



(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/IB2024/052567

(22) International Filing Date:

16 March 2024 (16.03.2024)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

202321018199 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 Corporate Park, Scheme No. 63, Survey No. 536, Khoraj (Gandhinagar), Nr. Vaishnodevi Circle, Ahmedabad, Gandhinagar, Gujarat 382481 (IN).

BANDYOPADHYAY, Sanjay; Zydus Corporate Park, Scheme No. 63, Survey No. 536, Khoraj (Gandhinagar), Nr. Vaishnodevi Circle, Ahmedabad, Gandhinagar, Gujarat 382481 (IN). SINGH, Avnish; Zydus Corporate Park, Scheme No. 63, Survey No. 536, Khoraj (Gandhinagar), Nr. Vaishnodevi Circle, Ahmedabad, Gandhinagar, Gujarat 382481 (IN). KALI-TA, Pankaj; Zydus Corporate Park, Scheme No. 63, Survey No. 536, Khoraj (Gandhinagar), Nr. Vaishnodevi Circle, Ahmedabad, Gandhinagar, Gujarat 382481 (IN). SONI, Swagat; Zydus Corporate Park, Scheme No. 63, Survey No. 536, Khoraj (Gandhinagar), Nr. Vaishnodevi Circle, Ahmedabad, Gandhinagar, Gujarat 382481 (IN).

(74) Agent: BHASIN, Gayatri 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: DARATUMUMAB DRUG CONJUGATES AND PREPARATION THEREOF

(57) Abstract: The invention provides antibody-linker-drug conjugates wherein antibody is daratumumab 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-PCT0890		FOR FURTHER ACTION See Form PCT/IPEA/416	
International application No. PCT/IB2024/052567	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>9</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ a total of <u>237</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/IB2024/052567

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* 1-32 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 1-3 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 18-07-2025
- ☒ 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/IB2024/052567

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	6-10, 12-15	YES
	Claims	1-5, 11 and 16	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims		YES
	Claims	1-16	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.

The applicant has stated that selection of Daratumumab and its successful conjugation with MMAE is a significant invention and cannot be considered a routine substitution. The prior art documents cited does not disclose or suggest the claimed Daratumumab vedotin.

The applicant contends that claims 1 to 5, 11, and 16 are novel, asserting that document D5 does not explicitly disclose the specific DAR range of 1 to 8 for Daratumumab vedotin.

D1 presents broad, unsubstantiated lists of antibodies and payloads, including Daratumumab and MMAE, without any specific guidance or motivation to combine them. D1 does not teach or suggest using Daratumumab as an ADC for multiple myeloma, nor does it address the critical requirement for antibody internalization, which is essential for ADC efficacy. Prior examples, such as Rituximab and Cetuximab ADCs, demonstrate that not all antibodies in such lists are suitable. Furthermore, multiple clinical failures of ADCs in multiple myeloma highlight the technical challenges and unpredictability in this field. The successful development of a Daratumumab-MMAE ADC represents a non-obvious and inventive step beyond the teachings of D1, and cannot be arrived at through routine experimentation or hindsight.

D2 does not disclose the specific linker-drug-antibody configuration or the optimized drug-to-antibody ratio (DAR) employed in the present invention. Moreover, the Daratumumab-MMAE conjugate of the present invention demonstrates significantly improved cytotoxicity, with an IC of 0.3302 µg/mL compared to 0.88 µg/mL reported in D2.

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)

D3 teaches MMAE conjugated to an anti-FcRL5 antibody, not Daratumumab targeting CD38, and emphasizes FcRL5 as a preferable target due to its specificity, teaching away from CD38-directed ADCs.

D4 discloses an MMAE conjugate targeting CS1 (SLAMF7), favoring MMAF over MMAE for multiple myeloma treatment, providing no motivation to combine Daratumumab with MMAE.

D6 discloses the Daratumumab antibody and not its application in ADCs.

The applicant's arguments were considered and were not found persuasive for the reasons as stated below. Upon re-evaluation of the amended claims 1-16 under Article 33 of PCT, it is concluded by this IPEA that they do not meet the requirements of PCT Article 33(3).

Reference is made to the following documents:

D1: WO2019183438A1, [SEATTLE GENETICS, INC.], 26 September 2019 [26-09-2019]

D2: Zhang X et al: "Design, synthesis and evaluation of anti-CD38 antibody drug conjugate based on Daratumumab and maytansinoid". Bioorg Med Chem., 16 Dec 2018;27(3):479-482.

D3: Elkins K et al: "FcRL5 as a target of antibody-drug conjugates for the treatment of multiple myeloma". Mol Cancer Ther., 17 July 2012;11(10):2222-32.

D4: Vij R et al: "First-in-Human Phase I Study of ABBV-838, an Antibody-Drug Conjugate Targeting SLAMF7/CS1 in Patients with Relapsed and Refractory Multiple Myeloma". Clin Cancer Res., 22 Jan 2020;26(10):2308-2317.

D5: Anti-CD38 (Daratumumab)-MC-Vc-PAB-MMAE ADC, Cat. No: ADC-W-827, <https://www.creative-biolabs.com/adc/daratumumab-mc-vc-pab-mmae-adc1108.htm>
20 June 2019

D6: EP3110440A2 (JANSSEN BIOTECH INC) 04 JANURARY 2017 (04-01-2017)

D7: Li et al. Clinical pharmacology of vc-MMAE antibody-drug conjugates in cancer patients: learning from eight first-in-human Phase 1 studies, MAbs. 2019 Dec 18;12(1):1699768.

D8: Dawicki et al. Daratumumab-225Actinium conjugate demonstrates greatly enhanced antitumor activity against experimental multiple myeloma tumors, Oncoimmunology. 2019 May 1;8(8):1607673.

D1 discloses a antibody drug conjugate for treating cancer, wherein the antibody can be specific for CD38 and the drug can be MMAE and the linker can be protease cleavable linker comprising maleimidocaproyl spacer, a valine- citrulline dipeptide, and a p-amino- benzyloxycarbonyl spacer (see claims 1,5,8,20, 29, paragraph [0090]).

D2 discloses anti-CD38 antibody drug conjugate (ADC), Dara-DM4 for treatment of multiple myeloma, by conjugating Daratumumab (anti-cd38 antibody) and DM4 (drug) through a cleavable crosslinker SPDP. DM4 is a maytansinoid derivative, an antitubulin agent that inhibits cell division.

D3 discloses is an antibody-drug conjugate for the treatment of multiple myeloma comprising anti-human FcRL5 monoclonal antibody and a potent anti-mitotic agent, monomethyl auristatin E (MMAE), linked through maleimidocaproyl -valine-citrullinep-aminobenzyloxycarbonyl (MC-VC-PAB) linker.

D4 discloses ABBV-838 an ADC comprising a humanized recombinant immunoglobulin G1k directed against a unique epitope of CD2 subset 1 (CS1, also known as SLAMF7; a cell-surface glycoprotein expressed on multiple myeloma cells) conjugated to the cytotoxic monomethyl auristatin E (MMAE) through a valine-citrulline linker.

D5 discloses ADC product comprising anti-CD38 monoclonal antibody specifically Daratumumab, maleimidocaproylvaline-citrulline-p-aminobenzoyloxycarbonyl ADC linker and MMAE payload drug. The MMAE is targeted to certain cancers by immunerecognition and delivered into cancer cells via receptor mediated endocytosis. Within the cell, MMAE binds to tubulins, interrupts microtubule dynamics, and subsequently, induces cell death.

D6 discloses anti-CD38 antibody Daratumumab comprising VH and a VL

amino acid sequences SEQ ID NO: 4 and 5, respectively, heavy chain CDRs HCDR1, HCDR2 and HCDR3 of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, and light chain CDRs LCDR1, LCDR2 and LCDR3 of SEQ ID NOs: 9, 10 and 11, respectively. The CDRs disclosed in claim 1 and 2 of the present application are 100% identical to the CDRs of Daratumumab of D6.

D7 states that the average drug-to-antibody ratios (DARs) for most vc-MMAE antibody-drug conjugates (ADCs) in clinical development are typically around 3 to 4. It also notes that conjugation via reduced inter-chain disulfide cysteine residues produces a heterogeneous mixture of vc-MMAE based ADC species, characterized by even-numbered DARs—specifically 0, 2, 4, 6, or 8.

D8 discloses that Daratumumab's ability to internalize into tumor cells upon binding to CD38 likely contributes to its prolonged retention within the tumor. This extended retention may enhance the therapeutic potential of the attached payload (such as ²²⁵Ac), by not only facilitating targeted delivery but also maintaining tumoricidal concentrations within the tumor microenvironment.

ARTICLE 33(2) OF THE PCT - NOVELTY

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT because the subject matter of the claims 1-5, 11 and 16 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

D5 discloses ADC comprising anti-CD38 monoclonal antibody (Daratumumab), maleimidocaproyl-valine-citrulline-p-aminobenzoyloxycarbonyl ADC linker and MMAE payload drug. The heavy chain and light CDRs mentioned in the claims 1 and 2 corresponds to the heavy chain and light CDRs of Daratumumab. Thus, the claims 1-5, 11 and 16 are directed towards Daratumumab based ADC with maleimidocaproyl-valine-citrulline-p-aminobenzoyloxycarbonyl ADC linker and MMAE payload drug. Therefore, claims 1-5, 11, and 16, which are directed to a Daratumumab-based ADC Daratumumab vedotin comprising the mc-vc-PABC linker and MMAE payload for use in cancer treatment, are anticipated by the disclosure of D5.

Further, regarding the applicant's argument that claims 1-5, 11, and 16 are novel because D5 does not explicitly disclose a DAR range of 1 to 8 for Daratumumab vedotin, it is noted that the claims themselves do not recite this specific DAR range. Rather, they broadly characterize the ADC by its components—Daratumumab, the mc-vc-PABC linker, and MMAE—without limiting the DAR. Accordingly, the argument regarding DAR does not establish novelty over D5.

Furthermore, it is well established in the literature prior to the priority date of the application that vc-MMAE antibody-drug conjugates (ADCs) typically exhibit average drug-to-antibody ratios (DARs) in the range of 3 to 4 during clinical development.

As noted in document D7, conjugation through reduced inter-chain disulfide cysteine residues results in a heterogeneous mixture of ADC species with even-numbered DARs—specifically 0, 2, 4, 6, or 8. Therefore, even though D5 does not explicitly disclose a DAR value of 1 to 8, it would be obvious to a person skilled in the art that such DAR values are inherently encompassed by the ADCs described in D5.

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 claims 1-5, 11 and 16 not new over D5 cannot be acknowledged with an inventive step. Furthermore, with respect to claims 6 and 7, while D5 does not explicitly disclose a drug-to-antibody ratio (DAR) of 1 to 8, it is well known from the literature prior to the priority date—and as evidenced by D7—that vc-MMAE-based ADCs typically exhibit average DARs around 3 to 4. Conjugation via reduced inter-chain disulfide cysteine residues inherently results in a heterogeneous ADC mixture comprising even-numbered DARs (0, 2, 4, 6, or 8), making it obvious to a person skilled in art that such DARs are encompassed by D5's disclosure.

D1 further supports the lack of inventive step of the invention by disclosing CD38 as a suitable ADC target and identifying Daratumumab as a candidate anti-CD38 monoclonal antibody. D1 also teaches the use of MMAE as the cytotoxic payload, conjugated via the same cleavable linker (mc-vc-PABC) used in the present application. While D1 exemplifies Brentuximab vedotin, its broader teaching includes other antibodies—such as Daratumumab—for use in ADC constructs. In the absence of demonstrated technical challenges or unexpected properties associated with the use of Daratumumab, its substitution would have been a routine optimization for the person skilled in art. The applicant's assertion that D1 does not disclose explicit methodology for synthesizing Daratumumab-MMAE ADCs is unconvincing, given that antibody conjugation with MMAE via mc-vc-PABC linkers was a well-established technique prior to the priority date. No evidence has been submitted to show that applying this technique to Daratumumab yields any surprising or advantageous technical effect. The argument that D1 merely presents unsubstantiated lists of antibodies and payloads without specific motivation to combine Daratumumab and MMAE is also not persuasive in light of D8. D8 confirms that Daratumumab conjugates internalize effectively upon binding to CD38 and exhibit prolonged tumor retention, thereby enhancing payload delivery and therapeutic effect. This property satisfies the internalization criterion essential for ADC efficacy and would have made Daratumumab an obvious choice for substitution into the ADC format taught in D1. Furthermore, Daratumumab itself (D6), Daratumumab-based ADCs (D1-D5), and their therapeutic applications were already known in the prior art. The broader concept of using monoclonal antibodies to deliver cytotoxic agents

directly to tumor cells is also well established. In the absence of experimental data or technical evidence demonstrating superior efficacy or unexpected results, the claimed Daratumumab-MMAE ADC reflects a predictable and obvious implementation of existing ADC technology using known components. Accordingly, the claimed subject matter does not involve an inventive step in view of D1-D8. Further, the other dependent or related claims 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 cannot be acknowledged with an 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

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)

(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario ZLL-PCT0890		PARA CONTINUAR LA TRAMITACIÓN Ver formulario PCT/IPEA/416	
Solicitud internacional No. PCT/IB2024/052567	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 16-03-2024	Fecha de prioridad (día/mes/año) 17-03-2023	
Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o a la vez clasificación nacional e CIP C07K16/28 versión= 2025.1			
Solicitante ZYDUS LIFESCIENCES LIMITED			

1. El presente informe preliminar internacional sobre patentabilidad, se establece por esta Administración encargada del examen preliminar internacional según el Artículo 35 y se transmite al solicitante conforme al Artículo 36.

2. Este INFORME comprende 9 hojas, incluida la presente hoja de portada.

3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden:

a. ☒ un total de 237 hojas, descritas a continuación:

☒ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas, y/u hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración, a menos que estas hojas hubieran sido reemplazadas o canceladas, y cualquier escrito de acompañamiento (ver Reglas 46.5, 66.8, 70.16, 91.2 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).

☐ hojas que contienen rectificaciones no tomadas en cuenta por esta Administración porque no estuvieran disponibles en el momento en el que esta Administración comenzó a elaborar este informe, así como los escritos de acompañamiento (Reglas 66.4bis, 70.2.e), 70.16 y 91.2)

☐ hojas de reemplazo y escritos de acompañamiento, que esta Administración considera que, o bien contienen una modificación que se extiende más allá de lo divulgado en la solicitud internacional tal y como fue inicialmente presentada, o bien las hojas de reemplazo no se acompañaron de un escrito indicando la base para la modificación en la solicitud tal y como se presentó, según se indica en el punto 4 del Recuadro I y en el Recuadro Suplementario (ver Regla 70.16.b)).

b. ☒ un archivo electrónico por separado que contiene un listado de secuencias (*remitido únicamente a la Oficina Internacional*).

4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los puntos siguientes: _____

☒ Recuadro I Base de este informe

☐ Recuadro II Prioridad

☐ Recuadro III No formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial

☐ Recuadro IV Falta de unidad de invención

☒ Recuadro V Declaración motivada según el Artículo 35.2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

☐ Recuadro VI Ciertos documentos citados

☐ Recuadro VII Defectos en la solicitud internacional

☐ Recuadro VIII Observaciones relativas a la solicitud internacional

Fecha de presentación de la solicitud de examen preliminar internacional 17-01-2025	Fecha de finalización del presente informe 18-07-2025
Nombre y dirección postal de la Administración encargada del examen preliminar internacional Oficina de Patentes de la India Plot No.32, Sector 14, Dwarka, Nueva Delhi 110075 Nº de fax:	Funcionario autorizado Anjana Haridas Nº de teléfono: +91-1125300200

Recuadro I. Base de este informe

1. Por lo que respecta al **idioma**, este informe se ha establecido sobre la base:
 - ☒ de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó.
 - ☐ de una traducción del idioma original al siguiente idioma _____, que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
 - ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3.a) y 23.1.b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4.a))
 - ☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2.a) y/o 55.3.a) y b))
2. Por lo que respecta a los **elementos** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina Receptora en respuesta a un requerimiento según el Artículo 14 se las denominan en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe)*:
 - ☐ la solicitud internacional tal y como fue inicialmente presentada/enviada
 - ☒ la descripción:
 - páginas _____, tal como se presentaron/enviaron inicialmente
 - páginas 1-32, recibidas por esta Administración en fecha 17-01-2025
 - páginas _____, recibidas por esta Administración en fecha _____
 - ☐ las reivindicaciones:
 - Nos. _____, tal como se presentaron/enviaron inicialmente
 - Nos. _____, modificadas (acompañadas de una declaración) según el Artículo 19
 - Nos. 1-16, recibidas por esta Administración en fecha 17-01-2025
 - ☒ los dibujos:
 - páginas 1-3, tal como se presentaron/enviaron inicialmente
 - páginas _____, recibidas por esta Administración en fecha _____
 - páginas _____, recibidas por esta Administración en fecha _____
 - ☒ un listado de secuencias - ver Recuadro Suplementario relativo a listados de secuencias
3. ☐ Las modificaciones ha ocasionado la anulación de:
 - ☐ la descripción, páginas _____
 - ☐ la reivindicaciones, Nos. _____
 - ☐ los dibujos, páginas/figuras _____
 - ☐ el listado de secuencias (*especificar*), páginas _____
4. ☐ Esta opinión se ha establecido como si (algunas de) las modificaciones listadas más abajo no se hubieran realizado ya que, o bien se considera que van más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, o bien no se acompañaron de una carta indicando la base para las modificaciones en la solicitud tal y como se presentó, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla 70.2.c) y (c-bis)).
 - ☐ la descripción, páginas _____
 - ☐ la reivindicaciones, Nos. _____
 - ☐ los dibujos, páginas/figuras _____
 - ☐ el listado de secuencias (*especificar*), páginas _____
5. ☐ Esta opinión se ha establecido:
 - ☐ tomando en consideración la **rectificación de un error evidente** autorizado por o notificado a esta Administración según la Regla 91 (Reglas 66.1.d-bis) y 70.2.e)).
 - ☐ sin tomar en consideración la **rectificación de un error evidente** autorizado por o notificado a esta Administración según la Regla 91 (Reglas 66.4bis y 70.2.e)).
6. Por lo que respecta a las búsquedas complementarias (Reglas 66.1ter y 70.2.f):
 - ☒ esta Administración ha realizado una búsqueda complementaria 18-07-2025
 - ☒ se han recuperado documentos adicionales durante la búsqueda complementaria
 - ☐ esta Administración no ha realizado búsqueda complementaria por considerar que no sería de utilidad.
7. ☐ El(los) informe(s) de búsqueda internacional suplementario(s) emitido(s) por la(s) Administración(es) _____ ha(n) sido recibido(s) y tomados(s) en consideración para establecer esta opinión (Regla 45bis.8.b) y c))

* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituida".

Declaración motivada según el Artículo 35.2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. Declaración

Reivindicaciones	6-10, 12-15	SÍ	Reivindicaciones	6-10,
11 y 16	NO			
Reivindicaciones		SÍ	Reivindicaciones	1-16
	NO			
Reivindicaciones		SÍ	Reivindicaciones	1-16
	NO			

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

La respuesta del solicitante de fecha 18 de julio de 2025 al dictamen escrito de la Administración encargada del examen preliminar internacional (emitido para las reivindicaciones modificadas presentadas por el solicitante en virtud del artículo 34 mediante solicitud de examen preliminar internacional de fecha 17.01.2025) ha sido debidamente examinada.

El solicitante ha declarado que la selección de daratumumab y su conjugación exitosa con MMAE es una invención significativa y no puede considerarse una sustitución rutinaria. Los documentos técnicos anteriores citados no divulgan ni sugieren el daratumumab vedotina reivindicado.

El solicitante sostiene que las reivindicaciones 1 a 5, 11 y 16 son novedosas, afirmando que el documento D5 no divulga explícitamente el rango específico de DAR de 1 a 8 para el daratumumab vedotina.

D1 presenta listados amplios y sin fundamento de anticuerpos y cargas útiles, incluidos daratumumab y MMAE, sin ninguna orientación o motivación específica para combinarlos. D1 no enseña ni sugiere el uso de daratumumab como ADC para el mieloma múltiple, ni aborda el requisito crítico para la internalización del anticuerpo, que es esencial para la eficacia de ADC. Los ejemplos anteriores, tales como los ADC de rituximab y cetuximab, demuestran que no todos los anticuerpos de tales listas son adecuados. Asimismo, los múltiples fracasos clínicos de los ADC en el mieloma múltiple ponen de manifiesto los retos técnicos y la imprevisibilidad de este campo. El desarrollo exitoso de un ADC de daratumumab-MMAE representa una actividad no obvia e inventiva más allá de las enseñanzas de D1, y no se puede llegar al mismo a través de experimentación rutinaria o retrospectiva.

D2 no divulga la configuración específica enlazador-fármaco-anticuerpo ni la relación fármaco-anticuerpo (DAR) optimizada empleada en la presente invención. Asimismo, el conjugado de daratumumab-MMAE de la presente invención demuestra una citotoxicidad significativamente mejorada, con una CI de 0,3302 pg/mL en comparación con 0,88 pg/mL notificado en D2.

Recuadro suplementario relacionado con el listado de secuencias

Continuación del Recuadro No. 1, punto 2:

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos divulgada en la aplicación internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión ha establecido que la base del listado de secuencias:
 - a. ☒ forma parte de la aplicación internacional tal como se presentó.
 - b. ☐ recibida con posterioridad a la fecha límite internacional a efectos de la búsqueda y/o el examen internacionales,
 - ☐ acompañada de una declaración en la que se indique que la secuencia listada no excede la divulgación contenida en la solicitud internacional tal y como fue presentada.
 - c. ☐ recibida por esta Administración como una modificación* bajo el Artículo 34 del PCT en _____.
2. ☐ 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 en la medida en que se ha podido formular una opinión significativa, tal como se contempla en el artículo 33.1), sin una lista de secuencias que cumpla con la norma ST.26 de la OMPI.
3. Comentarios adicionales:

** Si se utiliza el punto 4 del Recuadro No. 1, el listado de secuencias, que forma parte de la base de esta opinión, puede llevar el sello de "sustituido".*

Recuadro suplementario

En caso de que el espacio de cualquier recuadro anterior no sea suficiente.

Continuación de:

Continuación de la citación y explicación (Recuadro 5)

D3 enseña un conjugado de MMAE con un anticuerpo anti-FcRL5, no daratumumab dirigido a CD38, y enfatiza FcRL5 como un objetivo preferible debido a su especificidad, enseñando lejos de ADC dirigidos a CD38.

D4 divulga un conjugado de MMAE dirigido a CS1 (SLAMF7), favoreciendo MMAF sobre MMAE para el tratamiento del mieloma múltiple, no proporcionando ninguna motivación para combinar daratumumab con MMAE.

D6 divulga el anticuerpo daratumumab y no su aplicación en ADC.

Se examinaron los argumentos del Solicitante y no se consideraron convincentes por las razones que se exponen a continuación. Tras una nueva evaluación de las reivindicaciones modificadas 1-16 en virtud del artículo 33 del PCT, esta IPEA concluye que no cumplen los requisitos del artículo 33(3) del PCT.

Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1:WO2019183438A1, [SEATTLE GENETICS, INC.], 26 de septiembre de 2019 [26-09-2019]

D2: Zhang X et al: "Design, synthesis and evaluation of anti-CD38 antibody drug conjugate based on Daratumumab and maytansinoid". *Bioorg Med Chem*, 16 dic 2018;27(3):479-482.

D3: Elkins K et al: "FcRL5 as a target of antibody-drug conjugates for the treatment of multiple myeloma". *Mol Cancer Ther*, 17 de julio de 2012;11(10): 2222-32.

D4: Vij R et al: "First-in-Human Phase I Study of ABBV-838, an Antibody-Drug Conjugate Targeting SLAMF7/CS1 in Patients with Relapsed and Refractory Multiple Myeloma". *Clin Cancer Res.*, 22 Ene 2020;26(10): 2308-2317.

D5: Anti-CD38 (Daratumumab)-MC-Vc-PAB-MMAE ADC, Cat. No: ADC-W-827, <https://www.creative-biolabs.com/adc/daratumumab-mc-vc-pab-mmae-adc1108.htm>
20 de junio de 2019

OPINIÓN ESCRITA DE LA ADMINISTRACIÓN INTERNACIONAL ENCARGADA DEL EXAMEN DE BÚSQUEDA

D6: EP3110440A2 (JANSSEN BIOTECH INC) 04 ENERO 2017 (04-01-2017)

D7: Li et al. Clinical pharmacology of vc-MMAE antibody-drug conjugates in cancer patients: learning from eight first-in-human Phase 1 studies, MAbs. 2019 Dic 18;12(1):1699768.

D8: Dawicki et al. Daratumumab-225Actinium conjugate demonstrates greatly potentiated antitumor activity against experimental multiple myeloma tumors, Oncoimmunology. 2019 mayo 1;8(8):1607673.

D1 divulga un conjugado anticuerpo-fármaco para el tratamiento del cáncer, en donde el anticuerpo puede ser específico para CD38 y el fármaco puede ser MMAE y el enlazador puede ser un enlazador escindible por proteasa que comprende un espaciador maleimidocaproilo, un dipéptido valina-citrulina y un espaciador p-aminobenziloxicarbonilo (ver las reivindicaciones 1, 5, 8, 20, 29, párrafo [0090]).

D2 divulga el conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) anti-CD38, Dara-DM4 para el tratamiento del mieloma múltiple, por la conjugación de Daratumumab (anticuerpo anti-CD38) y DM4 (fármaco) a través de un agente reticulante escindible SPDP. El DM4 es un derivado maytansinoide, un agente antitubulina que inhibe la división celular.

D3 divulga es un conjugado anticuerpo-fármaco para el tratamiento del mieloma múltiple que comprende un anticuerpo monoclonal FcRL5 antihumano y un potente agente antimitótico, la monometilauristatina E (MMAE), enlazados a través del enlazador maleimidocaproil-valina-citrulinea-aminobenziloxicarbonilo (MC-VC-PAB).

D4 divulga ABBV-838 un ADC que comprende una inmunoglobulina recombinante humanizada G1k dirigida contra un epítipo único del subconjunto CD21 (CS1, también conocido como SLAMF7; una glicoproteína de superficie celular expresada en células de mieloma múltiple) conjugada con la citotóxica monometilauristatina E (MMAE) a través de un enlazador valina-citrulina.

D5 divulga el producto de ADC que comprende el anticuerpo monoclonal anti-CD38 específicamente daratumumab, el enlazador de ADC maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenziloxicarbonilo y el fármaco de carga útil MMAE. MMAE se dirige a ciertos tipos de cáncer por reconocimiento inmunológico y se introduce en las células cancerosas mediante endocitosis mediada por receptores. Dentro de la célula, la MMAE se une a las tubulinas, interrumpe la dinámica de los microtúbulos y, subsecuentemente, induce la muerte celular.

OPINIÓN ESCRITA DE LA ADMINISTRACIÓN INTERNACIONAL ENCARGADA DEL EXAMEN DE BÚSQUEDA

D6 divulga el anticuerpo anti-CD38 daratumumab que comprende secuencias de aminoácidos VH y VL de las SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente, las CDR de cadena pesada HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, y las CDR de cadena ligera LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente. Las CDR divulgadas en las reivindicaciones 1 y 2 de la presente solicitud son 100 % idénticas a las CDR de daratumumab de D6.

D7 afirma que las relaciones promedio fármaco-anticuerpo (DAR) para la mayoría de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) vc-MMAE en desarrollo clínico son típicamente de alrededor de 3 a 4. También señala que la conjugación mediante residuos disulfuro reducidos de cisteína entre cadenas produce una mezcla heterogénea de especies de ADC basadas en vc-MMAE, caracterizadas por DAR de número par -específicamente 0, 2, 4, 6 u 8-.

D8 divulga que la capacidad del daratumumab de internalizarse en las células tumorales al unirse a CD38 probablemente contribuye a su retención prolongada dentro del tumor. Esta retención prolongada puede potenciar el potencial terapéutico de la carga útil unida (tal como '225Ac), no solamente facilitando el suministro dirigido sino también manteniendo concentraciones tumoricidas dentro del microambiente tumoral.

ARTÍCULO 33(2) DEL PCT - NOVEDAD

La presente solicitud no cumple los criterios del artículo 33(1) del PCT porque el objeto de las reivindicaciones 1-5, 11 y 16 no es nuevo en el sentido del artículo 33(2) del PCT.

D5 divulga un ADC que comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD38 (daratumumab), un enlazador ADC maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenzoiloxicarbonilo y un fármaco de carga útil MMAE. La cadena pesada y las CDR ligeras mencionadas en las reivindicaciones 1 y 2 corresponden a la cadena pesada y las CDR ligeras del daratumumab. Así, las reivindicaciones 1-5, 11 y 16 están dirigidas al ADC basado en daratumumab con el enlazador ADC maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenzoiloxicarbonilo y el fármaco de carga útil MMAE. Por lo tanto, las reivindicaciones 1-5, 11 y 16, que están dirigidas a un ADC de daratumumab vedotina basado en daratumumab que comprende el enlazador mc-vc-PABC y la carga útil de MMAE para usar en el tratamiento del cáncer, están anticipadas por la divulgación de D5.

Además, en relación con el argumento del solicitante de que las reivindicaciones 1-5, 11 y 16 son novedosas porque D5 no divulga explícitamente un rango DAR de 1 a 8 para daratumumab vedotina, se observa que las propias reivindicaciones no recitan este rango específico de DAR. Más bien, caracterizan ampliamente el ADC por sus componentes -daratumumab, el enlazador mc-vc-PABC y MMAE- sin limitar la DAR. Por consiguiente, el argumento relativo a DAR no establece la novedad sobre D5.

Además, está bien establecido en la literatura anterior a la fecha de prioridad de la solicitud que los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) vc-MMAE exhiben típicamente relaciones promedio fármaco-anticuerpo (DAR) en el rango de 3 a 4 durante el desarrollo clínico.

OPINIÓN ESCRITA DE LA ADMINISTRACIÓN INTERNACIONAL ENCARGADA DEL EXAMEN DE BÚSQUEDA

Como se señala en el documento D7, la conjugación a través de residuos de cisteína disulfuro reducidos entre cadenas resulta en una mezcla heterogénea de especies de ADC con DAR de número par -específicamente 0, 2, 4, 6 u 8-. Por lo tanto, aunque D5 no divulga explícitamente un valor DAR de 1 a 8, sería obvio para un experto en la técnica que tales valores de DAR están inherentemente abarcados por los ADC descritos en D5.

ARTÍCULO 33(3) DEL PCT - ACTIVIDAD INVENTIVA

La presente solicitud no cumple los criterios del artículo 33.1 del PCT, porque el objeto de las reivindicaciones 1-16 no implica una actividad inventiva en el sentido del artículo 33.3 del PCT.

Las reivindicaciones 1-5, 11 y 16 no nuevas sobre D5 no pueden ser reconocidas con una actividad inventiva. Además, con respecto a las reivindicaciones 6 y 7, mientras que D5 no divulga explícitamente una relación fármaco-anticuerpo (DAR) de 1 a 8, es bien sabido por la literatura anterior a la fecha de prioridad -y como lo demuestra D7- que los ADC basados en vc-MMAE típicamente exhiben DAR promedio alrededor de 3 a 4. La conjugación mediante residuos disulfuro de cisteína reducidos entre cadenas resulta intrínsecamente en una mezcla heterogénea de ADC que comprende DAR pares (0, 2, 4, 6 u 8), por lo que es obvio para un experto en la técnica que tales DAR están abarcados por la divulgación de D5.

D1 apoya además la falta de actividad inventiva de la invención al divulgar CD38 como un objetivo adecuado de ADC e identificar daratumumab como un anticuerpo monoclonal anti-CD38 candidato. D1 también enseña el uso de MMAE como carga útil citotóxica, conjugada mediante el mismo enlazador escindible (mc-vc-PABC) usado en la presente solicitud. Mientras que el D1 ejemplifica el brentuximab vedotina, su enseñanza más amplia incluye otros anticuerpos - tal como daratumumab - para usar en constructos ADC. En ausencia de desafíos técnicos demostrados o de propiedades inesperadas asociadas al uso de daratumumab, su sustitución habría sido una optimización rutinaria para el experto en la técnica. La afirmación del solicitante de que D1 no divulga una metodología explícita para sintetizar ADC de daratumumab-MMAE no es convincente, dado que la conjugación de anticuerpos con MMAE mediante enlazadores mc-vc-PABC era una técnica bien establecida antes de la fecha de prioridad. No se ha presentado ninguna prueba que demuestre que la aplicación de esta técnica al daratumumab produzca algún efecto técnico sorprendente o ventajoso.

El argumento de que D1 se limita a presentar listados infundados de anticuerpos y cargas útiles sin una motivación específica para combinar daratumumab y MMAE tampoco es convincente a la luz de D8. D8 confirma que los conjugados de daratumumab se internalizan efectivamente al unirse a CD38 y muestran una retención prolongada en el tumor, potenciando por lo mismo el suministro de la carga útil y el efecto terapéutico. Esta propiedad satisface el criterio de internalización esencial para la eficacia de los ADC y habría hecho del daratumumab una elección obvia para su sustitución en el formato ADC enseñado en D1. Asimismo, el propio daratumumab (D6), los ADC basados en daratumumab (D1-D5) y sus aplicaciones terapéuticas ya se conocían en la técnica anterior. El concepto más amplio de usar anticuerpos monoclonales para administrar agentes citotóxicos directamente a las células tumorales también está bien establecido. En ausencia de datos experimentales o pruebas técnicas que demuestren una eficacia superior o resultados inesperados, el ADC de daratumumab-MMAE reivindicado refleja una implementación predecible y obvia de la tecnología ADC existente que utiliza componentes conocidos. Por consiguiente, el objeto reivindicado no implica una actividad inventiva a la vista de D1-D8.

OPINIÓN ESCRITA DE LA ADMINISTRACIÓN INTERNACIONAL ENCARGADA DEL EXAMEN DE BÚSQUEDA

Además, las demás reivindicaciones dependientes o conexas no contienen ningún atributo que, en combinación con los atributos de las reivindicaciones a las que se refieren, cumpla los requisitos de actividad inventiva, ya que la materia pertinente o bien se divulga en las técnicas anteriores citadas o bien está dentro del conocimiento y la capacidad del experto en la técnica. Así pues, no puede reconocerse actividad inventiva a las reivindicaciones 1-16.

ARTÍCULO 33(4) DEL PCT - APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-16 tiene aplicabilidad industrial y por lo tanto cumple los requisitos del artículo 33.4 del PCT.

MODIFICACIONES POR ARTICULO 34

CONJUGADOS DE DARATUMUMAB-FÁRMACO Y PREPARACIÓN DE LOS MISMOS

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención proporciona conjugados de anticuerpo-enlazador-fármaco en donde el anticuerpo es daratumumab y el fármaco es análogo de auristatina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés), compuestos por un anticuerpo, un enlazador y un agente citotóxico (fármaco), son una de las plataformas farmacológicas más complejas del arsenal oncológico [1]. Son un sistema de suministro 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 enlazador 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]. En 2015, el daratumumab, un anticuerpo CD38, fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) para el tratamiento del mieloma múltiple [4, 5]. CD38 es una glicoproteína transmembrana de tipo II de 46 kDa con una corta cola citoplasmática N-terminal de 20-aa y un largo dominio extracelular de 256-aa [6]. Las funciones atribuidas a CD38 incluyen eventos de adhesión y señalización mediados por receptores, así como importantes actividades ectoenzimáticas bifuncionales que contribuyen a la movilización del calcio intracelular [7]. El daratumumab se une a CD38, que está sobreexpresado en la superficie de las células del mieloma múltiple, y en consecuencia induce la muerte de las células tumorales mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés), citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés) y otros mecanismos directamente asociados con el cambio funcional del antígeno de superficie después de la unión. La presente invención proporciona conjugados de

anticuerpo-fármaco derivados de daratumumab para permitir el suministro específico de fármacos (auristatina y/o sus análogos) a células cancerosas sobreexpresadas con CD38.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención proporciona conjugados de anticuerpo-enlazador-fármaco en donde el anticuerpo es daratumumab y el fármaco es análogo de auristatina. La invención también proporciona un proceso de preparación de conjugados de anticuerpo-enlazador de la presente invención. La presente invención también está dirigida a conjugados de anticuerpo-enlazador-fármaco en el tratamiento del cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa.

10 Abreviaturas:

Ab: Anticuerpo

ADC: Conjugado de anticuerpo-fármaco

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

IRS: Estándar de referencia interno

15 MMAE: Monometilauristatina E

MMAF: Monometilauristatina F

PAB: *para*-aminobencilo

PABC: carbamato de *para*-aminobencilo

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

20 TCEP: Tris(2-carboxietil)fosfina

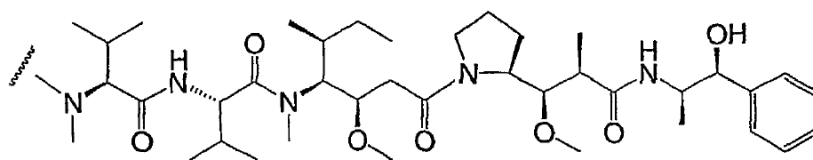
Modalidades de la invención:

Modalidad 1:

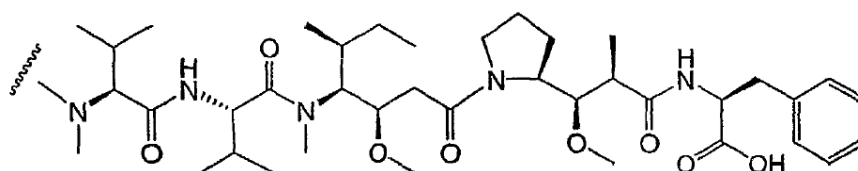
En una modalidad, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-enlazador-fármaco de Fórmula I: $Ab-(Aa-Ww-Yy-D)_p$, en donde el anticuerpo (Ab) es daratumumab; -Aa-Ww-Yy- es una unidad enlazadora escindible enzimáticamente que

25

enlaza la unidad del 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 espaciadora; w es un número entero en el rango de 2 a 12, y es 1 o 2; p está en en rango de 1 a aproximadamente 20; y el fármaco (D) se selecciona de MMAE y MMAF, como se define en las siguientes estructuras;

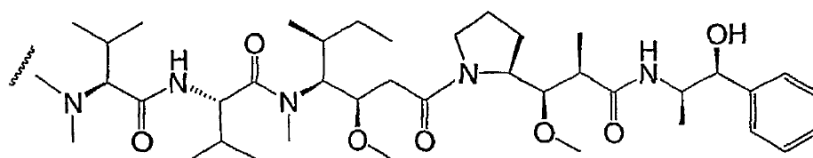


MMAE

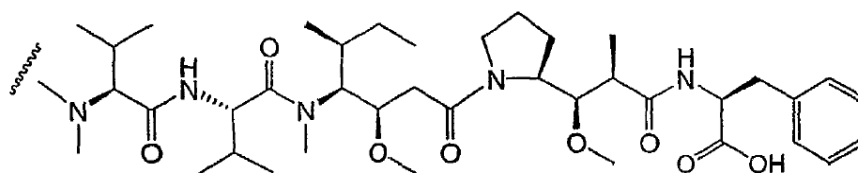


MMAF

En otra modalidad, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-enlazador-fármaco de fórmula $Ab-(Aa-Ww-Yy-D)_p$, en donde anticuerpo (Ab) es daratumumab; -Aa-Ww-Yy- es una unidad enlazadora escindible enzimáticamente que enlaza la unidad del fármaco y el anticuerpo, en donde: -A- es una unidad extensora; a es 1; cada -W- es independientemente una unidad de aminoácidos seleccionada de -fenilalanina-lisina- o -valina-citrulina-; -Y- es una unidad espaciadora seleccionada de -glicina-glicina- o alcohol *p*-aminobencílico (PAB) o carbamato de *p*-aminobencilo (PABC); w es un número entero en un rango de 2 a 12, y es 1 o 2; p está en el rango de 1 a aproximadamente 20; y el fármaco (D) se selecciona de MMAE y MMAF como se define en las siguientes estructuras:

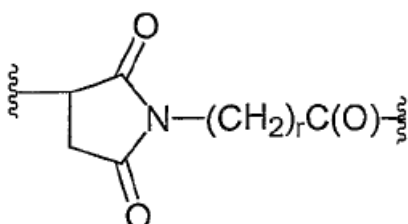


MMAE



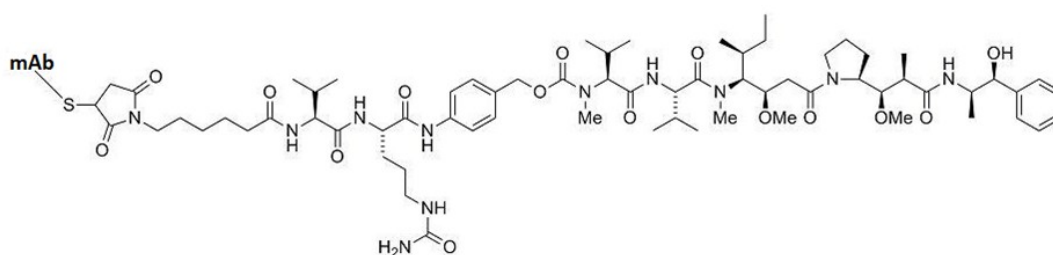
MMAF

En donde A se define por la siguiente estructura;



- 5 r es un número entero en un rango 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 modalidad preferiblemente, la presente invención proporciona una estructura de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) representada por:



10

- en donde el mAb (por sus siglas en inglés) es un anticuerpo monoclonal que comprende secuencias de región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) de región variable de cadena ligera CDR1 (RASQSVSSYLA, SEQ ID NO: 1), CDR2 (DASNRAT, SEQ ID NO: 2) y CDR3 (QQRSNWPPTF, SEQ ID NO: 3), y secuencias
- 15 CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (SFAMS, SEQ ID NO: 4), CDR2 (AISGSGGGTTYADSVKG, SEQ ID NO: 5) y CDR3 (DKILWFGEPVFDY, SEQ ID NO: 6). En esta modalidad, el anticuerpo es daratumumab.

Otras modalidades:

En una segunda modalidad, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo-fármaco, preferiblemente el conjugado de daratumumab-fármaco de acuerdo con la modalidad 1 y un portador aceptable. Por portador aceptable se entiende cualquier excipiente farmacéutico adecuado conocido en la técnica y que sea compatible con el principio farmacéutico activo (API, por sus siglas en inglés), es decir, el conjugado de anticuerpo-fármaco, en la presente invención.

En una tercera modalidad, la presente invención proporciona un proceso para preparar el conjugado de anticuerpo-fármaco, preferiblemente el conjugado de daratumumab-fármaco de acuerdo con la modalidad 1, en donde el proceso comprende a) purificación del anticuerpo daratumumab, b) reducción parcial del daratumumab c) conjugación del daratumumab parcialmente reducido con el enlazador vc-MMAE-fármaco (por sus siglas en inglés).

En otra modalidad, el conjugado de daratumumab-fármaco de acuerdo con la presente invención puede usarse en el tratamiento del cáncer.

En otra modalidad adicional, el conjugado de daratumumab-fármaco de acuerdo con la presente invención puede usarse en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa.

En otra modalidad, el conjugado de daratumumab-fármaco de acuerdo con la presente invención puede usarse solo como monoterapia en el tratamiento del cáncer.

En otra modalidad adicional, el conjugado de daratumumab-fármaco de acuerdo con la presente invención puede usarse solo como monoterapia en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa.

En otra modalidad, el conjugado de daratumumab de acuerdo con la presente invención puede usarse en combinación con otros fármacos en el tratamiento del cáncer, una enfermedad autoinmune 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.

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

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

En otra modalidad, la presente invención proporciona una vía de administración del conjugado de daratumumab-fármaco en un sujeto mediante vía intravenosa (i.v), intramuscular (i.m), subcutánea (s.c), intraperitoneal (i.p) o cualquier otra vía de administración adecuada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: La Figura 1 muestra la relación fármaco-anticuerpo (DAR, por sus siglas en inglés) de los conjugados de daratumumab-MMAE analizados por HP-HIC (por sus siglas en inglés).

Figura 2: La Figura 2 muestra el perfil polipeptídico del conjugado de daratumumab-MMAE de la presente invención por análisis SDS-PAGE.

Figura 3: La Figura 3 muestra el ensayo de citotoxicidad *in vitro* del conjugado de daratumumab-MMAE usando células Daudi.

Figura 4: La Figura 4 demuestra la eficacia de daratumumab-ADC en el modelo de enfermedad de xenoinjerto de linfoma de Burkitt en ratones SCID (por sus siglas en inglés).

Definiciones:

El término “enlazador” es cualquier resto químico capaz de enlazar un compuesto, usualmente un fármaco, tal como la auristatina, a un agente de unión celular tal como el daratumumab de manera covalente. El enlazador incluye una unidad extensora (-A-), una unidad de aminoácidos (-W-) y una unidad espaciadora (-Y-) de acuerdo con la fórmula;



Los enlazadores 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 escisión inducida por esterasa y a la escisión por unión disulfuro, en condiciones en las que el compuesto o el anticuerpo permanecen activos. Los enlazadores 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 esterases. Los enlazadores también incluyen enlazadores cargados, y formas hidrofílicas de

los mismos como se describe en la presente y se conoce 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”, “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 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 gallináceas, patos, gansos y primates no humanos, incluidos, tal como, pero no se limitan a, monos, chimpancés y otras especies de simios y monos. El término no denota una edad particular. Así, interesan los individuos adultos, juveniles y recién nacidos.

En el contexto del cáncer, el término “tratar” incluye cualquiera o todos los siguientes: prevenir el crecimiento de células tumorales o células cancerosas, prevenir la replicación de células tumorales o células cancerosas, disminuir la carga tumoral global y mejorar uno o más síntomas asociados a la enfermedad.

En el contexto de una enfermedad autoinmune, el término “tratar” incluye alguno o todos los siguientes: prevenir la replicación de células asociadas con un estado de enfermedad autoinmune, que incluye, pero no se limita a, células capaces de producir un anticuerpo autoinmune, disminuir la carga de anticuerpos autoinmunes y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune.

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-enlazador-fármaco” “conjugado” e “inmunconjugado” se usan indistintamente en la presente invención. El conjugado de anticuerpo-fármaco preferido de la presente invención es el conjugado de daratumumab-MMAE. Los términos “conjugado de daratumumab-MMAE” y “daratumumab vedotina” se usan indistintamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-enlazador-fármaco de Ab-(Aa-Ww-Yy-D)_p, en donde el anticuerpo (Ab) es daratumumab; -Aa-Ww-Yy- es una unidad enlazadora escindible enzimáticamente que enlaza la unidad del 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 espaciadora; w es un número entero en el rango de 2 a 12, y es 1 o 2; p está en el rango 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 un anticuerpo objetivo CD-38, preferiblemente daratumumab 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 es daratumumab

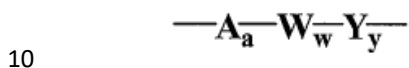
variante. Las variantes de daratumumab de la presente invención incluyen una sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos en una secuencia polipeptídica del anticuerpo daratumumab

En una modalidad, el anticuerpo de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención es daratumumab variante. Las variantes de daratumumab de la presente invención incluyen una sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos en una secuencia polipeptídica del anticuerpo daratumumab. En la otra modalidad, el anticuerpo dirigido a CD-38 de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo que comprende secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (RASQSVSSYLA, SEQ ID NO: 1), CDR2 (DASNRAT, SEQ ID NO: 2) y CDR3 (QQRSNWPPTF, SEQ ID NO: 3), y secuencias CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (SFAMS, SEQ ID NO: 4), CDR2 (AISGSGGGTTYADSVKG, SEQ ID NO: 5) y CDR3 (DKILWFGPEVFDY, SEQ ID NO: 6). Dicha secuencia se ha divulgado en Denominaciones Comunes Internacionales para Sustancias Farmacéuticas (DCI, Vol. 24, No. 1, 2010[8] para el producto daratumumab. El anticuerpo de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención es daratumumab y comprende la secuencia de cadena ligera (EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK, SEQ ID NO: 7) y la cadena pesada (EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFN SFAMSWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGGTTY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYFCAKDK ILWFGPEVFD YWGQGTLVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTKQKSLSLSP GK, SEQ ID NO: 8). El daratumumab es un anticuerpo monoclonal humano de inmunoglobulina G1 kappa (IgG1k) contra el antígeno CD38, producido en una línea celular de mamífero (ovario de hámster chino [CHO, por sus siglas en inglés]) usando tecnología de ADN recombinante. El peso molecular del daratumumab es de aproximadamente 148 kDa. En una modalidad, el anticuerpo de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención es daratumumab o sus variantes que

pueden mejorar la afinidad de unión del ADC al antígeno CD38. En una modalidad más, el anticuerpo de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención es daratumumab o sus variantes que pueden mejorar la afinidad de unión del ADC al antígeno CD38 a un pH adecuado. El pH preferido puede ser un pH de 6,0 o un pH de 7,0. En otra
5 modalidad, el anticuerpo de la presente invención es daratumumab o sus variantes que pueden usarse para aumentar la vida media del ADC.

Unidad enlazadora:

La unidad enlazadora del conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco enlaza la unidad del fármaco y la unidad del anticuerpo y tiene la fórmula:



En donde:

-A- es una unidad extensora;

a es 0 o 1;

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

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

-Y- es una unidad espaciadora; y

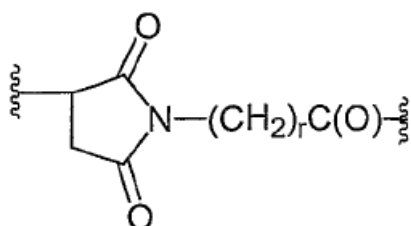
Y es 0, 1 o 2.

Unidad extensora:

La unidad extensora (-A-), cuando está presente, enlaza una unidad del anticuerpo
20 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 limitan a, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. Los
25 grupos funcionales de anticuerpos preferidos son sulfhidrilo y amino.

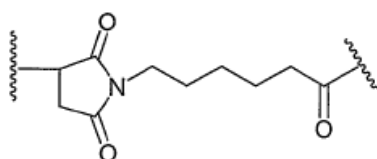
La unidad extensora (-A-) de la presente invención se define por la siguiente

estructura;



r es un número entero en un rango 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
5 unión con un anticuerpo (Ab).

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;

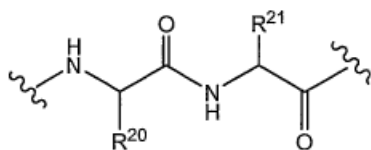


10

Unidad de aminoácidos (-W-):

La unidad de aminoácidos (-W-), cuando está presente, enlaza la unidad extensora con la unidad espaciadora si la unidad espaciadora está presente, enlaza la unidad extensora con la unidad del fármaco si la unidad espaciadora está ausente, y enlaza la
15 unidad del anticuerpo con la unidad del fármaco si la unidad extensora y la unidad espaciadora están ausentes.

-Ww- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. La unidad de aminoácidos del ADC de la invención puede ser escindida enzimáticamente por
20 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 $(CH_2)_3NHCONH_2$.

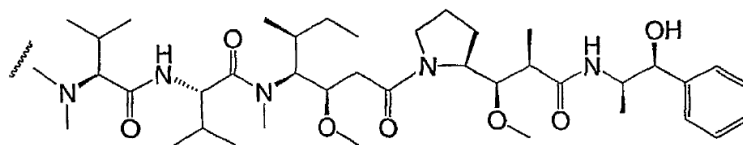
Unidad espaciadora:

La unidad espaciadora (-Y-), cuando está presente, enlaza una unidad de aminoácidos con la unidad del fármaco cuando hay una unidad de aminoácidos presente. Alternativamente, la unidad espaciadora enlaza la unidad extensora con la unidad del fármaco cuando la unidad de aminoácidos está ausente. La unidad espaciadora también enlaza la unidad del fármaco con la unidad del anticuerpo cuando faltan tanto la unidad de aminoácidos como la unidad extensora. Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmolables y no autoinmolables. En una modalidad, la unidad espaciadora (-Y-) de la presente invención puede ser autoinmolable o no autoinmolable. Una unidad espaciadora no autoinmolable es aquella en la que parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida a la unidad del fármaco después de la escisión, particularmente por vía enzimática, de una unidad de aminoácidos del conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo. Los ejemplos de una unidad espaciadora no autoinmolable incluyen, pero no se limitan a, una unidad espaciadora (glicina-glicina) y una unidad espaciadora de glicina. Cuando un compuesto de la invención que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora 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-Aa-Ww-. En una modalidad, -Yy- es una unidad de alcohol *p*-aminobencílico (PAB). En una modalidad, la invención proporciona un compuesto fármaco-enlazador o conjugado de fármaco anticuerpo-enlazador en el que la unidad espaciadora 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 carbonato, carbamato o éter.

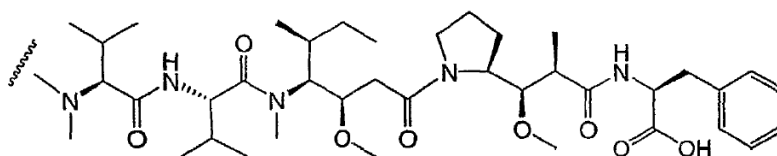
Unidad del fármaco:

La presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco, en donde el

anticuerpo es daratumumab y el fármaco es un análogo de auristatina seleccionado de MMAE y MMAF como se define en las siguientes fórmulas:



MMAE



5

MMAF

Conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención

La presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco en donde el anticuerpo es daratumumab o su variante que tiene como objetivo el antígeno CD-38 y el fármaco o carga útil es un análogo de la auristatina preferiblemente MMAE. El conjugado de anticuerpo-fármaco preferido de la presente invención es el conjugado de daratumumab-MMAE también denominado daratumumab vedotina. El conjugado de daratumumab-MMAE de la presente invención comprende daratumumab o sus variantes como anticuerpo, mc-vc-PABC (por sus siglas en inglés) como enlazador y MMAE como 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 descubierto que los conjugados de daratumumab-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 aprobada de conjugado de fármaco (Darzalex®) en cáncer que expresa CD-38. El nuevo conjugado de fármaco de la presente invención es mejor que el conjugado de fármaco aprobado, Darzalex®.

Se espera que la actividad biológica del daratumumab-MMAE de la presente invención se extrapole al uso clínico en humanos. El nuevo conjugado de fármaco de la presente invención también es mejor que el conjugado de fármaco aprobado en el sentido de que es eficaz a concentraciones de fármaco significativamente más bajas, lo que hace

25

que el fármaco sea más barato para los pacientes y posiblemente menos tóxico, al tiempo que es igual o más eficaz que el conjugado de fármaco aprobado, es decir, Darzalex®.

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

5 El anticuerpo de la presente invención, preferiblemente daratumumab 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,
10 preferiblemente daratumumab, de la presente invención se redujo con agentes reductores tales como tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en amortiguador de fosfato a pH en el rango de 5-8,5 a temperatura de aproximadamente 37 °C por 120 minutos. Alternativamente, el daratumumab de la presente invención puede reducirse por ditioneitol (DTT, por sus siglas en inglés). El daratumumab reducido se hizo reaccionar con un exceso molar de
15 aproximadamente 5 a 10 del conjugado de fármaco-enlazador de la presente invención. El conjugado de fármaco-enlazador de la presente invención es la vedotina, que está disponible comercialmente en el mercado. La vedotina de la presente invención comprende un enlazador 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
20 ultrafiltración-diafiltración. La relación fármaco-anticuerpo (DAR) se determinó mediante el método de columna HPLC-HIC. Las relaciones fármaco anticuerpo (DAR) obtenidas para el daratumumab vedotina de la presente invención, que típicamente están en el rango de 1 a 8, preferiblemente de 3 a 5 más preferiblemente de 3,5 a 4,5. Para el almacenamiento a largo plazo, las alícuotas del conjugado de fármaco purificado se han almacenado en condiciones
25 de congelación, a -25 ± 5 °C.

Uso del conjugado de la presente invención

En otro aspecto, el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención puede usarse en el tratamiento de un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado terapéutico, preferiblemente el conjugado de
30 daratumumab-fármaco, como se describe en la presente. La dosis efectiva del conjugado puede estar en el rango de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg. Las enfermedades que pueden tratarse con el conjugado de daratumumab-fármaco incluyen, pero no se limitan a, cánceres, enfermedades autoinmunes y/o infecciosas, mieloma múltiple, artritis reumatoide,

poliarteritis nodosa, vasculitis crioglobulinémica esencial, angiitis leucocitoclástica cutánea, enfermedad de Kawasaki, arteritis de Takayasu, artritis de células gigantes, púrpura de Henoch-Schonlein, angiitis cerebral primaria o aislada, eritema nodoso, trombangiitis obliterante, púrpura trombótica trombocitopénica (incluido el síndrome urémico hemolítico), y

5 vasculitis secundarias, incluida la vasculitis leucocitoclástica cutánea (por ejemplo, secundaria a hepatitis B, hepatitis C, síndrome de Sjogren o lupus eritematoso sistémico), eritema nodoso, vasculitis alérgica, paniculitis, enfermedad de Weber-Christian, púrpura hiperglobulinémica y enfermedad de Berger, trastornos cutáneos, tales como dermatitis de contacto, dermatosis IgA lineal, vitíligo, pioderma gangrenoso, epidermólisis bullosa

10 adquirida, pénfigo vulgar (incluido el penfigoide cicatricial y el penfigoide bulloso), alopecia areata (incluida la alopecia universal y la alopecia total), dermatitis herpetiforme, eritema multiforme y urticaria crónica autoinmune (incluido el edema angioneurótico y la vasculitis urticarial), citopenias inmunomediadas, tales como la neutropenia autoinmune y la aplasia pura de eritrocitos; trastornos del tejido conjuntivo, tales como lupus del SNC, lupus

15 eritematoso discoide, síndrome de CREST, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, polimiositis/dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, crioglobulinemia tipo I y tipo II, fibromialgia, síndrome de anticuerpos fosfolípidos, hemofilia secundaria, policondritis recidivante, sarcoidosis, síndrome del hombre rígido y fiebre reumática, fascitis eosinofílica, espondilitis anquilosante, artritis crónica juvenil, enfermedad de Still del adulto y síndrome

20 SAPHO, sacroileítis, artritis reactiva, enfermedad de Still, gota; trastornos hematológicos, tales como anemia aplásica, anemia hemolítica primaria (incluido el síndrome de aglutinina fría) o lupus eritematoso sistémico; síndrome POEMS, anemia perniciosa y púrpura hiperglobulinémica de Waldenström; otros ejemplos son la agranulocitosis, la neutropenia autoinmune, la enfermedad de Franklin, la enfermedad de Seligmann, la enfermedad de

25 cadenas pesadas gamma y la formación de inhibidores del factor VIII; endocrinopatías, tales como la polendocrinopatía y la enfermedad de Addison; otros ejemplos son la hipoglucemia autoinmune, el hipotiroidismo autoinmune, el síndrome de insulina autoinmune, la tiroiditis de Quervain y la resistencia a la insulina mediada por anticuerpos del receptor de insulina; trastornos hepato-gastrointestinales, tales como la enfermedad celíaca, la enfermedad de

30 Whipple, la cirrosis biliar primaria, la hepatitis crónica activa y la colangitis esclerosante primaria; otro ejemplo es la gastritis autoinmune; nefropatías, tales como la glomerulonefritis progresiva rápida, la nefritis postestreptocócica, el síndrome de Goodpasture, la glomerulonefritis membranosa y la nefritis crioglobulinémica, la enfermedad de cambios mínimos; trastornos neurológicos, tales como neuropatías autoinmunes, mononeuritis

35 múltiple, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, corea de Sydenham, tabes dorsal y

síndrome de Guillain-Barré, mielopatía/paresia espástica tropical, miastenia grave, polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; esclerosis múltiple; trastornos cardíacos y pulmonares, tales como COPD, alveolitis fibrosante, bronquiolitis obliterante, aspergilosis alérgica, fibrosis quística, síndrome de Löffler, miocarditis y pericarditis; otros ejemplos son neumonitis por hipersensibilidad, y trastornos alérgicos, tales como asma bronquial y síndrome de hiperIgE, amaurosis fugax; trastornos oftalmológicos, tales como coriorretinitis idiopática, enfermedades infecciosas, tales como infección por parvovirus B (incluido el síndrome de manos y calcetines); trastornos gineco-obstétricos, tales como aborto recurrente, pérdida fetal recurrente y retraso del crecimiento intrauterino, síndrome paraneoplásico secundario a neoplasias ginecológicas; trastornos reproductivos masculinos, tales como síndrome paraneoplásico secundario a neoplasias testiculares; (por sus siglas en inglés, respectivamente).

Tales terapias pueden administrarse una o varias veces, dependiendo del estado de la enfermedad y de la tolerabilidad del conjugado, y pueden usarse solas como monoterapia o en combinación con otras modalidades terapéuticas, tales como cirugía, radiación externa, radioinmunoterapia, inmunoterapia, quimioterapia, terapia antisentido, terapia de ARN de interferencia, terapia génica y otras similares. Cada combinación se adaptará al tipo de tumor, etapa, condición del paciente y terapia previa, y otros factores considerados por el médico responsable.

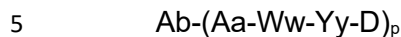
Formulación y administración

Las vías de administración adecuadas de los conjugados de fármaco de daratumumab de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la administración oral, parenteral, rectal, transmucosa, intestinal, intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intravítrea, intraperitoneal, intranasal o intraocular. Las vía de administración preferida es la parenteral. Alternativamente, se puede administrar el compuesto de forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección del compuesto directamente en un tumor sólido.

El conjugado de anticuerpo-fármaco, preferiblemente el conjugado de daratumumab-fármaco de la presente invención puede formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en las cuales el conjugado de anticuerpo-fármaco se combina en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente adecuado. La solución salina estéril amortiguada con fosfato es un ejemplo de excipiente

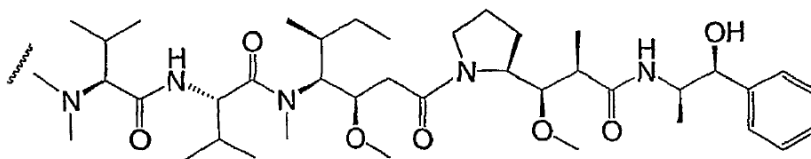
farmacéuticamente adecuado. Otros excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una modalidad, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco (ADC) de Fórmula (I):

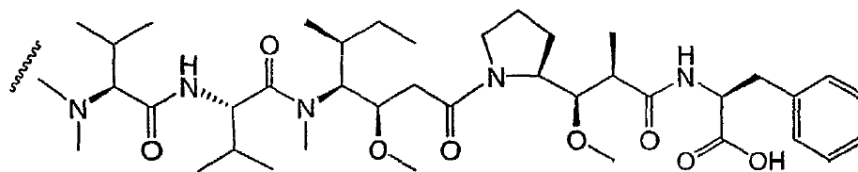


En donde el anticuerpo (Ab) es un anticuerpo objetivo CD-38;

-Aa-Ww-Yy- es una unidad enlazadora escindible enzimáticamente que enlaza la unidad del fármaco (D) 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 espaciadora; w es
10 un número entero en el rango de 2 a 12, y es 1 o 2; p en el rango de 1 a aproximadamente 20; y el fármaco (D) es un análogo adecuado de la auristatina seleccionado de MMAE y MMAF como se define en las siguientes estructuras;



MMAE



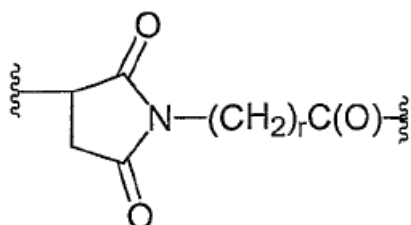
15

MMAF

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

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

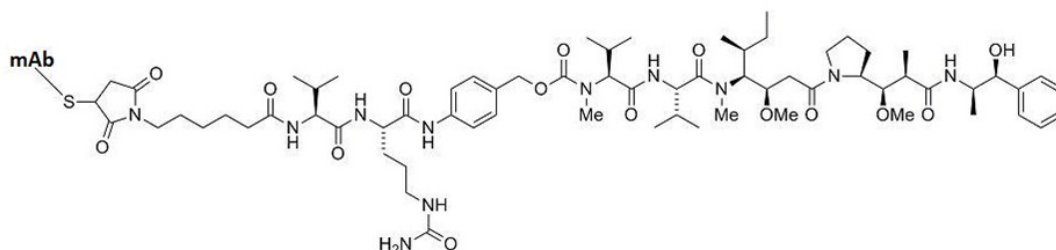
En otra modalidad, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-enlazador-fármaco en donde: -A- es una unidad extensora definida por la siguiente estructura;



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

En otra modalidad, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-enlazador-fármaco (ADC) en donde el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (RASQSVSSYLA, SEQ ID NO: 1), CDR2 (DASNRAT, SEQ ID NO: 2) y CDR3 (QQRSNWPPTF, SEQ ID NO: 3), y secuencias CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (SFAMS, SEQ ID NO: 4), CDR2 (AISGSGGGTTYADSVKG, SEQ ID NO: 5) y CDR3 (DKILWFGPEPVFDY, SEQ ID NO: 6); la unidad enlazadora escindible enzimáticamente es mc-vc-PABC y el fármaco es fármaco (D) es un análogo adecuado de la auristatina MMAE.

En otra modalidad, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-enlazador-fármaco (ADC) en donde la estructura del ADC está representada por;



En otra modalidad, la presente invención proporciona mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (RASQSVSSYLA, SEQ ID NO: 1), CDR2

(DASNRAT, SEQ ID NO: 2) y CDR3 (QQRSNWPPTF, SEQ ID NO: 3), y secuencias CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (SFAMS, SEQ ID NO: 4), CDR2 (AISGSGGGTYADSVKG, SEQ ID NO: 5) y CDR3 (DKILWFGEPVFDY, SEQ ID NO: 6).

En una modalidad, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), en donde el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende dominios
5 constantes y un dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano.

En una modalidad, la presente invención proporciona un 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
10 aminoácidos en la porción Fc (por sus siglas en inglés) están mutados.

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

En otra modalidad, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), en donde dicho mAb está unido a entre 1 y 8 restos de fármaco, preferiblemente de 3 a 5, más preferiblemente de 3,5 a 4,5.
15

En una modalidad, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención y un portador aceptable.

En una modalidad, la presente invención proporciona un proceso para preparar el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención en donde el proceso comprende
20 a) purificación del anticuerpo, daratumumab b) reducción parcial de daratumumab c) conjugación de daratumumab reducido con enlazador de fármaco vc-MMAE.

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

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

En otra modalidad, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-
30

fármaco (ADC), en donde el ADC se usa para tratar una infección con un organismo patógeno.

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

5 En otra modalidad, la presente invención proporciona un 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 radiomarcados, anticuerpos conjugados con fármacos, anticuerpos conjugados con toxinas, terapia génica, quimioterapia, péptidos terapéuticos,
10 oligonucleótidos, radioterapia localizada, cirugía y terapia de ARN de interferencia.

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

En una modalidad, la presente invención proporciona que el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) es daratumumab vedotina.

15 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1: Preparación del conjugado de daratumumab-enlazador-fármaco

El daratumumab se expresó en células CHO y se purificó por cromatografía en columna convencional que comprendía cromatografía en columna de afinidad con r-proteína A, de intercambio fuerte de cationes y de modo mixto. La pureza del daratumumab fue de
20 99,5 %, de acuerdo con la valoración de HP-SEC. La conjugación del fármaco con daratumumab (a > 1 mg/mL) se realizó sobre el grupo tiol (-SH) en condiciones reductoras por exceso molar (con respecto a la proteína) del fármaco MMAE acoplado valina-citrulina a una temperatura entre 2 °C y 30 °C a un pH entre 5,0 y 8,5. El complejo enlazador-fármaco se disolvió en acetonitrilo al 5-20 % antes de mezclarlo con la solución proteica. El complejo
25 enlazador-fármaco también puede disolverse en otro disolvente orgánico como acetato de dimetilo o sulfóxido de dimetilo. La reacción de conjugación se llevó a cabo por aproximadamente 60 minutos. Tras la conjugación, el conjugado de anticuerpo-fármaco (conjugado de daratumumab-MMAE) se intercambió con amortiguador, se filtró a través de un filtro de 0,2 y se almacenó a - 20 °C o menos. En el análisis HP-SEC, se observó la
30 pureza mencionada en la Tabla 1.

Tabla 1: Pureza del conjugado de daratumumab-fármaco por análisis HP-SEC

Muestra	Análisis de HP-SEC		
	HMW (alto peso molecular)	Pico principal	LMW (bajo peso molecular)
Conjugado de daratumumab-MMAE	3,89 %	95,00 %	1,11 %

Se observó que el conjugado de anticuerpo-fármaco presentaba una pureza aproximada de 95 % en el análisis HP-SEC.

El conjugado de daratumumab-MMAE también puede prepararse por el método
5 descrito en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2: Método de preparación del conjugado de daratumumab-MMAE

El anticuerpo monoclonal daratumumab 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
10 purificación, se determinó una pureza del anticuerpo mayor a 99 % usando cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC).

Conjugación del fármaco vc-MMAE con daratumumab

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

Descongelación del Intermedio Crítico (CI, es decir, daratumumab)

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

Reducción parcial del CI por TCEP

El daratumumab se sometió a una reducción parcial (enlaces cruzados S-S entre cadenas) en presencia de una cantidad molar excesiva de tris(carboxietil)fosfina [TCEP] por aproximadamente 300 min. La temperatura de incubación se mantuvo a 37 °C o menos, en condiciones de agitación (200 rpm), durante la reacción. Al final de la reacción, la mezcla de proteínas se pasó por un filtro de 0,2 y se recolectó en un frasco limpio de vidrio despirogenado (2 L) para realizar el siguiente paso de la reacción.

Conjugación del enlazador del fármaco con el CI

El daratumumab tratado con TCEP se incubó con una cantidad molar en exceso del enlazador del fármaco, vc-MMAE (valina-citrulina-monometilauristatina E). La incubación se llevó a cabo en condiciones de frío por no más de 120 min, con agitación suave (200 rpm). La conjugación tiene lugar con la formación de una unión covalente de tioéter entre los grupos -SH libres (entre cadenas) de la proteína daratumumab parcialmente reducida y el grupo maleimida del enlazador del fármaco, vc-MMAE. 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 enlazador de fármaco que no habían reaccionado.

Eliminación del exceso de enlazador de fármacos e intercambio de amortiguadores por UF/DF

Tras la filtración, la mezcla de reacción bruta que contenía daratumumab vedotina se sometió a UF/DF para eliminar el enlazador del fármaco vc-MMAE que no había reaccionado, seguido de un intercambio amortiguador final. Para UF/DF, se usaron filtros de 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 ± 0,1; conductividad de 4,5 ± 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. Una vez alcanzados los objetivos de pH y conductividad, el daratumumab vedotina se recuperó a aproximadamente 7 mg/mL, y se pasó a través de un filtro de 0,2 µm.

Preparación de formulados a granel

La solución concentrada de proteínas se recolectó en un frasco de vidrio limpio y

despirogenado. A ella se añadió trehalosa a partir de una solución madre al 30 % recién preparada (filtrada a 0,2 µm) para alcanzar una concentración final de 7 % (p/v). Además, se añadió polisorbato 80 a una concentración final de 0,02 % y se ajustó el volumen final del granel con la adición del amortiguador del principio activo para alcanzar una concentración de proteína de 5 mg/mL para daratumumab vedotina. El granel formulado de daratumumab vedotina se pasó a través de un filtro de 0,2 µm, bajo cabina de bioseguridad, y se recolectó en un frasco de polietileno tereftalato de glicol (PETG, por sus siglas en inglés) de un único uso, estéril y no pirogénico, con cierre de rosca de polietileno de alta densidad (HDPE, por sus siglas en inglés) blanco. El granel formulado filtrado se etiquetó como principio activo daratumumab vedotina.

Ejemplo 3: Relación fármaco anticuerpo (DAR) del conjugado de daratumumab-MMAE

Las muestras de daratumumab-fármaco vedotina del Ejemplo 3 se analizaron por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) -HPLC analítica para valorar la distribución del enlazador de fármaco (DI, por sus siglas en inglés) en el daratumumab. 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 determinar la relación fármaco-anticuerpo (DAR) media en daratumumab vedotina. Los experimentos se realizaron usando una columna de butilo (4,6 × 100 mm; 5 µm) acoplada a un sistema HPLC. Las muestras que contenían el principio activo daratumumab vedotina se inyectaron en la columna HIC saturada con la fase móvil A (50 mM de fosfato con pH 7,0 y 1,2 M de amortiguador de sulfato de amonio que contenía 5 % de alcohol isopropílico), a 25 °C. El daratumumab vedotina portador de un número variable de cargas útiles se eluyó de la columna con la fase móvil B (50 mM de fosfato con pH 7,0 que contenía 20 % de alcohol isopropílico), en modo de concentración salina decreciente, a 1,0 mL/min, y la elución se registró con detección UV, a 214 nm. La Figura 1 ilustra la apariencia de las variantes de anticuerpos ligados a fármacos obtenidas con tres lotes independientes de daratumumab vedotina.

Las tres muestras de daratumumab-fármaco vedotina mostraron cinco picos prominentes, que corresponden a DAR0, DAR2, DAR4, DAR6 y DAR8, como se muestra en la Figura 1. 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. El daratumumab vedotina obtenido de todos los lotes derivados mostraba una DAR

promedio de 4 ± 1 , preferiblemente una DAR de aproximadamente 1 a 8, más preferiblemente de aproximadamente 3,5 a 4,5 en el análisis HP-HIC, como se indica en la Tabla 2 a continuación, y la Figura 1.

Tabla 2: % de Relación fármaco anticuerpo (DAR) del conjugado de daratumumab-MMAE

Muestras	% de DAR0	% de DAR2	% de DAR4	% de DAR6	% de DAR8	DAR promedio
Conjugado de daratumumab-MMAE	3,36	20,64	43,18	25,16	7,66	4,26

Ejemplo 4: Perfil polipeptídico del conjugado de daratumumab-enlazador-fármaco usando electroforesis SDS PAGE

Preparación del conjugado de daratumumab-enlazador-fármaco

El conjugado de daratumumab-enlazador-fármaco se preparó de acuerdo con el proceso descrito en el Ejemplo 1.

Electroforesis SDS PAGE

Instrumento: Sistema de electroforesis BIO-RAD.

Composición del amortiguador de electroforesis: 0,0247 M de Tris, 0,192 M de glicina, 0,1 % de SDS, pH a $8,3 \pm 0,1$.

Preparación de la muestra

Cada muestra junto con el patrón de referencia interno se diluyó con agua Milli-Q y amortiguador de muestras 5X de tal manera que, al cargar la muestra, cada pozo del gel se cargara con 10 µg de proteína.

Perfil polipeptídico del conjugado de enlazador-fármaco de daratumumab (ADC de daratumumab)

En la Figura 2 se muestra el perfil polipeptídico del ADC de daratumumab. Describe

los resultados de los análisis SDS-PAGE de varias muestras obtenidas durante la reacción de conjugación del ADC daratumumab, incluyendo el daratumumab purificado en los carriles No. 4 y 5. Los análisis SDS-PAGE de las muestras se realizaron en condiciones no reductoras. El estándar de referencia interno, es decir, brentuximab vedotina (ADC), también se analizó en las mismas condiciones, como control positivo. Tras los análisis SDS-PAGE, se ha observado que el daratumumab está intacto en el amortiguador de borato después del intercambio de amortiguadores, ya que se observa una única banda en los carriles No. 4 y 5. El carril No. 6 del SDS-PAGE sin reducción muestra múltiples bandas de especies heterogéneas de mAb tras la reducción parcial con TCEP 2,7 molar. La muestra conjugada en los carriles No. 8, 9 y 10 significa que la conjugación ha tenido éxito, ya que cada banda con carga útil se desplaza hacia la parte superior, es decir, hacia un peso molecular más alto en comparación con la muestra tratada con TCEP en la línea 6.

Ejemplo 5: Estudio de citotoxicidad *in vitro* del conjugado de daratumumab-enlazador-fármaco

Se sembraron células Daudi (ATCC CCL-213, linfoblasto B) en una placa de 96 pozos de fondo negro transparente (Costar 3603). Se eligió esta línea celular porque se sabe que expresa el receptor CD38. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del conjugado de daratumumab-MMAE y Darzalex, incubadas en incubadora de CO₂ por 2 horas. Después de la incubación, se eliminó el exceso de daratumumab-MMAE no unido, se añadió medio fresco y se incubó por 4 días en CO₂ al 5 % a 37 °C. Al final de la incubación, se añadió a las células el tinte azul alamar (Invitrogen, DAL-1100) y se incubaron por 5 horas en incubadora de CO₂. Después de la incubación, se cuantificaron las células viables midiendo 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 placas fluorescentes SpectraMax M2E. La Figura 3 muestra que la actividad relativa *in vitro* del conjugado de daratumumab-MMAE probado es mejor que la de Darzalex. El anticuerpo daratumumab por sí solo no muestra actividad sin funciones efectoras. Sin embargo, el conjugado de daratumumab-MMAE muestra una buena actividad *in vitro* sin necesidad de una destrucción mediada por células efectoras. Por consiguiente, los datos muestran que el conjugado de daratumumab-MMAE de la presente invención es activo y no inferior a Darzalex.

Ejemplo 6: Eficacia del daratumumab-ADC en el modelo de xenoinjerto de linfoma de Burkitt en ratones SCID

En el presente estudio, se ha evaluado el potencial terapéutico del nuevo daratumumab-ADC en comparación con el anticuerpo daratumumab únicamente. Específicamente para inducir el xenoinjerto de linfoma de Burkitt, se inyectaron células Daudi (1 millón de células/animal/200 µL de volumen, en relación 1:1 de suspensión celular y matrigel) en la región del flanco derecho de los animales a ratones SCID inmunodeficientes. Se observó el desarrollo tumoral de los animales y se administró el fármaco cuando el volumen tumoral promedio de los animales alcanzó aproximadamente 20-25 mm³. En este estudio, el daratumumab-ADC y el daratumumab se compararon frente a frente a un nivel de dosis de 5 mg/kg (vía intravenosa, administración única).

La Figura 4 que se muestra demuestra la eficacia del daratumumab-ADC en comparación con el daratumumab en la línea celular Daudi de linfoma de Burkitt. Aquí, el daratumumab a una dosis de 5 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 la carga tumoral. Al mismo tiempo, el daratumumab-ADC a una dosis similar fueron capaces de hacer retroceder la carga tumoral, lo que indica que el daratumumab-ADC tiene un buen potencial para hacer retroceder el tumor de linfoma de Burkitt portador de sobreexpresión CD38 y ha demostrado una clara superioridad sobre la terapia anti-CD38 disponible con el anticuerpo monoclonal daratumumab.

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.

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. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, Nahi H, Gimsing P, Hansson M, Minnema MC, Lassen U, Krejcik J, Palumbo A, van de Donk NWCJ, Ahmadi T, Khan I, Uhlar CM, Wang J, Sasser AK, Losic N, Lisby S, Basse L, Brun N and Richardson PG, *N Engl J Med.* 2015; 373: 1207-1219. 10.1056/NEJMoa1506348. [PubMed: 26308596]

5. de Weers M, Tai Y- T, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DCH, Oomen LA, Peipp M, Valerius T, Slootstra JW, Mutis T, Bleeker WK, Anderson KC, Lokhorst

HM, van de Winkel JGJ and Parren PWHI, *J Immunol.* 2011; 186: 1840-1848. 10.4049/jimmunol.1003032. [PubMed: 21187443]

6. Malavasi, F., A. Funaro, S. Roggero, A. Horenstein, L. Calosso, and K. Mehta. 1994. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol. Today* 15: 95-97.

5 7. Mehta, K., and F. Malavasi, eds. 2000. Human CD38 and Related Molecules. Karger, Basel, Suiza.

8. Información Farmacéutica de la OMS, Vol. 24, No. 1, 2010 DCI recomendada: Lista 63 41 Denominaciones Comunes Internacionales de Sustancias Farmacéuticas (DCI).

Incorporación por referencia

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

Equivalentes

15 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 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 rango de equivalencia de las reivindicaciones están contemplados en las mismas.

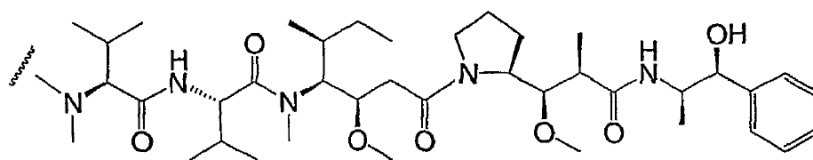
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco (ADC) de fórmula (I):

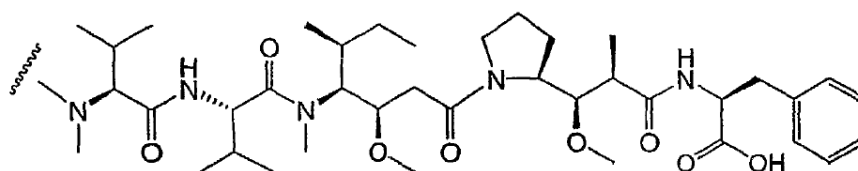


En donde el anticuerpo (Ab) es un anticuerpo objetivo CD-38;

- 5 -Aa-Ww-Yy- es una unidad enlazadora escindible enzimáticamente que enlaza la unidad del fármaco (D) 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 espaciadora; w es un número entero en el rango de 2 a 12, y es 1 o 2; p en el rango de 1 a aproximadamente 20; y el fármaco (D) es un análogo adecuado de la auristatina seleccionado de MMAE y
- 10 MMAF como se define en las siguientes estructuras;



MMAE



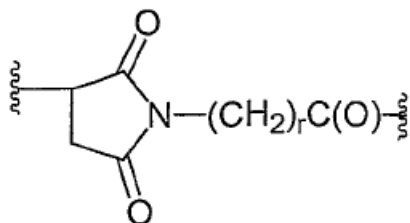
MMAF

- 15 En donde la línea ondulada representa el punto de conexión con el enlazador.

2. El conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, 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 espaciadora seleccionada de -glicina-glicina- o alcohol *p*-aminobencílico (PAB) o
- 20 carbamato de *p*-aminobencilo (PABC).

3. El conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco de acuerdo con la

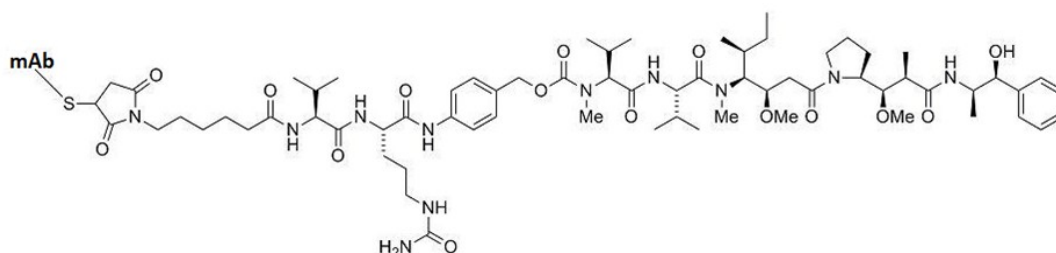
reivindicación 2, en donde: -A- es una unidad extensora definida por la siguiente estructura;



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

4. El conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco (ADC) de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (RASQSVSSYLA), CDR2 (DASNRAT) y CDR3 (QQRSNWPPTF) y secuencias CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (SFAMS), CDR2 (AISGSGGGTTYADSVKG) y CDR3 (DKILWFGPEVFDY); la unidad enlazadora escindible enzimáticamente es mc-vc-PABC y el fármaco es fármaco (D) es un análogo adecuado de la auristatina MMAE.

5. El conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco (ADC) de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la estructura del ADC representada por;



15

En donde mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de región variable de cadena ligera CDR1 (RASQSVSSYLA), CDR2 (DASNRAT) y CDR3 (QQRSNWPPTF) y secuencias CDR de región variable de cadena pesada CDR1 (SFAMS), CDR2 (AISGSGGGTTYADSVKG) y CDR3 (DKILWFGPEVFDY).

20

6. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el mAb es un anticuerpo monoclonal que comprende dominios constantes y un

dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano.

7. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con la reivindicación 6, 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
5 porción Fc están mutados.

8. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde mAb es el anticuerpo monoclonal daratumumab o variantes del mismo.

9. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho mAb está unido a entre 1 y 8 restos de fármacos,
10 preferiblemente de 3 a 5, más preferiblemente de 3,5 a 4,5.

10. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador aceptable.

11. Un proceso para preparar el conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo
15 con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el proceso comprende a) purificación del anticuerpo, daratumumab b) reducción parcial del daratumumab c) conjugación del daratumumab reducido con el enlazador fármaco vc-MMAE.

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

13. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ADC se usa para tratar el cáncer.

14. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con cualquiera de las
25 reivindicaciones anteriores, en donde el ADC se usa para tratar una infección por un organismo patógeno.

15. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ADC se usa para tratar una enfermedad autoinmune.

16. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, 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 radiomarcados, anticuerpos conjugados con fármacos, anticuerpos conjugados con toxinas, terapia génica, quimioterapia, péptidos terapéuticos, oligonucleótidos, radioterapia localizada, cirugía y terapia de ARN de interferencia.

17. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la dosis del ADC es de aproximadamente 0,1 mg/kg a 10 mg/kg.

18. El conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde es daratumumab vedotina.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona conjugados de anticuerpo-enlazador-fármaco, en donde el anticuerpo es daratumumab y el fármaco es análogo de auristatina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La invención también proporciona un proceso de
5 preparación de conjugados de anticuerpo-enlazador de la presente invención.