anteriores caracterizado porque es sacituzumab vedotina.

RESUMEN

La invención proporciona conjugados de anticuerpo-ligador-fármaco en donde el anticuerpo es sacituzumab y el fármaco son análogos de auristatina o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. La invención también proporciona un proceso para preparar

5 conjugados de anticuerpo-ligador de la presente invención.