

CONJUGADO DE ANTICUERPO ANTI-PDL1-FÁRMACO Y USO

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente China N.º CN 202310513959.4 presentada el 9 de mayo de 2023 y la Solicitud de Patente China N.º CN 202311311898.X presentada el 10 de octubre de 2023.

Campo técnico

La presente solicitud pertenece al campo farmacéutico y se refiere a un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) y al uso de este. En particular, la presente solicitud se refiere a un conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco novedoso, y a un método de uso de este y al uso de este en el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la expresión de PDL1.

Antecedentes de la técnica

En las últimas décadas, los anticuerpos contra PD-1 y PDL1, representativos de inhibidores de puntos de control inmunitario, han fomentado el desarrollo rápido de la inmunoterapia tumoral y se han convertido en otro medio terapéutico eficaz para tumores después de cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia dirigida. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de los tumores y a la complejidad de los mecanismos reguladores de la expresión de PDL1, así como a la permeabilidad relativamente mala de los anticuerpos monoclonales anti-PDL1 macromoleculares para tumores densos, el uso clínico de los anticuerpos monoclonales anti-PDL1 está muy limitado, y la tasa de respuesta objetiva global en los pacientes es de aproximadamente un 15 %-30 %. Existe una importante necesidad clínica no satisfecha.

Con el fin de mejorar la capacidad de respuesta y la eficacia terapéutica en pacientes con tumores, se ha iniciado una investigación para combinar anticuerpos monoclonales anti-PD-1 con quimioterapia, terapia dirigida y radioterapia, especialmente con quimioterapia. Dado que la quimioterapia puede provocar muerte celular inmunogénica, se pueden liberar más antígenos tumorales, lo que fomenta eficazmente la activación de la respuesta inmunitaria. Además, también se puede reducir el número y la actividad de las células

inmunosupresoras. Por lo tanto, la quimioterapia es la principal solución alternativa para las combinaciones de inmunización. Sin embargo, los efectos secundarios sistémicos provocados por la quimioterapia siguen suponiendo un problema muy importante. PDL1 se expresa en diversos tipos de tumores y muestra una expresión limitada en tejidos normales. Por lo tanto, la conjugación de fármacos químicos citotóxicos de bajo peso molecular altamente activos con anticuerpos monoclonales anti-PDL1 puede dar como resultado fármacos ADC dirigidos a PDL1 bifuncionales, y esta será una dirección muy prometedora en cuanto al desarrollo de fármacos.

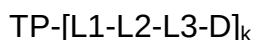
Actualmente, existen fármacos ADC dirigidos a PDL1 en fases exploratorias de ensayos preclínicos y de fase I. SGN-PDL1V es un producto técnico de plataforma de ADC dirigido a PDL1 clásico desarrollado por Seagen, que utiliza MMAE como fármaco cargado (carga), y actualmente se encuentra en fase clínica I. MMAE (monometilauristatina E), uno de los fármacos cargados utilizados de forma más generalizada en ADC, destruye las células cancerosas principalmente inhibiendo la polimerización de la tubulina, lo que resulta eficaz en la inhibición mitótica; sin embargo, el producto de ADC tiene una ventana de calidad relativamente estrecha. Por lo tanto, se necesita urgentemente en la técnica disponer de fármacos que sean más activos biológicamente y menos tóxicos, especialmente fármacos que sean eficaces para mutantes resistentes, por ejemplo, conjugados de anticuerpo-fármaco, con el fin de mejorar adicionalmente la eficacia y reducir los efectos secundarios.

Compendio de la invención

La presente solicitud se refiere a un conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmula (I) tal como se define en el presente documento y a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco. La presente solicitud se caracteriza por un método para tratar o prevenir un tumor o cáncer relacionado con la expresión de PDL1, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmula (I), el profármaco, sal farmacéuticamente aceptable o solvato de este, o el solvato de la sal farmacéuticamente aceptable, tal como se define en el

presente documento. El método de la presente solicitud se puede utilizar para tratar o prevenir un tumor o cáncer relacionado con la expresión de PDL1.

Un primer aspecto de la presente solicitud se refiere a un conjugado de anticuerpo-fármaco, un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable o solvato de este, o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable, en donde el conjugado de anticuerpo-fármaco tiene una estructura de fórmula (I):



(I)

en donde

TP es un resto de direccionamiento que se une o reconoce selectivamente a PDL1;

L1 es una unidad de extensión que conecta TP y L2;

L2 es un residuo aminoacídico opcional o un péptido corto que consiste en 2-10 residuos aminoacídicos;

L3 es un elemento espaciador;

D es una molécula biológicamente activa; y

k representa cualquier valor numérico comprendido entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 10.0.

Otro aspecto de la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmula (I), el profármaco, la sal farmacéuticamente aceptable o solvato de este, o el solvato de la sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional de la presente solicitud se refiere a un método para tratar un tumor o cáncer relacionado con la expresión de PDL1. El método comprende administrar a un sujeto que lo necesite el conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmula (I), el profármaco, la sal farmacéuticamente aceptable o el solvato de este, o el solvato de la sal farmacéuticamente aceptable, o una composición farmacéutica que lo comprende. El tumor o cáncer relacionado con la expresión de PDL1 se selecciona entre melanoma, cáncer de

pulmón (p. ej., cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo (CMTN), cáncer de ovario, cáncer urotelial, carcinoma hepatocelular (CHC), cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer pancreático y glioma.

Un aspecto adicional de la presente solicitud se refiere al uso del conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmula (I), el profármaco, sal farmacéuticamente aceptable o solvato de este, o el solvato de la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la presente divulgación, o la composición farmacéutica que lo comprende en la preparación de un medicamento.

En particular, la presente solicitud proporciona además un conjugado de anticuerpo-fármaco y una composición con una potencia y/o actividad antitumoral mejorada y una toxicidad menor en comparación con los ADC anti-PDL1 conocidos en la técnica anterior.

Los detalles de la presente solicitud se exponen en la descripción adjunta a continuación. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente solicitud, a continuación se describen métodos y materiales ilustrativos. Otras características, objetos y ventajas de la presente solicitud resultarán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones. En la descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular también incluyen formas en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que les atribuyen habitualmente los expertos en el campo al que pertenece la presente solicitud. Todas las patentes y publicaciones citadas en la descripción se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

El contenido de todas las referencias (incluidas las referencias bibliográficas, patentes concedidas, solicitudes de patente publicadas y solicitudes de patente pendientes) que se

citan a lo largo de la presente solicitud se incorpora expresamente al presente documento por referencia en su totalidad. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los significados que interpretan habitualmente los expertos en la técnica.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico que muestra la afinidad de un conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco por células positivas para PDL1 NCI-H292 y NCI-H441. (A) Afinidad del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco MAB20-LP62 (DAR8) por células NCI-H292. (B) Afinidad del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco MAB20-LP62 (DAR8) por células NCI-H441. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62 (cuya estructura se muestra en los Ejemplos); DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo; IgG1 representa un control de IgG1 humana de isotipo κ .

La FIG. 2 es un gráfico que muestra la internalización del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en células positivas para PDL1 NCI-H292 a lo largo del tiempo. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la actividad de destrucción celular del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco MAB20-LP62 (DAR8). (A) Actividad de destrucción celular de MAB20-LP62 (DAR8) en una línea celular NCI-H292. (B) Actividad de destrucción celular de MAB20-LP62 (DAR8) en una línea celular BXP3. (C) Actividad de destrucción celular de MAB20-LP62 (DAR8) en una línea celular NCI-H441. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-

LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 4 es un gráfico que muestra la actividad de unión cruzada del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco respecto a PDL1 que deriva de diferentes especies. (A) Unión de MAB20-LP62 (DAR8) a ECD de PDL1 humano. (B) Unión de MAB20-LP62 (DAR8) a ECD de PDL1 de macaco cangrejero. (C) Unión de MAB20-LP62 (DAR8) a ECD de PDL1 de ratón. (D) Unión de MAB20-LP62 (DAR8) a ECD de PDL1 de rata. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo; IgG1 representa un control de IgG1 humana de isotipo κ .

La FIG. 5 es un gráfico que muestra el efecto de vecinidad del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco MAB20-LP62 (DAR8). (A) Destrucción *in vitro* de células MDA-MB-468 por parte de las moléculas de prueba. (B) Destrucción por vecindad de células MDA-MB-468 por parte de un sobrenadante de un medio que tiene células HEK293 que sobreexpresan PD-L1 incubadas con las moléculas de prueba. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; IgG1-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de IgG1 con LP62, que tiene un valor DAR de 8; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra la destrucción de macrófagos humanos *in vitro* por parte del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco MAB20-LP62 (DAR8). Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; IgG1-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de IgG1 con LP62; IgG1-VC-MMAE

representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado a partir de una IgG1 de control de isotipo preparada de manera similar al Ejemplo 3.2 con MC-VC-PABC-MMAE; SGN-PDL1V representa una molécula de ADC de referencia tal como se describe en el documento WO 2021067776 A1, que es un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de un resto de anticuerpo SGN-PDL1V (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en el Listado de secuencias) con un enlazador-toxina MC-VC-PABC-MMAE; y DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra la destrucción *in vitro* de células dendríticas humanas por parte del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco MAB20-LP62 (DAR8). Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; IgG1-VC-MMAE representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado a partir de una IgG1 de control de isotipo preparada de manera similar al Ejemplo 3.2 con MC-VC-PABC-MMAE; SGN-PDL1V representa una molécula de ADC de referencia tal como se describe en el documento WO 2021067776 A1, que es un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de un resto de anticuerpo SGN-PDL1V (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en el Listado de secuencias) con un enlazador-toxina MC-VC-PABC-MMAE; y DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 8 es un gráfico que muestra la actividad antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en un modelo de ratón NCG inoculado por vía subcutánea con la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; MAB20-VC-MMAE representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con un enlazador-toxina MC-VC-PABC-MMAE; MAB20-GGFG-Dxd representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado

por la conjugación de MAB20 con un enlazador-toxina MC-GGFG-Dxd; A 1.3 representa el compuesto de tipo toxina A 1.3 del Ejemplo 1, que es un fármaco cargado libre; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 9 es un gráfico que muestra la actividad antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en un modelo de ratón NCG inoculado por vía subcutánea con la línea celular de cáncer pancreático humano BxPC3. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; MAB20-VC-MMAE representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con un enlazador-toxina MC-VC-PABC-MMAE; MAB20-GGFG-DXD representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con un enlazador-toxina MC-GGFG-DXD; A 1.3 representa el compuesto de tipo toxina A 1.3 del Ejemplo 1, que es un fármaco cargado libre; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 10 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones atímicos BALB/c con xenoinjerto PDX de cáncer de pulmón no microcítico humano LU6437. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; SGN-PDL1V representa una molécula de ADC de referencia tal como se describe en el documento WO 2021067776 A1, que es un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de un resto de anticuerpo SGN-PDL1V (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en el Listado de secuencias) con un enlazador-toxina MC-VC-PABC-MMAE; y DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 11 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones NU/NU con xenoinjerto PDX de cáncer de hígado positivo para PD-L1 humano LD1-0011-200617. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-

PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 12 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones atímicos NCG con xenoinjerto PDX de carcinoma escamoso de cabeza y cuello positivo para PD-L1 humano LD1-2023-411020. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; A 1.3 representa el compuesto de tipo toxina A 1.3 del Ejemplo 1, que es un fármaco cargado libre; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 13 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones atímicos Balb/c con xenoinjerto PDX de cáncer de cuello uterino positivo para PD-L1 humano LD1-0010-200614. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; A 1.3 representa el compuesto de tipo toxina A 1.3 del Ejemplo 1, que es un fármaco cargado libre; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 14 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones atímicos Balb/c con xenoinjerto PDX de carcinoma escamoso de esófago positivo para PD-L1 humano LD1-0015-362448. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 15 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones NU/NU con xenoinjerto PDX de cáncer gástrico positivo para PD-L1 humano LD1-0017-200636. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; A 1.3 representa el compuesto de tipo toxina A 1.3 del Ejemplo 1, que es un fármaco cargado libre; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

La FIG. 16 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones NU/NU con xenoinjerto PDX de cáncer colorrectal positivo para PD-L1 humano LD1-2013-362125. Nota: MAB20 representa un anticuerpo anti-PDL1, cuya secuencia de aminoácidos se expone en el Listado de secuencias; MAB20-LP62 representa un conjugado de anticuerpo-fármaco formado por la conjugación de MAB20 con LP62; A 1.3 representa el compuesto de tipo toxina A 1.3 del Ejemplo 1, que es un fármaco cargado libre; DAR representa la relación de fármaco cargado:anticuerpo.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona un conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco novedoso. El conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco presenta buena afinidad por células positivas para PDL1, puede internalizarse eficazmente en las células positivas para PDL1 y también presenta buenos efectos de destrucción celular incluso en células tumorales insensibles a anti-PDL1. Además, el conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco tiene un buen efecto de vecinidad y una toxicidad más baja (especialmente inmunotoxicidad). Además, el conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco presenta una excelente actividad inhibidora de tumores en varios modelos tumorales, incluso modelos tumorales con una expresión baja de PDL1.

A efectos de claridad y no como limitación, la descripción detallada de la presente divulgación se divide en las siguientes subsecciones:

1. Definiciones;

2. Conjugado de anticuerpo-fármaco;
3. Método de uso;
4. Formulación farmacéutica; y
5. Artículo de elaboración y kit.

1. Definiciones

En la presente divulgación, los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen los significados que interpretan habitualmente los expertos en la técnica, a menos que se especifique otra cosa. Además, los términos y pasos de operaciones de laboratorio relacionados con la química de proteínas y ácidos nucleicos, la biología molecular, el cultivo celular y tisular, la microbiología y la inmunología que se utilizan en el presente documento son todos términos y pasos convencionales que se utilizan de forma generalizada en la técnica correspondiente. Además, para una mejor comprensión de la presente divulgación, a continuación se proporcionan definiciones y explicaciones de términos relacionados.

Los términos "PD-L1", "PDL1", "CD274", "B7-H1" y "ligando 1 de muerte celular programada" se utilizan indistintamente en el presente documento y, a menos que se especifique otra cosa, incluyen cualesquiera variantes, isoformas y homólogos de PD-L1 humano que se expresan en general por parte de células o en células transfectadas con el gen PD-L1.

El término "anticuerpo" se utiliza en su sentido más amplio y abarca varias estructuras de anticuerpos, que incluyen, sin carácter limitante, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos de longitud completa, y fragmentos de unión al antígeno de estos, siempre que exhiban la actividad de unión al antígeno deseada. La expresión "resto de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión al antígeno de este.

El anticuerpo de longitud completa comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las regiones variables de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras son

responsables de la unión al antígeno. Se puede hacer referencia a los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera como " V_H " y " V_L ", respectivamente. Las regiones variables en las dos cadenas contienen generalmente tres bucles altamente variables denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (CDR de la cadena ligera (LC) que incluyen LC-CDR1, LC-CDR2 y LC-CDR3, y CDR de la cadena pesada (HC) que incluyen HC-CDR1, HC-CDR2 y HC-CDR3). Los límites de CDR de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno divulgados en el presente documento pueden definirse o identificarse mediante las siguientes convenciones: Kabat, Chothia o Al-Lazikani (Al-Lazikani 1997; Chothia 1985; Chothia 1987; Chothia 1989; Kabat 1987 y Kabat 1991). Las tres CDR de la cadena pesada o la cadena ligera están interpuestas entre segmentos flanqueantes denominados regiones marco (FR), que están más altamente conservadas que las CDR y forman un armazón que soporta los bucles hipervariables. Las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera no participan en la unión al antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras. Los anticuerpos se asignan a clases basándose en la secuencia de aminoácidos de la región constante de su cadena pesada. Las cinco clases o isotipos principales de anticuerpos son IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que se caracterizan por la presencia de cadenas pesadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Varias de las principales clases de anticuerpos se dividen en subclases tales como IgG1 (cadena pesada $\gamma 1$), IgG2 (cadena pesada $\gamma 2$), IgG3 (cadena pesada $\gamma 3$), IgG4 (cadena pesada $\gamma 4$), IgA1 (cadena pesada $\alpha 1$) o IgA2 (cadena pesada $\alpha 2$).

La expresión "fragmento de unión al antígeno" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un fragmento de anticuerpo, que incluye, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, Fab, Fab', F(ab')₂, un fragmento Fv, un fragmento Fv estabilizado por disulfuro (dsFv), (dsFv)₂, dsFv biespecífico (dsFv-dsFv'), un anticuerpo biespecífico estabilizado por disulfuro (anticuerpo biespecífico ds), Fv de cadena única (ScFv), un dímero de ScFv (diacuerpo bivalente), un anticuerpo multiespecífico que consiste en un resto de anticuerpo que comprende una o más CDR, un anticuerpo de un solo dominio camelizado, un

nanocuerpo, un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de dominio bivalente o cualquier otro fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno pero que no contiene una estructura completa de anticuerpo. Un fragmento de unión al antígeno puede unirse al mismo antígeno al que se une el anticuerpo original o el fragmento de anticuerpo original (p. ej., ScFv original). En algunas realizaciones, un fragmento de unión al antígeno puede comprender una o más CDR de un anticuerpo humano particular, en donde la una o más CDR se injertan en regiones marco de uno o más anticuerpos humanos diferentes.

Tal como se utiliza en el presente documento, se pretende que la expresión "CDR" o "región determinante de la complementariedad" se refiera a los sitios de unión al antígeno no contiguos que se encuentran dentro de la región variable de un polipéptido de la cadena pesada y/o cadena ligera. Estas regiones específicas se han descrito en: Kabat *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 252:6609-6616 (1977); Kabat *et al.*, Departamento de Sanidad y Servicios Sociales de los EE. UU., "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Al-Lazikani B. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 273: 927-948 (1997); MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996); Abhinandan y Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008); Lefranc M.P. *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 55-77 (2003); y Honegger y Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 309:657-670 (2001), en donde la definición incluye superposiciones o subconjuntos de residuos aminoacídicos tras una alineación mutua. No obstante, se pretende que la aplicación de una cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o anticuerpos injertados o variantes de estos se encuentre dentro del alcance del término tal como se define y utiliza en el presente documento. Los restos aminoacídicos que abarcan las CDR, según se definen mediante cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen a continuación en la Tabla 1 a modo de comparación. En la técnica se conocen algoritmos e interfaces de predicción de CDR, que incluyen, por ejemplo, Abhinandan y Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008); Ehrenmann F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 38: D301-D307 (2010); y Adolf-Bryfogle J. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 43: D432-D438 (2015). El contenido de las referencias citadas en este párrafo se incorpora al presente

documento por referencia en su totalidad para su uso en la presente solicitud y para la posible inclusión en una o más reivindicaciones del presente documento.

Tabla 1: Definiciones de CDR

	Kabat¹	Chothia²	MacCallum³	IMGT⁴	AHo⁵
CDR1 de V _H	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
CDR2 de V _H	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
CDR3 de V _H	95-102	96-101	93-101	105- 117	109- 137
CDR1 de V _L	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
CDR2 de V _L	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
CDR3 de V _L	89-97	91-96	89-96	105- 117	109- 137

¹La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Kabat *et al.*, mencionada anteriormente.

²La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Chothia *et al.*, mencionada anteriormente.

³La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de MacCallum *et al.*, mencionada anteriormente.

⁴La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Lefranc *et al.*, mencionada anteriormente.

⁵La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Honegger y Plückthun, mencionada anteriormente.

La expresión "numeración de los residuos del dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de los aminoácidos como en Kabat", y variaciones de estas, se refieren a un sistema de numeración utilizado para los dominios variables de la cadena

pesada o los dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos según Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales acortados o insertados correspondientes a una FR o región hipervariable (HVR) de un dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede comprender una inserción de un solo aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (p. ej., residuos 82a, 82b y 82c según Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de los residuos de Kabat en un anticuerpo dado puede determinarse alineando la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada por Kabat "estándar" en todas las regiones de homología.

A menos que se especifique otra cosa en el presente documento, los residuos aminoacídicos que abarcan las CDR de un anticuerpo de longitud completa se definen según la nomenclatura de Kabat de Kabat *et al.*, que se ha mencionado anteriormente, y la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina, p. ej., una región Fc, se refiere a la numeración según el índice EU tal como se describe en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente, excepto que los residuos aminoacídicos de las CDR que abarcan cualquier secuencia consenso se definen según la nomenclatura de Kabat, en donde las modificaciones se basan en condiciones experimentales. El "índice EU tal como se describe en Kabat" se refiere a la numeración de residuos de un anticuerpo EU de IgG1 humana.

Los residuos de "marco" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de CDR tal como se definen en el presente documento.

Una forma "humanizada" de un anticuerpo no humano (p. ej., de roedor) es un anticuerpo quimérico que contiene una secuencia mínima derivada de un anticuerpo no humano. En la mayoría de los casos, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que se reemplazan residuos de la región hipervariable (HVR) de un receptor por residuos de una región hipervariable (anticuerpo donante) con la especificidad, afinidad y capacidad por el antígeno deseadas en una especie no humana (p.

ej., un ratón, una rata, un conejo o un primate no humano). En algunos ejemplos, se reemplazan residuos de la región marco (FR) de una inmunoglobulina humana por residuos no humanos correspondientes. Además, un anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para mejorar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá al menos uno de los dos dominios variables, y de forma habitual sustancialmente ambos, en donde todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son las de la secuencia de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente al menos una porción de una inmunoglobulina humana. Para consultar más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525, (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido en un ser humano y/o que se ha preparado utilizando cualquier técnica tal como se divulga en el presente documento para producir anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen colecciones de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También son útiles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los métodos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando un antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos

como respuesta a una exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se han inhabilitado, p. ej., xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.^{os} 6 075 181 y 6 150 584 para la tecnología de XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:3557-3562 (2006) para anticuerpos humanos generados mediante la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

El "porcentaje (%)" de identidad de la secuencia de aminoácidos" u "homología" con respecto a las secuencias de polipéptidos y anticuerpos que se identifican en el presente documento se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos en el polipéptido que se está comparando, después de la alineación de las secuencias (considerando cualesquiera sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia). La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede conseguirse utilizando diversos métodos dentro de las técnicas de la materia, por ejemplo, utilizando un software informático de dominio público tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR) o software MUSCLE. Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, que incluyen cualesquiera algoritmos necesarios para conseguir una alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Sin embargo, a los efectos del presente documento, los valores del % de identidad de la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de alineación de secuencias MUSCLE (Edgar, R.C., *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797, 2004; y Edgar, R.C., *BMC Bioinformatics* 5(1):113, 2004).

El término "homólogo" se refiere a la similitud de la secuencia o identidad de la secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en las dos secuencias que se están comparando está ocupada por la misma base o subunidad monomérica de aminoácido, p. ej., si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en esa

posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones que se están comparando multiplicado por 100. Por ejemplo, si 6 de 10 posiciones en dos secuencias son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son 60 % homólogas. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN ATTGCC y TATGGC comparten un 50 % de homología. En general, la comparación se realiza cuando dos secuencias se alinean para obtener la homología máxima.

La expresión "dominio constante" se refiere a una porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada respecto a la otra porción de la inmunoglobulina, es decir, un dominio variable, que contiene un sitio de unión al antígeno. Un dominio constante contiene los dominios C_H1 , C_H2 y C_H3 (a los que se hace referencia de forma colectiva como C_H) de una cadena pesada y un dominio CHL (o C_L) de una cadena ligera.

Una "cadena ligera" de un anticuerpo (inmunoglobulina) de cualquier especie de mamífero puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa ("κ") y lambda ("λ"), respectivamente, basándose en la secuencia de aminoácidos del dominio constante de esta.

El "dominio $CH1$ " (al que también se hace referencia como " $C1$ " del dominio " $H1$ ") va habitualmente de aproximadamente el aminoácido 118 a aproximadamente el aminoácido 215 (sistema de numeración EU).

Una "región bisagra" se define generalmente como una región en IgG que corresponde a desde Glu216 hasta Pro230 de IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.*, 22:161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con una secuencia de IgG1 colocando el primer y el último residuo de cisteína de modo que formen enlaces S-S entre las cadenas pesadas en las mismas posiciones.

El "dominio $CH2$ " de una región Fc de IgG humana (al que también se hace referencia como dominio " $C2$ ") va normalmente de aproximadamente el aminoácido 231 a

aproximadamente el aminoácido 340. El dominio CH2 es singular ya que no está estrechamente apareado con otro dominio. En su lugar, dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas a N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el apareamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec Immunol.*, 22:161-206 (1985).

El "dominio CH3" (al que también se hace referencia como dominio "C2") comprende una región de residuos en la región Fc próxima al extremo C del dominio CH2 (es decir, desde aproximadamente el residuo aminoacídico 341 hasta el extremo C de la secuencia del anticuerpo [normalmente en el residuo 446 o 447 en IgG]).

La expresión "región Fc" o "región cristalizable del fragmento" en el presente documento se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de secuencias nativas y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente de modo que se extienda desde un residuo aminoacídico en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de esta. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o modificando por ingeniería genética de manera recombinante el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede incluir poblaciones de anticuerpos de las que se han eliminado todos los residuos K447, poblaciones de anticuerpos de las que no se han eliminado residuos K447 y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Las regiones Fc de secuencias nativas adecuadas para su uso en los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4 humanas.

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Un FcR preferido es un FcR humano nativo. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (receptor γ) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, incluidas las variantes alélicas y, como alternativa, formas de corte y empalme de estos receptores, los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA ("receptor activante") y Fc γ RIIB ("receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activante Fc γ RIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). El FcR se revisa en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab.Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). El término "FcR" en el presente documento abarca otros FcR, incluidos los que se identifiquen en el futuro.

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "se une específicamente", "que reconoce específicamente" y "es específico para" se refieren a interacciones medibles y reproducibles, tales como la unión entre una diana y un anticuerpo o resto de anticuerpo, que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluidas las moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo o resto de anticuerpo que reconoce específicamente una diana (que puede ser un epítipo) es un anticuerpo o resto de anticuerpo que se une a esa diana con mayor afinidad, mayor avidez, mayor disposición y/o mayor duración que su unión a otras dianas. En algunas realizaciones, el grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % del grado de unión del anticuerpo a la diana según se mide, p. ej., mediante radioinmunoensayo (RIA). En algunas realizaciones, la constante de disociación de un anticuerpo que se une específicamente a una diana es (K_D) $\leq 10^{-5}$ M, $\leq 10^{-6}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-10}$ M, $\leq 10^{-11}$ M o $\leq 10^{-12}$ M. En algunas realizaciones, un anticuerpo se

une específicamente a un epítipo de una proteína que está conservado entre proteínas de diversas especies. En algunas realizaciones, la unión específica puede incluir, pero no requiere, una unión exclusiva. La especificidad de unión de un anticuerpo o dominio de unión al antígeno puede determinarse experimentalmente mediante un método conocido en la técnica. Tales métodos incluyen, sin carácter limitante, inmunotransferencias de Western, ensayos de ELISA, RIA, ECL, IRMA, EIA, BIACORETM y barridos de péptidos.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "agente citotóxico" se refiere a una sustancia que inhibe o bloquea las funciones celulares y/o provoca la destrucción celular. Se pretende que el término incluya: radioisótopos, p. ej., los radioisótopos At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , C^{60} y Lu; agentes quimioterapéuticos; y toxinas, tales como toxinas que son moléculas de bajo peso molecular o toxinas enzimáticas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos los análogos sintéticos y derivados de estos.

Un "enlazador", "unidad enlazadora" o "elemento enlazador" se refiere a un módulo químico que comprende un enlace covalente o cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo o resto de direccionamiento a un módulo de fármaco.

Tal como se utilizan en el presente documento, las expresiones "conjugado de anticuerpo-fármaco", "conjugado de anticuerpo", "conjugado", "inmunoconjugado" y "ADC" se utilizan indistintamente y se refieren a un compuesto o derivado de este unido a un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo anti-PDL1, tal como se define mediante la siguiente fórmula general: $\text{AB}-(\text{L}-\text{D})_k$, en donde Ab = resto de anticuerpo (es decir, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno), L = resto de enlazador, D = resto de fármaco y k = el número de restos de fármaco conjugados por resto de anticuerpo.

Entre los conjugados de anticuerpo-fármaco disponibles actualmente en el mercado, existen dos métodos principales para conjugar un anticuerpo con un enlazador: (1) La lisina es el sitio de unión más común en los anticuerpos y un grupo ϵ -amino de esta puede reaccionar con un grupo carboxilo activado en el enlazador para formar un enlace de tipo

amida. Actualmente, existen técnicas que consiguen una conjugación dirigida al sitio activando un grupo carboxilo en el enlazador con un grupo activante y a continuación formando un enlace de tipo amida con el grupo ϵ -amino de una lisina específica en el anticuerpo. (2) Los grupos sulfhidrilo (SH) de las cisteínas en un anticuerpo existen todos en forma de enlaces disulfuro (-S-S-). La apertura del enlace disulfuro en el anticuerpo puede proporcionar una pluralidad de grupos sulfhidrilo libres como sitios de conjugación. La conjugación con los grupos sulfhidrilo del anticuerpo se realiza mediante una reacción de adición de Michael entre un grupo sulfhidrilo libre en el anticuerpo y maleimida, o mediante reacciones de adición de Michael dobles entre un sustrato específico y el grupo sulfhidrilo libre en el anticuerpo para formar un enlace de puente de azufre estructuralmente singular.

Los códigos de los aminoácidos de tres letras y de una letra tal como se utilizan en el presente documento son tal como se describen en *J. Biol. Chem.* 1968, 243, 3558.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado alifático saturado, que es un grupo lineal o ramificado que contiene de 1 a 20 átomos de carbono, preferentemente un alquilo que contiene de 1 a 12 átomos de carbono, más preferentemente un alquilo que contiene de 1 a 10 átomos de carbono y de la forma más preferida un alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos no limitantes incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, n-hexilo, 1-etil-2-metilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2-etilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2,3-dimetilbutilo, n-heptilo, 2-metilhexilo, 3-metilhexilo, 4-metilhexilo, 5-metilhexilo, 2,3-dimetilpentilo, 2,4-dimetilpentilo, 2,2-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 2-etilpentilo, 3-etilpentilo, n-octilo, 2,3-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 2,2-dimetilhexilo, 3,3-dimetilhexilo, 4,4-dimetilhexilo, 2-etilhexilo, 3-etilhexilo, 4-etilhexilo, 2-metil-

2-etilpentilo, 2-metil-3-etilpentilo, n-nonilo, 2-metil-2-etilhexilo, 2-metil-3-etilhexilo, 2,2-dietilpentilo, n-decilo, 3,3-dietilhexilo, 2,2-dietilhexilo y varios isómeros ramificados de estos, etc. Más preferentemente, el alquilo es un grupo alquilo inferior que contiene de 1 a 6 átomos de carbono y los ejemplos no limitantes incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, n-hexilo, 1-etil-2-metilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2-etilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2,3-dimetilbutilo, etc. El grupo alquilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el sustituyente puede ocupar una posición de sustitución en cualquier punto de unión disponible y el sustituyente es preferentemente uno o más grupos seleccionados independientemente entre alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alquiltio, alquilamino, halógeno, sulfhidrilo, hidroxilo, nitro, amino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalcoxi, heterocicloalcoxi, cicloalquiltio, heterocicloalquiltio y oxo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "haloalquilo" se refiere a un alquilo sustituido con uno o más halógenos, en donde el alquilo es tal como se ha definido anteriormente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ciano" se refiere a -CN.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "grupo de ácido sulfónico" se refiere al grupo -SO₃H.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "carboxi" se refiere a -C(O)OH.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alcoxi" se refiere a -O-(alquilo) y -O-(cicloalquilo), en los que el alquilo o cicloalquilo es tal como se ha definido anteriormente. Los ejemplos no limitantes de alcoxi incluyen: metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, ciclopropoxi, ciclobutoxi, ciclopentoxi y ciclohexoxi. El alcoxi puede estar opcionalmente sustituido o no sustituido y, cuando está sustituido, el sustituyente es preferentemente uno o

más grupos seleccionados independientemente entre alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alquiltio, alquilamino, halógeno, sulfhidrilo, hidroxilo, nitro, ciano, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalcoxi, heterocicloalcoxi, cicloalquiltio y heterocicloalquiltio.

El término "alquenilo" se refiere a un compuesto alquílico que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono en la molécula, en donde el alquilo es tal como se ha definido anteriormente, y el alquenilo tiene de 2 a 10 (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) átomos de carbono (es decir, alquenilo C₂₋₁₀). El alquenilo es preferentemente un grupo alquenilo que tiene de 2 a 6 átomos de carbono (es decir, alquenilo C₂₋₆). El alquenilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el sustituyente se selecciona preferentemente entre uno o más de los siguientes: alcoxi, halógeno, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquiloxi, heterocicliloxi, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, amino, nitro, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo.

El término "alquinilo" se refiere a un compuesto alquílico que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono en la molécula, en donde el alquilo es tal como se ha definido anteriormente, y el alquinilo tiene de 2 a 10 (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) átomos de carbono (es decir, alquinilo C₂₋₁₀). El alquinilo es preferentemente un grupo alquinilo que tiene de 2 a 6 átomos de carbono (es decir, alquinilo C₂₋₆). El alquinilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el sustituyente se selecciona preferentemente entre uno o más de los siguientes: alcoxi, halógeno, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquiloxi, heterocicliloxi, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, amino, nitro, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilo deuterado" se refiere a un alquilo sustituido con uno o más halógenos, en donde el alquilo es tal como se ha definido anteriormente.

La presente divulgación comprende además diversas formas deuteradas de fórmula (I). Cada átomo de hidrógeno disponible unido a un átomo de carbono puede reemplazarse independientemente por un átomo de deuterio. Los expertos en la técnica pueden sintetizar formas deuteradas de fórmula (I) haciendo referencia a referencias bibliográficas relevantes.

Se pueden utilizar materiales de partida deuterados comercializados para preparar formas deuteradas de fórmula (I) o se pueden sintetizar utilizando técnicas convencionales empleando reactivos deuterados, cuyos ejemplos no limitantes incluyen: borano deuterado, una solución de un borano trideuterado en tetrahidrofurano, hidruro de aluminio y litio deuterado, yodoetano deuterado, yodometano deuterado, etc.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "DAR" se refiere a la relación de fármaco cargado:anticuerpo, que representa el número promedio de fármacos citotóxicos cargados por anticuerpo, o también puede representar la relación de la cantidad del fármaco respecto a la cantidad del anticuerpo. La carga de fármaco puede estar comprendida en el intervalo de 0 a 12, preferentemente de 1 a 10 fármacos citotóxicos (D) conjugados por anticuerpo (Ab). En una realización de la presente divulgación, la DAR se designa como k, que puede ser un valor medio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, a modo de ejemplo, sin limitación. El número promedio de fármacos por molécula de ADC después de una reacción de conjugación puede caracterizarse mediante métodos convencionales tales como espectroscopía UV/visible, espectrometría de masas, ensayo ELISA y HPLC.

En una realización de la presente divulgación, el fármaco citotóxico se conjuga con un grupo sulfhidrilo de cisteína intercatenario expuesto (-SH) de un anticuerpo y/o un grupo sulfhidrilo de cisteína (-SH) resultante de mutagénesis dirigida al sitio mediante una unidad enlazadora. Por lo general, el número de moléculas de fármaco que se pueden conjugar con el anticuerpo en una reacción de conjugación será inferior o igual al valor teóricamente máximo.

Los siguientes métodos no limitantes se pueden utilizar para controlar la carga de un conjugado de ligando-fármaco citotóxico e incluyen:

- (1) controlar la relación molar de un enlazador-fármaco cargado respecto a un agente reductor respecto a un anticuerpo monoclonal,
- (2) controlar el tiempo de reacción, la temperatura y el valor de pH, y
- (3) seleccionar diferentes reactivos de reacción y su contenido.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "forma solvatada" o "solvato" se refiere a que el conjugado de ligando-fármaco de la presente divulgación forma un solvato farmacéuticamente aceptable con una o más moléculas de disolvente, cuyos ejemplos no limitantes incluyen agua, etanol, acetonitrilo, isopropanol, DMSO, acetato de etilo, dimetilacetamida (DMAC), etc.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sal orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable de un conjugado de anticuerpo-fármaco. Las sales ilustrativas incluyen, sin carácter limitante, sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanninato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisato, fumarato, gluconato, glucuronato, sal de azúcar ácido, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Las sales farmacéuticamente aceptables pueden implicar la inclusión de otra molécula, tal como un ion acetato, un ion succinato u otros contraiones. Los contraiones pueden ser cualquier módulo orgánico o inorgánico que establezca la carga del compuesto precursor. Además, las sales farmacéuticamente aceptables pueden tener más de un átomo cargado en su estructura. Cuando una variedad de átomos cargados actúan como un constituyente de una sal farmacéuticamente aceptable, puede haber una variedad de contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Un "solvato farmacéuticamente aceptable" se refiere a una combinación de una o más moléculas de disolvente y un ADC o una sal de este. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin carácter limitante, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

Tal como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" es una estrategia para obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos. A los

efectos de la presente solicitud, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin carácter limitante, uno o más de los siguientes: aliviar uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, disminuir el alcance de la enfermedad, estabilizar la enfermedad (p. ej., prevenir o retrasar el empeoramiento de la enfermedad), prevenir o retrasar la dispersión (p. ej., metástasis) de la enfermedad, prevenir o retrasar la recidiva de la enfermedad, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad, mejorar el estado patológico, proporcionar una remisión (parcial o total) de la enfermedad, reducir la dosis de uno o más fármacos distintos necesarios para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, aumentar o mejorar la calidad de vida, incrementar el aumento de peso corporal y/o prolongar la supervivencia. En el "tratamiento" también se engloba una reducción de las consecuencias patológicas del cáncer (tales como, por ejemplo, el volumen tumoral). El método de la presente solicitud contempla uno cualquiera o más de estos aspectos del tratamiento.

En el contexto del cáncer, el término "tratamiento" incluye uno cualquiera de los siguientes o todos ellos: inhibir el crecimiento de las células cancerosas, inhibir la replicación de las células cancerosas, reducir la carga tumoral global y mejorar uno o más síntomas relacionados con la enfermedad.

El término "inhibición" o "inhibir" se refiere a la reducción o cese de cualquier característica fenotípica, o la reducción o cese de la incidencia, extensión o probabilidad de esa característica. "Reducir" o "inhibir" se refiere a reducir, disminuir o prevenir la actividad, función y/o cantidad en comparación con una referencia. En ciertas realizaciones, "reducir" o "inhibir" se refiere a la capacidad de provocar una reducción global de un 20 % o más. En otra realización, "reducir" o "inhibir" se refiere a la capacidad de provocar una reducción global de un 50 % o más. En otra realización más, "reducir" o "inhibir" se refiere a la capacidad de provocar una reducción global de un 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o más.

El término "referencia", tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier muestra, patrón o nivel utilizado con fines comparativos. La referencia puede obtenerse a partir de muestras sanas y/o sin enfermedad. En determinadas realizaciones, la referencia

puede obtenerse a partir de una muestra no tratada. En determinadas realizaciones, la referencia se obtiene a partir de una muestra sin enfermedad o no tratada de un individuo. En algunos ejemplos, la referencia se obtiene a partir de uno o más individuos sanos distintos del individuo o paciente.

Tal como se utiliza en el presente documento, "retrasar el desarrollo de una enfermedad" se refiere a retrasar, impedir, ralentizar, atrasar, estabilizar, inhibir y/o retrasar el desarrollo de una enfermedad, tal como un cáncer. El retraso puede variar en cuanto al periodo de tiempo, dependiendo del historial de la enfermedad y/o del individuo que se esté tratando. Resultaría obvio para los expertos en la técnica que un retraso suficiente o significativo podría incluir de hecho la prevención, ya que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, podría retrasar el cáncer avanzado (p. ej., el desarrollo de metástasis).

Tal como se utiliza en el presente documento, la "prevención" incluye proporcionar prevención contra la aparición o recidiva de una enfermedad en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad pero al que todavía no se le ha diagnosticado la enfermedad.

Tal como se utiliza en el presente documento, una función o actividad "inhibidora" es una disminución en la función o actividad en comparación con la misma condición distinta de la condición o parámetro de interés o, como alternativa, en comparación con otra condición. Por ejemplo, los anticuerpos que inhiben el crecimiento tumoral reducen la velocidad de crecimiento tumoral en comparación con la velocidad de crecimiento tumoral en ausencia de los anticuerpos.

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un mamífero, que incluye, sin carácter limitante, un ser humano, ganado bovino, caballo, animal felino, canino, roedor o primate. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a una cantidad eficaz, con dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o

profiláctico deseado. La dosis específica puede variar dependiendo de uno o más de los siguientes: el agente particular seleccionado, la pauta posológica que se va a seguir, si se va a administrar de forma combinada con otros compuestos, el momento de la administración, el tejido del que se va a obtener imágenes y el sistema de suministro físico que lo porta.

La "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula, agonista o antagonista de la presente solicitud puede variar dependiendo de factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso corporal del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista de provocar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una cantidad en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos compensan cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales de la sustancia/molécula, agonista o antagonista. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede suministrarse en una o más administraciones.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, con dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, dado que se utiliza una dosis profiláctica en un sujeto antes o en una etapa más temprana de una enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

Las expresiones "formulación farmacéutica" y "composición farmacéutica" se refieren a un preparado en una forma que permite que la actividad biológica de uno o más principios activos sea eficaz y no comprende otros componentes que son inaceptablemente tóxicos para el individuo al que se va a administrar la formulación. Tales formulaciones pueden ser estériles.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a una relleno, diluyente, material encapsulante, auxiliar de formulación o portador sólido, semisólido o líquido atóxico convencional en la técnica para su uso con un agente terapéutico, ambos de los cuales constituyen conjuntamente una "composición farmacéutica" para la administración a un individuo. El portador farmacéuticamente aceptable es atóxico para el receptor en la dosis y

concentración empleada y es compatible con los otros ingredientes de la formulación. Un portador farmacéuticamente aceptable es adecuado para la formulación empleada.

Debe entenderse que cuando un nombre químico no es coherente con la estructura química de la presente solicitud, si la hay, prevalece la estructura química.

Debe entenderse que las realizaciones de la presente solicitud descritas en el presente documento incluyen realizaciones "que consisten" y/o "que consisten esencialmente en".

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, una descripción que se refiere a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Tal como se utiliza en el presente documento, la referencia a que "no" es un valor o parámetro por lo general significa y describe un valor o parámetro "diferente". Por ejemplo, cuando no se utiliza un método para tratar un cáncer de tipo X, esto significa que el método se utiliza para tratar cánceres distintos del tipo X.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "aproximadamente X-Y" tiene el mismo significado que "de aproximadamente X a aproximadamente Y".

Tal como se utiliza en el presente documento, modificar la cantidad de un ingrediente o reactivo en la presente divulgación con el término "aproximadamente" es una variación en la cantidad de un valor numérico que puede ocurrir, por ejemplo, en las mediciones habituales y los procedimientos de tratamiento de líquidos utilizados para preparar concentrados o de hecho en las soluciones utilizadas; en errores ocasionales en estos procedimientos; en diferencias en la elaboración, las fuentes o la pureza de los ingredientes utilizados para preparar la composición o llevar a cabo el método; etc. El término "aproximadamente" también incluye cantidades que difieren debido a diferentes condiciones de equilibrio respecto a una composición resultante de una mezcla de partida particular. Tanto si están modificadas o no por el término "aproximadamente", los equivalentes de las cantidades se incluyen en las reivindicaciones. En una realización, el término

"aproximadamente" significa que está dentro de un 10 % del valor numérico indicado, preferentemente dentro de un 5 % del valor numérico indicado.

Los expertos en la técnica entenderán que, cuando se menciona un valor numérico en las reivindicaciones, tanto si va precedido de "aproximadamente" como si no, el valor real del valor numérico puede variar en un 10 % (± 10 %) respecto al valor mencionado, preferentemente en un 5 % (± 5 %).

Tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "o" y "el/la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

2. Conjugado de anticuerpo-fármaco

Un anticuerpo anti-PD-L1 puede conjugarse con un resto citotóxico o citostático (incluida una sal farmacéuticamente compatible de este) para formar un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). Los restos particularmente adecuados para la conjugación con el anticuerpo son agentes citotóxicos (p. ej., agentes quimioterapéuticos), enzimas convertidoras de profármacos, radioisótopos o compuestos o toxinas (se puede hacer referencia a estos restos de forma colectiva como agentes terapéuticos). Por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-L1 puede conjugarse con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico o una toxina (p. ej., un agente citostático o citolítico tal como, por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria).

El anticuerpo anti-PD-L1 puede conjugarse con una enzima convertidora de profármacos. La enzima convertidora de profármacos se puede fusionar de forma recombinante o conjugar químicamente con el anticuerpo utilizando un método conocido. Algunas enzimas convertidoras de profármacos ilustrativas son la carboxipeptidasa G2, β -glucuronidasa, penicilina-V-amidasa, penicilina-G-amidasa, β -lactamasa, β -glucosidasa, nitrorreductasa y carboxipeptidasa A.

Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos con proteínas, particularmente con anticuerpos, son muy conocidas. (Véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies

For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld *et al.* eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled DrugDelivery* (Robinson *et al.* eds., Marcel Dekker, Inc., 2.^a edición, 1987); Thorpe, "AntibodyCarriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera *et al.* eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For CancerDetection And Therapy* (Baldwin *et al.* eds., Academic Press, 1985); y Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Véase también, por ejemplo, la Publicación de PCT N.º WO 89/12624).

El agente terapéutico se puede conjugar de manera que reduzca su actividad a menos que se escinda del anticuerpo (p. ej., mediante hidrólisis, mediante la degradación del anticuerpo o mediante un agente de escisión). Tal agente terapéutico se une al anticuerpo utilizando un enlazador escindible que es sensible a la escisión en el entorno intracelular o el microentorno tumoral de las células cancerosas que expresan PD-L1 de manera que se escinde del anticuerpo cuando el conjugado está en ese entorno (p. ej., en endosomas o, por ejemplo, debido a la sensibilidad al pH o sensibilidad a proteasas en entornos lisosómicos, en entornos de caveolas o en el microentorno tumoral).

Habitualmente, el ADC comprende una región enlazadora entre el agente terapéutico y el anticuerpo anti-PD-L1. Tal como se ha descrito anteriormente, habitualmente el enlazador se puede escindir en condiciones intracelulares o en el microentorno tumoral, de tal forma que la escisión del enlazador se produce en el entorno intracelular (p. ej., en lisosomas o endosomas o caveolas) o en el microentorno tumoral, lo que conduce a la liberación del agente terapéutico del anticuerpo. El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador de tipo peptídico que se escinde mediante peptidasas o proteasas intracelulares, que incluyen proteasas lisosomales o endosómicas. Habitualmente, el enlazador de tipo peptídico tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o al menos tres aminoácidos. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D, plasmina, etc. (véase, por ejemplo,

Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123). Los enlazadores de tipo peptidilo más habituales son enlazadores de tipo peptidilo que pueden ser escindidos por enzimas presentes en las células que expresan PD-L1 o dentro del microentorno tumoral. Por ejemplo, se pueden utilizar enlazadores de tipo peptidilo que pueden ser escindidos por la proteasa dependiente de tiol catepsina B, que puede expresarse altamente en tejidos cancerosos (p. ej., un enlazador que contiene un péptido Phe-Leu o Gly-Phe-Leu-Gly). Se describen otros enlazadores de este tipo, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 6 214 345. En una realización específica, un enlazador de tipo peptidilo que puede ser escindido por una proteasa intracelular incluye un enlazador Val-Cit o un dipéptido Phe-Lys (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 6 214 345, que describe la síntesis de doxorubicina utilizando el enlazador Val-Cit). Una ventaja del uso de proteólisis intracelular para liberar el agente terapéutico es que el agente normalmente descompone durante la conjugación y la estabilidad en suero del conjugado es generalmente alta.

El enlazador escindible puede ser sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a determinados valores de pH. Normalmente, los enlazadores sensibles al pH se pueden hidrolizar en condiciones ácidas. Por ejemplo, se pueden utilizar enlazadores lábiles en medio ácido que pueden hidrolizarse en lisosomas (p. ej., hidrazonas, hemicarbazonas, tiosemicarbazonas, amida cis-aconítica, ortoésteres, acetales y cetales). (Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 122 368, 5 824 805 y 5 622 929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; y Neville *et al.*, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661). Tales enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero no son estables por debajo de pH 5.5 o 5.0 (el pH aproximado de los lisosomas). En determinadas realizaciones, un enlazador hidrolizable es un enlazador de tipo tioéter (tal como un tioéter unido a un agente terapéutico mediante un enlace de tipo acilhidrazona) (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 5 622 929).

Otros enlazadores, tales como enlazadores de tipo disulfuro, se pueden escindir en condiciones reductoras. Los enlazadores de tipo disulfuro incluyen aquellos que pueden

formarse con SATA (S-acetiltioacetato de N-succinimidilo), SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo), SPDB (3-(2-piridilditio)butirato de N-succinimidilo) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno), SPDB y SMPT. Véase, por ejemplo, Thorpe *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel eds, Oxford U. Press, 1987. Véase también la Patente de EE. UU. N.º 4 880 935.)

El enlazador también puede ser un enlazador de tipo malonato (Johnson *et al.*, 1995, *Anticancer Res.* 15: 1387-93), un enlazador de tipo maleimidobenzoílo (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3 (10):1299-1304) o análogos de 3'-N-amida (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3 (10):1305-12). El enlazador también puede ser un enlazador de tipo malonato (Johnson *et al.*, 1995, *Anticancer Res.* 15: 1387-93), un enlazador de tipo maleimidobenzoílo (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3 (10):1299-1304) o análogos de 3'-N-amida (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3 (10):1305-12).

El enlazador también puede ser un enlazador no escindible, tal como un enlazador de tipo maleimido-alquileo o maleimido-arilo unido directamente a un agente terapéutico (p. ej., un fármaco). El fármaco activo-enlazador se libera mediante la degradación del anticuerpo.

Habitualmente, el enlazador es sustancialmente insensible al entorno del sistema circulatorio, lo que significa que cuando el ADC está presente en plasma, se escinde no más de aproximadamente un 20 %, habitualmente no más de aproximadamente un 15 %, más habitualmente no más de aproximadamente un 10 %, incluso más habitualmente no más de aproximadamente un 5 %, no más de aproximadamente un 3 %, o no más de aproximadamente un 1 % del enlazador en una muestra de ADC.

Se puede determinar si el enlazador es sustancialmente insensible al entorno del sistema circulatorio, por ejemplo, de la siguiente manera: incubando tanto (a) ADC ("muestra de ADC") como (b) una cantidad equimolar de un anticuerpo o agente terapéutico no conjugado ("muestra de control") independientemente con plasma durante un periodo de tiempo predeterminado (p. ej., 2, 4, 8, 16, o 24 horas), y a continuación comparando la

cantidad del anticuerpo o agente terapéutico no conjugado presente en la muestra de ADC tal como se mide, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución, con la cantidad presente en la muestra de control.

El anticuerpo anti-PDL1 puede conjugarse con el enlazador a través de un heteroátomo en el anticuerpo. Tales heteroátomos pueden estar presentes en su estado natural en el anticuerpo o pueden introducirse en el anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PDL1 se conjugará con el enlazador a través del átomo de nitrógeno del residuo de lisina. En otros aspectos, el anticuerpo anti-PDL1 se conjugará con el enlazador a través del átomo de azufre del resto de cisteína. El resto de cisteína puede ser un resto de origen natural o que se modifica por ingeniería genética en el anticuerpo. En la técnica se conocen métodos para conjugar enlazadores y fármaco-enlazadores con anticuerpos a través de residuos de lisina y cisteína.

Los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco también incluyen conjugados de anticuerpo-fármaco basados en camptotecina (es decir, el componente farmacológico es un fármaco de camptotecina). La camptotecina es un inhibidor de la topoisomerasa que se ha demostrado que tiene actividad anticancerosa. Normalmente, el conjugado de anticuerpo-fármaco basado en camptotecina comprende un enlazador entre el fármaco de camptotecina y el anticuerpo anti-PDL1. El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador escindible (p. ej., un enlazador de tipo peptídico o un enlazador de tipo carbohidrato) o un enlazador no escindible (p. ej., un enlazador liberado por la degradación del anticuerpo). La síntesis y estructura de enlazadores de fármacos de camptotecina ilustrativos se describen en el documento PCT/US19/025968, que se incorpora al presente documento a todos los efectos por referencia en su totalidad.

Otros conjugados de anticuerpo-fármaco ilustrativos incluyen conjugados de anticuerpo-fármaco de maitansinoide (es decir, el componente farmacológico es un fármaco de maitansinoide) y conjugados de anticuerpo-fármaco de benzodiazepina (es decir, el componente farmacológico es una benzodiazepina (p. ej., un dímero de

pirrolo[1,4]benzodiazepina (dímero de PBD), un dímero de indolobenzodiazepina y un dímero de oxazolidinobenzodiazepina)).

Las clases útiles de agentes citotóxicos que se conjugan con anticuerpos anti-PDL1 incluyen, por ejemplo, agentes anti-tubulina, agentes de unión al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, sensibilizadores quimioterapéuticos, etc. Otras clases ilustrativas de agentes citotóxicos incluyen antraciclinas, auristatinas, camptotecinas, duocarmicina, etopósido, maitansinoides y alcaloides de la vinca. Algunos agentes citotóxicos ilustrativos incluyen camptotecinas (p. ej., irinotecán y DXD), auristatinas (p. ej., auristatina T, auristatina E, AFP, monometilauristatina F (MMAF), monometilauristatina F lipófila, monometilauristatina E (MMAE)), agentes de unión al surco menor del ADN (p. ej., enediinas y lexitropsinas), duocarmicina, taxanos (p. ej., taxol y docetaxel), alcaloides de la vinca, inhibidores de la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPTi), tubulisina M, doxorubicina, morfolino-doxorubicina y ciclomorfolino-doxorubicina.

El agente citotóxico puede ser un agente quimioterapéutico tal como, por ejemplo, doxorubicina, taxol, melfalán, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. El agente también puede ser un análogo de CC-1065, calicheamicina, maitansina, un análogo de dolastatina 10, rizoxina o palitoxina.

El agente citotóxico también puede ser auristatina. La auristatina puede ser un derivado de auristatina E, tal como un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E puede reaccionar con ácido p-acetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas habituales incluyen auristatina T, AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y estructura de diversas auristatinas se describe, por ejemplo, en los documentos US 2005-0238649 y US 2006-0074008.

La presente divulgación divulga un conjugado de anticuerpo-fármaco, un método de preparación de este y el uso de este, en particular un conjugado de un anticuerpo anti-PD-L1 y un inhibidor de la topoisomerasa I novedoso que es más sensible a tumores, una composición farmacéutica de este, un método de preparación de este y el uso de este. Se ha

descubierto que el conjugado de anticuerpo-fármaco resultante tiene una actividad mejor, tal como una actividad antitumoral potente, según experimentos antitumorales. Mejora significativamente la supervivencia de los animales portadores de tumores, tiene una toxicidad significativamente reducida, supone menos carga en el cuerpo de los animales de experimentación, y se ha reducido en gran medida la dosis mínima eficaz del fármaco que es una molécula de bajo peso molecular cuando se utiliza por sí solo, expande la ventana terapéutica de este, es prometedor para su uso en el desarrollo de fármacos para tratar una variedad de enfermedades tales como tumores, y muestra buenas perspectivas y valor de aplicación.

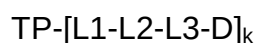
El conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco de la presente divulgación es un conjugado novedoso de anticuerpo dirigido a PDL1-fármaco (ADC) que consiste esencialmente en tres restos, a saber, un anticuerpo monoclonal dirigido a PDL1, un fármaco que es una molécula de bajo peso molecular (carga) y un enlazador sensible al microentorno tumoral (Enlazador), en donde el fármaco cargado es un inhibidor novedoso de la topoisomerasa I (TOP) que es más sensible a los tumores. Después de que el conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco de la presente divulgación entra en el cuerpo, una parte del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco puede liberar el fármaco cargado en el microentorno tumoral tras la unión del resto de anticuerpo de este específicamente a PDL1 altamente expresado en las células tumorales, mientras que la otra parte entra en las células cancerosas mediante una internalización del fármaco mediada por PDL1. En un entorno especial dentro de los tumores, el enlazador peptídico del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco de la presente divulgación se escinde para liberar eficazmente la carga, y el fármaco cargado que es una molécula de bajo peso molecular ejerce un efecto citotóxico y, por lo tanto, puede destruir las células cancerosas de una manera dirigida. Debido a la lipofilia relativamente alta, algunas cargas pueden ejercer un "efecto de vecinidad", lo que hace posible su acción después de entrar en las células que rodean a las células cancerosas, mientras que los ADC de PDL1 tienen el potencial de bloquear los puntos de

control inmunitario de PD-1/PDL1. Estos mecanismos de acción anticancerosos también son eficaces contra células tumorales negativas y de baja expresión del antígeno. Cabe esperar que el conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco de la presente divulgación sea un fármaco terapéutico ideal para los siguientes pacientes: pacientes que han mostrado una respuesta insatisfactoria a la terapia con un inhibidor de PD-1/PDL1 o progresión después de la terapia con un inhibidor de PD-1/PDL1.

El conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco de la presente divulgación tiene las siguientes características:

- (1) Se utiliza una nueva generación de tipo de enlazador que es relativamente sensible al microentorno tumoral para garantizar la estabilidad de los fármacos del ADC en la circulación sanguínea y permitir la liberación eficaz del fármaco cargado que es una molécula de bajo peso molecular en las células tumorales o cuando se encuentra en el microentorno tumoral.
- (2) Se utilizan fármacos cargados (cargas) con la nueva generación de mecanismo de acción para destruir de manera eficaz las células cancerosas con diferentes niveles de expresión de PDL1.
- (3) Se utiliza una nueva generación de tecnología de conjugación de anticuerpos para garantizar la uniformidad y precisión del sitio de conjugación del anticuerpo, de modo que su semivida e inmunogenicidad son similares a las del anticuerpo, a la vez que se conserva la función de bloqueo del punto de control inmunitario de PD-1/PDL1 del resto de anticuerpo.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco, un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable o solvato de este, o un solvato de la sal farmacéuticamente aceptable, en donde el conjugado de anticuerpo-fármaco tiene una estructura representada mediante la fórmula (I):



(I)

en donde

TP es un resto de direccionamiento que se une o reconoce selectivamente a PDL1;

L1 es una unidad de extensión que conecta TP y L2, en donde TP se conecta con L1 mediante un grupo activo (p. ej., un grupo sulfhidrilo o amino), preferentemente en donde L1 se conjuga con un grupo sulfhidrilo de cisteína intercatenario (-SH) expuesto en TP y/o un grupo sulfhidrilo de cisteína (-SH) resultante de mutagénesis dirigida al sitio;

L2 es un residuo aminoacídico opcional o un péptido corto que consiste en 2-10 residuos aminoacídicos;

L3 es un elemento espaciador;

D es una molécula biológicamente activa; y

k representa cualquier valor numérico comprendido entre 0.1 y 10.0.

Con referencia al conjugado de anticuerpo-fármaco, el subíndice k representa la carga de fármaco y, dependiendo del contexto, puede representar el número molecular de las moléculas de fármaco-enlazador unidas a la molécula de anticuerpo individual; por lo tanto, es un valor entero; como alternativa, k puede representar la carga de fármaco promedio y, por lo tanto, puede ser un valor entero o no entero. La carga de fármaco promedio representa el número promedio de moléculas de fármaco-enlazador por anticuerpo en una población. Habitualmente, pero no siempre, cuando se hace referencia a anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales, se hace referencia a una población de moléculas de anticuerpo. En una composición que comprende una población de moléculas de conjugado de anticuerpo-fármaco, la carga de fármaco promedio es un atributo de masa importante, ya que determina la cantidad del fármaco que puede suministrarse a la célula diana. El porcentaje de moléculas de anticuerpo no conjugadas en la composición se incluye en el valor de carga de fármaco promedio.

En un aspecto preferido de la presente divulgación, cuando se hace referencia a una composición que comprende una población de compuestos de conjugado de anticuerpo-

fármaco, la carga de fármaco promedio es de 1 a aproximadamente 16, preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 14, más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10.

Para los ADC de MMAE y camptotecina, tales como los que se ilustran en el presente documento, una carga de fármaco promedio preferida es de aproximadamente 2, 4 u 8, y una carga de fármaco promedio particularmente preferida es de aproximadamente 8. En una realización, una carga de fármaco promedio preferida para un ADC de MMAE es 2 o 4. En una realización, una carga de fármaco promedio preferida para un ADC de camptotecina es 4 u 8. En una realización ilustrativa, el fármaco-enlazador se conjuga con un residuo de cisteína en un disulfuro intercatenario reducido. En algunos aspectos, la carga de fármaco real por molécula de anticuerpo individual en una población de compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco es de 1 a 10 (o de 6 a 10 o de 6 a 8), siendo la carga de fármaco predominante 8.

En algunas realizaciones de fórmula (I), TP es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este.

En algunas realizaciones de fórmula (I), el fragmento de unión al antígeno se selecciona entre una inmunoglobulina de longitud completa, un fragmento Fv monocatenario (ScFv), un fragmento Fab, un fragmento Fab', F(ab')₂, un fragmento Fv, un fragmento Fv estabilizado con disulfuros (dsFv), (dsFv)₂, una fusión Fv-Fc, una fusión ScFv-Fc, una fusión ScFv-Fv, un diacuerpo, un tricuerpo, un tetracuerpo, o cualquier combinación de estos.

En algunas realizaciones de fórmula (I), TP es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno de este.

En algunas realizaciones de fórmula (I), TP comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL), en donde la región variable de la cadena pesada (VH) comprende la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 1 (HCDR1), HCDR2 y HCDR3 contenidas en la SEQ ID NO: 7, y la región variable de la cadena ligera (VL) comprende la región

determinante de la complementariedad de la cadena ligera 1 (LCDR1), LCDR2 y LCDR3 contenidas en la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones de fórmula (I), la secuencia de aminoácidos de HCDR1 es la SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de HCDR2 es la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos de HCDR3 es la SEQ ID NO: 3; y la secuencia de aminoácidos de LCDR1 es la SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de LCDR2 es la SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos de LCDR3 es la SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones de fórmula (I), TP comprende una secuencia de Fc de IgG humana.

En algunas realizaciones de la fórmula (I), la IgG se selecciona entre IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En algunas realizaciones de fórmula (I), TP comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones de fórmula (I), TP comprende una región variable de la cadena ligera (VL) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones de fórmula (I), TP comprende una cadena pesada (HC) y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (HC) tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones de fórmula (I), TP comprende una cadena ligera (LC) y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (LC) tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 10.

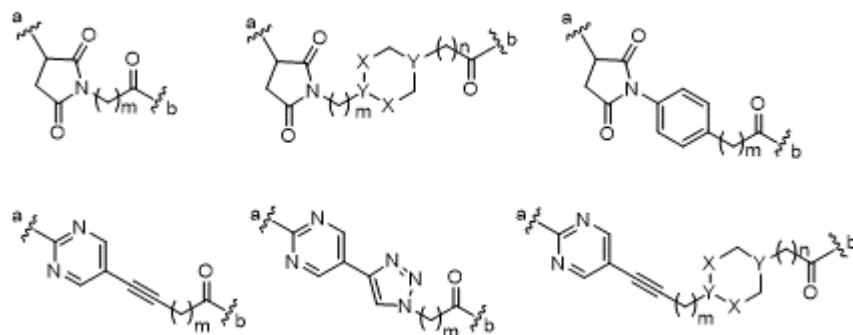
En algunas realizaciones de fórmula (I), TP es un anticuerpo multiespecífico.

En algunas realizaciones de fórmula (I), TP es un anticuerpo afucosilado.

En algunas realizaciones de fórmula (I), la región de Fc comprende una lisina C-terminal.

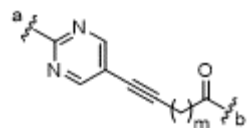
En algunas realizaciones de fórmula (I), la región Fc comprende una delección de la lisina C-terminal.

En algunas realizaciones de fórmula (I), L1 se selecciona entre



en donde L1 se conecta con TP en la posición a mediante un átomo de S y con L2 en la posición b, m es cualquier número entero comprendido entre 1 y 10, n es cualquier número entero comprendido entre 1 y 10, y X e Y son cada uno independientemente C, O, S o N.

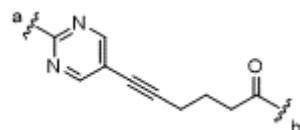
En algunas realizaciones de fórmula (I), L1 es



en donde m se selecciona entre 1, 2, 3, 4 o 5,

en donde L1 se conecta con TP en la posición a mediante un átomo de S y con L2 en la posición b.

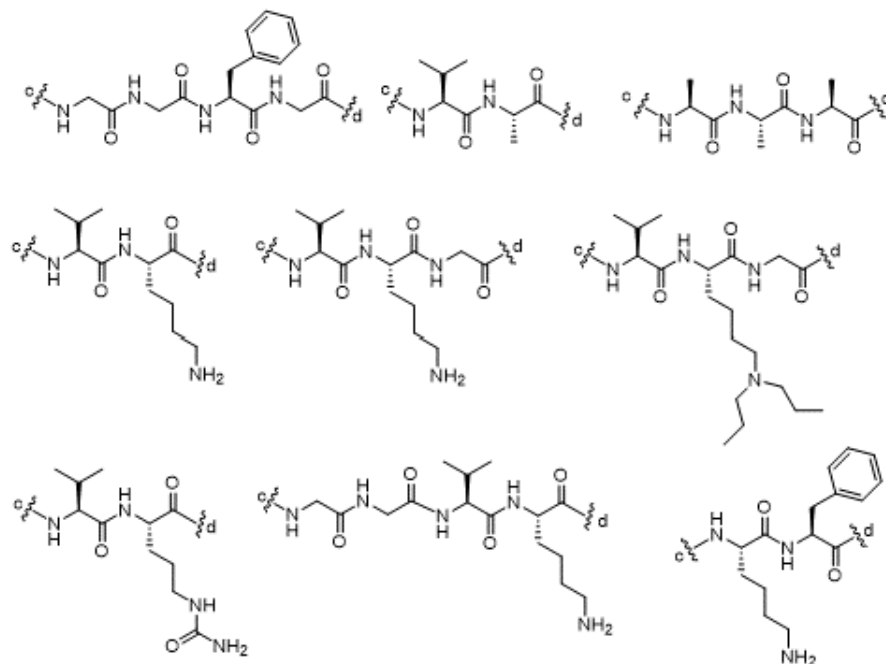
En algunas realizaciones de fórmula (I), L1 es



en donde L1 se conecta con TP en la posición a mediante un átomo de S y con L2 en la posición b.

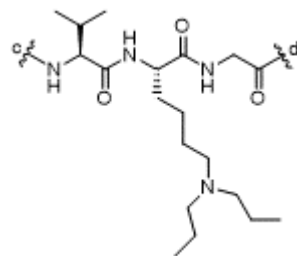
En algunas realizaciones, L1 se conecta con una cisteína de TP (más específicamente, el grupo sulfhidrido de la cisteína) en la posición a.

En algunas realizaciones de fórmula (I), L2 se selecciona entre



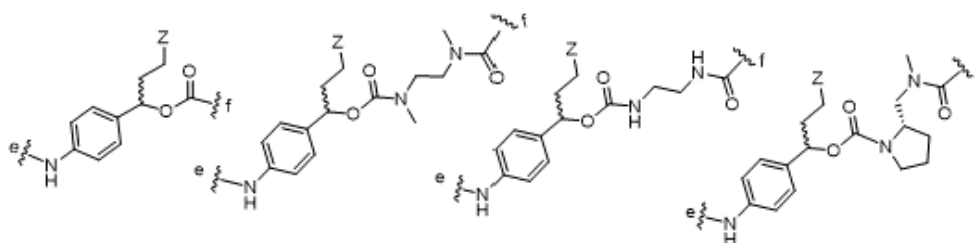
en donde L2 se conecta con L1 en la posición c y con L3 en la posición d.

En algunas realizaciones de fórmula (I), L2 es



en donde L2 se conecta con L1 en la posición c y con L3 en la posición d.

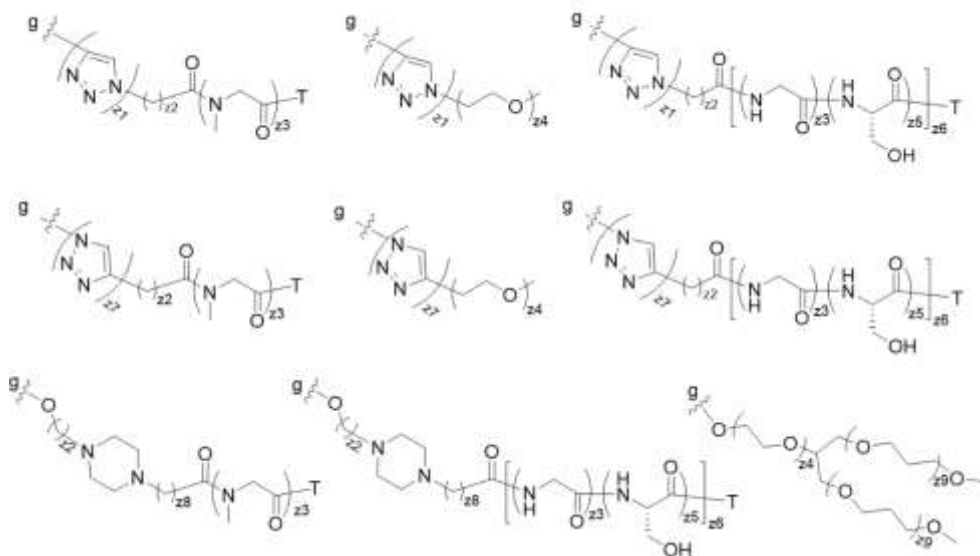
En algunas realizaciones de fórmula (I), L3 es un enlace sencillo o un grupo seleccionado entre:



en donde L3 se conecta con L2 en la posición e y con D en la posición f,

Z se selecciona entre hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₂₀, haloalquilo C₁-C₂₀, ciano, sulfo, carboxilo, alcoxi C₁-C₂₀, alquilo C₂-C₁₀ insaturado, un aminoácido natural, un aminoácido no natural y un péptido corto que consiste en los aminoácidos anteriores.

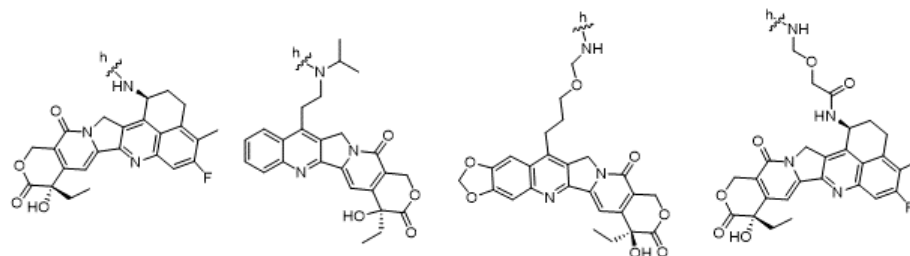
En algunas realizaciones de fórmula (I), Z se selecciona entre



en donde Z se conecta con el resto de L3 en la posición g, z1-z9 son cada uno independientemente un número entero comprendido entre 0 y 10, y T es NH₂ u OH.

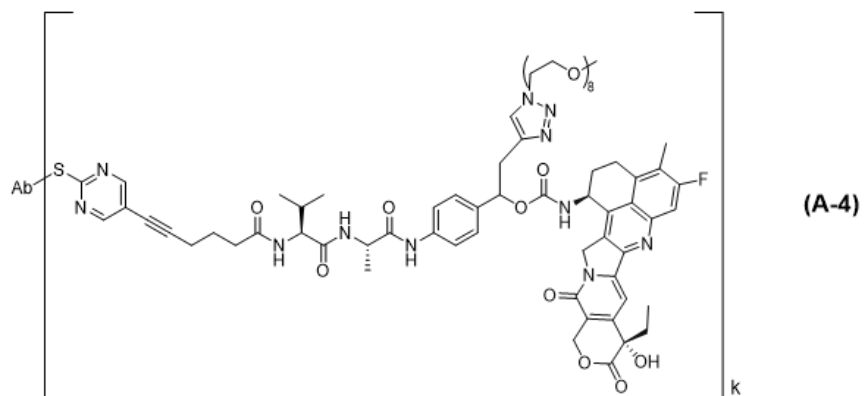
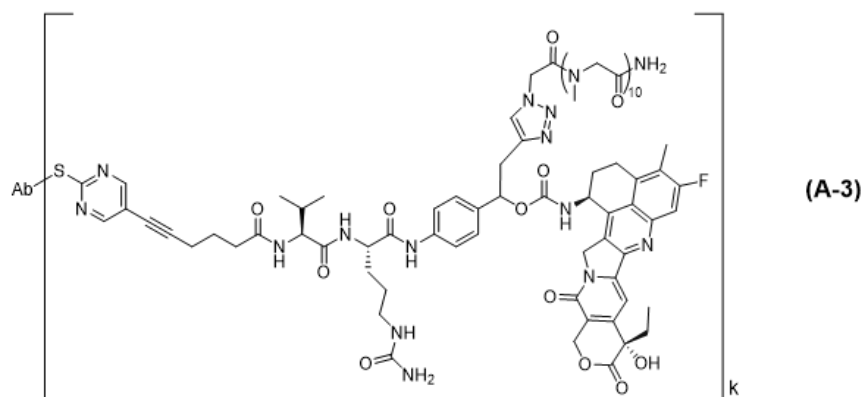
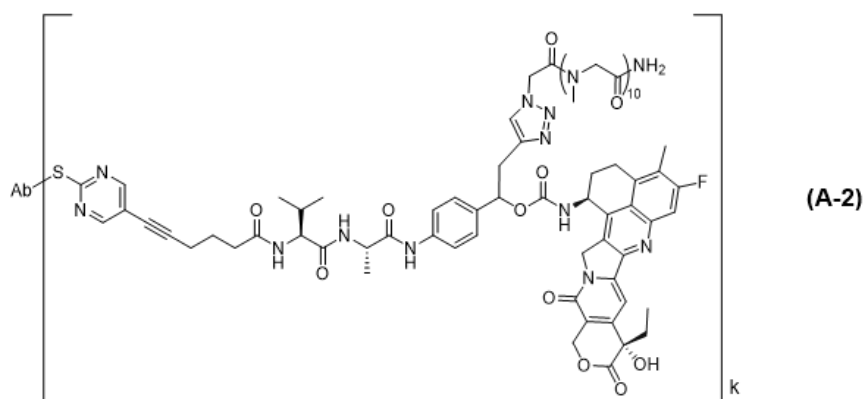
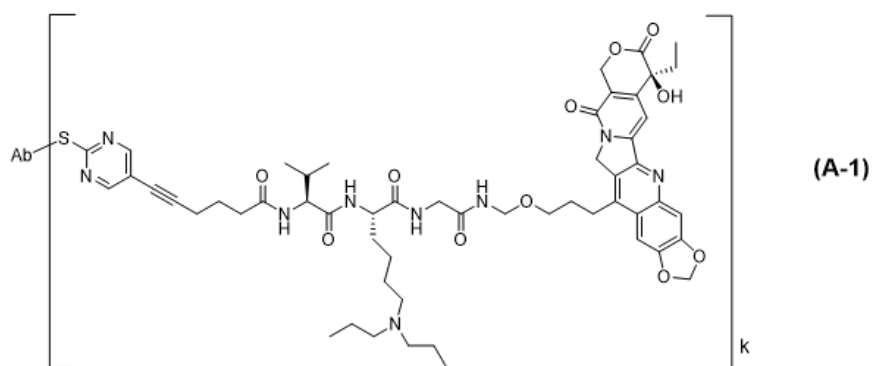
En algunas realizaciones de fórmula (I), D es un agente citotóxico.

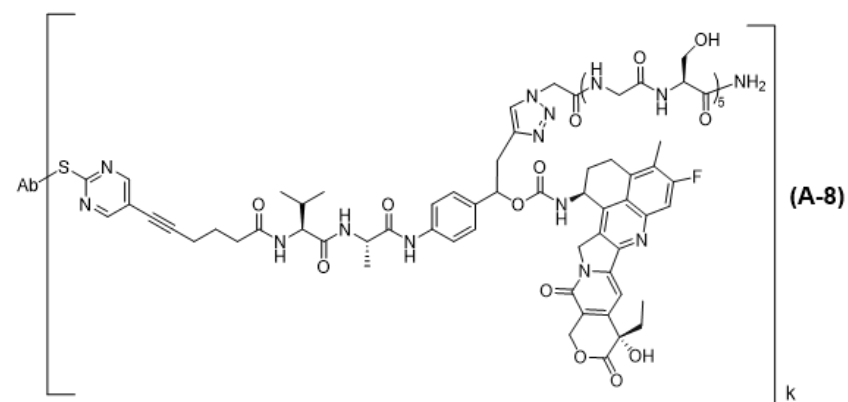
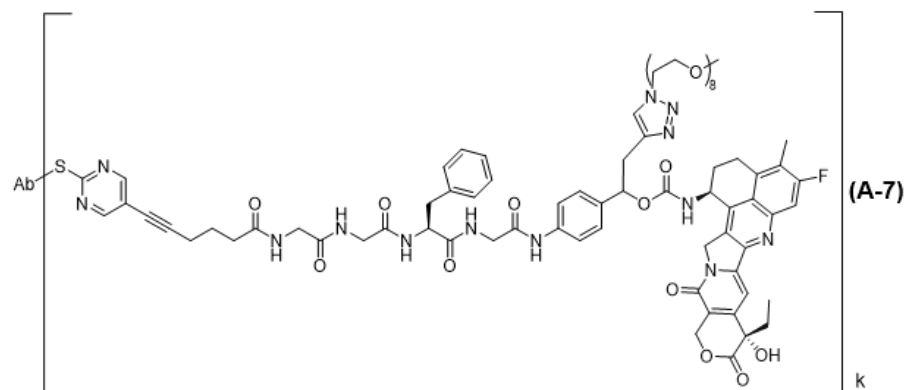
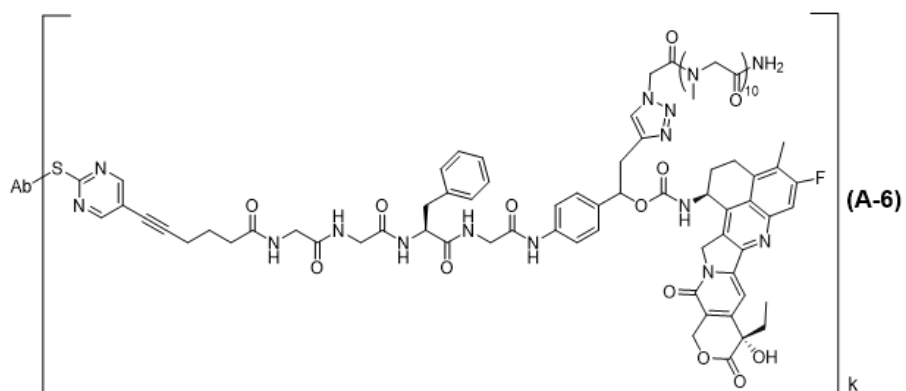
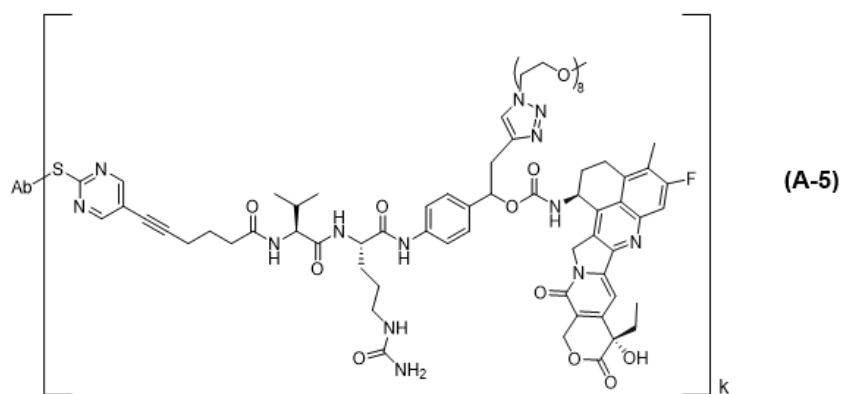
En algunas realizaciones de fórmula (I), D se selecciona entre

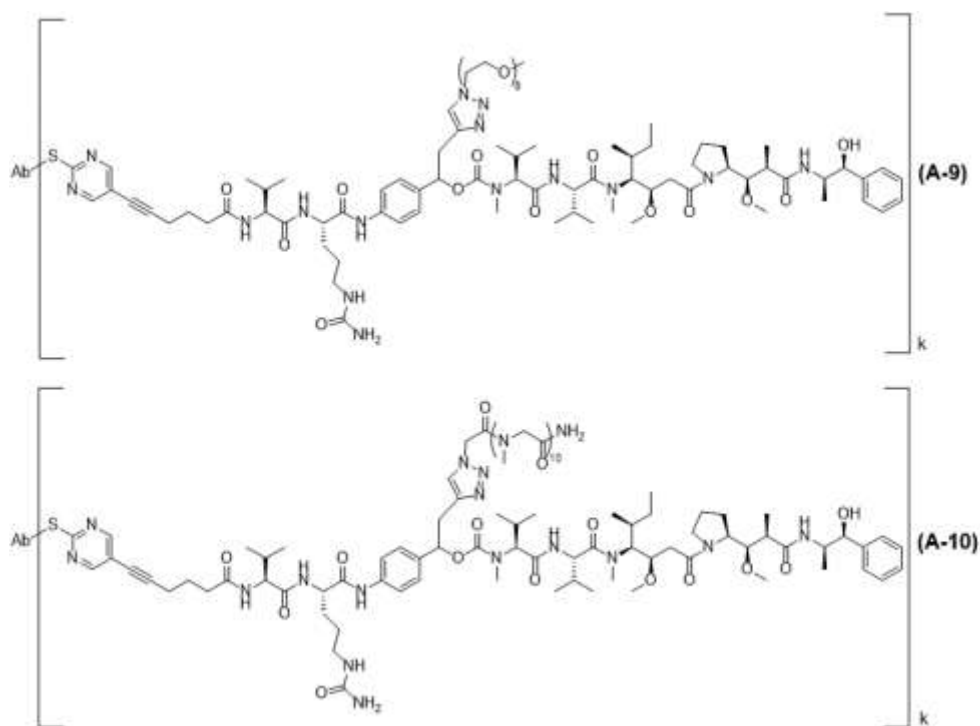


en donde D se conecta con L3 en la posición h.

En algunas realizaciones de fórmula (I), el conjugado de anticuerpo-fármaco se selecciona entre:







Ab representa el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este tal como se define en las realizaciones anteriores.

En algunas realizaciones de fórmula (I), k es 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10.0, o se encuentra en un intervalo entre dos cualquiera de estos. En realizaciones adicionales, k es 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, o se encuentra en un intervalo entre dos cualesquiera de estos. En otras realizaciones, k es 4.0, 6.0 u 8.0.

3. Método de uso

El conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco de la presente divulgación se puede utilizar para tratar el cáncer. Algunos de tales cánceres muestran niveles detectables de

PDL1 medidos a nivel de proteína (p. ej., mediante inmunoensayo utilizando uno de los anticuerpos ilustrativos) o de ARNm. Algunos de tales cánceres muestran niveles elevados de PDL1 respecto al mismo tipo de tejido no canceroso, preferentemente del mismo paciente. Un nivel ilustrativo de PDL1 en células cancerosas tratables es de 5000-500 000 moléculas de PDL1 por célula; sin embargo, pueden tratarse los que tienen niveles más elevados o más bajos. Opcionalmente, el nivel de PDL1 en un cáncer se mide antes del tratamiento.

Los ejemplos de cánceres relacionados con la expresión de PDL1 y adecuados para el tratamiento incluyen melanoma, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de pulmón microcítico (CPM), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo (CMTN)), cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer urotelial, carcinoma hepatocelular (CHC), cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de cuello de útero, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer pancreático y glioma. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar melanoma. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar CPNM. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar CPM. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar cáncer de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar cáncer de mama. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar CMTN. El cáncer de mama triple negativo es una expresión específica para un cáncer que carece de receptores detectables de estrógeno y progestina y carece de sobreexpresión de HER2/neu. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar cáncer pancreático. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para

tratar cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar cáncer urotelial. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar CHC. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar cáncer de esófago. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar cáncer gástrico. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar cáncer de cuello uterino. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar cáncer de riñón. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar cáncer pancreático. En algunas realizaciones, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se utiliza para tratar glioma. El tratamiento se puede aplicar a pacientes con estos tipos de tumores primarios o metastásicos. El tratamiento también se puede aplicar a pacientes refractarios al tratamiento convencional o que han recaído después de responder a tal tratamiento.

El conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se administra con una pauta eficaz lo cual significa una dosis, vía de administración y frecuencia de administración que pueden retrasar el inicio, reducir la gravedad, inhibir una exacerbación adicional y/o mejorar al menos un signo o síntoma del cáncer. Si el paciente ya había padecido cáncer, se puede hacer referencia a la pauta como una pauta terapéuticamente eficaz. Si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar cáncer respecto a la población general, pero no ha experimentado síntomas, se puede hacer referencia a la pauta como una pauta profilácticamente eficaz. En algunos casos, puede observarse eficacia terapéutica o profiláctica en pacientes individuales respecto a controles del historial o experiencia pasada en el mismo paciente. En otros casos, se puede demostrar la eficacia terapéutica o

profiláctica en ensayos preclínicos o clínicos respecto a una población de control de pacientes no tratados.

Una dosis ilustrativa del conjugado de anticuerpo-fármaco puede ser de 1 µg/kg a 15 mg/kg (p. ej., de 0.1 mg/kg a 20 mg/kg), p. ej., de 1 mg/kg a 7.5 mg/kg, o de 2 mg/kg a 7.5 mg/kg, o de 3 mg/kg a 7.5 mg/kg del peso corporal del sujeto, o 0.1-20 mg/kg el peso corporal del sujeto, o 0.5-5 mg/kg del peso corporal del sujeto (p. ej., 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg o 10 mg/kg), o como una dosis fija de 10-1500 mg o 200-1500 mg. En algunos métodos, se administra al paciente una dosis de al menos 1 mg/kg, al menos 1.5 mg/kg, al menos 2 mg/kg, al menos 3 mg/kg, al menos 8 mg/kg o al menos 10 mg/kg, una vez a la semana, una vez cada tres semanas o de forma menos frecuente. La dosis depende de factores tales como la frecuencia de administración, el estado del paciente y la respuesta, si la hay, al tratamiento previo, de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico, y de si el trastorno es agudo o crónico.

La administración puede ser parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, local, intranasal o intramuscular. La administración también puede localizarse directamente en el tumor. Preferentemente, se administra a la circulación sistémica mediante administración intravenosa o subcutánea. La administración intravenosa puede realizarse, por ejemplo, mediante infusión durante un periodo de tiempo (p. ej., 30-90 min) o mediante una única inyección en bolo.

La frecuencia de administración depende de factores tales como la semivida del conjugado en circulación, el estado del paciente y la vía de administración. La frecuencia puede ser una vez al día, una vez a la semana, una vez al mes, una vez cada trimestre o en intervalos irregulares como respuesta a cambios en el estado del paciente o la progresión del cáncer que se esté tratando. Durante un ciclo continuo de tratamiento, una frecuencia ilustrativa de administración intravenosa se encuentra entre dos veces a la semana y una vez cada trimestre, pero la administración también puede tener una frecuencia mayor o menor. Durante un ciclo continuo de tratamiento, otras frecuencias ilustrativas de administración

intravenosa se encuentran entre una vez a la semana o tres veces cada cuatro semanas, pero la administración también puede tener una frecuencia mayor o menor. Para la administración subcutánea, las frecuencias ilustrativas de las dosis son de una vez al día a una vez al mes, pero la administración también puede tener una frecuencia mayor o menor.

El número de dosis administradas depende de la naturaleza del cáncer (p. ej., si presenta síntomas agudos o crónicos) y la respuesta del trastorno al tratamiento. Normalmente, son suficientes entre 1 y 10 dosis para trastornos agudos o trastornos crónicos exacerbados de manera aguda. En ocasiones, las dosis en bolo individuales (opcionalmente en formas separadas) son suficientes para trastornos agudos o trastornos crónicos exacerbados de manera aguda. La recidiva o exacerbación aguda de trastornos agudos puede tratarse repetidamente. Para trastornos crónicos, los anticuerpos pueden administrarse en intervalos regulares, p. ej., una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada trimestre o una vez cada seis meses durante al menos 1, 5 o 10 años o la vida del paciente.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son preferentemente estériles y sustancialmente isotónicas y se fabrican en condiciones de BPF. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en una forma farmacéutica unitaria (es decir, una dosis para una única administración). Las composiciones farmacéuticas se pueden formular utilizando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables. La formulación depende de la vía de administración elegida. Para inyección, el anticuerpo puede formularse en una solución acuosa, preferentemente en un tampón fisiológicamente compatible tal como la solución de Hank, solución de Ringer o solución salina normal, o tampón de acetato (para reducir el malestar en el sitio de la inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o agentes dispersantes. Como alternativa, antes de su uso, el anticuerpo puede estar en una forma liofilizada para su constitución en un vehículo adecuado

(p. ej., agua estéril libre de pirógenos). La concentración del anticuerpo en una formulación líquida puede ser, por ejemplo, de 1-100 mg/ml, tal como 10 mg/ml.

El tratamiento con el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación puede combinarse con quimioterapia, radiación, terapia con células madre, cirugía u otras terapias que sean eficaces para el trastorno que se esté tratando. Las clases útiles de otros agentes que pueden administrarse con los conjugados de anticuerpo-fármaco dirigidos a PDL1 como se describen en el presente documento incluyen, por ejemplo, anticuerpos dirigidos a otros receptores expresados en células cancerosas, agentes antitubulina (p. ej., auristatinas), agentes de unión al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (p. ej., complejos de platino tales como cisplatino, mono(platino), bis(platino) y complejos trinucleares de platino, y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores quimioterapéuticos, duocarmicina, etopósido, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosourea, platinoles, compuestos preformadores, antimetabolitos de purina, puomicina, radiosensibilizadores, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de la vinca, etc.

El tratamiento con un conjugado de anticuerpo-fármaco, opcionalmente combinado con cualquiera de los otros agentes o pautas que se han descrito anteriormente, puede aumentar la mediana de la supervivencia sin progresión o el tiempo de supervivencia global de un paciente con un tumor (p. ej., melanoma, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de pulmón microcítico (CPM), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo (CMTN)), cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer urotelial, carcinoma hepatocelular (CHC), cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer colorrectal y cáncer de cuello uterino), especialmente en el caso de tumores recidivantes o refractarios, en al menos un 30 % o un 40 %, pero preferentemente en un 50 %, 60 % hasta un 70 % o incluso un 100 % o más, en comparación con el mismo tratamiento (p. ej., quimioterapia) sin el conjugado de anticuerpo-fármaco. Adicionalmente o como alternativa, un tratamiento que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco (p. ej., quimioterapia

convencional) puede aumentar la tasa de respuesta completa, la tasa de respuesta parcial o la tasa de respuesta objetiva (completa + parcial) de un paciente con un tumor en al menos un 30 % o un 40 %, pero preferentemente en un 50 %, 60 % hasta un 70 % o incluso un 100 %, en comparación con el mismo tratamiento (p. ej., quimioterapia) sin el conjugado de anticuerpo-fármaco.

4. Formulación farmacéutica

Aunque el conjugado de anticuerpo-fármaco descrito en el presente documento puede utilizarse por sí solo (p. ej., mediante administración), generalmente está presente preferentemente en una composición o formulación.

En un aspecto, la composición es una composición farmacéutica (p. ej., formulación, preparado o agente) que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco descrito en el presente documento y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la composición es una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los conjugados de anticuerpo-fármaco descritos en el presente documento y uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables diferentes muy conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, sin carácter limitante, portadores, diluyentes, excipientes, adyuvantes, rellenos, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (p. ej., agentes humectantes), agentes enmascarantes, colorantes, saborizantes y edulcorantes farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, la composición comprende además otros agentes activos, tales como otros agentes terapéuticos o profilácticos.

Los portadores, diluyentes, excipientes adecuados, etc. se pueden encontrar en referencias bibliográficas farmacéuticas estándar. Véase, por ejemplo, *Handbook of Pharmaceutical Additives*, 2.^a edición (M. Ash e I. Ash eds.), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE. UU., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20.^a edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; y *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2.^a edición, 1994.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar al menos un conjugado de anticuerpo-fármaco o un compuesto similar a un conjugado de anticuerpo-fármaco radiomarcado con [11C] tal como se define en el presente documento con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables (p. ej., portadores, diluyentes y excipientes) muy conocidos por los expertos en la técnica. Si se formula como unidades individuales (p. ej., comprimidos), cada unidad contiene una cantidad predeterminada (dosis) del compuesto activo.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas farmacéuticas, etc., que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para entrar en contacto con el tejido del sujeto en cuestión (p. ej., un ser humano), sin toxicidad, irritación o reacciones alérgicas excesivas, u otros problemas o complicaciones, que son proporcionales a una relación racional de beneficio/riesgo. Cada portador, diluyente, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

Las formulaciones se pueden preparar mediante cualquier método muy conocido en el campo farmacéutico. Tales métodos incluyen el paso de asociar el compuesto activo con un portador que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el compuesto activo con un portador (p. ej., un portador líquido o un portador sólido finamente dividido) y después conformando el producto según sea necesario.

La formulación se puede preparar para proporcionar una liberación rápida o lenta; liberación inmediata, retardada, temporizada o sostenida; o una combinación de estas.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral (p. ej., mediante inyección) incluyen líquidos (p. ej., soluciones o suspensiones) acuosos o no acuosos, isotónicos y estériles exentos de pirógenos, en donde el principio activo se disuelve,

suspende o proporciona de otro modo (p. ej., en liposomas u otras micropartículas). Tales líquidos pueden contener adicionalmente otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, agentes bacteriostáticos, agentes de suspensión, espesantes y solutos, que pueden hacer que la formulación sea isotónica con la sangre (u otros fluidos corporales relevantes) del receptor previsto. Los ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales, etc. Los ejemplos de portadores isotónicos adecuados para tales formulaciones incluyen una inyección de cloruro de sodio, solución de Ringer o inyección de Ringer con lactato. Normalmente, la concentración del principio activo en el líquido es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml. La formulación puede estar presente en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis (p. ej., ampollas y viales) y puede almacenarse en condiciones de secado por congelación (liofilización), lo que requiere solo la adición de un portador líquido estéril (p. ej., agua) para inyección (inmediatamente) antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones temporales para inyección a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

5. Artículo de elaboración y kit

En otro aspecto, se proporciona un artículo de elaboración o kit que comprende un conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco descrito en el presente documento. El artículo de elaboración o kit también puede comprender instrucciones para el uso de los conjugados de anticuerpo anti-PDL1-fármaco descritos en el presente documento en los métodos de la presente divulgación. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el artículo de elaboración o kit comprende instrucciones para el uso del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco descrito en el presente documento en un método para tratar un cáncer (p. ej., melanoma, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de pulmón microcítico (CPM), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo (CMTN)), cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer urotelial, carcinoma hepatocelular (CHC), cáncer de

esófago, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de cuello de útero, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer pancreático y glioma), comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

El artículo de elaboración o kit puede comprender además un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales (p. ej., viales de doble compartimento), inyectoros (p. ej., inyectoros de un solo compartimento o de doble compartimento) y tubos de ensayo. En algunas realizaciones, el recipiente es un vial. El recipiente puede estar hecho de diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente aloja la formulación.

El artículo de elaboración o kit también puede comprender una etiqueta o prospecto sobre o asociado con el recipiente que puede indicar instrucciones para la reconstitución y/o el uso de la formulación. La etiqueta o prospecto puede indicar además que la formulación es útil o está destinada para la administración subcutánea, intravenosa (p. ej., infusión intravenosa) u otro modo de administración para tratar un cáncer (p. ej., melanoma, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de pulmón microcítico (CPM), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo (CMTN)), cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer urotelial, carcinoma hepatocelular (CHC), cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de cuello de útero, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer pancreático y glioma) en un sujeto. El recipiente que aloja la formulación puede ser un vial desechable o un vial multiuso, que permite la administración repetida de la formulación reconstituida. El artículo de elaboración o kit también puede comprender un segundo recipiente que contiene un diluyente adecuado. El artículo de elaboración o kit también puede comprender otros materiales deseados desde una perspectiva comercial, terapéutica y del usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos impresos con instrucciones de uso.

El artículo de elaboración o kit del presente documento también comprende opcionalmente un recipiente que contiene un segundo agente, en donde el conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco es un primer agente, y el artículo de elaboración o kit comprende además instrucciones en una etiqueta o prospecto para tratar a un sujeto con una cantidad eficaz del segundo agente. En algunas realizaciones, el segundo agente se utiliza para eliminar o reducir la gravedad de uno o más eventos adversos.

En algunas realizaciones, el conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco está presente en el recipiente como un polvo liofilizado. En algunas realizaciones, el polvo liofilizado está en un recipiente herméticamente sellado tal como un vial, ampolla o bolsa, en donde el recipiente indica la cantidad del agente activo. En el caso de la administración del fármaco mediante inyección, se puede proporcionar opcionalmente una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina normal, por ejemplo, como parte del kit de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración. Tales kits también pueden comprender, si se desea, uno o más de diversos componentes farmacológicos convencionales tales como, por ejemplo, un recipiente que tiene uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, un recipiente adicional, etc. Esto resulta evidente para los expertos en la técnica. El kit también puede comprender instrucciones impresas como prospectos o etiquetas que indican la cantidad de los componentes que se ha de administrar, directrices de administración y/o instrucciones para mezclar los componentes.

Listado de secuencias

SEQ ID NO	Nombre del gen	Secuencia de aminoácidos
1.	CDR1 de la cadena pesada de MAB20	SYTMN
2.	CDR2 de la cadena	SISSGSDYLYADSVKG

	pesada de MAB20	
3.	CDR3 de la cadena pesada de MAB20	NELRWYPQAGAFDR
4.	CDR1 de la cadena ligera de MAB20	SGSSSYIESSYVG
5.	CDR2 de la cadena ligera de MAB20	DDDMRPS
6.	CDR3 de la cadena ligera de MAB20	EIWRSGLGGV
7.	Región variable de la cadena pesada de MAB20	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNWVRQAPG KGLEWVSSISSGSDYLYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARNELRWYPQAGAFDRWGQGTMVTVSS
8.	Región variable de la cadena ligera de MAB20	QSVVTQPPSMSAAPGQRTISCSGSSSYIESSYVGWYQQLPGT APRLLIYDDDMRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADY YCEIWRSGLGGVFGGGTKLTVLSQP
9.	Cadena pesada de MAB20	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNWVRQAPG KGLEWVSSISSGSDYLYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARNELRWYPQAGAFDRWGQGTMVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM

		ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10.	Cadena ligera de MAB20	QSVVTQPPSMSAAPGQRTISCSGSSSYIESSYVGWYQQLPGT APRLLIYDDDMRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADY YCEIWRSGLGGVFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVERTVALTEC
11.	ECD de PDL1 humano	FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVWEMEDK NIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQARLLKDQLSLGNAALQITDVKL QDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSE HELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVT STLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNER
12.	ECD de PDL1 de mono	FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVWEMEDK NIIQFVHGEEDLKVQHSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKL QDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSE HELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVT STLRINTTANEIFYCIFRRLDPEENHTAELVIPELPLALPPNERH
13.	ECD de PDL1 de rata	FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVEQKDLLALVYWEKEDK EVIQFVEGEEDLKPQHSSFRGRAFLPKDQLLKGNALVQITDVKL QDAGVYCCMISYGGADYKRITLKVNPYRKINQRISMDPATSEH ELMCQAEGYPEAEVIWTNSDHQSLSGETTVTTSQTEEKLLNVT SVLRVNATANDVFHCTFWRVHSGENHTAELIPELVPRLPHNR TH
14.	ECD de PDL1 de ratón	FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDE QVIQFVAGEEDLKPQHNSFRGRASLPKDQLLKGNALQITDVKL QDAGVYCCIIISYGGADYKRITLKVNPYRKINQRISVDPATSEHE LICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSS

		LRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIPELPPATHPPQNRTH
15.	Cadena pesada del resto de anticuerpo de SGN-PDL1V	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKTSGDTFSTAAISWVRQAPG QGLEWMGGIIPFGKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYFCARKFH FVSGSPFGMDVWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16.	Cadena ligera del resto de anticuerpo de SGN-PDL1V	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQRSNWPTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Ejemplos

La presente divulgación se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como una limitación para la presente divulgación.

Reactivos y materiales:

Los disolventes orgánicos tales como el sulfóxido de dimetilo se adquirieron en Spectrum Chemical Mfg Corp y el reactivo TCEP-HCl en Thermo Fisher, etc.

IgG1 es un control de isotipo que se adquirió en Beijing Sino Biological, Inc

El reactivo de marcaje de IgG Zenon™ pHrodo™ iFL sensible al pH se adquirió en Thermo Fisher.

La solución CellTiter-Glo se adquirió en Promega.

Las cepas celulares NCI-H292, BXPC-3 (para modelos *in vivo*) y MDA-MB-231 se adquirieron en el Banco de Células de la Academia China de Ciencias, NCI-H441 se adquirió

en ATCC, BXPC-3 (para la destrucción celular *in vitro*) se adquirió en Wuhan Pricella Biotechnology Co., Ltd., y diversos trasplantes de PDX fueron establecidos y mantenidos por Shanghai Lide Biotech Co., Ltd.

Esquema de preparación:

Las estructuras de los compuestos descritos en los siguientes ejemplos se determinaron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H RMN) o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS).

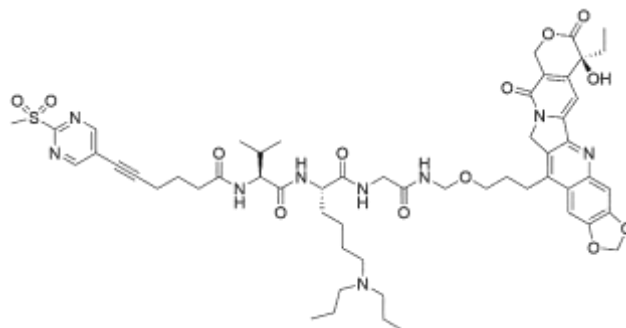
Se utilizó un instrumento de resonancia magnética nuclear de 400 MHz de Bruker para medir la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H RMN); el disolvente para la medición fue metanol deuterado (CD_3OD), cloroformo deuterado (CDCl_3) o sulfóxido de dimetilo hexadeuterado ($\text{DMSO}-d_6$); y la sustancia de patrón interno es tetrametilsilano (TMS).

Las abreviaturas en los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) utilizadas en los ejemplos se muestran a continuación.

s: singlete; d: doblete; t: triplete; c: cuádruplete; dd: doblete de dobletes; cd: cuádruplete de dobletes; ddd: doblete de doblete de dobletes; ddt: doblete de doblete de triplete; dddd: doblete de dobletes de doblete de dobletes; m: multiplete; a: ancho; J: constante de acoplamiento; Hz: Hertz; $\text{DMSO}-d_6$: sulfóxido de dimetilo deuterado. Los valores de Δ se expresaron en ppm.

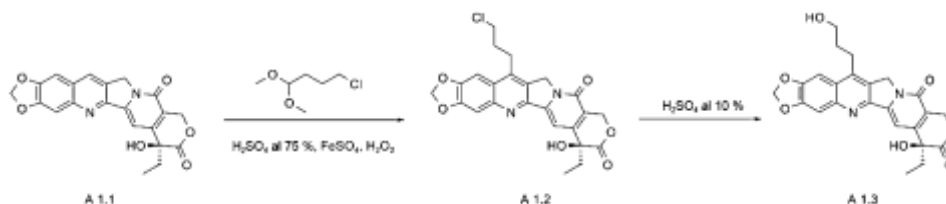
La detección mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas modelo Agilent 6120B (ESI) de Agilent.

Ejemplo 1. Preparación del enlazador-toxina (LP62)



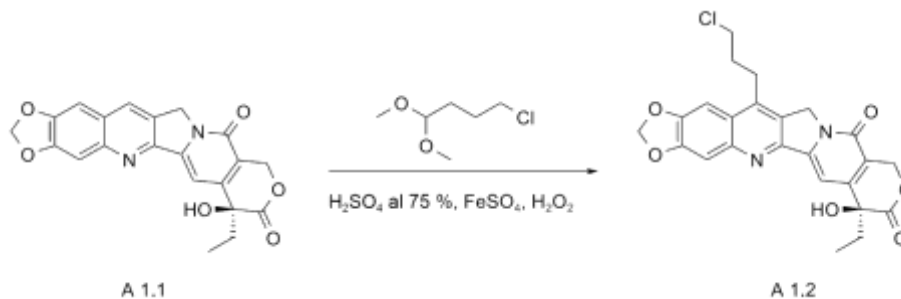
Ejemplo 1.1: Síntesis de (S)-7-etil-7-hidroxi-14-(3-hidroxipropil)-10,13-dihidro-11H-[1,3]-dioxolo[4,5-g]pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-8,11(7H)-diona (A1.3)

La ruta sintética para el compuesto A1.3 es como se muestra en el esquema 1 a continuación:



Esquema 1: Preparación del compuesto activo A1.3

Los pasos específicos fueron los siguientes:

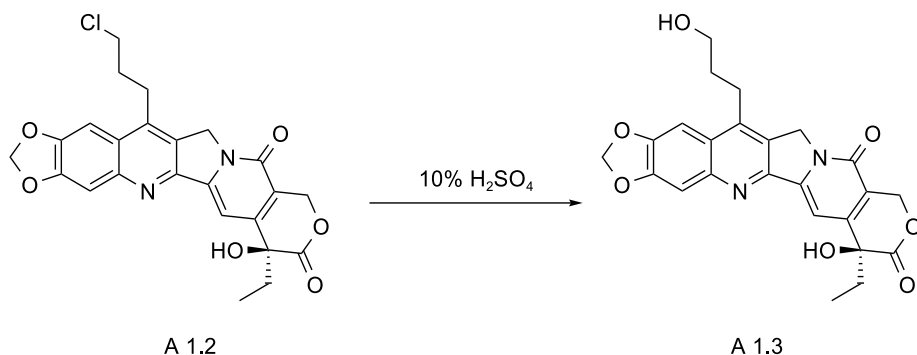


Paso 1: En condiciones de baño de hielo, a una solución de (S)-7-etil-7 -hidroxi-10,13-dihidro-11H-[1,3]-dioxolo[4,5-g]pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-8,11(7H)-diona (**A1.1**, 500 mg) en ácido sulfúrico al 75 % (5 ml), se le añadió sulfato ferroso heptahidratado (570 mg de sulfato ferroso heptahidratado disuelto en 1 ml de agua) y 4,4-dimetoxiclorobutano (3.89 g). El líquido de reacción se agitó durante tres minutos y a continuación se añadió peróxido de hidrógeno (al 29 %, 2.5 ml) gota a gota en condiciones de baño de hielo. Después de completarse la adición gota a gota, el líquido de reacción se hizo reaccionar con agitación a 0 °C durante 5 minutos, a continuación se calentó hasta temperatura ambiente y se hizo reaccionar con agitación durante 3 horas. El líquido de reacción se diluyó con agua (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (80 ml × 2). La fase orgánica se lavó con una

solución acuosa saturada de cloruro de sodio y a continuación se secó con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se evaporó a presión reducida y a continuación se concentró para obtener un producto crudo, que se purificó utilizando cromatografía líquida preparativa dotada de una columna C18 (acetonitrilo/solución acuosa de ácido fórmico al 0.05 %; 5 %-60 %) para obtener finalmente el compuesto diana (**A1.2**, como un sólido amarillo, 400 mg, rendimiento: 67 %).

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 468.9:

$^1\text{HMRN}$ (400 Hz, DMSO- d_6) δ 7.65 (s,1H), 7.51 (s,1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s,1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 3.81(d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.22 (s, 2H), 1.98 (d, J = 6.7 Hz, 4H), 0.88(t, J = 7.2 Hz, 3H).



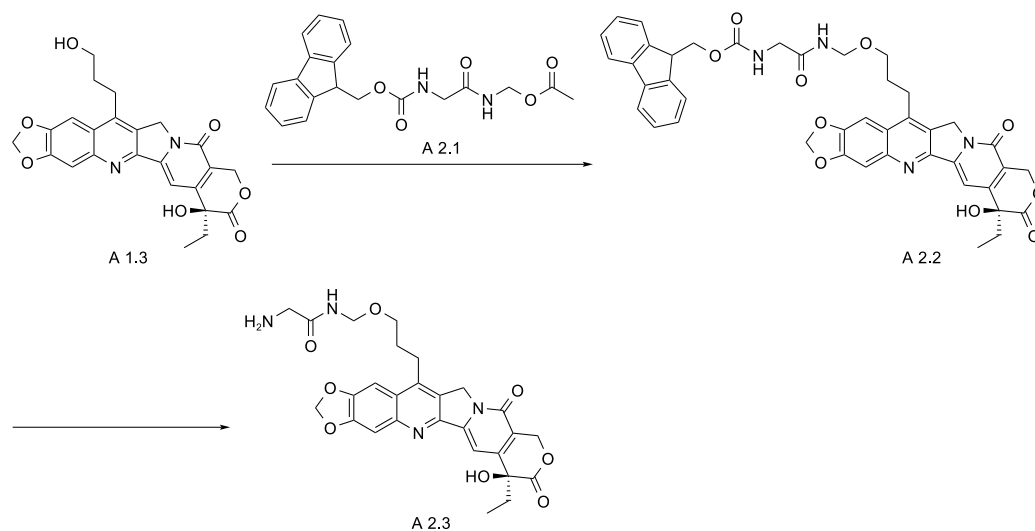
Paso 2: Se disolvió (S)-7-etil-7-hidroxi-14-(3 -cloropropil)-10,13-dihidro-11H-[1,3]-dioxolo[4,5-g]pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2- b]quinolin-8,11(7H)-diona (A1.2, 100 mg, 0.213 mmol) en una solución de ácido sulfúrico al 10 % (5 ml) y el líquido de reacción se hizo reaccionar a 110 °C durante 48 horas. Al líquido de reacción se le añadió una solución saturada de bicarbonato de sodio (30 ml) y el líquido de reacción se extrajo con diclorometano (10 ml $\times$ 5), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró por succión y se concentró a presión reducida para obtener un producto crudo. El producto crudo se sometió a una purificación preparativa mediante cromatografía líquida de alta resolución (acetonitrilo/agua, con un 0.05 % de ácido fórmico) para obtener (S)-7-etil-7-hidroxi-14-(3-hidroxipropil)-10,13-dihidro-11 H-[1,3]-dioxolo[4,5-g]pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-8,11(7H)-diona (**A1.3**, 1.78 mg).

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 451.0:

$^1\text{H NMR}$ (400 Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.63 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.47-5.37 (m, 2H), 5.32-5.19 (m, 2H), 3.51-3.46 (m, 2H), 3.17-3.13 (m, 2H), 1.92-1.76 (m, 4H), 0.90-0.84 (m, 3H).

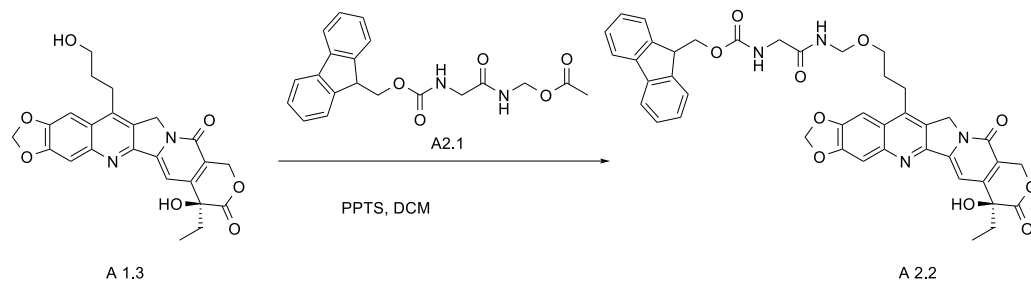
Ejemplo 1.2: Síntesis del compuesto A2.3

La ruta sintética para el compuesto A2.3 es como se muestra en el esquema 2 a continuación:



Esquema 2: Ruta sintética del compuesto A2.3

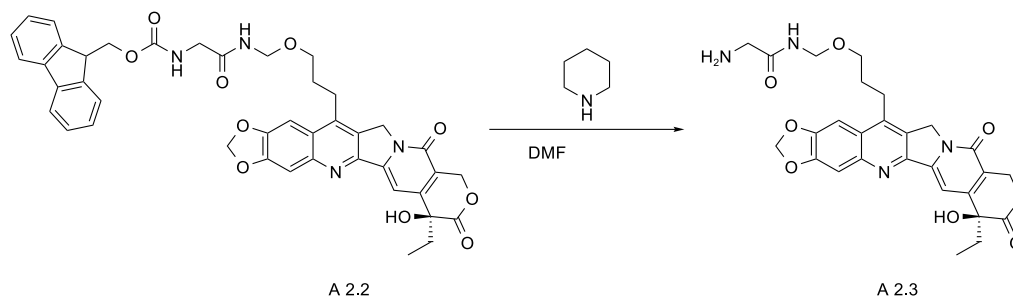
Los pasos específicos para la síntesis del compuesto A2.3 fueron los siguientes:



Paso 1: El compuesto A2.1 (368 mg), el compuesto A1.3 (440 mg) y p-toluenosulfonato de piridinio (PPTS, 25 mg) se calentaron a reflujo en diclorometano (20 ml) a 40 °C durante 20 horas y a continuación se lavaron por separado con una solución acuosa de bicarbonato de sodio y una solución acuosa de ácido clorhídrico, y el disolvente orgánico se eliminó a presión reducida para obtener un producto crudo. El producto crudo se separó y

se purificó mediante cromatografía en columna (diclorometano:metanol = 10 : 1) para obtener el compuesto diana A2.2 (240 mg).

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 747:



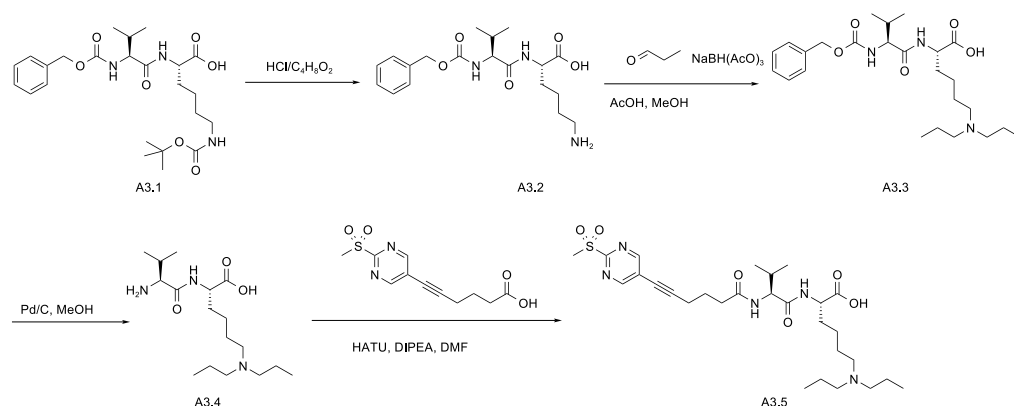
Paso 2: Se disolvió A2.2 (240 mg) en DMF (5 ml) y se añadió piperidina (1 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se eliminaron los componentes de punto de ebullición bajo a presión y el residuo se utilizó directamente en el siguiente paso de la síntesis. Se purificó una pequeña cantidad del producto crudo mediante cromatografía en fase inversa (acetonitrilo/FA al 0.05 % en agua: 5 %-50 %) para obtener el compuesto diana A2.3.

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 525:

^1H RMN (400 Hz, DMSO- d_6) δ 9.13 (t, 1H), 8.04 (a, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.65 (d, 2H), 3.63 (m, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 1.87 (m, 4H), 0.88 (t, 3H).

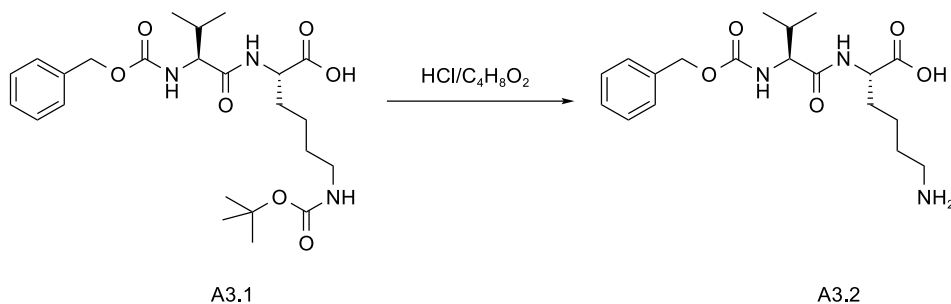
Ejemplo 1.3: Síntesis del compuesto A3.5

La ruta sintética para el compuesto A3.5 es como se muestra en el esquema 3 a continuación:



Esquema 3: Ruta sintética del compuesto A3.5

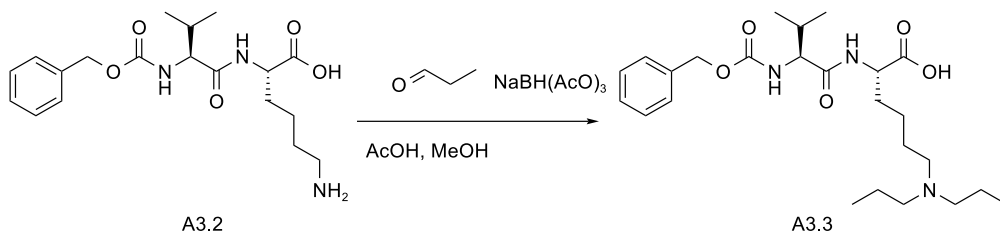
Los pasos de síntesis específicos para el compuesto A3.5 fueron los siguientes:



Paso 1: Al compuesto A3.1 (10.0 g) se le añadió una solución de cloruro de hidrógeno-dioxano (dioxano, $C_4H_8O_2$) (100 ml) y la mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. El líquido de reacción se concentró a presión reducida para obtener el compuesto diana A3.2 (8.0 g) como un sólido blanco.

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 380.1

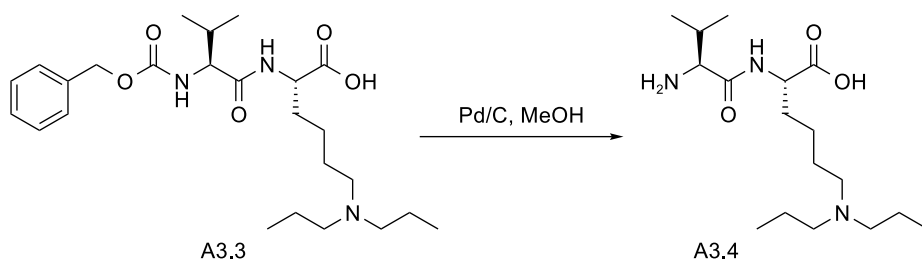
^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.18 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.40-7.30 (m, 5H), 7.26 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.08-4.99 (m, 2H), 4.23-4.11 (m, 1H), 3.94-3.88 (m, 1H), 2.78-2.73 (m, 2H), 2.03-1.94 (m, 1H), 1.77-1.51 (m, 4H), 1.44-1.31 (m, 2H), 0.87 (dd, J = 17.3, 6.6 Hz, 6H).



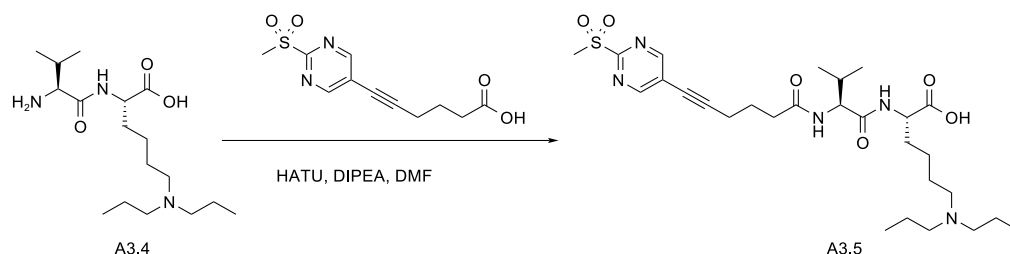
Paso 2: El compuesto A3.2 (5.0 g, 12 mmol) se disolvió en diclorometano (100 ml) y se añadió n-propanal (4.2 g, 72.3 mmol) al líquido de reacción. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y a continuación se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (12.8 g, 60.25 mmol) al líquido de reacción. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El análisis por LC-MS mostró que la reacción se había completado. Se añadió una solución acuosa saturada de cloruro de amonio al líquido de reacción y se agitó durante 1 hora. Después de un secado rotatorio y una filtración, el filtrado se purificó mediante una separación en fase inversa utilizando una columna C18 para obtener el compuesto diana A3.3 (4.57 g, rendimiento 82.0 %). El compuesto A3.3 fue un sólido blanco.

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 464.0:

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.81 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.38-7.28 (m, 5H), 5.04 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 4.12- 4.02 (m, 1H), 3.94-3.82 (m, 1H), 2.65-2.52 (m, 6H), 2.06-1.94 (m, 1H), 1.76-1.64 (m, 1H), 1.64-1.53 (m, 1H), 1.52-1.40 (m, 6H), 1.34-1.18 (m, 2H), 0.92-0.80 (m, 12H).



Paso 3: El compuesto 3.3 (2.0 g, 4.32 mmol) se disolvió en metanol (80 ml) a temperatura ambiente y a continuación se añadió Pd/C (0.16 g) al líquido de reacción. La reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de hidrógeno durante 12 horas. Después de que el análisis por LC-MS mostrara que la reacción se había completado, el líquido de reacción se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto diana A3.4 (1.2 g, rendimiento de un 85.5 %) como un sólido blanco.

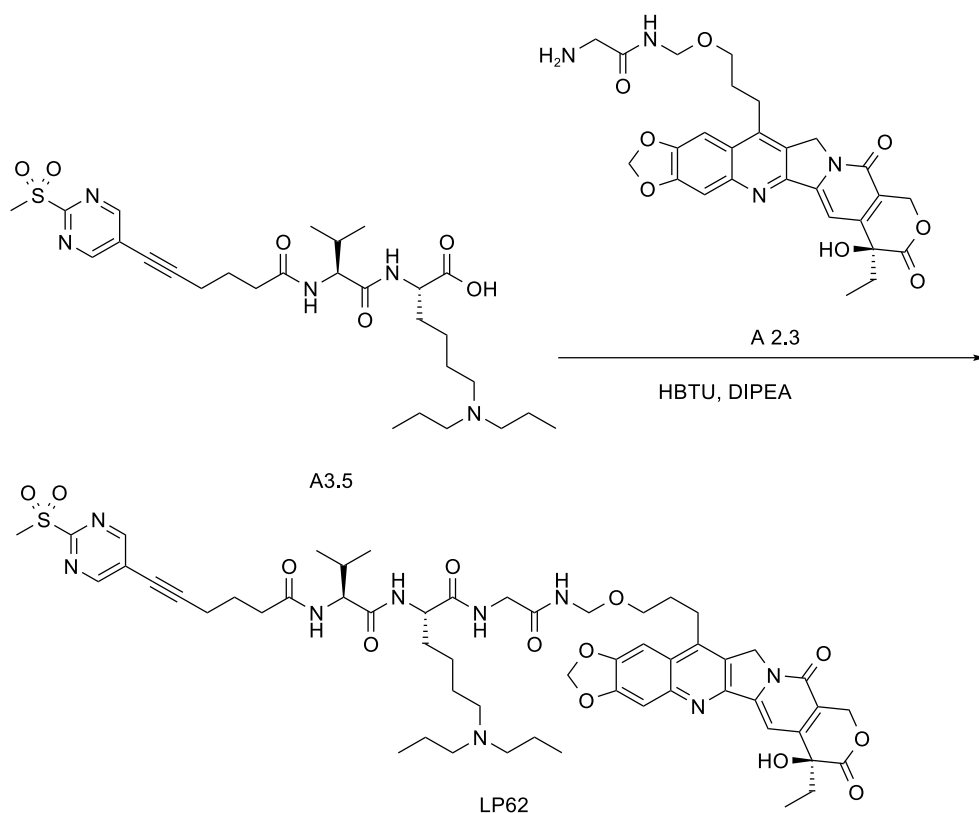


Paso 4: Se disolvió ácido 6-(2-(metilsulfonil)pirimidin-5-il)hex-5-inoico (100 mg, 0.373 mmol) en DMF (1 ml) y a continuación se añadieron HATU (142 mg, 0.373 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (120 mg, 0.93 mmol). El sistema se agitó durante 30 minutos y a continuación se añadió el compuesto A3.4 (122 mg, 0.371 mmol). El líquido de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que la reacción se completara, lo cual se detectó mediante LC-MS, el líquido de reacción se purificó directamente mediante cromatografía de fase inversa en una columna C18 (sistema de acetonitrilo y una solución acuosa de ácido fórmico al 0.05 %) para obtener el compuesto diana N^6,N^6 -dipropil- N^2 -((6-(2-(metilsulfonil)pirimidin-5-il)hex-5-inoil)-L-valina)-L-lisina (compuesto A3.5, 50 mg, rendimiento de un 28 %) como un sólido de color amarillo pálido.

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 580.0:

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.24 (s, 2H), 7.98-7.93 (m, 2H), 4.24-4.16 (m, 1H), 4.10 (d, $J = 5.2\text{Hz}$, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.79-2.64 (m, 6H), 2.55 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 2H), 2.45-2.26 (m, 2H), 2.06-1.91 (m, 1H), 1.89-1.78 (m, 2H), 1.76-1.66 (m, 1H), 1.64-1.57 (m, 1H), 1.57-1.42 (m, 6H), 1.37-1.24 (m, 2H), 0.93-0.78 (m, 12H).

Ejemplo 1.4: Síntesis del enlazador-toxina (LP62)



Paso 1: El compuesto A3.5 (43 mg, 0.074 mmol) y el compuesto A2.3 (40 mg, 0.074 mmol) se disolvieron en 1 ml de DMF y a continuación se añadieron secuencialmente HBTU (28 mg, 0.075 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (24 mg, 0.187 mmol). El líquido de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que la reacción se completara, lo cual se detectó mediante LC-MS, el líquido de reacción se purificó directamente mediante cromatografía preparativa (una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.01 %, acetonitrilo) para obtener el compuesto diana LP62 como una sal de tipo trifluoroacetato (8.5 mg, rendimiento de un 10 %) en forma de un sólido amarillo.

LC-MS (ESI) $[M+H]^+$: 1098.6:

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.10 (s, 2H), 9.03 (s, 1H), 8.64 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.19 (m, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.66-4.52 (m, 2H), 4.31-4.21 (m, 1H), 4.19-4.10 (m, 1H), 3.74 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.49-3.48 (m, 2H), 3.40 (s, 3H),

3.15-3.06 (m,2H), 3.02-2.95 (m,6H), 2.59-2.52 (m, 3H), 2.41-2.29 (m, 2H), 2.50-1.90 (m, 2H), 1.91-1.77 (m, 6H), 1.63-1.57 (m, 6H), 1.31-1.29 (m,2H), 0.92-0.80 (m,15H).

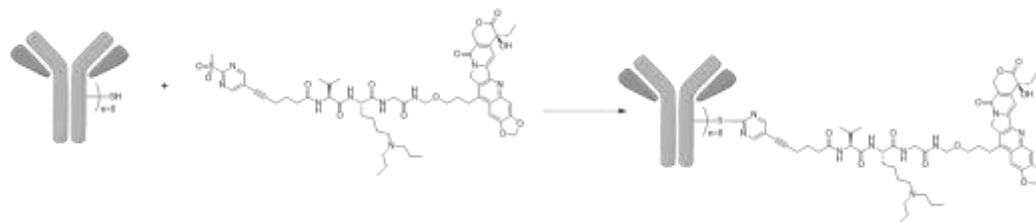
Ejemplo 2. Preparación del anticuerpo

A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anti-PDL1 utilizado en la presente descripción se describen en el Listado de secuencias.

En general, el anticuerpo se preparó de la siguiente manera: Se construyó una línea celular CHO estable que expresaba y secretaba un anticuerpo anti-PDL1. La línea celular CHO estable se cultivó en un medio de cultivo adecuado. Se recolectó un sobrenadante del cultivo y se sometió secuencialmente a una filtración en profundidad, cromatografía de afinidad en una columna de proteína A, desactivación de virus, filtración, cromatografía aniónica, cromatografía catiónica, nanofiltración/ultrafiltración y otros procesos. Finalmente, se obtuvo un anticuerpo diana.

Ejemplo 3. Preparación y detección del conjugado de anticuerpo-fármaco

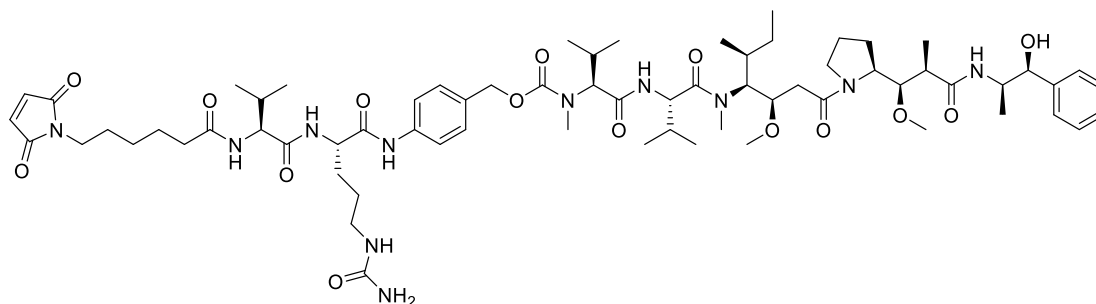
Ejemplo 3.1. Preparación de MAB20-LP62



en donde $n = 8$, lo que indica la relación molar del enlazador-fármaco cargado respecto al anticuerpo.

Se colocaron 2-5 ml del anticuerpo anti-PDL1 MAB20 (anti-PDL1_mAb, 10-30 mg/ml) en un reactor de conjugación de anticuerpos dedicado. Se añadió EDTA con una concentración final de 10-20 mM y a continuación se ajustó el pH hasta 5.5-7.5 con una solución de hidrogenofosfato disódico 0.5-1 M. Se añadió lentamente TCEP 10-20 mM (tris(2-carboxietil)fosfina, 4-10 eq., 0.1-0.8 ml) y la mezcla se mezcló uniformemente y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 50-80 minutos. Después de que se completara la

mediante cromatografía catiónica, el tampón del sistema se reemplazó con PB 20-50 mM, pH 5.5-7.5, utilizando Amicon Ultra-15 para obtener MAB20-VC-MMAE, un producto conjugado del anticuerpo anti-PDL1 MAB20 y MC-VC-PAB-MMAE. El valor DAR y el contenido en monómero de este se verificaron mediante análisis de LC-MS, HIC y HPLC-SEC y cumplieron los estándares.



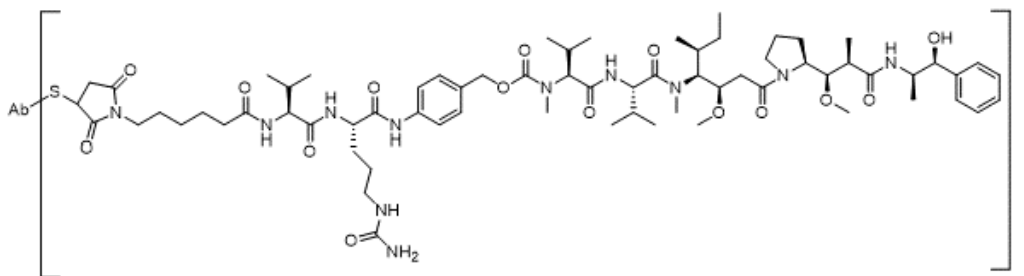
MC-VC-PABC-MMAE

Nombre de la muestra	Agregado (%)	Pico principal (%)	Fragmento (%)
MAB20-VC-MMAE	0.8	98.6	0.6

Nombre de la muestra	Cadena	DAR para LC/HC	DAR para IgG
MAB20-VC-MMAE	LC (cadena ligera)	0.6	4.00
	HC (cadena pesada)	1.40	

Valor DAR para la muestra de conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco

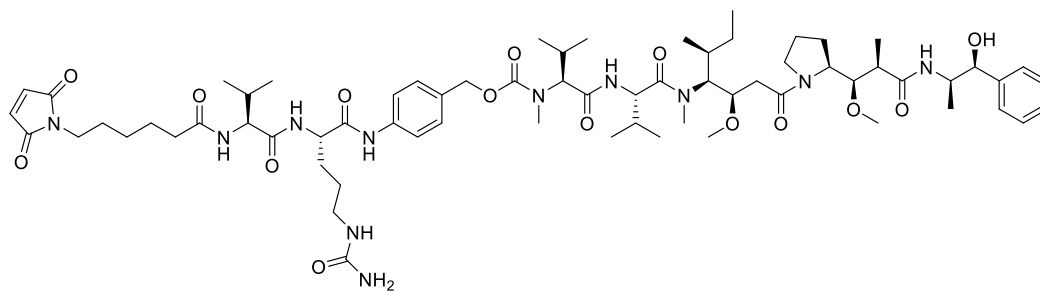
Ejemplo 3.3. Preparación del ADC de referencia SGN-PDL1V



Estructura de SGN-PDL1V (en la que Ab era el resto de anticuerpo de SGN-PDL1V y k era el valor DAR)

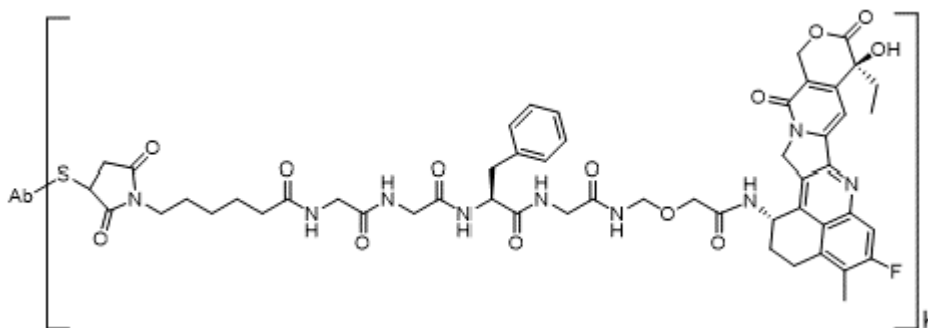
SGN-PDL1V se puede preparar haciendo referencia al método descrito en el documento WO 2021067776 A1. Como alternativa, se puede preparar de la siguiente

manera: se colocaron 2-5 ml del resto de anticuerpo de SGN-PDL1V (10-30 mg/ml) en un reactor de conjugación de anticuerpos dedicado. Se añadió EDTA con una concentración final de 10-20 mM y a continuación se ajustó el pH hasta 5.5-7.5 con una solución de hidrogenofosfato disódico 0.5-1 M. Se añadió lentamente TCEP 10-20 mM (tris(2-carboxietil)fosfina, 2-4 eq., 0.1-0.8 ml) y la mezcla se mezcló uniformemente y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 50-80 minutos. Después de que se completara la reacción de reducción del anticuerpo, se añadió una solución de enlazador-toxina MC-VC-PAB-MMAE (cuya estructura era como se muestra más adelante) (4-15 eq., 1-10 μmol) que se había disuelto previamente en sulfóxido de dimetilo (DMSO) o disolvente DMAC al sistema de solución anterior, y el sistema se agitó y se mezcló uniformemente y se dejó a temperatura ambiente durante 100-150 minutos. Después de una purificación mediante cromatografía catiónica, el tampón del sistema se reemplazó con PB 20-50 mM, pH 5.5-7.5, utilizando Amicon Ultra-15 para obtener SGN-PDL1V, un producto conjugado del resto de anticuerpo de SGN-PDL1V y MC-VC-PAB-MMAE. El valor DAR (DAR₄) y el contenido en monómero de este se verificaron mediante análisis de LC-MS, HIC y HPLC-SEC y cumplieron los estándares.



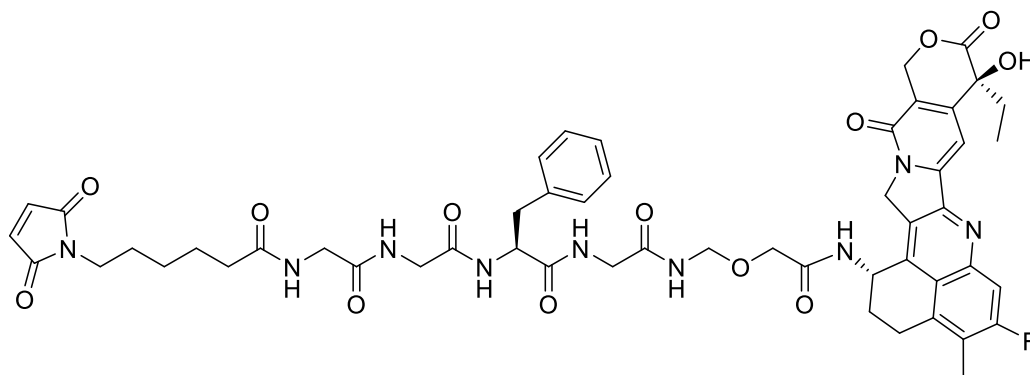
MC-VC-PABC-MMAE

Ejemplo 3.4. Preparación del ADC de referencia MAB20-GGFG-DXD



Estructura de MAB20-GGFG-DXD (en la que Ab era MAB20 y k era el valor DAR)

Se preparó MAB20-GGFG-DXD de acuerdo con un método general de la técnica anterior. Específicamente, se tomaron 2-5 ml del anticuerpo anti-PDL1 MAB20 (anti-PDL1_mAb, 10-25 mg/ml) y se colocaron en un tubo de reacción. Se añadió EDTA con una concentración final de 10-20 mM y a continuación se ajustó el pH hasta 6.0-7.5 con una solución de hidrogenofosfato disódico 0.5-1 M. Se añadió lentamente TCEP 10-20 mM (tris(2-carboxietil)fosfina, 4-10 eq., 0.1-0.4 ml) y la mezcla se mezcló uniformemente y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 50-80 minutos. Después de que se completara la reacción de reducción de MAB20, se añadió una solución de enlazador-toxina MC-GGFG-DXD (cuya estructura era como se muestra más adelante) (8-12 eq., 2-10 μ mol) que se había disuelto previamente en sulfóxido de dimetilo (DMSO) o disolvente DMAC al sistema de solución anterior, y el sistema se agitó y se mezcló uniformemente y se dejó a temperatura ambiente durante 100-150 minutos. El tampón del sistema se reemplazó con PB 10-50 mM o clorhidrato de histidina-histidina, pH 5.5-7.5, utilizando Amicon Ultra-15 para obtener MAB20-GGFG-DXD, un producto conjugado de MAB20 y el enlazador-toxina MC-GGFG-DXD. El valor DAR y el contenido en monómero de este se verificaron mediante análisis de LC-MS, HIC y HPLC-SEC y cumplieron los estándares.



MC-GGFG-DXD

Ejemplo 3.5: Análisis del conjugado de anticuerpo-fármaco mediante LC-MS para determinar la relación de fármaco cargado : anticuerpo (DAR)

Se redujo una muestra de conjugado de anticuerpo-fármaco con DTT a 37 °C durante 10 minutos y a continuación se analizó el valor DAR del conjugado utilizando LC-MS. Específicamente, la muestra reducida se inyectó en un sistema de LC-MS (sistema de LC Agilent 1290 Infinity II y Agilent 6545XT AdvanceBio Q-TOF) dotado de una columna de fase inversa Acquity UPLC BEH C4 (Waters Corporation, 2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm, 300 Å). La relación de fármaco : anticuerpo (DAR) se calculó utilizando los resultados de LC-MS deconvolucionados proporcionados.

Ejemplo 4. Ensayo para determinar la afinidad del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco por células positivas para PDL1

Se recolectaron, respectivamente, células tumorales NCI-H292 y NCI-H441 cultivadas y sometidas a pases de forma habitual, se lavaron con PBS, se resuspendieron y se inocularon en una placa de 96 pocillos con una densidad de 1×10^6 células/pocillo/50 μl. A continuación, la muestra de prueba se diluyó con un gradiente utilizando, por ejemplo, un tampón FACS (PBS + 2 % de FBS), y después de la dilución, la muestra de prueba que se debía analizar y la muestra de control se añadieron secuencialmente a la placa de 96 pocillos inoculada con las células, en donde la muestra de control IgG1 era un control de isotipo κ de IgG1 humana, (adquirido en Beijing Sino Biological, Inc.). La placa de la muestra se incubó a 4 °C durante 0.5 h y se centrifugó, a continuación se eliminó el sobrenadante y se lavó con

300 µl/pocillo de tampón FACS. Posteriormente, se añadió una solución de detección de anticuerpo anti-IgG humana de cabra marcado fluorescentemente a la placa de la muestra (100 µl/pocillo) de una manera secuencial para la incubación con las células. La placa de la muestra se incubó a 4 °C durante 0.5 h y se lavó con 300 µl/pocillo de tampón FACS y, finalmente, las células se resuspendieron. El valor numérico de fluorescencia para cada muestra se detectó mediante un citómetro de flujo. Los datos se analizaron en GraphPad prism 8.1 y se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros.

Tal como se muestra en la FIG. 1A, MAB20-LP62 (DAR8) mostró una afinidad mejor por células NCI-H292 positivas para PDL1, y la afinidad de este fue comparable a la afinidad del anticuerpo no conjugado MAB20. De manera similar, tal como se muestra en la FIG. 1B, MAB20-LP62 (DAR8) mostró una afinidad mejor por células NCI-H441 positivas para PDL1.

Ejemplo 5. Ensayo para determinar la internalización del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en células positivas para PDL1

Se tomó un volumen de células NCI-H292 cultivadas y sometidas a pases de forma habitual y se centrifugó, a continuación se eliminó el sobrenadante y se realizó una resuspensión en un medio de cultivo celular (medio de cultivo RPMI-1640 + 10 % de FBS). Se inocularon 50 µl de la suspensión celular en una placa de 96 pocillos para su uso (1×10^5 células/pocillo). Se formuló un reactivo de marcaje de IgG Zenon™ pHrodo™ iFL sensible al pH (adquirido en ThermoFisher) con el medio de cultivo celular para formar 4x solución de trabajo 1 (480 nM). Este conjugado de tinte sensible al pH no emitió fluorescencia extracelularmente, sino que emitió fluorescencia brillante en un entorno ácido, incluidos los lisosomas. El material de prueba se formuló con el medio de cultivo celular para formar 4x solución de trabajo 2 (160 nM). Se tomaron por separado 25 µl de la solución de trabajo 1 y 25 µl de la solución de trabajo 2 y se añadieron a una placa de 96 pocillos, a continuación se mezclaron e incubaron. El líquido mezclado se pipeteó en 50 µl de la suspensión celular, se mezcló uniformemente y se colocó en una incubadora para su cultivo. Los materiales de prueba se tomaron en puntos temporales de 0, 2, 16, 24 h y se centrifugaron, y se eliminaron

los sobrenadantes. A continuación, el material resultante se lavó con 300 µl/pocillo de tampón FACS y se resuspendió, y se midió el valor de fluorescencia de cada muestra utilizando un citómetro de flujo.

Tal como se muestra en la FIG. 2, en comparación con los datos del control de isotipo de IgG1, la proporción de internalización de MAB20-LP62 (DAR8) y MAB20 aumentó a medida que el tiempo de incubación aumentó y alcanzó el máximo a las 4 h, lo que indica que el conjugado de anticuerpo anti-MAB20-fármaco MAB20-LP62 (DAR8) puede unirse eficazmente al antígeno PDL1 en la superficie celular e internalizarse en la ruta lisosomal intracelular.

Ejemplo 6. Ensayo para determinar la actividad de destrucción celular del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco

Se recolectan las células en fase de crecimiento exponencial y se cuentan las células viables utilizando un citómetro Vi-Cell XR. La suspensión celular se ajustó para obtener una concentración apropiada con un medio de cultivo. Se añadieron 80 µl/pocillo de la suspensión celular a una placa de cultivo celular. La muestra de prueba se diluyó con un gradiente (diluciones de factor 5). Se tomaron 20 µl de cada uno de los artículos de prueba diluidos y se añadieron a la suspensión celular en la placa de cultivo celular, y la placa de cultivo celular se colocó en una incubadora y se cultivó durante 72 horas. Después de 72 horas, se añadieron 50 µl/pocillo de una solución de CellTiter-Glo (adquirida en Promega) que se había descongelado por adelantado y equilibrado a temperatura ambiente según las instrucciones de operación de CellTiter-Glo. Los pocillos se mezclaron uniformemente con un agitador de placas de micropocillos durante 2 minutos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La señal de fluorescencia se midió utilizando un lector de placas Envision 2104. Los datos sin procesar se analizaron utilizando Graphpad prism 8.1 y se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros.

Tal como se muestra en la FIG. 3, MAB20-LP62 (DAR8) mostró unos efectos de destrucción celular más potentes en células tumorales NCI-H292, BXP-3 y NCI-H441 positivas para PDL1 insensibles a MAB20.

Ejemplo 7. Actividad de unión cruzada del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco a PDL1 de diferentes especies

Se diluyeron por separado dominios extracelulares (ECD) de PDL1 derivados de ser humano, macaco cangrejero, rata y ratón con 1x PBS hasta una concentración de trabajo de 2 µg/ml, como soluciones de recubrimiento de ELISA. La placa de prueba se lavó 3 veces con PBST (PBS con un 0.05 % de Tween 20). La placa se incubó con una solución de bloqueo que era un tampón de bloqueo SuperBlock T20 (PBS) (60 µl/pocillo) a temperatura ambiente, a continuación la muestra de prueba se diluyó con un gradiente y a continuación las muestras diluidas se cargaron por separado en una placa de prueba y se incubaron a temperatura ambiente. La placa de prueba se lavó y se añadió un anticuerpo anti-IgG humana de cabra marcado con enzima HRP como anticuerpo secundario, y a continuación se incubó. La placa de prueba se lavó y se añadió una solución de parada (30 µl/pocillo), a continuación se centrifugó. Se leyó la absorbancia de la luz a una longitud de onda de 450 nm. Los datos sin procesar se analizaron utilizando Graphpad prism 8.1 y se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros.

Tal como se muestra en la FIG. 4, la afinidad de unión de MAB20-LP62 por ECD de PDL1 de macaco cangrejero y ratón fue parecida a la de ECD de PDL1 humano, con valores de CE50 de 0.039 nM, 0.094 nM y 0.054 nM, respectivamente. MAB20-LP62 (DAR8) mostró una unión específica débil a ECD de PDL1 de rata.

Ejemplo 8. Ensayo para determinar el efecto de vecindad del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco

Se recolectaron células MDA-MB-468 de un tumor negativo para PDL1 en la fase de crecimiento exponencial y se contaron las células viables utilizando un citómetro Vi-Cell XR. La suspensión celular se ajustó para obtener una concentración apropiada con un medio de

cultivo. Se añadieron 80 µl/pocillo de la suspensión celular a una placa de cultivo celular. El fármaco de prueba se diluyó con un gradiente (diluciones de factor 5). Se tomaron 20 µl de cada uno de los artículos de prueba diluidos y se añadieron a la suspensión celular en la placa de cultivo celular, y la placa de cultivo celular se colocó en una incubadora y se cultivó durante 96 horas. Se añadieron 50 µl/pocillo de una solución de CellTiter-Glo (adquirida en Promega) que se había descongelado por adelantado y equilibrado a temperatura ambiente según las instrucciones de operación de CellTiter-Glo. Los pocillos se mezclaron uniformemente con un agitador de placas de micropocillos durante 2 minutos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La señal de fluorescencia se midió utilizando un lector de placas Envision 2104.

Se recolectaron células HEK293 que sobreexpresaban PDL1 en la fase de crecimiento exponencial y se contaron las células viables utilizando un citómetro Vi-Cell XR. La suspensión celular se ajustó para obtener una concentración apropiada con un medio de cultivo. Se añadieron 80 µl/pocillo de la suspensión celular a una placa de cultivo celular. El fármaco de prueba se diluyó con un gradiente (diluciones de factor 5). Se tomaron 20 µl de cada uno de los artículos de prueba diluidos y se añadieron a la suspensión celular en la placa de cultivo celular, y la placa de cultivo celular se colocó en una incubadora y se cultivó durante 96 horas. Después de 96 horas, se recolectó el sobrenadante de un medio acondicionado a partir de las células HEK293 que sobreexpresaban PDL1 y se transfirió en un volumen equivalente para cultivar células MDA-MB-468. Después de un cultivo continuado durante 96 horas, se añadieron 50 µl/pocillo de una solución de CellTiter-Glo (adquirida en Promega) que se había descongelado por adelantado y equilibrado a temperatura ambiente según las instrucciones de operación de CellTiter-Glo. Los pocillos se mezclaron uniformemente con un agitador de placas de micropocillos durante 2 minutos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La señal de fluorescencia se midió utilizando un lector de placas Envision 2104.

Tal como se muestra en las FIGs. 5A y 5B, MAB20-LP62 (DAR8) presentó un efecto de vecinidad significativo.

Ejemplo 9. Ensayo para determinar la inmunotoxicidad del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco

Dado que algunas células inmunitarias humanas tales como las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, etc.) expresan PDL1, la inmunotoxicidad de los fármacos conjugados con anticuerpos dirigidos a PDL1 es un problema inevitable. Se digirieron células dendríticas y macrófagos humanos, después de una diferenciación inducida, y se contaron las células viables utilizando un citómetro Vi-Cell XR. La suspensión celular se ajustó para obtener una concentración apropiada con un medio de cultivo. Se añadieron 80 µl/pocillo de la suspensión celular a una placa de cultivo celular, que se complementó con 500 UI/ml de IFN-γ. El fármaco de prueba se diluyó con un gradiente (diluciones de factor 5). Se tomaron 20 µl de cada uno de los artículos de prueba diluidos y se añadieron a la suspensión celular en la placa de cultivo celular, y la placa de cultivo celular se colocó en una incubadora y se cultivó durante 96 horas. Se añadieron 50 µl/pocillo de una solución de CellTiter-Glo (adquirida en Promega) que se había descongelado por adelantado y equilibrado a temperatura ambiente según las instrucciones de operación de CellTiter-Glo. Los pocillos se mezclaron uniformemente con un agitador de placas de micropocillos durante 2 minutos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La señal de fluorescencia se midió utilizando un lector de placas Envision 2104. Se utilizó SGN-PDL1V como una de las moléculas de control, la cual se divulga en la Patente de EE. UU. N.º US 20210101982 A1.

Tal como se muestra en las FIGs. 6 y 7, la molécula de control SGN-PDL1V mostró una inmunotoxicidad similar en macrófagos y células dendríticas *in vitro* en comparación con el ADC de control de isotipo (IgG1-MMAE); sin embargo, cuando la concentración estuvo por encima de 20 nM, SGN-PDL1V dio como resultado una destrucción no específica de ambas células inmunitarias. Por el contrario, MAB20-LP62 (DAR8) no mostró citotoxicidad

significativa para macrófagos ni células dendríticas incluso con concentraciones elevadas (500 nM). Como resultado, MAB20-LP62 presentó una inmunotoxicidad insignificante y una mayor seguridad en comparación con SGN-PDL1V.

Ejemplo 10. Actividad antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en un modelo de ratón NCG inoculado por vía subcutánea con células de cáncer de mama humano MDA-MB-231

Se cultivaron células MDA-MB-231 en un medio de cultivo de crecimiento (RPMI 1640 + 10 % de FBS + IL15). Se recolectaron las células en la fase de crecimiento logarítmico, se lavaron dos veces con DPBS y se utilizaron para la inoculación. Las células se resuspendieron con PBS y la matriz Matrixgel en una relación de 1:1, las células MDA-MB-231 ($5 \times 10^6/100 \mu\text{l/ratón}$) se inocularon por vía subcutánea en la parte posterior derecha de los ratones a la edad de 6-7 semanas. Una vez que el tumor había crecido hasta un volumen promedio de 204.54 mm^3 , los ratones se agruparon aleatoriamente en función del tamaño del tumor y se le suministró la dosis, garantizando unos volúmenes tumorales similares entre los grupos. El día del agrupamiento se definió como el día 0. Después de iniciar la administración, se midieron el peso corporal y el tamaño del tumor de los ratones dos veces a la semana, y los ratones recibieron la dosis una vez a la semana, durante tres dosis. Se registraron los síntomas clínicos observados durante el experimento. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: volumen tumoral (mm^3) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (en donde a representaba el diámetro largo y b representaba el diámetro corto).

Tal como se muestra en la FIG. 8, el día 35 después de la dosis, en comparación con el grupo de control (MAB20, 8 mg/kg, tasa de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) de un 21.26 %), tanto MAB20-LP62 (DAR4) (3 mg/kg y 8 mg/kg) como MAB20-LP62 (DAR8) (3 mg/kg y 8 mg/kg) presentaron ambos una inhibición del crecimiento tumoral significativa, con un valor de TGI de un 46.89 % ($p < 0.001$), 74.50 % ($p < 0.001$), 80.33 % ($p < 0.001$) y 92.91 % ($p < 0.001$), respectivamente. MAB20-LP62 (DAR8) exhibió unos efectos antitumorales significativos con dosis bajas. En comparación con los conjugados de anticuerpo-fármaco

MAB20-VC-MMAE (DAR4) (3 mg/kg, TGI de un 38.79 %) y MAB20-GGFG-DXD (DAR8) (3 mg/kg, TGI de un 44.60 %; 8 mg/kg, TGI de un 72.98 %) contruidos basándose en una técnica de conjugación de la técnica anterior, MAB20-LP62 (DAR8) mostró una actividad antitumoral significativamente excelente. Ninguno de los animales experimentó una pérdida de peso corporal significativa a lo largo del periodo de tratamiento.

Ejemplo 11. Actividad antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en un modelo de ratón NCG inoculado por vía subcutánea con células BxPC3 de cáncer pancreático humano con una expresión baja de PDL1

Se cultivaron células BxPC3 en un medio de cultivo de crecimiento (RPMI 1640 + 10 % de FBS). Se recolectaron las células en la fase de crecimiento logarítmico, se lavaron dos veces con DPBS y se utilizaron para la inoculación. Las células se resuspendieron con PBS y la matriz Matrixgel en una relación de 1:1. Las células BxPC3 ($5 \times 10^6/100 \mu\text{l/ratón}$) se inocularon por vía subcutánea en la parte posterior derecha de los ratones a la edad de 7-8 semanas. Una vez que el tumor había crecido hasta un volumen promedio de 210.90 mm^3 , los ratones se agruparon aleatoriamente en función del tamaño del tumor y se le suministró la dosis, garantizando unos volúmenes tumorales similares entre los grupos. El día del agrupamiento se definió como el día 0. Después de iniciar la administración, se midieron el peso corporal y el tamaño del tumor de los ratones dos veces a la semana, y los ratones recibieron la dosis una vez a la semana, durante tres dosis. Se registraron los síntomas clínicos observados durante el experimento. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: $\text{volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 1/2 \times (a \times b^2)$ (en donde a representaba el diámetro largo y b representaba el diámetro corto).

Tal como se muestra en la FIG. 9, el día 35 después de la dosis, en comparación con el grupo de control (MAB20) (TGI de un -28.31 %), MAB20-LP62 (DAR4) (8 mg/kg) y MAB20-LP62 (DAR8) (8 mg/kg) mostraron ambos ciertos efectos inhibidores de tumores, con valores de TGI de un 14 % y un 40.9 %, respectivamente. En comparación con los otros fármacos de prueba MAB20-VC-MMAE (DAR4) (3 mg/kg, TGI de un -6.79 %) y MAB20-GGFG-DXD

(DAR8) (3 mg/kg, TGI de un -18.00 %; 8 mg/kg, TGI de un -0.12 %), solo MAB20-LP62 consiguió un efecto inhibitor del crecimiento tumoral en modelos con una expresión baja de PDL1. Ninguno de los animales experimentó una pérdida de peso corporal significativa a lo largo del periodo de tratamiento.

Ejemplo 12. Efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones atímicos BALB/c con xenoinjerto PDX de cáncer de pulmón no microcítico humano LU6437

Se recolectó un tejido tumoral regenerado a partir de ratones portadores de un tumor LU6437 de un modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón HuPrime® y se cortó en bloques tumorales con un diámetro de 2-3 mm, que se inocularon por vía subcutánea en la escápula anterior derecha de ratones atímicos BALB/c. Una vez que el tumor había crecido hasta un volumen de aproximadamente 200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en función del tamaño del tumor, garantizando que cada grupo tenía un volumen tumoral similar. El volumen promedio fue de 253.70 mm³ en los grupos reales. El día del agrupamiento se definió como el día 0. Después de iniciar la administración, los ratones recibieron la dosis una vez a la semana, durante tres dosis, y se midieron el peso corporal y el tamaño del tumor de los ratones dos veces a la semana. Se registraron los síntomas clínicos observados durante el experimento. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: volumen tumoral (mm³) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (en donde a representaba el diámetro largo y b representaba el diámetro corto).

Cabe destacar que el experimento previo preliminar había mostrado una toxicidad gravemente letal de SGN-PDL1V con una dosis de 8 mg/kg para los ratones. Por consideraciones éticas, el grupo experimental no se estableció en el diseño experimental.

Tal como se muestra en la FIG. 10, en el modelo LU6437 de PDX de cáncer de pulmón no microcítico humano resistente a anticuerpos monoclonales anti-PD1, MAB20-LP62 con una dosis de 1 mg/kg (día 21, TGI de un -0.16 %), 3 mg/kg (día 21, TGI de un 43.23 %) y 8 mg/kg (día 21, TGI de un 106.85 %) exhibió en todos los casos unos efectos

inhibidores del tumor mejores que la molécula de control SGN-PDL1V (1 mg/kg, día 21, TGI de un -15.17 %; 3 mg/kg, día 21, TGI de un 24.11 %). MAB20-LP62 con una dosis de 8 mg/kg presentó el efecto inhibidor del tumor más potente. Ninguno de los animales experimentó una pérdida de peso corporal significativa a lo largo del periodo de tratamiento.

Ejemplo 13. Efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones NU/NU con xenoinjerto PDX de cáncer de hígado positivo para PDL1 humano LD1-0011-200617

Se regeneró un modelo de cáncer de hígado LD1-0011-200617 derivado de ser humano en ratones NCG. Una vez que el tumor había crecido hasta 500-800 mm³, se extirpó el tejido tumoral quirúrgicamente de forma aséptica y se retiraron los tejidos no tumorales y tejidos necróticos. El tejido tumoral se extrajo y se cortó uniformemente en bloques de tejido (aproximadamente 30-60 mg) de aproximadamente 3 mm × 3 mm × 3 mm de tamaño y a continuación se inocularon por vía subcutánea en el costado derecho de ratones NU/NU. Una vez que el volumen tumoral promedio de los ratones para la agrupación alcanzó 155.24 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente de acuerdo con el tamaño del volumen tumoral, asegurando unos volúmenes tumorales similares entre los grupos. El día del agrupamiento se definió como el día 0. Después de iniciar la administración, se midieron el peso corporal y el tamaño del tumor de los ratones dos veces a la semana, y los ratones recibieron la dosis una vez a la semana, durante tres dosis. Se registraron los síntomas clínicos observados durante el experimento. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: volumen tumoral (mm³) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (en donde a representaba el diámetro largo y b representaba el diámetro corto).

Tal como se muestra en la FIG. 11, en el modelo de PDX de cáncer de hígado positivo para PDL1 LD1-0011-200617, el valor de TGI para MAB20 con una dosis de 10 mg/kg fue de un 30.3 % el día 21 después del tratamiento. Por el contrario, MAB20-LP62 (DAR8) presentó unos efectos inhibidores del tumor dependientes de la dosis para ambas dosis de 3 mg/kg (día 21, TGI de un 75.24 %) y 10 mg/kg (día 21, TGI de un 89.51 %). La dosis más elevada

de MAB20-LP62 (DAR8) presentó el efecto inhibidor del tumor más potente. Ninguno de los animales experimentó una pérdida de peso corporal significativa a lo largo del periodo de tratamiento.

Ejemplo 14. Efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones NCG con xenoinjerto PDX de carcinoma escamoso de cabeza y cuello positivo para PDL1 humano LD1-2023-411020

Se regeneró un modelo de carcinoma escamoso de cabeza y cuello positivo para PDL1 derivado de ser humano LD1-2023-411020 en ratones NCG. Una vez que el tumor había crecido hasta 500-800 mm³, se extirpó el tejido tumoral quirúrgicamente de forma aséptica y se retiraron los tejidos no tumorales y tejidos necróticos. El tejido tumoral se extrajo y se cortó uniformemente en bloques de tejido (aproximadamente 20-30 mg) de aproximadamente 3 mm × 3 mm × 3 mm de tamaño y a continuación se inocularon por vía subcutánea en el costado derecho de ratones NCG. Una vez que el volumen tumoral promedio de los ratones para la agrupación alcanzó 138.88 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente de acuerdo con el tamaño del volumen tumoral, asegurando unos volúmenes tumorales similares entre los grupos. El día del agrupamiento se definió como el día 0. Después de iniciar la administración, se midieron el peso corporal y el tamaño del tumor de los ratones dos veces a la semana, y los ratones recibieron la dosis una vez a la semana, durante tres dosis. Se registraron los síntomas clínicos observados durante el experimento. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: volumen tumoral (mm³) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (en donde a representaba el diámetro largo y b representaba el diámetro corto).

Tal como se muestra en la FIG. 12, en el modelo de PDX de carcinoma escamoso de cabeza y cuello positivo para PDL1 humano resistente a anticuerpos monoclonales anti-PD1 LD1-2023-411020, MAB20 con una dosis de 10 mg/kg no exhibió ningún efecto inhibidor del tumor (día 28, TGI de un -34.46 %) y el fármaco cargado libre A1.3 tampoco exhibió ningún efecto inhibidor del tumor (día 28, TGI de un -8.74 %); sin embargo, MAB20-LP62 (DAR8) con la misma dosis (día 28, TGI de un 102.31 %) exhibió un efecto inhibidor del tumor

potente. Ninguno de los animales experimentó una pérdida de peso corporal significativa a lo largo del periodo de tratamiento.

Ejemplo 15. Efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones atímicos Balb/c con xenoinjerto PDX de cáncer de cuello uterino positivo para PDL1 humano LD1-0010-200614

Se regeneró un modelo de cáncer de cuello uterino positivo para PDL1 derivado de ser humano LD1-0010-200614 en ratones atímicos Balb/c. Una vez que el tumor había crecido hasta 500-800 mm³, se extirpó el tejido tumoral quirúrgicamente de forma aséptica y se retiraron los tejidos no tumorales y tejidos necróticos. El tejido tumoral se extrajo y se cortó uniformemente en bloques de tejido (aproximadamente 25-35 mg) de aproximadamente 3 mm × 3 mm × 3 mm de tamaño y a continuación se inocularon por vía subcutánea en el costado derecho de ratones atímicos Balb/c. Una vez que el volumen tumoral promedio de los ratones para la agrupación alcanzó 146.74 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente de acuerdo con el tamaño del volumen tumoral, asegurando unos volúmenes tumorales similares entre los grupos. El día del agrupamiento se definió como el día 0. Después de iniciar la administración, se midieron el peso corporal y el tamaño del tumor de los ratones dos veces a la semana, y los ratones recibieron la dosis una vez a la semana, durante tres dosis. Se registraron los síntomas clínicos observados durante el experimento. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: volumen tumoral (mm³) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (en donde a representaba el diámetro largo y b representaba el diámetro corto).

Tal como se muestra en la FIG. 13, en el modelo de PDX de cáncer de cuello uterino positivo para PDL1 humano LD1-0010-200614, MAB20 con una dosis de 10 mg/kg (día 35, TGI de un 67.38 %) exhibió un efecto inhibidor del tumor medio y el fármaco cargado libre A1.3 exhibió un efecto inhibidor del tumor medio (día 35, TGI de un 56.5 %); sin embargo, MAB20-LP62 (DAR8) con la misma dosis (día 35, TGI de un 109.33 %) exhibió un efecto inhibidor del tumor potente. Ninguno de los animales experimentó una pérdida de peso corporal significativa a lo largo del periodo de tratamiento.

Ejemplo 16. Efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones atímicos Balb/c con xenoinjerto PDX de carcinoma escamoso de esófago positivo para PDL1 humano LD1-0015-362448

Se regeneró un modelo de carcinoma escamoso de esófago positivo para PDL1 derivado de ser humano LD1-0015-362448 en ratones atímicos Balb/c. Una vez que el tumor había crecido hasta 500-800 mm³, se extirpó el tejido tumoral quirúrgicamente de forma aséptica y se retiraron los tejidos no tumorales y tejidos necróticos. El tejido tumoral se extrajo y se cortó uniformemente en bloques de tejido (aproximadamente 25-35 mg) de aproximadamente 3 mm × 3 mm × 3 mm de tamaño y a continuación se inocularon por vía subcutánea en el costado derecho de ratones atímicos Balb/c. Una vez que el volumen tumoral promedio de los ratones para la agrupación alcanzó 140.46 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente de acuerdo con el tamaño del volumen tumoral, asegurando unos volúmenes tumorales similares entre los grupos. El día del agrupamiento se definió como el día 0. Después de iniciar la administración, se midieron el peso corporal y el tamaño del tumor de los ratones dos veces a la semana, y los ratones recibieron la dosis una vez a la semana, durante tres dosis. Se registraron los síntomas clínicos observados durante el experimento. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: volumen tumoral (mm³) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (en donde a representaba el diámetro largo y b representaba el diámetro corto).

Tal como se muestra en la FIG. 14, en el modelo de PDX de carcinoma escamoso de esófago positivo para PDL1 humano LD1-0015-362448, MAB20-LP62 (DAR8) con una dosis de 10 mg/kg (día 45, TGI de un 92.02 %) exhibió un efecto inhibitor del tumor potente. Ninguno de los animales experimentó una pérdida de peso corporal significativa a lo largo del periodo de tratamiento.

Ejemplo 17. Efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones NU/NU con xenoinjerto PDX de cáncer gástrico positivo para PDL1 humano LD1-0017-200636

Se regeneró un modelo de cáncer gástrico positivo para PDL1 derivado de ser humano LD1-0017-200636 en ratones NU/NU. Una vez que el tumor había crecido hasta 500-800 mm³, se extirpó el tejido tumoral quirúrgicamente de forma aséptica y se retiraron los tejidos no tumorales y tejidos necróticos. El tejido tumoral se extrajo y se cortó uniformemente en bloques de tejido (aproximadamente 30-60 mg) de aproximadamente 3 mm × 3 mm × 3 mm de tamaño y a continuación se inocularon por vía subcutánea en el costado derecho de ratones NU/NU. Una vez que el volumen tumoral promedio de los ratones para la agrupación alcanzó 138.70 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente de acuerdo con el tamaño del volumen tumoral, asegurando unos volúmenes tumorales similares entre los grupos. El día del agrupamiento se definió como el día 0. Después de iniciar la administración, se midieron el peso corporal y el tamaño del tumor de los ratones dos veces a la semana, y los ratones recibieron la dosis una vez a la semana, durante tres dosis. Se registraron los síntomas clínicos observados durante el experimento. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: volumen tumoral (mm³) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (en donde a representaba el diámetro largo y b representaba el diámetro corto).

Tal como se muestra en la FIG. 15, en el modelo de PDX de cáncer gástrico positivo para PDL1 humano LD1-0017-200636, 10 mg/kg de MAB20 mostraron un valor de TGI de un 14.89 % el día 21 y el fármaco cargado libre A1.3 mostró un valor de TGI de un 34.12 %; sin embargo, 10 mg/kg de MAB20-LP62 (DAR8) (día 21, TGI de un 108.18 %) mostraron un efecto inhibidor del tumor potente. Ninguno de los animales experimentó una pérdida de peso corporal significativa a lo largo del periodo de tratamiento.

Ejemplo 18. Efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-PDL1-fármaco en ratones NU/NU con xenoinjerto PDX de cáncer colorrectal positivo para PDL1 humano LD1-2013-362125

Se regeneró un modelo de cáncer colorrectal positivo para PDL1 derivado de ser humano LD1-2013-362125 en ratones NU/NU. Una vez que el tumor había crecido hasta 500-800 mm³, se extirpó el tejido tumoral quirúrgicamente de forma aséptica y se retiraron los

tejidos no tumorales y tejidos necróticos. El tejido tumoral se extrajo y se cortó uniformemente en bloques de tejido (aproximadamente 25-35 mg) de aproximadamente 3 mm × 3 mm × 3 mm de tamaño y a continuación se inocularon por vía subcutánea en el costado derecho de ratones NU/NU. Una vez que el volumen tumoral promedio de los ratones para la agrupación alcanzó 156.99 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente de acuerdo con el tamaño del volumen tumoral, asegurando unos volúmenes tumorales similares entre los grupos. El día del agrupamiento se definió como el día 0. Después de iniciar la administración, se midieron el peso corporal y el tamaño del tumor de los ratones dos veces a la semana, y los ratones recibieron la dosis una vez a la semana, durante tres dosis. Se registraron los síntomas clínicos observados durante el experimento. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: volumen tumoral (mm³) = $1/2 \times (a \times b^2)$ (en donde a representaba el diámetro largo y b representaba el diámetro corto).

Tal como se muestra en la FIG. 16, en el modelo de PDX de cáncer colorrectal positivo para PDL1 humano LD1-2013-362125, 10 mg/kg de MAB20 mostraron un valor de TGI de un 50.27 % el día 31 y el fármaco cargado libre A1.3 mostró un valor de TGI de un 37.16 %; sin embargo, MAB20-LP62 (DAR8) con la misma dosis (TGI de un 101.59 %) mostró un efecto inhibidor del tumor potente. Ninguno de los animales experimentó una pérdida de peso corporal significativa a lo largo del periodo de tratamiento.

Además de las diversas realizaciones representadas y reivindicadas, la materia en cuestión divulgada también se refiere a otras realizaciones que tienen otras combinaciones de las características divulgadas y reivindicadas en el presente documento. En este sentido, las características particulares expuestas en el presente documento se pueden combinar entre sí de otras maneras dentro del alcance de la materia en cuestión divulgada, de modo que la materia en cuestión divulgada incluye cualquier combinación adecuada de las características divulgadas el presente documento. La descripción anterior de realizaciones específicas de la materia en cuestión divulgada se ha presentado con fines ilustrativos y

descriptivos. No se pretende que la descripción anterior sea exhaustiva ni que limite la materia en cuestión divulgada a las realizaciones divulgadas.

Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar diversas modificaciones y variaciones en las composiciones y métodos de la materia en cuestión divulgada sin alejarse de la naturaleza o el alcance de la materia en cuestión divulgada. Por tanto, se pretende que la materia en cuestión divulgada incluya modificaciones y variaciones que están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

En el presente documento se citan diversas publicaciones, patentes y solicitudes de patente, cuyo contenido se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.