

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 4 217 398

a nome: AbbVie Manufacturing Management Unlimited Company

a: Dublin, D02 R296 - IRLANDA

dal titolo: Coniugati anticorpo-farmaco anti-c-Met.

DESCRIZIONE

1. Riferimento incrociato a domande di brevetto correlate

Questa domanda di brevetto rivendica il beneficio della domanda di brevetto provvisoria U.S. con numero di serie 63/181.963, depositata il 29 aprile 2021.

2. Elenco delle sequenze

La presente domanda contiene un Elenco di sequenze che è stato presentato elettronicamente in formato ASCII. Detta copia ASCII, creata il 28 aprile 2022, è denominata 632WO_SL_ST25.txt e ha una dimensione di 22.918 byte.

3. Campo tecnico

La presente domanda di brevetto concerne, tra le altre cose, nuovi farmaci inibitori di topoisomerasi, linker di farmaci, coniugati anticorpo-farmaco anti-c-Met (ADC, Antibody Drug Conjugate) e metodi per realizzare gli stessi.

4. Sfondo

c-Met è un recettore di tirosina chinasi di segnalazione espresso sulla superficie di cellule epiteliali ed endoteliali. È stato mostrato che l'attivazione di c-Met da parte del fattore di crescita degli epatociti (HGF, Hepatocyte Growth Factor), il suo unico ligando noto, controlla proliferazione cellulare, angiogenesi, sopravvivenza e motilità cellulare.

Il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC, Non-Small Cell

Lung Cancer) rappresenta l'85% di tutti i cancri polmonari ed è la principale causa di morte correlata a cancro in tutto il mondo. La segnalazione di c-Met aberrante è comune nell'NSCLC e si ritiene che avvenga tramite molteplici meccanismi. La segnalazione di c-Met deregolata è stata associata a prognosi sfavorevole, tumorigenesi, resistenza a chemioterapia/radioterapia e resistenza acquisita a inibitori di tirosina chinasi (TKI, Tyrosine Kinase Inhibitor) del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor).

I coniugati anticorpo-farmaco-(ADC) rappresentano una classe relativamente nuova di terapie comprendenti un anticorpo coniugato a un farmaco citotossico tramite un linker chimico. Il concetto terapeutico di ADC è combinare le capacità di un anticorpo con un farmaco, dove l'anticorpo viene usato per erogare il farmaco a una cellula tumorale per mezzo di legame a un antigene di superficie bersaglio, inclusi antigeni di superficie bersaglio che sono sovraespressi o amplificati nelle cellule tumorali. US10543284 divulga coniugati anticorpo-farmaco che comprendono un anticorpo c-Met e alcuni derivati di camptotecina.

WO 2021/052402 divulga (formula D) un derivato di camptotecina che include un gruppo metilendioossano.

Tuttavia, non sono stati approvati coniugati anticorpo-farmaco per il trattamento di carcinoma polmonare non a piccole cellule. Rimane una necessità nell'arte di coniugati anticorpo-farmaco che possano essere usati a scopi terapeutici, come nel trattamento di carcinoma polmonare non a piccole cellule.

5. Sommario

La presente divulgazione fornisce coniugati anticorpo-farmaco che si legano specificamente a c-Met umano. Le sequenze di amminoacidi di CDR esemplificative, nonché la sequenza di amminoacidi delle regioni V_H e V_L delle

catene pesanti e leggere dell'anticorpo di ADC anti-c-Met esemplificativi sono fornite nella Descrizione dettagliata nel seguito.

In un altro aspetto, la presente divulgazione fornisce composizioni che includono gli ADC anti-c-Met descritti nel presente contesto. Le composizioni comprendono generalmente uno o più ADC anti-c-Met come descritto nel presente contesto, e uno o più eccipienti, veicoli o diluenti.

La presente divulgazione fornisce metodi per trattare soggetti, come soggetti umani, aventi NSCLC, comprendenti somministrare una quantità efficace di un ADC anti-c-Met divulgato nel presente contesto. Un ADC anti-c-Met viene tipicamente somministrato come un'infusione e/o iniezione endovenosa.

6. Breve descrizione dei disegni

La FIG. 1 mostra una via di sintesi per l'inibitore della topoisomerasi I (TOP1, topoisomerase I) di Formula I.

Le FIGG. 2A-2B mostrano proliferazione cellulare in seguito a somministrazione di composti inibitori di TOP1 per Calu-6 (adenocarcinoma polmonare; FIG. 2A) e A375 (melanoma maligno; FIG. 2B).

Le FIGG. 3A-3J mostrano attività in vitro di un ADC della presente divulgazione (ADC-1) su linee di cellule, incluse (A) SNU-5 (carcinoma gastrico umano), (B) Hs 746T (adenocarcinoma gastrico), (C) EBC1 (carcinoma squamocellulare polmonare umano), (D) NCI-H441 (adenocarcinoma polmonare umano), (E) NCI-H1573 (adenocarcinoma polmonare), (F) HCC827 (adenocarcinoma polmonare), (G) NCI-H820 (adenocarcinoma papillare polmonare), (H) Calu-3 (adenocarcinoma polmonare), (I) MIA PaCa-2 (adenocarcinoma duttale pancreatico) e (J) HEK-293.

Le FIGG. 4A-4B mostrano attività in vivo di ADC-1 nei modelli tumorali di

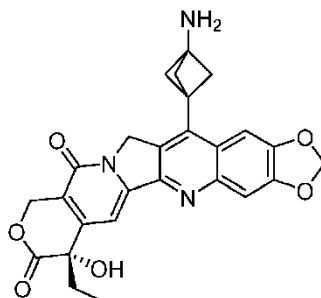
xenotrapianto NCI-H441 (adenocarcinoma umano, FIG. 4A) e Hs 746T (adenocarcinoma gastrico, FIG. 4B).

7. Descrizione dettagliata

Vari aspetti dell'invenzione riguardano inibitori della topoisomerasi I (TOP1) e coniugati farmaco-anticorpo anti-c-Met comprendenti tali inibitori TOP1. In certe forme di realizzazione, l'invenzione fornisce ADC anti-c-Met, inclusi ADC anti-c-Met comprendenti inibitori TOP1, sintoni utili per sintetizzare gli ADC, metodi per realizzare gli ADC e vari metodi per usare gli ADC.

7.1. Inibitori della topoisomerasi 1 (TOP1i)

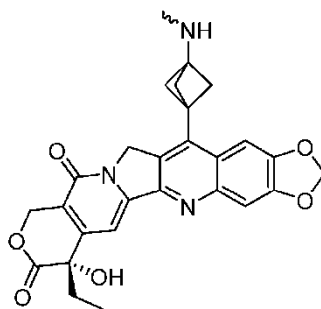
Topoisomerasi 1 (TOP1) rimuove i superavvolgimenti formati durante la replicazione del DNA. Gli inibitori di TOP1 (TOP1i) possono legare e stabilizzare complessi TOP1-DNA, inducendo rottura del filamento di DNA e apoptosi. Nel presente contesto viene presentato un farmaco inibitore della topoisomerasi I ("farmaco TOP1i") secondo la formula di struttura (I), che può essere destinato all'erogazione mirata a cellule mediante coniugazione a un anticorpo.



(I)

In forme di realizzazione, un farmaco TOP1i è un composto secondo formula (I). In forme di realizzazione, il farmaco TOP1i è (7S)-14-(3-amminobicyclo[1.1.1]pentan-1-il)-7-etil-7-idrossi-2H,10H-[1,3]diossolo[4,5-g]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-8,11(7H,13H)-dione, o una forma strutturalmente equivalente di esso.

Farmaci TOP1i come contemplato nel presente contesto possono essere coniugati a un anticorpo in un ADC come mostrato nella formula di struttura (II):



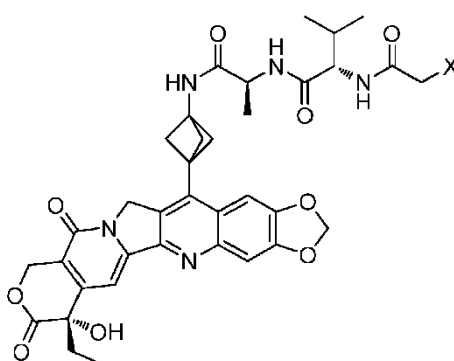
(II)

in cui  rappresenta il punto di attacco di un linker al farmaco TOP1i.

7.2. ADC anti-c-Met

Inibitori della topoisomerasi come descritto nel presente contesto possono essere coniugati a un anticorpo anti-c-Met per formare un coniugato anticorpo-farmaco (ADC) TOP1i anti-c-Met. I coniugati anticorpo-farmaco possono aumentare l'efficacia terapeutica degli anticorpi nel trattare malattie dovute all'abilità dell'ADC di erogare selettivamente uno o più raggruppamenti di farmaco a tessuti bersaglio, come un antigene tumore-associato, ad es., tumori esprimenti c-Met. Dunque, in forme di realizzazione, la presente divulgazione fornisce ADC TOP1i anti-c-Met per uso terapeutico, ad es., nel trattamento di carcinoma polmonare non a piccole cellule.

In certe forme di realizzazione, un farmaco TOP1i viene coniugato a un anticorpo per mezzo di un linker secondo la formula di struttura (III):



(III)

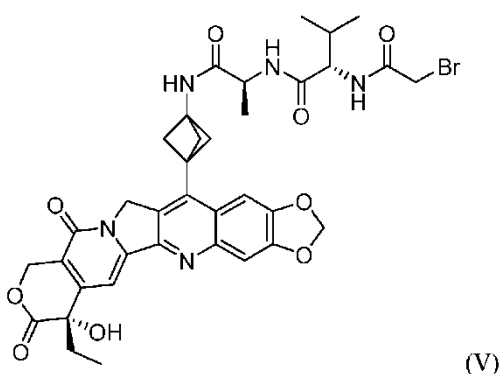
in cui X rappresenta bromo o una maleimmide N-legata.

Negli ADC anti-c-Met descritti nel presente contesto, i farmaci TOP1i sono coniugati all'anticorpo anti-c-Met per mezzo di un raggruppamento di linker. Come è

apprezzato da esperti dell'arte, i linker collegano il farmaco TOP1i all'anticorpo anti-c-Met formando un legame covalente al farmaco TOP1i in corrispondenza di un'ubicazione e un legame covalente all'anticorpo in corrispondenza di un'altra. I legami covalenti sono formati mediante reazione tra gruppi funzionali sul linker e gruppi funzionali sul farmaco TOP1i e l'anticorpo anti-c-Met.

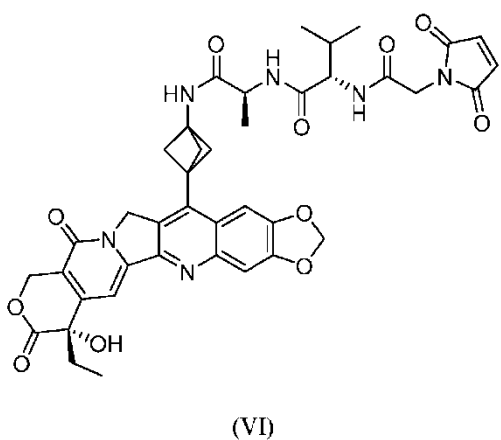
Composti intermedi sintetici che possono essere usati per formare ADC possono includere:

7.2.1. Farmaco linker LD1 (Formula di struttura (V))



(2S)-2-(2-bromoacetammido)-N-[(2S)-1-({3-[(7S)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-7,8,11,13-tetraidro-2H,10H-[1,3]diossolo[4,5-g]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il]ammino)-1-ossopropan-2-il]-3-metilbutanammide

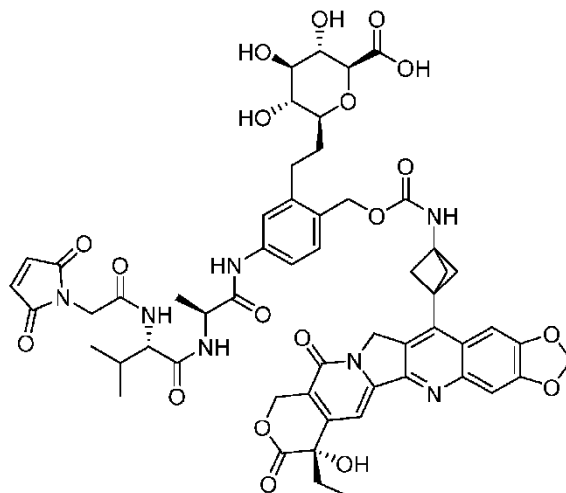
7.2.2. Farmaco linker LD2 (Formula di struttura (VI))



(2S)-2-[2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)acetammido]-N-[(2S)-1-({3-[(7S)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-7,8,11,13-tetraidro-2H,10H-[1,3]diossolo[4,5-

g]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]chinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il]ammino)-1-ossopropan-2-il]-3-metilbutanamide

7.2.3. Farmaco linker LD3 (Formula di struttura (VII))



(VII)

Acido (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-6-[2-(5-[[[(2*S*)-2-((2*S*)-2-[2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1*H*-pirrol-1-il)]acetammido]-3-metilbutanoil]ammino)propanoil]ammino)-2-[[[3-[(7*S*)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-7,8,11,13-tetraidro-2*H*,10*H*-[1,3]diossolo[4,5-*g*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]chinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il]carbamoil)ossi]metil]fenil)etil]-3,4,5-triidrossiossano-2-carbossilico

7.2.4. Numero di farmaci legati

Gli ADC divulgati nel presente contesto comprendono molecole di farmaco legate a raggruppamenti di anticorpi in vari rapporti molari stechiometrici a seconda della configurazione dell'anticorpo e, almeno in parte, del metodo usato per effettuare la coniugazione.

Le locuzioni "carico di farmaco" o "caricamento di farmaco" si riferiscono al numero di molecole di farmaco per anticorpo in una molecola di ADC individuale. Il numero di farmaci TOP1i legati a un ADC anti-c-Met può variare ed è limitato dal numero di siti di attacco disponibili sull'anticorpo anti-c-Met. Come contemplato per gli ADC anti-c-Met dell'invenzione, il linker lega un singolo farmaco TOP1i all'anticorpo, un ADC anti-c-Met. Fintanto che l'ADC anti-c-Met non esibisce livelli inaccettabili di aggregazione nelle condizioni d'uso e/o conservazione, sono

contemplati ADC anti-c-Met (cioè, formula di struttura (III)) aventi un n fino a 10. In alcune forme di realizzazione, gli ADC anti-c-Met hanno un n nell'intervallo 1-10. In alcune forme di realizzazione, gli ADC anti-c-Met hanno un n selezionato tra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. In forme di realizzazione, n è 2, 4, 6, 8 o 10. In forme di realizzazione, n è 6. In forme di realizzazione, il caricamento di farmaco può comprendere 1 molecola di farmaco, 2 molecole di farmaco, 3 molecole di farmaco, 4 molecole di farmaco, 5 molecole di farmaco, 6 molecole di farmaco, 7 molecole di farmaco, 8 molecole di farmaco, 9 molecole di farmaco o 10 molecole di farmaco.

7.2.5. Anticorpo AbA

AbA è una versione umanizzata dell'anticorpo monoclonale murino 224G11, che è stato divulgato e incorporato nel brevetto U.S. n. 8.329.173. L'anticorpo murino m224G11 ha un dominio pesante variabile evidenziato come ID di SEQ n. 13 e un dominio leggero variabile evidenziato come ID di SEQ n. 14:

Dominio variabile di catena pesante di m224G11 (CDR sottolineate ed evidenziate come ID di SEQ nn. 15, 16 e 17)

**EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHWVRQSLGESLDWIGGKIPNNGLAN
YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCCARSEITTEFDYWGQGTALTVSS**
(ID di SEQ n. 13)

Dominio variabile di catena leggera di m224G11 (CDR sottolineate ed evidenziate come ID di SEQ nn. 18, 19 e 20):

**DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSEFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLES
GIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADVATYYCQQSKEDPLTFGSGTKLEMK**
(ID di SEQ n. 14)

AbA è una IgG1 κ ricombinante umanizzata (divulgata come 224G11 [TH7 Hz3] nel brevetto U.S. n. 8.741.290) che mira a un epitopo unico di c-Met ubicato all'interno del dominio 1 con omologia a immunoglobulina-plessina-fattore di trascrizione (IPT), che dà come risultato blocco di segnalazione c-Met sia HGF-dipendente sia HGF-indipendente.

Come definito nella nomenclatura IMGT, le sequenze di CDR di AbA comprendono le seguenti sequenze:

- CDR-H1: GYIFTAYT (ID di SEQ n. 1)
- CDR-H2: IKPNNGLA (ID di SEQ n. 2)
- CDR-H3: ARSEITTEFDY (ID di SEQ n. 3)
- CDR-L1: ESVDSYANSF (ID di SEQ n. 4)
- CDR-L2: RAS (ID di SEQ n. 5)
- CDR-L3: QQSKEDPLT (ID di SEQ n. 6)

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-c-Met che compone un ADC di questa divulgazione comprende una CDR-H1 avente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 1, una CDR-H2 avente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 2; una CDR-H3 avente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 3, una CDR-L1 avente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 4, una CDR-L2 avente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 5; e una CDR-L3 avente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 6.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-c-Met che compone un ADC di questa divulgazione comprende una regione variabile di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 7:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTMHWVRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLAN
YAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCARSEITTEFDYWGQGLTVTVSS
(ID di SEQ n. 7);

e una regione variabile di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 8:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVDYANSFLHWYQKPGQPPKLLIYRASTRESGVP
DRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGGTKVEIK (ID di SEQ n. 8).

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-c-Met che compone un ADC di questa divulgazione comprende una catena pesante comprendente la

sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 9 (regioni costanti sono in grassetto; CDR sono sottolineate (divulgate come ID di SEQ nn. 1-3, rispettivamente, in ordine di comparsa)):

```

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYIFT AYTMHWVRQA PGQGLEWMGW 050
IKPNNGLANY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRRLRSDD TAVYYCARSE 100
ITTEFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDCHCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL 250
MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR 300
VVSLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL 350
PPSREEMTKN QVSLTCCLKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY KTTTPVLDS 400
GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG 445

```

(sequenza a lunghezza intera divulgata come ID di SEQ n. 9)

e una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 10 (sequenze CDR divulgate come ID di SEQ nn. 4-6, rispettivamente, in ordine di comparsa):

```

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSEESVD SYANSFLHWY QQKPGQPPKL 050
LIYRASTRES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSKEDPL 100

IFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV 150
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV 200
THQGLSSPVT KSFNRGEC 218

```

(sequenza a lunghezza intera divulgata come ID di SEQ n. 10).

In forme di realizzazione, un anticorpo della presente divulgazione comprende una catena pesante di ID di SEQ n. 9 e una catena leggera di ID di SEQ n. 10.

In una forma di realizzazione, la catena pesante di un anticorpo anti-c-Met che compone un ADC di questa divulgazione è codificata dalla seguente sequenza nucleotidica (sequenza a lunghezza intera divulgata come ID di SEQ n. 21):

ATGGGATGGTCTTGGATCTTTCTGCTGTTTCTGTCTGGTACTGCTGGTGTGCTGAG
Ccaggtccagctggtgcaatccggcgagaggtgaagaagccaggcgctccgtgaaggtgagctgtaaggcctctgctacatcttcacagca
tacacatgcactgggtgaggcaagctcctgggcaggactggagtggatggatgattaaacccaacaatgggctggccaactacgccag
aaattccagggtaggtcactatgacaagggataccagcatcagcaccgcatataggagctgagcaggctgaggctgacgacactgctgtctat
tattgcccaggagcggaaattacaacagaattcgattactggggcagggcaccctggtgaccgtgctctctgccagcaccaagggcccaagc
gtgttccccctggccccagcagcaagagcaccagcggcgccacagcgcgctgggctgctggtgaaggactactccccgagccctg
gaccgtgctctggaacagcggagccctcacttctggagttcatacttccagcagattgacagagcagtgccctgtattcactgtcttccgt
cgtaacagttccatectccagcctgggacacagacttacattgtaacgtgaatcacaagcctagcaacaccaaggtcgacaagagagt
tgaaccaaaagagttgtgattgccactgtctcctgccagctcctgagctgcttggcggtccagtgcttcttgttccccctaaacccaaa
gacacctgatgatctcaaggactcccgaggtgacatgcgtggtggatgtgtctcatgaggaccagaggtgaagttcaactggtac
gtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggagcagtaaacagcacctacaggggtggtgctcgtgctgacc
gtgctgcaccaggactggtgaacggcaaggagtacaagtgtaagggtccaacaaggccctgccagcccaatcgaaaagaccatca
gcaaggccaagggccagccaagagagcccaggtgtacacctgccaccagcagggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctga
cctgtctggtgaagggcttaccacaagcgacatcgccgtggagtgaggagcaacggccagcccagagaacaactacaagaccaccc
cccagtgctggacagcgacggcagcttctctgtacagcaagctgaccgtggacaagagcagatggcagcagggcaacgtgttcagct
gctccgtgatgcagggccctgcacaaccaactacaccagaagagcctgagcctgccccaggtga (ID di SEQ n. 21)

Peptide segnale di secrezione in lettere MAIUSCOLE; include il codone di arresto finale (TGA); la regione costante è in grassetto; le CDR sono sottolineate (sequenze di CDR divulgate come ID di SEQ nn. 22-24, rispettivamente, in ordine di comparsa)

In una forma di realizzazione, la catena leggera di un anticorpo anti-c-Met che compone un ADC di questa divulgazione è codificata dalla seguente sequenza nucleotidica (sequenza a lunghezza intera divulgata come ID di SEQ n. 25):

ATGGAAACTGATACACTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTCCTGGAAGCACAGGGgacattgtgatgac
ccagctctccgatagcctggccgtgtccctgggcgagagggctaccatcaactgtaaaagctccgaatctgtgg
actcttacgcaaacagcttctgcaactggatcagcaaaagccaggccaacctccaaagctgctgatttacagg
gcttctaccagggagagcggcgtgcccgataggttcagcggatctggcagcggcaccgactttacactgaccat
ctccagcctgcaggccgaagatgtggcagctctattactgccagcagtcgaaggaggacccccctgactttcgggg
gtggtactaaagtggagatcaagcgtacgggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcag
ctgaagagcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggccaaggtgcagtgga
ggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggacagcaaggactccacctaca
gcctgagcagcaccctgacctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgtgaggtgaccac
cagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacagggcgagtgctga (ID di SEQ n. 25)

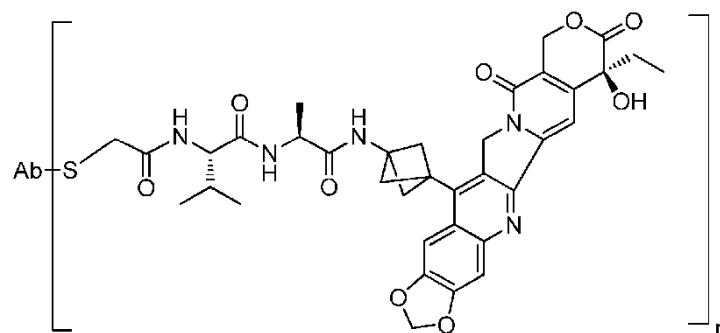
Peptide segnale di secrezione in lettere in **grassetto MAIUSCOLE**; include il codone di arresto finale (TGA); la regione costante è in **grassetto**; le CDR sono sottolineate (sequenze di CDR divulgate come ID di SEQ nn. 26-28, rispettivamente, in ordine di comparsa).

7.2.6. ADC anti-c-Met esemplificativi

In particolari forme di realizzazione, ADC anti-c-Met dell'invenzione comprendono un anticorpo anti-c-Met comprendente sei regioni determinanti la complementarità (CDR, Complementarity Determining Region) corrispondenti alle CDR di anticorpo AbA, che è coniugato a un farmaco TOP1i attraverso un linker valina alanina (va) scindibile. In certe forme di realizzazione, il linker comprende un gruppo funzionale bromoacetammide per la coniugazione a un solfidrile di una cisteina ridotta dall'anticorpo anti-c-Met dell'ADC. In altre forme di realizzazione, il linker comprende un gruppo funzionale maleimmide per la coniugazione a un solfidrile di una cisteina ridotta dall'anticorpo anti-c-Met dell'ADC. In alcune forme di realizzazione, il linker comprende inoltre uno spaziatore auto-immolante, preferibilmente p-amminobenzilcarbonile (PABC) o un analogo di esso.

In forme di realizzazione, un ADC anti-c-Met comprende un anticorpo anti-c-Met comprendente sei regioni determinanti la complementarità (CDR) corrispondenti alle CDR di anticorpo AbA che è coniugato al farmaco linker LD1 (formula di struttura (V)) tramite un legame formato con un gruppo solfidrile di un residuo di cisteina dell'anticorpo anti-c-Met. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-c-Met comprende le sequenze della regione della catena pesante variabile (VH, Variable Heavy) e catena leggera variabile (VL, Variable Light) dell'anticorpo AbA. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-c-Met comprende le sequenze della catena pesante (HC, Heavy Chain) e catena leggera (LC, Light Chain) dell'anticorpo AbA.

In forme di realizzazione, un ADC anti-c-Met ha la seguente formula di struttura (VIII):



(VIII)

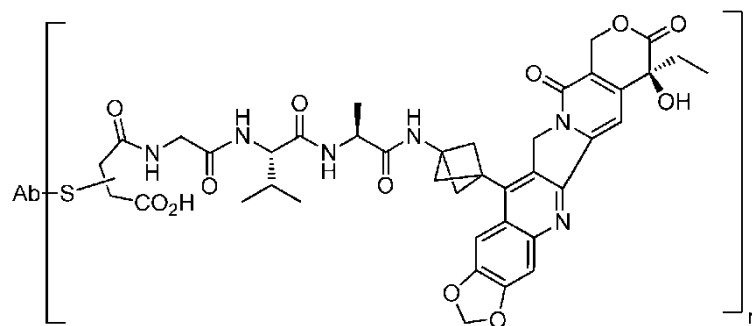
in cui n è un numero intero 1-10 e in cui Ab è un anticorpo anti-c-Met IgG₁ comprendente una catena pesante CDR1 mostrata come ID di SEQ n. 1, una

catena pesante CDR2 mostrata come ID di SEQ n. 2, una catena pesante CDR3 mostrata come ID di SEQ n. 3, una catena leggera CDR1 mostrata come ID di SEQ n. 4, una catena leggera CDR2 mostrata come ID di SEQ n. 5 e una catena leggera CDR3 mostrata come ID di SEQ n. 6. In forme di realizzazione, l'anticorpo Ab è un anticorpo anti-c-Met IgG₁ comprendente una regione variabile di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 7 e una regione variabile di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 8. In forme di realizzazione, l'anticorpo Ab è un anticorpo anti-c-Met comprendente una catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 9 e una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 10. In forme di realizzazione, la coniugazione del farmaco linker all'anticorpo è tramite un legame formato con un gruppo solfidrile di un residuo di cisteina dell'anticorpo. In forme di realizzazione, n ha un valore di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. In forme di realizzazione, n ha un valore di 2, 4, 6, 8 o 10. In forme di realizzazione, n è 6. In una forma di realizzazione, ADC anti-c-Met di formula di struttura (VIII) comprende un anticorpo Ab avente una catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 9 e una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 10 e n ha un valore di 2, 4, 6, 8 o 10. In una forma di realizzazione, ADC anti-c-Met di formula di struttura (VIII) comprende un anticorpo Ab avente una catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 9 e una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 10 e n ha un valore di 6.

In certe forme di realizzazione, un ADC anti-c-Met comprende un anticorpo anti-c-Met comprendente sei regioni determinanti la complementarità

(CDR) corrispondenti alle CDR di anticorpo AbA che è coniugato al farmaco linker LD2 (formula di struttura (VI)) tramite un legame formato con un gruppo solfidrile di un residuo di cisteina dell'anticorpo anti-c-Met. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-c-Met comprende le sequenze della regione della catena pesante variabile (VH, Variable Heavy) e catena leggera variabile (VL, Variable Light) dell'anticorpo AbA. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-c-Met comprende le sequenze della catena pesante (HC, Heavy Chain) e catena leggera (LC, Light Chain) dell'anticorpo AbA.

In alcune forme di realizzazione, un ADC anti-c-Met ha la seguente formula di struttura (IX):



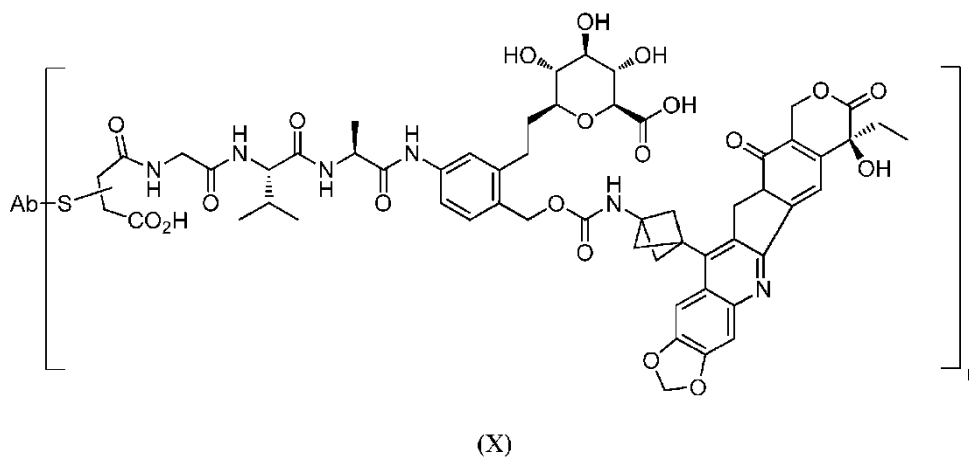
(IX)

in cui n è un numero intero 1-10 e in cui Ab è un anticorpo anti-c-Met IgG₁ comprendente una catena pesante CDR1 mostrata come ID di SEQ n. 1, una catena pesante CDR2 mostrata come ID di SEQ n. 2, una catena pesante CDR3 mostrata come ID di SEQ n. 3, una catena leggera CDR1 mostrata come ID di SEQ n. 4, una catena leggera CDR2 mostrata come ID di SEQ n. 5 e una catena leggera CDR3 mostrata come ID di SEQ n. 6. In forme di realizzazione, l'anticorpo Ab è un anticorpo anti-c-Met IgG₁ comprendente una regione variabile di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 7 e una regione variabile di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 8. In forme di realizzazione, l'anticorpo Ab è un anticorpo anti-c-Met comprendente una catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 9 e una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 10. In forme di realizzazione, la coniugazione del farmaco linker all'anticorpo è tramite un legame

formato con un gruppo solfidrile di un residuo di cisteina dell'anticorpo. In forme di realizzazione, n ha un valore di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. In forme di realizzazione, n ha un valore di 2, 4, 6, 8 o 10. In forme di realizzazione, n è 6. In una forma di realizzazione, ADC anti-c-Met di formula di struttura (IX) comprende un anticorpo Ab avente una catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 9 e una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 10 e n ha un valore di 2, 4, 6, 8 o 10. In una forma di realizzazione, ADC anti-c-Met di formula di struttura (IX) comprende un anticorpo Ab avente una catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 9 e una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 10 e n ha un valore di 6.

In certe forme di realizzazione, un ADC anti-c-Met comprende un anticorpo anti-c-Met comprendente sei regioni determinanti la complementarità (CDR) corrispondenti alle CDR di anticorpo AbA che è coniugato al farmaco linker LD3 (formula di struttura (VII)) tramite un legame formato con un gruppo solfidrile di un residuo di cisteina dell'anticorpo anti-c-Met. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-c-Met comprende le sequenze della regione della catena pesante variabile (VH, Variable Heavy) e catena leggera variabile (VL, Variable Light) dell'anticorpo AbA. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-c-Met comprende le sequenze della catena pesante (HC, Heavy Chain) e catena leggera (LC, Light Chain) dell'anticorpo AbA.

In alcune forme di realizzazione, un ADC anti-c-Met ha la seguente formula di struttura (X):



in cui n è un numero intero 1-10 e in cui Ab è un anticorpo anti-c-Met IgG₁

comprendente una catena pesante CDR1 mostrata come ID di SEQ n. 1, una catena pesante CDR2 mostrata come ID di SEQ n. 2, una catena pesante CDR3 mostrata come ID di SEQ n. 3, una catena leggera CDR1 mostrata come ID di SEQ n. 4, una catena leggera CDR2 mostrata come ID di SEQ n. 5 e una catena leggera CDR3 mostrata come ID di SEQ n. 6. In forme di realizzazione, l'anticorpo Ab è un anticorpo anti-c-Met IgG₁ comprendente una regione variabile di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 7 e una regione variabile di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 8. In forme di realizzazione, l'anticorpo Ab è un anticorpo anti-c-Met comprendente una catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 9 e una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 10. In forme di realizzazione, la coniugazione del farmaco linker all'anticorpo è tramite un legame formato con un gruppo solfidrile di un residuo di cistina dell'anticorpo. In forme di realizzazione, n ha un valore di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. In forme di realizzazione, n ha un valore di 2, 4, 6, 8 o 10. In forme di realizzazione, n è 6. In una forma di realizzazione, ADC anti-c-Met di formula di struttura (X) comprende un anticorpo Ab avente una catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 9 e una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 10 e n ha un valore di 2, 4, 6, 8 o 10. In una forma di realizzazione, ADC anti-c-Met di formula di struttura (X) comprende un anticorpo Ab avente una catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 9 e una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 10 e n ha un valore di 6.

Gli ADC di questa divulgazione possono essere forniti come una

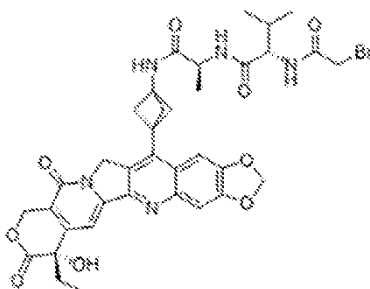
composizione idonea alla somministrazione a un soggetto. In alcune forme di realizzazione, la composizione di ADC è una composizione farmaceutica, comprendente un ADC di questa divulgazione e un veicolo farmaceuticamente accettabile. Una data formulazione degli ADC divulgati nel presente contesto può comprendere una distribuzione di anticorpi aventi differente caricamento di farmaco, cioè, differenti valori di n .

7.3. Metodi d'uso

In forme di realizzazione, i metodi descritti nel presente contesto implicano trattare pazienti che hanno NSCLC non squamoso con gli ADC anti-c-Met dell'invenzione.

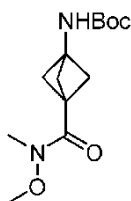
8. Esempi

I seguenti Esempi che mettono in evidenza certe peculiarità e proprietà delle forme di realizzazione esemplificative degli anticorpi e frammenti leganti descritti nel presente contesto, sono forniti a scopi di illustrazione.



Esempio 1

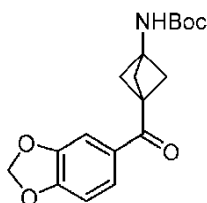
(2S)-2-(2-bromoacetammido)-N-[(2S)-1-({3-[(7S)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-7,8,11,13-tetraidro-2H,10H-[1,3]diossolo[4,5-g]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il}ammino)-1-ossopropan-2-il]-3-metilbutanammide



Esempio 1A

terz-butil(3-(metossi(metil)carbamoil)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)carbammato

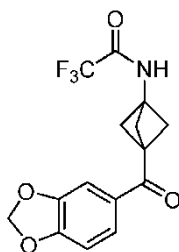
A una soluzione di acido 3-((*terz*-butossicarbonil)ammino)biciclo[1.1.1]pentan-1-carbossilico (4,9 g), *N,O*-dimetilidrossilammina cloridrato (2,2 g) e *N,N*-diisopropiletilammina (11,30 ml) in diclorometano (10 ml) è stato addizionato 1-[bis(dimetilammino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazol-[4,5-*b*]piridinio-3-ossido esafluorofosfato (8,61 g) in porzioni a 10 °C. La miscela di reazione è stata rimescolata a 20 °C per 12 ore. Due reazioni aggiuntive sono state impostate e lasciate rimescolare a 20 °C per 12 ore come descritto. Tutte le tre reazioni sono state combinate. La reazione è stata diluita con diclorometano (200 ml) e addizionata a HCl acquoso 1 N (50 ml). Il precipitato formatosi è stato filtrato e il filtrato è stato lasciato separare. Lo strato organico è stato lavato con soluzione di bicarbonato di sodio acquosa satura (50 ml) e salamoia (50 ml), essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, eluendo con 1-50% di etilacetato in etere di petrolio per dare il composto del titolo. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4,97 (br s, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,18 (s, 3H), 2,34 (s, 6H), 1,45 (s, 9H). MS (ESI+) *m/z* 271,2 (M+H)⁺.

Esempio 1B

terz-butil(3-(benzo[*d*][1,3]diossol-5-carbonil)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)carbammato

A una soluzione di 5-bromobenzo[*d*][1,3]diossolo (8,83 g) in tetraidrofurano (100 ml) è stato addizionato *n*-butillitio (17,57 ml, 2,5 M in esano) lentamente a -65 °C sotto gas azoto. La miscela è stata rimescolata a -65 °C per 30 minuti. Una

soluzione di Esempio 1A, (4,75 g) in tetraidrofurano (40 ml) è stata addizionata lentamente. La miscela è stata rimescolata a -65 °C per 3 ore. Tre reazioni aggiuntive sono state impostate e lasciate rimescolare a -65 °C per 3 ore. Tutte le quattro reazioni sono state combinate. La miscela è stata raffreddata rapidamente con soluzione di cloruro di ammonio acquoso saturo (500 ml) ed estratta con etilacetato (3 × 500 ml). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (500 ml), essiccati su solfato di sodio anidro, filtrati e concentrati a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, eluendo con 1-50% di etilacetato in etere di petrolio per dare il composto del titolo. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,63 (dd, 1H), 7,45 (d, 1H), 6,82 (d, 1H), 6,03 (s, 2H), 5,04 (br s, 1H), 2,50 (s, 6H), 1,46 (s, 9H). MS (ESI+) *m/z* 354,2 (M+Na)⁺.



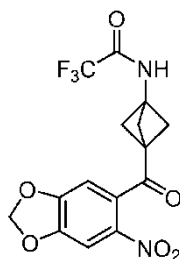
Esempio 1C

N-(3-(benzo[*d*][1,3]diossol-5-carbonil)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)-2,2,2-trifluoroacetammide

Passo 1: a una soluzione di Esempio 1B (6,2 g) in diclorometano (62 ml) è stato addizionato acido trifluoroacetico (62 ml) lentamente a 0 °C. La reazione è stata rimescolata a 25 °C per 4 ore. Due reazioni aggiuntive sono state impostate e rimescolate a 25 °C per 4 ore. Ciascuna miscela è stata concentrata a pressione ridotta. Ciascun residuo è stato usato nel passo successivo senza ulteriore purificazione.

Passaggio 2: a una soluzione di prodotto grezzo sopra in diclorometano (62 ml) è stato addizionato *N,N*-diisopropiletilammina (16,34 ml) e anidride trifluoroacetica (3,96 ml) a gocce a 0 °C. La miscela è stata rimescolata a 25 °C per 2 ore. Due reazioni aggiuntive sono state impostate come descritto e rimescolate a

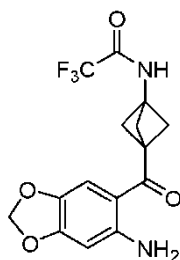
25 °C per 2 ore. Tutte le tre reazioni sono state combinate e versate in acqua (200 ml), estratte con diclorometano (2 × 200 ml). Lo strato organico è stato lavato con salamoia (200 ml), essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, eluendo con il 25% di etilacetato in etere di petrolio per dare il composto del titolo. ¹H NMR (501 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,61 (dd, 1H), 7,43 (d, 1H), 7,00 (s, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,05 (s, 2H), 2,62 (s, 6H). MS (ESI+) *m/z* 328,2 (M+H)⁺.



Esempio 1D

2,2,2-trifluoro-*N*-(3-(6-nitrobenzo[*d*][1,3]diossol-5-carbonil)bicyclo[1.1.1]pentan-1-il)acetamide

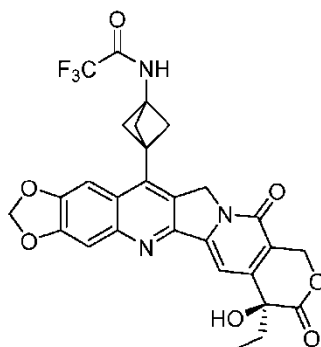
A una soluzione di Esempio 1C (4,3 g) in anidride acetica (25 ml) è stato aggiunto nitrato di rame(II) triidrato (4,76 g) in porzioni a 0 °C. La miscela è stata rimescolata a 0 °C per 3 ore. Tre reazioni aggiuntive sono state impostate e rimescolate a 0 °C per 3 ore come descritto. Tutte le quattro reazioni sono state combinate. La miscela è stata versata in acqua (50 ml) ed estratta con etilacetato (5 × 100 ml). Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato, concentrato a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, eluendo con il 75% di etilacetato in etere di petrolio per dare il composto del titolo. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,61 (s, 1H), 6,77 (br s, 1H), 6,64 (s, 1H), 6,21 (s, 2 H), 2,43 (s, 6 H). MS (APCI+) *m/z* 373,1 (M+H)⁺.



Esempio 1E

N-(3-(6-amminobenzo[*d*][1,3]diossol-5-carbonil)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)-2,2,2-trifluoroacetammide

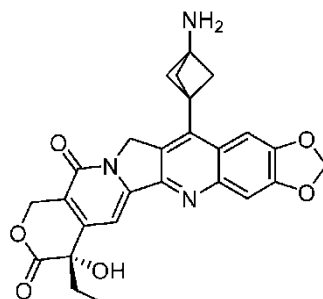
A una soluzione di Esempio 1D (4 g) in etanolo (40 ml) e acqua (8 ml) sono stati addizionati ferro (5,4 g) e cloruro di ammonio (5,17 g) sotto azoto. La miscela è stata rimescolata a 100 °C per 3 ore. Tre reazioni aggiuntive sono state impostate e rimescolate a 100 °C per 3 ore come descritto. Dopo il raffreddamento fino a temperatura ambiente, tutte le quattro reazioni sono state combinate. La miscela è stata versata in acqua (1 l) ed estratta con etilacetato (5 × 500 ml). Le fasi organiche combinate sono state essiccate su solfato di sodio anidro, filtrate, e concentrate a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna su gel di silice, eluendo con il 10-75% di etilacetato in etere di petrolio per dare il composto del titolo. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,22 (s, 1H), 6,70 (s, 1H), 6,50 (s, 2H), 6,14 (s, 1H), 5,92 (s, 2H), 2,63 (s, 6H). MS (ESI+) *m/z* 343,2 (M+H)⁺.

Esempio 1F

(*S*)-*N*-(3-(7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-8,10,11,13-tetraidro-7H-[1,3]diossol[4,5-*g*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]chinolin-14-il)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)-2,2,2-trifluoroacetammide

A una sospensione di Esempio 1E (3,5 g) e (*S*)-4-etil-4-idrossi-7,8-diidro-1H-pirano[3,4-*f*]indolizin-3,6,10(4*H*)-trione (2,69 g) in toluene (140 ml) è stato addizionato acido *paratoluensolfonico* monoidrato (1,945 g). La miscela è stata rimescolata a 115 °C per 12 ore. Tre reazioni aggiuntive sono state impostate e rimescolate a 115 °C per 12 ore come descritto. Dopo il raffreddamento fino a temperatura ambiente, tutte le quattro reazioni sono state combinate. La miscela è

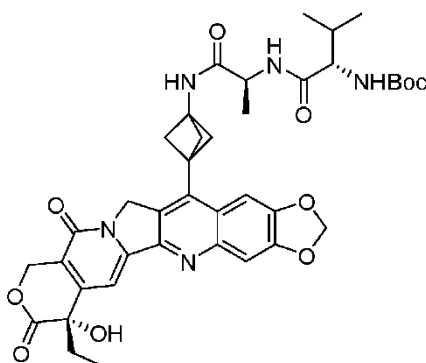
stata filtrata e il solido raccolto è stato triturato con acetonitrile (200 ml) per dare il composto del titolo. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, dimetilsolfossido- d_6) δ ppm 10,28 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,30 (dd, 2H), 5,42 (s, 2H), 5,36 (s, 2H), 2,87 (s, 6H), 1,94-1,77 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). MS (ESI+) m/z 570,3 (M+H) $^+$.



(I)

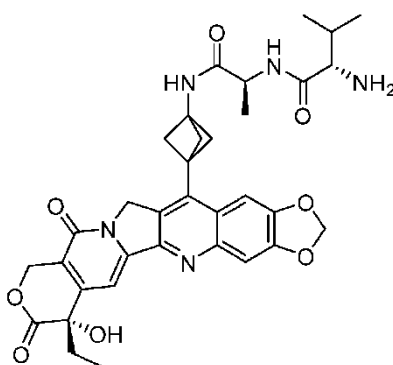
Esempio 1G: (7S)-14-(3-amminobiciclo[1.1.1]pentan-1-il)-7-etil-7-idrossi-2H,10H-[1,3]diossolo[4,5-g]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-8,11(7H,13H)-dione

A una soluzione di Esempio 1F (3 g) in metanolo (30 ml) è stato aggiunto HCl (60 ml, 4 M in metanolo). La miscela è stata rimescolata a 65 °C per 4 ore. Quattro reazioni aggiuntive sono state impostate e rimescolate a 65 °C per 4 ore come descritto sopra. Dopo il raffreddamento fino a temperatura ambiente, tutte le cinque reazioni sono state combinate. La miscela è stata concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato triturato con metanolo (200 ml) per dare il composto del titolo. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, dimetilsolfossido- d_6) δ ppm 9,23 (s, 3H), 7,54 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 6,30 (d, 2H), 5,41 (s, 2H), 5,39-5,26 (m, 2H), 2,79 (s, 6H), 1,87 (ept, 2H), 0,88 (t, 3H). MS (ESI+) m/z 474,3 (M+H) $^+$.

Esempio 1H

terz-butil((*S*)-1-(((*S*)-1-(((*S*)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-8,10,11,13-tetraidro-7*H*-[1,3]diossolo[4,5-*g*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]chinolin-14-il)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)ammino)-1-ossopropan-2-il)ammino)-3-metil-1-ossobutan-2-il)carbammato

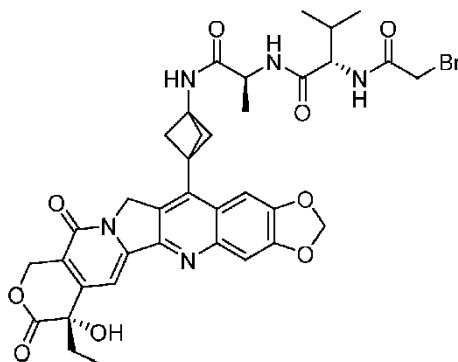
A una sospensione di acido (*S*)-2-((*S*)-2-((*terz*-butossicarbonil)ammino)-3-metilbutanammido)propanoico (2,49 g), 2-idrossipiridin-1-ossido (1,31 g) e *N*¹-((etilimmino)metilen)-*N*³, *N*³-dimetilpropan-1,3-diammina cloridrato (2,26 g) in acetonitrile (40 ml) è stata addizionata 2,6-lutidina (2,74 ml). La miscela è stata rimescolata a temperatura ambiente per 30 minuti. In un pallone separato, Esempio 1G (4 g) e 2,6-lutidina (2,74 ml) sono stati combinati in *N,N*-dimetilformammide (40 ml) e la soluzione di cui sopra è stata addizionata. La miscela è stata rimescolata a temperatura ambiente per tutta la notte. La miscela è stata concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato dissolto in diclorometano (300 ml), lavato con soluzione di cloruro di ammonio acquosa satura (100 ml), salamoia (100 ml), essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna su gel di silice, eluendo con 0-10% di metanolo in diclorometano per dare il composto del titolo. ¹H NMR (400 MHz, dimetilsolfossido-*d*₆) δ ppm 8,65 (s, 1H), 7,89 (d, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,22 (s, 1H), 6,77 (d, 1H), 6,46 (s, 1H), 6,29 (d, 2H), 5,41 (s, 2H), 5,32 (s, 2H), 4,29 (q, 1H), 3,87-3,77 (m, 1H), 2,76 (s, 6H), 1,99 (q, 1H), 1,92-1,81 (m, 2H), 1,41 (s, 9H), 1,25 (d, 3H), 0,92-0,80 (m, 9H). MS (ESI+) *m/z* 744,4 (M+H)⁺.



Esempio 1I

(S)-2-ammino-N-((S)-1-((3-((S)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-8,10,11,13-tetraidro-7H-[1,3]diossolo[4,5-g]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-14-il)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)ammino)-1-ossopropan-2-il)-3-metilbutanammide

Esempio 1H (5,5 g) è stato trattato con acido trifluoroacetico (30 ml) a temperatura ambiente per 30 minuti. La miscela è stata concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato dissolto in acetonitrile 50% in acqua (200 ml). La soluzione è stata liofilizzata per dare il composto del titolo. ¹H NMR (600 MHz, dimetilsolfossido-*d*₆) δ ppm 8,80 (s, 1H), 8,59 (d, 1H), 8,10 (d, 3H), 7,60 (s, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,23 (s, 1H), 6,33-6,26 (m, 2H), 5,41 (d, 2H), 5,35-5,23 (m, 2H), 4,35 (p, 1H), 3,66-3,63 (m, 1H), 2,77 (s, 6H), 2,17-2,06 (m, 1H), 1,91-1,83 (m, 2H), 1,31 (d, 3H), 1,01-0,96 (dd, 6H), 0,89 (t, 3H). MS (ESI+) *m/z* 644,4 (M+H)⁺.



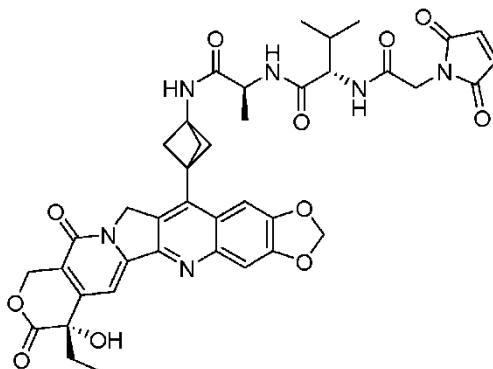
(V)

Esempio 1J

(2S)-2-(2-bromoacetammido)-N-[(2S)-1-({3-[(7S)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-7,8,11,13-tetraidro-2H,10H-[1,3]diossolo[4,5-g]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il)ammino)-1-ossopropan-2-il]-3-metilbutanammide

A una soluzione di acido 2-bromoacetico (1,435 g) in N,N-dimetilformammide (26 ml) è stato addizionato etil-2-etossichinolin-1(2H)-carbossilato (2,55 g). La miscela è stata rimescolata a temperatura ambiente per 10 minuti. In un pallone separato, Esempio 1I (4,5 g) e 2,6-lutidina (3,61 ml) sono stati combinati in N,N-dimetilformammide (26 ml) e la soluzione di cui sopra è stata addizionata. La miscela è stata rimescolata a temperatura ambiente per 30 minuti. La miscela è stata acidificata con acido trifluoroacetico (4 ml) e purificata mediante

HPLC a fase inversa su un sistema CombiFlash® Teledyne Isco usando una colonna Luna (250 × 50 mm, 10 mm), eluendo con acetonitrile 5-75% in acqua contenente acido trifluoroacetico 0,1% per 30 minuti per dare il composto del titolo dopo liofilizzazione. ¹H NMR (600 MHz, dimetilsolfossido-*d*₆) δ ppm 8,57 (s, 1H), 8,32 (d, 1H), 8,16 (d, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 6,30 (dd, 2H), 5,42 (s, 2H), 5,38 (d, 2H), 4,28-4,19 (m, 2H), 4,03-3,91 (m, 2H), 2,76 (s, 6H), 2,02 (h, 1H), 1,86 (ddp, 2H), 1,25 (d, 3H), 0,93-0,84 (m, 9H). MS (ESI+) *m/z* 764,46 (M+H)⁺.



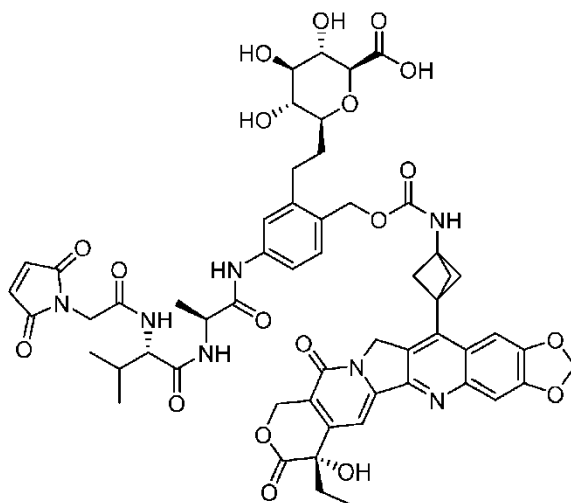
(VI)

Esempio 2

(2*S*)-2-[2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1*H*-pirrol-1-il)acetammido]-*N*-[(2*S*)-1-({3-[(7*S*)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-7,8,11,13-tetraidro-2*H*,10*H*-[1,3]diossolo[4,5-*g*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]chinolin-14-il]bicciclo[1.1.1]pentan-1-il]ammino)-1-ossopropan-2-il]-3-metilbutanamide

Una soluzione di Esempio 11 (2 g) in *N,N*-dimetilformammide (54 ml) è stata addizionata a 2,5-diossopirrolidin-1-il-2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1*H*-pirrol-1-il)acetato (0,7 g) seguito da *N,N*-diisopropiletilammia (2,3 ml). La miscela è stata rimescolata a temperatura ambiente per 30 minuti. La reazione è stata raffreddata rapidamente con acido trifluoroacetico (2 ml) e purificata mediante HPLC a fase inversa su un sistema Gilson PLC 2020 usando una colonna Luna (250 × 50 mm, 10 mm), eluendo con acetonitrile 5-75% in acqua contenente acido trifluoroacetico 0,1% per 30 minuti per fornire il composto del titolo dopo liofilizzazione. ¹H NMR (500 MHz, dimetilsolfossido-*d*₆) δ ppm 8,50 (s, 1H), 8,29 (d, 1H), 8,13 (d, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,23 (s, 1H), 7,12 (s, 2H), 6,30 (d, 2H), 5,42 (s, 2H), 5,36 (d,

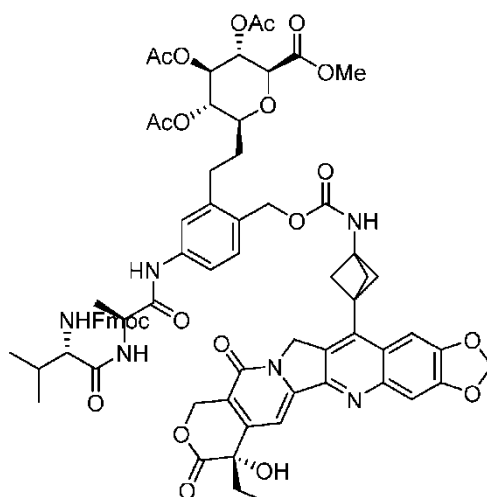
2H), 4,24 (p, 1H), 4,20-4,14 (m, 3H), 2,75 (s, 6H), 2,01 (h, 1H), 1,86 (dp, 2H), 1,26 (d, 3H), 0,93-0,83 (m, 9H). MS (ESI+) m/z 781,14 (M+H)⁺.



(VII)

Esempio 3

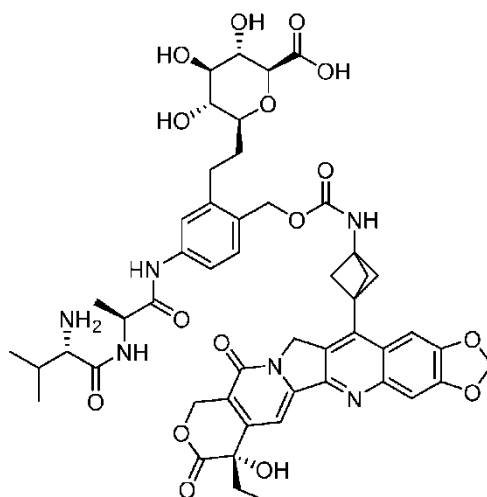
Acido (2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-(5-[[[(2S)-2-{{(2S)-2-[2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)acetammido]-3-metilbutanoil]ammino)propanoil]ammino}-2-[[{(3-[(7S)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-7,8,11,13-tetraidro-2H,10H-[1,3]diossolo[4,5-g]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il]carbamoil)ossi]metil}fenil)etil]-3,4,5-triidrossiossano-2-carbossilico



Esempio 3A

(2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-2-(5-((*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metossi)carbonil)ammino)-3-metilbutanammido)propanammido)-2-(((3-((*S*)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-8,10,11,13-tetraidro-7*H*-[1,3]diossolo[4,5-*g*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]chinolin-14-il)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)carbamoil)ossi)metil)fenil)-6-(metossicarbonil)tetraidro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato

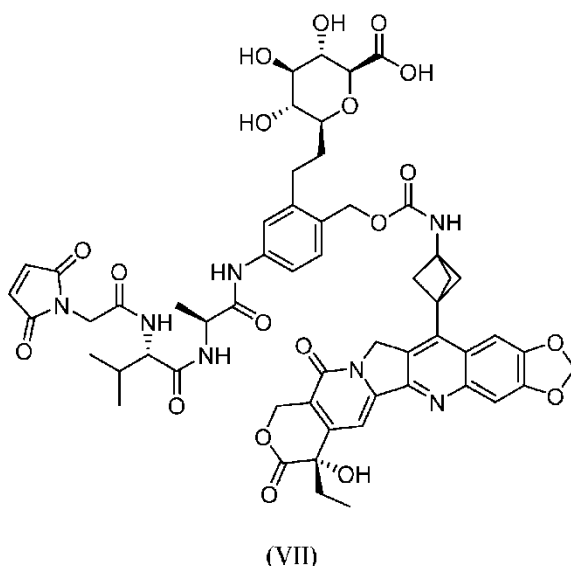
A una miscela di (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-2-(5-((*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metossi)carbonil)ammino)-3-metilbutanammido)propanammido)-2-(((4-nitrofenossi)carbonil)ossi)metil)fenetil)-6-(metossicarbonil)tetraidro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato (preparato come descritto in WO2016094509, 2,99 g), Esempio 1G (1,35 g) e 1-idrossi-7-azabenzotriazolo (0,361 g) in *N,N*-dimetilformammide (26,5 ml) è stata addizionata *N,N*-diisopropiletilammia (1,39 ml). La miscela è stata rimescolata a temperatura ambiente per 4 ore. La miscela è stata concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna su gel di silice, eluendo con metanolo 0-8% in diclorometano per dare il composto del titolo. ¹H NMR (501 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,43 (br s, 1H), 7,74 (d, 2H), 7,61 (br s, 1H), 7,57-7,46 (d, 4H), 7,43 (s, 1H), 7,38 (t, 3H), 7,33-7,27 (m, 3H), 6,43 (br s, 1H), 6,17 (s, 2H), 5,89 (br s, 1H), 5,72 (d, 1H), 5,37-5,02 (m, 8H), 4,94 (t, 1H), 4,67-4,56 (m, 1H), 4,53-4,44 (t, 2H), 4,19 (br s, 1H), 4,00 (d, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,48 (dt, 1H), 2,94 (d, 1H), 2,88-2,66 (m, 6H), 2,16 (br s, 1H), 2,08-1,97 (m, 9H), 1,94-1,80 (ddt, 4H), 1,45 (d, 3H), 1,02 (t, 3H), 0,98-0,90 (m, 6H). MS (ESI+) *m/z* 1359,5 (M+H)⁺.



Esempio 3B

Acido (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-6-(5-((*S*)-2-((*S*)-2-ammino-3-metilbutanamido)propanamido)-2-(((3-((*S*)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-8,10,11,13-tetraidro-7*H*-[1,3]diossolo[4,5-*g*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]chinolin-14-il)biciclo[1.1.1]pentan-1-il)carbamoil)ossi)metil)fenil)-3,4,5-triidrossitetraidro-2*H*-piran-2-carbossilico

A una soluzione di Esempio 3A (3,2 g) in metanolo (24 ml) e tetraidrofurano (24 ml) è stato addizionato idrossido di litio monoidrato (846 mg) in acqua (24 ml). La miscela è stata rimescolata a temperatura ambiente per 30 minuti. La reazione è stata raffreddata rapidamente con acido trifluoroacetico (3 ml) ed estratta con eptano (5 × 30 ml). Lo strato acquoso è stato purificato mediante HPLC a fase inversa su un sistema CombiFlash® Teledyne Isco usando una colonna Luna (250 × 50 mm, 10 mm), eluendo con acetonitrile 5-75% in acqua contenente acido trifluoroacetico 0,1% per 30 minuti per fornire il composto del titolo dopo liofilizzazione. ¹H NMR (400 MHz, dimetilsolfossido-*d*₆) δ ppm 10,03 (s, 1H), 8,62 (d, 1H), 8,02 (br s, 4H), 7,55 (s, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,41 (d, 2H), 7,35 (s, 1H), 7,22 (d, 1H), 7,16 (s, 1H), 6,40 (br s, 1H), 6,23 (s, 2H), 5,35 (s, 2H), 5,27 (s, 2H), 4,97 (s, 2H), 4,43 (p, 1H), 3,60-3,47 (m, 3H), 3,15-3,01 (m, 3H), 2,90 (t, 1H), 2,64 (s, 6H), 2,00 (tq, 2H), 1,79 (ept, 2H), 1,60-1,46 (m, 1H), 1,29 (d, 3H), 0,89 (dd, 6H), 0,80 (t, 3H). MS (ESI+) *m/z* 997,3 (M+H)⁺.



Esempio 3C

Acido (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-6-[2-(5-[[[(2*S*)-2-((2*S*)-2-[2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1*H*-pirrol-1-il)acetammido]-3-metilbutanoil]ammino)propanoil]ammino}-2-[[[3-[(7*S*)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-7,8,11,13-tetraidro-2*H*,10*H*-[1,3]diossolo[4,5-*g*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]chinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il]carbamoil)ossi]metil}fenil)etil]-3,4,5-triidrossiossano-2-carbossilico

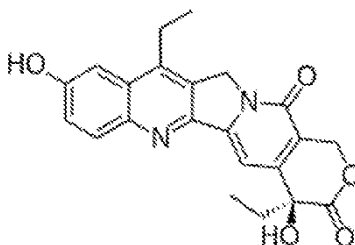
Una soluzione di Esempio 3B (1,02 g) in *N,N*-dimetilformammide (16 ml) è stata addizionata a 2,5-diossopirrolidin-1-il-2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1*H*-pirrol-1-il)acetato (0,28 g) seguito da *N,N*-diisopropiletilammina (0,8 ml). La miscela è stata rimescolata a temperatura ambiente per 30 minuti. La reazione è stata raffreddata rapidamente con acido acetico (0,8 ml) e purificata mediante HPLC a fase inversa su un sistema Gilson PLC 2020 usando una colonna Luna (250 × 50 mm, 10 mm), eluendo con acetonitrile 5-75% in acqua contenente acido trifluoroacetico 0,1% per 30 minuti per fornire il composto del titolo dopo liofilizzazione. ¹H NMR (501 MHz, dimetilsolfossido-*d*₆) δ ppm 9,90 (s, 1H), 8,29-8,25 (m, 2H), 8,11 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,47 (d, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,27 (d, 1H), 7,23 (s, 1H), 7,08 (s, 2H), 6,30 (s, 2H), 5,42 (s, 2H), 5,36 (s, 2H), 5,03 (s, 2H), 4,38 (p, 1H), 4,22 (dd, 1H), 4,13 (s, 2H), 3,58 (d, 2H), 3,15 (d, 4H), 2,97 (t, 1H), 2,71 (s, 6H), 2,10-1,93 (m, 2H), 1,86 (dp, 2H), 1,64-1,52 (m, 1H), 1,31 (d, 3H), 0,91-0,79 (m, 9H). MS (ESI+) *m/z* 1134,3 (M+H)⁺.

Esempio 4: proliferazione cellulare

L'effetto di farmaci TOP1i sulla vitalità cellulare è stato valutato monitorando la presenza di ATP per cellule metabolicamente attive. La proliferazione di cellule Calu-6 (adenocarcinoma polmonare) e cellule A375 (melanoma maligno) è stata quantificata usando luminescenza CellTiter-Glo[®]. Come mostrato nella FIG. 2A e nella Tabella 1, il composto di Formula I (Esempio 1G) ha esibito una potenza sub-nanomolare per ridurre la vitalità di cellule Calu-6

(0,57 nM, FIG. 2A) e A375 (0,50 nM, FIG. 2B) proliferanti. Questa potenza sub-nanomolare è migliorata rispetto alle prestazioni del farmaco TOP1i SN-38 nello stesso saggio, il che ha dimostrato un'EC₅₀ di 6,58 nM (Calu-6) e 2,30 nM (A375).

Tabella 1: potenza del composto TOPLi		
Composto	EC ₅₀ (nM)	
	Calu-6	A375
SN-38	6,58	2,30
Esempio 1G	0,57	0,50



(IV) SN-38

Esempio 5: preparazione e purificazione di AbA

AbA è stato espresso in cellule di ovaio di criceto cinese (CHO) con le sequenze di catena pesante e leggera di ID di SEQ nn. 9 e 10 rispettivamente. AbA è stato isolato e purificato prima della coniugazione.

Esempio 6: procedura per coniugazione (ADC-1)

Passo 1 di coniugazione

Prima della riduzione, una soluzione di anticorpo anti-c-Met AbA è stata incubata a 4 °C per un minimo di 12 ore. È stata poi addizionata una soluzione di sale disodico di acido etilendiamminotetraacetico 0,5 M (EDTA, Sigma Aldrich), per una concentrazione finale di 5 mM. Tris-(2-carbossietil)fosfina (TCEP, 100 mM, 2,67 equivalenti molar, Bond Breaker™, Thermo Scientific™) è stato addizionato alla soluzione (approssimativamente 10 mg/ml in 1X DPBS (soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco) con delicata miscelazione su piastra di rimescolamento (225 giri/min) per 5 minuti. In seguito a incubazione in frigorifero a 4 °C per 17 ore, la

soluzione è stata portata fino a 22 °C su una piastra di rimescolamento, miscelando a 225 giri/min. È stato poi addizionato un cosolvente N,N-dimetilacetammide (DMA, Sigma Aldrich) 10% v/v, seguito dal 20% v/v di acido borico 1 M preparato, pH 8,0 (Sigma Aldrich) e poi 6 equivalenti in moli di farmaco linker LD1 50 mM (formula di struttura V, Esempio 1J) in N,N-dimetilacetammide, a gocce. La miscelazione è stata interrotta dopo 20 minuti e la soluzione è stata incubata a 22 °C per 3,3 ore. In seguito a incubazione, 2 equivalenti in moli di N-acetil-L-cisteina (NAC, Sigma Aldrich) 50 mM preparati in 1X DPBS sono stati addizionati alla soluzione e miscelati delicatamente agitando manualmente il recipiente. In seguito a un'incubazione di 1 ora a 22 °C, la soluzione è stata dissalata usando una colonna G25 Fine Desalting da 691 ml (Cytiva™), in 1X DPBS.

Passo 2 di coniugazione

Prima della riduzione, una soluzione di anticorpo anti-c-Met AbA è stata incubata a 4 °C per un minimo di 12 ore. È stata poi addizionata una soluzione di sale disodico di acido etilendiamminotetraacetico 0,5 M (EDTA, Sigma Aldrich), per una concentrazione finale di 5 mM. Tris-(2-carbossietil)fosfina (TCEP, 100 mM, 1,00 eq. mol., Bond Breaker™, Thermo Scientific™) è stata addizionata a una soluzione di anticorpo (approssimativamente 4 mg/ml in 1X DPBS) con delicata miscelazione su piastra di rimescolamento (225 rpm) per 5 minuti. In seguito a incubazione in frigorifero a 4 °C per 17 ore, la soluzione è stata portata a 22 °C su una piastra di rimescolamento, miscelando a 225 giri/min. È stato poi addizionato un cosolvente N,N-dimetilacetammide (DMA, Sigma Aldrich) 10% v/v, seguito da acido borico 20% v/v 1 M, pH 8,0 (Sigma Aldrich) e poi 4 equivalenti molar di farmaco linker LD1 50 mM (formula di struttura V, Esempio 1J) in N,N-dimetilacetammide, a gocce. La miscelazione è stata interrotta dopo 20 minuti e la soluzione è stata incubata a

22 °C per 2,1 ore. In seguito a incubazione, 2 equivalenti molarli di *N*-acetil-L-cisteina (NAC, Sigma Aldrich) 10 mM preparati in 1X DPBS sono stati addizionati alla soluzione e miscelati delicatamente agitando manualmente il recipiente. In seguito a un'incubazione di 5 ore a 22 °C, la soluzione è stata concentrata e il tampone scambiato tramite ultrafiltrazione-diafiltrazione (UF/DF).

Passo di UF/DF

Una cassetta Pellicon® 3 da 0,22 m² (Millipore) è stata sciacquata con 2 l di acqua sterile e poi con 0,5 l di tampone di formulazione. L'ultrafiltrazione (UF) è stata svolta a una portata di alimentazione di 250 ml/minuto e una pressione transmembrana (TMP, Transmembrane Pressure) di 12-13 psi, con un volume iniziale di 1,3 l. Il volume di permeato finale era di 1,1 l. La diafiltrazione (DF) è stata svolta con 25 diavolumi (DV) di tampone di formulazione finale, alla stessa portata di alimentazione e TMP del passo di UF. In seguito a DF, è stato svolto un secondo passo di UF per ridurre ulteriormente il volume di soluzione di ADC a 100 ml. La soluzione di ADC è stata rimossa e la cassetta è stata risciacquata due volte con 125 ml di tampone di formulazione, che è stato poi ultrafiltrato a 20 ml ciascuno. Questi risciacqui sono stati poi addizionati alla soluzione di ADC in massa. La soluzione finale è stata filtrata in modo sterile con un filtro da 0,22 µm, prima della caratterizzazione.

Esempio 7: procedura per coniugazione (ADC-2)

Prima della riduzione, una soluzione di anticorpo anti-c-Met AbA è stata incubata su ghiaccio in fusione per 35 minuti. È stata poi addizionata una soluzione di sale disodico di acido etilendiamminotetraacetico 0,5 M (EDTA, Sigma Aldrich), per una concentrazione finale di 5 mM. Tris-(2-carbossietil)fosfina (TCEP, 25 mM, 3,50 equivalenti molarli, Bond Breaker™, Thermo Scientific™) è

stata addizionata alla soluzione (approssimativamente 10 mg/ml in 1X DPBS) e miscelata delicatamente capovolgendo lentamente la provetta svariate volte. La soluzione è stata poi posta su ghiaccio in fusione e posta nel frigorifero a 4 °C per 24 ore. In seguito a incubazione, co-solvente *N,N*-dimetilacetammide 10% v/v è stato addizionato seguito da 10 equivalenti molar di farmaco linker LD2 10 mM (formula di struttura VI, Esempio 2) in soluzione di *N,N*-dimetilacetammide (DMA, Sigma Aldrich) e miscelato delicatamente capovolgendo lentamente la provetta svariate volte. La soluzione è stata poi posta su ghiaccio in fusione per 30 minuti e incubata a 22 °C per 90 minuti. In seguito a incubazione, 8 equivalenti molar di *N*-acetil-L-cisteina (NAC, Sigma Aldrich) 10 mM preparati in PBS sono stati addizionati alla soluzione e miscelati delicatamente capovolgendo lentamente la provetta svariate volte. Dopo un'incubazione di 60 minuti a 22 °C, la soluzione è stata dissalata su una colonna di dissalazione HiPrep™ 26/10 in 1X DPBS (Cytiva™). Gli ADC dissalati sono stati poi idrolizzati mediante l'addizione di una soluzione preparata di acido borico 1 M 10% v/v, pH 8,0 (Sigma Aldrich) con un'incubazione a 22 °C, per 96 ore. Gli ADC idrolizzati sono stati purificati attraverso cromatografia di affinità accoppiata a dissalazione (2 x 1 ml di HiTrap MabSelect SuRe, HiPrep™ 26/10 Desalting, Cytiva™) in una formulazione finale di 1X DPBS. Le frazioni raccolte sono state accorpate e filtrate in modo sterile attraverso un filtro da 0,22 µm prima della caratterizzazione.

Esempio 8: procedura per coniugazione (ADC-3)

Il sale disodico dell'acido etilendiamminotetraacetico acquoso (EDTA, 0,5 M, 21,3 µl, Sigma Aldrich) è stato addizionato a 5,337 ml di una soluzione di anticorpo anti-c-Met (AbA, 13,34 mg/ml in 1X DPBS, pH 7,4). Tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP, 10 mM, 3,0 eq. molar, 142,4 µl, Bond Breaker™,

Thermo Scientific™) è stato aggiunto alla soluzione, rimescolato delicatamente e mantenuto a 37 °C per 75 minuti. La soluzione è stata raffreddata fino a temperatura ambiente ed è stato aggiunto il farmaco linker LD3 (formula di struttura VII, Esempio 3C) (10 eq., 527 µl di soluzione di LD3 10 mM (Formula di struttura VII, Esempio 3C in *N,N*-dimetilacetammide, purezza 90%)). La coniugazione è stata rimescolata delicatamente e lasciata riposare per 1,2 ore a temperatura ambiente. La soluzione di ADC è stata purificata mediante dissalazione. Dopo dissalazione, la soluzione di ADC è stata filtrata attraverso filtro da 0,22 µm e il campione risultante conservato a 4 °C. L'ADC risultante è stato idrolizzato aggiungendo tampone borato 10% v/v 1,0 M, pH 8,0 e incubato in un ambiente buio a temperatura ambiente per 72 ore. Dopo l'idrolisi, la soluzione di ADC risultante è stata purificata assorbendola su una colonna di resina di proteina A (MabSelect™ SuRe™ LX, GE Healthcare); lavandola con 4 volumi di colonna di 1X DPBS, pH 7,4; eluendola via dalla resina con 5 volumi di colonna di tampone di eluizione per IgG (Thermo Scientific™); e dissalata in 1X DPBS, pH 7,4. Dopo dissalazione, la soluzione di ADC è stata filtrata attraverso un filtro da 0,22 µm e il campione risultante è stato conservato a 4 °C.

Esempio 9: procedura per coniugazione (ADC-4)

Il sale disodico dell'acido etilendiamminotetraacetico acquoso (EDTA, 0,5 M, 974 µl, Sigma Aldrich) è stato aggiunto a 243,3 ml di una soluzione purificata di anticorpo MSL109-C6v1 (12,3 mg/ml in tampone Tris 20 mM, pH 7,4). MSL109-C6v1 è un anticorpo monoclonale che si lega alla glicoproteina H del CMV. MSL109-C6v1 comprende una catena pesante evidenziata come ID di SEQ n. 11 e una catena leggera evidenziata come ID di SEQ n. 12 e viene usato come anticorpo di controllo non mirato. Tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP, 500 mM, 6,0

eq. molar, 242,4 µl, Bond Breaker™, Thermo Scientific™) è stato addizionato alla soluzione di MSL109-C6v1 con EDTA 2 mM e rimescolato delicatamente e mantenuto a 4 °C per 20 ore. Tampone tris a 4 °C (1,0 M, pH 8,0) è stato addizionato alla soluzione (24,5 ml, 10% v/v). Il farmaco linker LD1 (Esempio 1J, (2S)-2-(2-bromoacetammido)-N-[(2S)-1-({3-[(7S)-7-etil-7-idrossi-8,11-diosso-7,8,11,13-tetraidro-2H,10H-[1,3]diossolo[4,5-g]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-14-il]biciclo[1.1.1]pentan-1-il}ammino)-1-ossopropan-2-il]-3-metilbutanamide) è stato addizionato all'anticorpo ridotto a pH 8,0 (10 equivalenti, 22,5 ml di soluzione di LD1 10 mM, formula di struttura V, Esempio 1J, in N,N-dimetilacetammide, purezza 90%). La coniugazione è stata rimescolata delicatamente e lasciata riposare per 1,5 ore in un bagno d'acqua a temperatura ambiente. La coniugazione è stata raffreddata rapidamente con l'aggiunta di 4 equivalenti di una soluzione acquosa di N-acetil-L-cisteina (NAC, Sigma Aldrich, soluzione 100 mM in 1X DPBS, 0,8 ml). La miscela è stata rimescolata delicatamente e lasciata riposare per 1 ora a temperatura ambiente. Tampone tris (15%, Sigma, 1,0 M, pH 7,4, 44 ml) è stato addizionato per regolare la soluzione di ADC a pH 7,5. La soluzione di ADC è stata conservata a 4 °C per tutta la notte. La soluzione di ADC è stata concentrata e il tampone scambiato tramite ultrafiltrazione diafiltrazione (Pellicon® 3 cassetta da 0,22 m² (Millipore)). La soluzione di ADC finale è stata filtrata attraverso un filtro da 0,22 µm e il campione di ADC risultante conservato a 4 °C. Il volume finale di ADC era di 138 ml.

Esempio 10: determinazione del DAR (Drug Antibody Ratio, Rapporto farmaco-anticorpo)

Il DAR è stato determinato mediante LC-MS. L'analisi LC-MS è stata eseguita utilizzando un sistema HPLC Agilent 1100 interfacciato a uno spettrometro

di massa Agilent LC/MSD TOF 6220 ESI. L'ADC è stato ridotto con soluzione di Bond-Breaker™ TCEP 5 mM (concentrazione finale) (Thermo Scientific™, Rockford, IL), caricato su una cartuccia di dissalazione Protein Microtrap (Michrom Bioresources, Auburn, CA) ed eluito con un gradiente dal 10% B al 75% B in 0,2 minuti a temperatura ambiente. La fase mobile A era H₂O con acido formico (FA, Formic Acid) 0,1%, la fase mobile B era acetonitrile con FA 0,1% e la portata era di 0,2 ml/minuto. Spettri di massa a tempo di volo con ionizzazione elettrospray delle catene leggere e pesanti co-eluite sono stati acquisiti usando il software di acquisizione Agilent MassHunter™. L'intensità estratta in contrapposizione allo spettro *m/z* è stata deconvoluta usando la funzione Maximum Entropy (entropia massima) del software MassHunter™ per determinare la massa di ciascun frammento di anticorpo ridotto. Il DAR è stato calcolato dallo spettro deconvoluto sommando le intensità dei picchi grezzi e modificati per la catena leggera e la catena pesante, normalizzato moltiplicando l'intensità per il numero di farmaci legati. Le intensità sommate e normalizzate sono state divise per la somma delle intensità e la somma dei risultati per due catene leggere e due catene pesanti ha prodotto un valore DAR medio finale per l'ADC completo. L'idrolisi di tiosuccinimide di un bioconiugato può essere monitorata mediante spettrometria di massa a elettrospray, dal momento che l'aggiunta di acqua al coniugato dà come risultato un aumento di 18 Dalton al peso molecolare osservabile del coniugato.

Esempio 11: saggio di citotossicità in vitro

Sono state piastrate cellule tumorali a 2000-5000 cellule/pozzetto in mezzo di crescita 180 µl contenente FBS (Fetal Bovine Serum, Siero bovino fetale) 10% in piastre da 96 pozzetti, e messe in coltura a 37 °C in un incubatore umidificato con CO₂ 5%. Dopo da 18 a 24 ore, sono state addizionate titolazioni di anticorpi o ADC in

20 µl e sono state incubate cellule per 6 giorni, eccetto per HCC827, NCI-H820 e HEK-293 (5 giorni) e MIA PaCa2 (4 giorni). La vitalità cellulare è stata determinata usando un saggio di vitalità cellulare luminescente CellTiter-Glo® (Promega) secondo le istruzioni del fabbricante. Un ADC non legante, di controllo negativo irrilevante (ADC-4, Formula di struttura VIII, dove Ab è MSL109-C6v1) è stato incluso anche in tutti i saggi per confermare che l'uccisione cellulare fosse antigene-dipendente. Tutti gli ADC avevano un DAR medio approssimativamente equivalente.

Tabella 2: coniugati anticorpo-farmaco					
	Anticorpo	Catena pesante di anticorpo (ID di SEQ n.)	Catena leggera di anticorpo (ID di SEQ n.)	Formula di struttura di ADC	Esempio di coniugazione
ADC-1	AbA	9	10	VIII	Es. 6
ADC-2	AbA	9	10	IX	Es. 7
ADC-3	AbA	9	10	X	Es. 8
ADC-4	MSL109-C6v1	11	12	VIII	Es. 9

Esempio 12: determinazione di densità dei recettori

La densità di superficie di cellule c-Met (capacità di legame con l'antigene per cellula) è stata determinata mediante colorazione a immunofluorescenza indiretta di antigeni di superficie di cellule su cellule messe in coltura usando QIFIKIT® (Dako/Agilent). In breve, le cellule sono state raccolte da un pallone di coltura come descritto sopra per analisi FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting, Separazione di cellule attivata da fluorescenza), addizionate a una piastra da 96 pozzetti a fondo rotondo a 100 µl/pozzetto e incubate a 4 °C con 3 µg/ml di anticorpo contro c-Met, m224G11. I pozzetti, trattati con un anticorpo monoclonale murino irrilevante dello stesso isotipo (mIgG1) a 3 µg/ml, sono stati inclusi come controlli. In seguito a un'incubazione di un'ora con anticorpo primario, le cellule sono state centrifugate per 3 minuti a 300 x g e lavate due volte con tampone FACS. Per la

colorazione a immunofluorescenza indiretta delle sferette QIFIKIT[®], 100 µl di sferette risospese dalla fiala 1 (sferette di preparazione) e fiala 2 (sferette di calibrazione) sono state addizionate a pozzetti separati, centrifugate per 3 minuti a 300 x g e lavate una volta con tampone FACS. Tutti i pozzetti sono stati incubati per un'ora a 4 °C con 100 µl dell'anticorpo coniugato anti-topo Alexa Fluor[®]488 (Invitrogen, n. cat. A-11029) diluiti 1:250 in tampone FACS. Le cellule sono state centrifugate per 3 minuti a 300 x g, lavate due volte con tampone FACS, e fissate con 100 µl/pozzetto di formaldeide 1% in PBS (Phosphate-Buffered Saline, Soluzione salina tamponata con fosfato). I dati sono stati acquisiti su un citometro a flusso BD[™] LSRII e i valori di media geometrica per le 5 popolazioni di sferette sono stati registrati e usati per generare una curva standard basata sulle molecole di anticorpo specifiche per lotto per sferetta. La curva standard è stata utilizzata per assegnare l'ABC (capacità di legame dell'anticorpo o numero di recettori) ai campioni cellulari colorati.

Risultati

Per determinare una potenziale correlazione tra livello di espressione di c-Met e sensibilità ad ADC-1, un pannello di 9 linee di cellule è stato testato in saggi di proliferazione in vitro. L'analisi FACS ha dimostrato che queste linee di cellule possiedono un intervallo di livelli di espressione di c-Met come quantificati tramite capacità di legame di anticorpo a c-Met che rappresenta il numero di molecole di c-Met sulla superficie della cellula (TABELLA 3). La sensibilità ad ADC-1 nel saggio di proliferazione cellulare è stata quantificata come uccisione massima e IC₅₀ (TABELLA 3). L'ADC-1 ha inibito la proliferazione di cellule di cancro che sovraesprimono c-Met, incluse le linee di cellule con *MET* amplificato (TABELLA 3). Come confronto, l'AbA non coniugato ha inibito la proliferazione di cellule *con amplificazione di MET*, cioè, Hs 746T, SNU-5 ed EBC-1 (FIGG. 3A-C), ma non linee

di cellule senza amplificazione di MET, cioè, NCI-H441, NCI-H1573, HCC827, NCI-H820 e Calu-3, e dove anche ADC-1 era attivo (FIGG. 3D-H). Né AbA non coniugato né ADC-1 erano attivi su cellule esprimenti bassi livelli di c-Met, HEK-293 e MIA PaCa2 (TABELLA 3, FIG. 3I e FIG. 3J), suggerendo che vi è un livello soglia di espressione di c-Met richiesto per un'uccisione significativa da parte di ADC-1.

TABELLA 3: potenza cellulare in vitro				
Tessuto	Recettori c-Met/cellula ^a	IC ₅₀ di citotossicità (nM)		
		ADC-3 (max ^b)	ADC-2 (max)	ADC-1 (max)
Adenocarcinoma NSCLC				
NCI-H441	197.000	0,1 (60%)	0,1 (70%)	0,25 (70%)
NCI-H441	170.000	0,2 (85%)	0,25 (90%)	0,3 (90%)
NCI-H1573	116.000	1,1 (60%)	1 ^c (40%)	1 ^c (40%)
HCC827	94.000	0,5 (80%)	0,9 (70%)	0,85 (70%)
NCI-H820	70.000	0,06 (75%)	0,16 (75%)	0,17 (75%)
Calu-3	60.000	nd	nd	20 (30%)
Gastrico				
Hs 746T	320.000	0,050 (40%)	0,1 (50%)	0,17 (50%)
SNU-5	290.000	nd ^e	nd	0,19 (90%)
Rene embrionale				
HEK-293	27.000	nd	nd	>60 ^d
Pancreatico				
MIA PaCa-2	5000	>60 ^d	>60 ^d	>60 ^d

^aNumero approssimativo di molecole di c-Met sulla superficie di cellule determinato mediante analisi FACS come capacità di legame di anticorpo per legame di m224GI (il progenitore murino di AbA) a 0,01 g/ml

^bMax è la diminuzione percentuale massima relativa al controllo non trattato nel saggio di proliferazione. ^cStimata, dovuta a questioni di interpolazione

^dNon differente dal controllo

^end significa non determinato

Esempio 13: ADC TOPLi che mira a c-Met inibisce la crescita di xenotrapianti di cancro in vivo

Le linee di cellule Hs 746T e NCI-H441 sono state ottenute da ATCC (American Type Culture Collection). Le cellule sono state mantenute in coltura monostrato per un massimo di 3 passaggi, secondo le raccomandazioni del fornitore. Una sospensione di 2×10^6 cellule in mezzo di coltura miscelato con Matrigel® (1:1, volume:volume) è stata iniettata per via sottocutanea nel fianco destro di topi SCID CB-17 femmina per generare xenotrapianti dalla linea di cellule di carcinoma gastrico, Hs 746T. Per generare xenotrapianti dalla linea di cellule NSCLC, NCI-H441, una sospensione di 5×10^6 cellule in mezzo di coltura miscelato con Matrigel (1:1, volume:volume) è stata iniettata per via sottocutanea in topi SCID/bg femmina. Il trattamento è iniziato quando la dimensione dei tumori sul fianco era approssimativamente di 200 mm^3 .

Sono stati somministrati il veicolo (0 mg/kg) e quattro livelli di dose (dosi A-D, dalla più bassa alla più alta). Ciascun animale ha ricevuto una singola dose.

Le Figure 4A e 4B mostrano che ADC-1 ha inibito la crescita di NSCLC umano cresciuto come xenotrapianti in topi immunocompromessi. È dimostrata una robusta inibizione della crescita dopo somministrazione di una dose di ADC-1 alla dose C e dose D, con moderato ritardo di crescita del tumore dopo aver dosato la dose B in entrambi gli xenotrapianti Hs 746T e NCI-H441.

Esempio 14: ADC TOPLi che mirano a c-MET inibiscono la crescita di cellule di cancro derivate da pazienti in vivo

I modelli di xenotrapianto derivati da pazienti (PDX, Patient-Derived Xenograft) con NSCLC, LU450, LU120, LU572, LU123, e LU413, sono stati stabiliti internamente impiantando frammenti di tessuto bioptico di paziente per via

sottocutanea in topi NOD/SCID immunodeficienti femmina (Charles River Laboratories). Una volta che i tumori si sono stabiliti, le cellule tumorali PDX sono state espanse mediante dissociazione di tumori in sospensioni cellulari e 5×10^4 cellule nel mezzo di coltura sono state miscelate con Matrigel® (1:1, volume:volume) sono state iniettate per via sottocutanea nella regione del cuscinetto adiposo mammario di topi NOD/SCID femmina. Per gli studi di efficacia, i topi portatori di tumore sono stati randomizzati in gruppi di trattamento, con ciascun gruppo avente volume di tumore medio uguale (130-200 mm³). Gli ADC contro c-Met sono stati somministrati come una dose singola a sei livelli di dose (dosi A-F, dalla più bassa alla più alta) tramite iniezione intraperitoneale. L'efficacia mirata a c-Met è stata confrontata con una somministrazione simile di veicolo. I volumi di tumore sono stati misurati da una a due volte alla settimana e l'efficacia è stata valutata tracciando il volume di tumore (mm³) in contrapposizione al tempo per calcolare il tempo alla progressione del tumore (TTP, Time To Tumor Progression). Il TTP, espresso in giorni, è il tempo dopo il trattamento della singola dose quando il tumore ricresce fino a raddoppiare la dimensione prima del trattamento (alla randomizzazione). Il TTP per risposte durature (cure) è indicato come la lunghezza dello studio con un segno ">" davanti al numero.

TABELLA 4. Attività in vivo di ADC-1 e ADC-2 in modelli PDX di NSCLC		
Nome PDX	ADC-1¹	TTP (giorni)
LU450	0	3
	3	15
	10	23
LU572	0	9
	0,1	26
	0,25	>78
	1	>91
	3	>91
LU211	0	4
	3	41
Nome PDX	ADC-2	TTP (giorni)

TABELLA 4. Attività in vivo di ADC-1 e ADC-2 in modelli PDX di NSCLC		
Nome PDX	ADC-1¹	TTP (giorni)
LU450	0	4
	5	34
	10	45
LU123	0	8
	5	> 106
	10	> 113
LU120	0	23
	5	>94
	10	>112
LU413	0	11
	5	40
	10	71
¹ 0 = controllo con veicolo Un ADC con una struttura secondo la formula di struttura (VIII) ha dimostrato tossicità in vivo migliorata.		

TABELLA DELL'ELENCO DELLE SEQUENZE		
ID di SEQ N.:	Descrizione	Sequenza
1	AbA CDR-H1	GYIFTAYT
2	AbA CDR-H2	IKPNNGLA
3	AbA CDR-H3	ARSEITTEFDY
4	AbA CDR-L1	ESVDSYANSF
5	AbA CDR-L2	RAS
6	AbA CDR-L3	QQSKEDPLT
7	Dominio variabile di catena pesante di AbA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTM HWVRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANAYAQKFQG RVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARSEI TTEFDYWGQGILVTVSS

TABELLA DELL'ELENCO DELLE SEQUENZE		
ID di SEQ N.:	Descrizione	Sequenza
8	Dominio variabile di catena leggera di AbA	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVDYANS FLHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGG TKVEIK
9	Catena pesante di AbA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTM HWVRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANYAQKFQG RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSEL TTEFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS SNTKVDKRVKPKSCDCHCPPCPAPELLGGPSVFLFPP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQ VYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
10	Catena leggera di AbA	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVDYANS FLHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
11	Catena pesante di MSL109-C6v1	EEQVLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSPYSVF WVRQAPGKGLEWVSSINSSTYKYYADSVKGRFT ISRDNAENSIFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRSYY AFSSGSLSDYYYGLDVWGQGTTVIVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

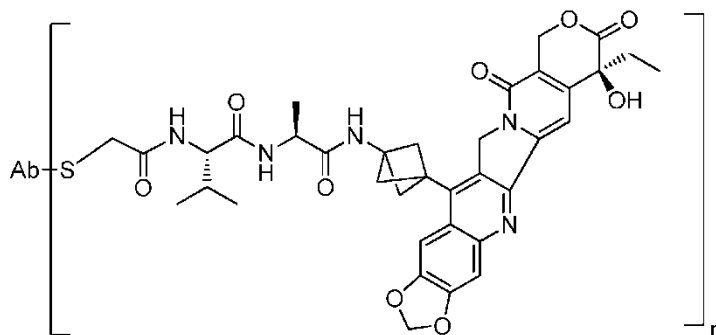
TABELLA DELL'ELENCO DELLE SEQUENZE		
ID di SEQ N.:	Descrizione	Sequenza
12	Catena leggera di MSL109-C6v1	DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLHTNGYN YLDWYVQKPGQSPQLLIYLASNRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEDVGVYYCMQALQIPRTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEA
13	Dominio variabile di catena pesante di m224G11	EVQLQDSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMH WVRQSLGESLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKGKA TLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCARSEITT EFDYWGQGTALTVSS
14	Dominio variabile di catena leggera di m224G11	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSF MHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGS RTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSKEDPLTFGSGT KLEMK
15	CDR1 di HC di m224G11	GYIFTAYT
16	CDR2 di HC di m224G11	IKPNNGLA
17	CDR3 di HC di m224G11	ARSEITTEFDY
18	CDR1 di LC di m224G11	ESVDSYANSF
19	CDR2 di LC di m224G11	RAS
20	CDR3 di LC di m224G11	QQSKEDPLT

TABELLA DELL'ELENCO DELLE SEQUENZE		
ID di SEQ N.:	Descrizione	Sequenza
21	DNA codificante per catena pesante di AbA	atgggatggctctggatctttctgctgtttctgctggtactgctggtgctgagc caggctccagctgggcaatccggcgcagaggtgaagaagccaggcgttcc gtgaaggtgagctgtaaggcctctggctacatctcacagcatacaccatgcac tgggtgaggcaagctcctgggcagggactggagtgatgggatggattaac ccaacaatgggctggccaactacgcccagaaattccagggtagggtcactatg acaaggatgaccagcatcagcaccgcatataggagctgagcaggctgaggt ctgacgacactgctgtctattatggcggagcgaattacaacagaattcga ttactggggcagggcaccctgggaccgtgtcctctgccagcacaagggc ccaagcgtgttccccctggccccagcagcaagagcaccagcggcgccaca gcccctgggctgctggtaaggactactccccagcccgtgaccgtgtc ctggaacagcggagccctcactctggagtcatcctccagcagatttga gagcagtgccctgtattactgtcttcgctgtaacagtccatcctccagcctc ggacacagactfacattgtaacgtgaatcacaagcctagcaacaccaaggctc acaagagagttgaaccaaagagttgtgattgccactgtcctccctgccagctc ctgagctgctggcggtccagtgctcttctgttccccctaaccacaagacac cctgatgatcgaaggacccccaggtgacatcgtgggtggatggtctca tgaggaccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcac aacgccaagaccaagcccagagaggagcagtacaacagcacctacagggtg gtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtaca agtgtgaaggtgtccaacaaggccctgccagccccaatcgaagaccatcag caaggccaaggccagccaagagagccccaggtgtacacctgcccaccag caggaggagatgaccaagaaccagggtgcctgacctgtctggtgaagggc ttctaccaagcgacatgccctggagtgaggagcaacggccagcccag aacaactacaagaccacccccagtgctggacagcgcggcagcttctct gtacagcaagctgaccgtggacaagagcagatggcagcaggcaacgtgttc agctgctccgtgatgcagaggccctgcacaaccactacaccagaagagcc tgagcctgtcccaggtga
22	DNA codificante per CDR-H1 di AbA	ggctacatcttcacagcatacacc
23	DNA codificante per CDR-H2 di AbA	attaaaccaacaatgggctggcc
24	DNA codificante per CDR-H3 di AbA	gccaggagcgaattacaacagaattcgattac

TABELLA DELL'ELENCO DELLE SEQUENZE		
ID di SEQ N.:	Descrizione	Sequenza
25	DNA codificante per catena leggera di AbA	atggaaactgatacactgctgctgtgggtcctgctgctgtgggtccctggaagc acaggggacattgtgatgaccagctctccgatagcctggcctgtccctggg cgagagggtaccatcaactgtaaagctccgaatctgtggactttacgcaaa cagctttctgactgggtatcagcaaaagccaggccaacctccaagctgctgat ttacagggcttaccagggagagcggcgtgcccgatagggtcagcggatctg gcagcggcaccgactttacactgaccatctcagcctgcaggccgaagatgtg gcagtctattactgccagcagtccaaggaggaccccctgactttcgggggtggt actaaagtggagatcaagcgtacgggtggccgctcccagcgtgttcatttcccc ccaagcgcagagcagctgaagagcggcaccgccagcgtgggtgtctctg aacaacttctaccaggaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgcc ctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggacagcaagga ctccacctacagcctgagcagcacctgacctgagcaaggccgactacgag aagcacaaggtgtacgctgtgaggtgaccaccagggcctgtccagccccg tgaccaagagctcaacaggggagtgctga
26	DNA codificante per CDR-L1 di AbA	gaatctgtggactcttacgcaaacagcttt
27	DNA codificante per CDR-L2 di AbA	agggcttct
28	DNA codificante per CDR-L3 di AbA	cagcagtccaaggaggaccccctgact

RIVENDICAZIONI

1. Coniugato anticorpo-farmaco anti-c-Met comprendente la seguente struttura:



in cui n è un numero intero da 1 a 10, e in cui Ab è un anticorpo anti-c-Met IgG₁ comprendente

una regione variabile di catena pesante comprendente un dominio CDR3 di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 3, un dominio CDR2 di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 2, e un dominio CDR1 di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 1; e

una regione variabile di catena leggera comprendente un dominio CDR3 di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 6, un dominio CDR2 di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 5, e un dominio CDR1 di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi mostrata come ID di SEQ n. 4.

2. Il coniugato anticorpo-farmaco anti-c-Met secondo la rivendicazione 1, in cui l'anticorpo Ab comprende una regione variabile di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi evidenziata come ID di SEQ n. 7 e una regione variabile di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi evidenziata come ID di SEQ n. 8.

3. Il coniugato anticorpo-farmaco anti-c-Met secondo la rivendicazione 1, in cui l'anticorpo Ab comprende una catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi evidenziata come ID di SEQ n. 9 e una catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi evidenziata come ID di SEQ n. 10.

4. Il coniugato anticorpo-farmaco anti-c-Met secondo la rivendicazione 3, in cui n è 6.
5. Il coniugato anticorpo-farmaco anti-c-Met secondo la rivendicazione 3, in cui n è 2.
6. Il coniugato anticorpo-farmaco anti-c-Met secondo la rivendicazione 3, in cui n è 4.
7. Il coniugato anticorpo-farmaco anti-c-Met secondo la rivendicazione 3, in cui n è 8.
8. Il coniugato anticorpo-farmaco anti-c-Met secondo la rivendicazione 3, in cui n è 10.

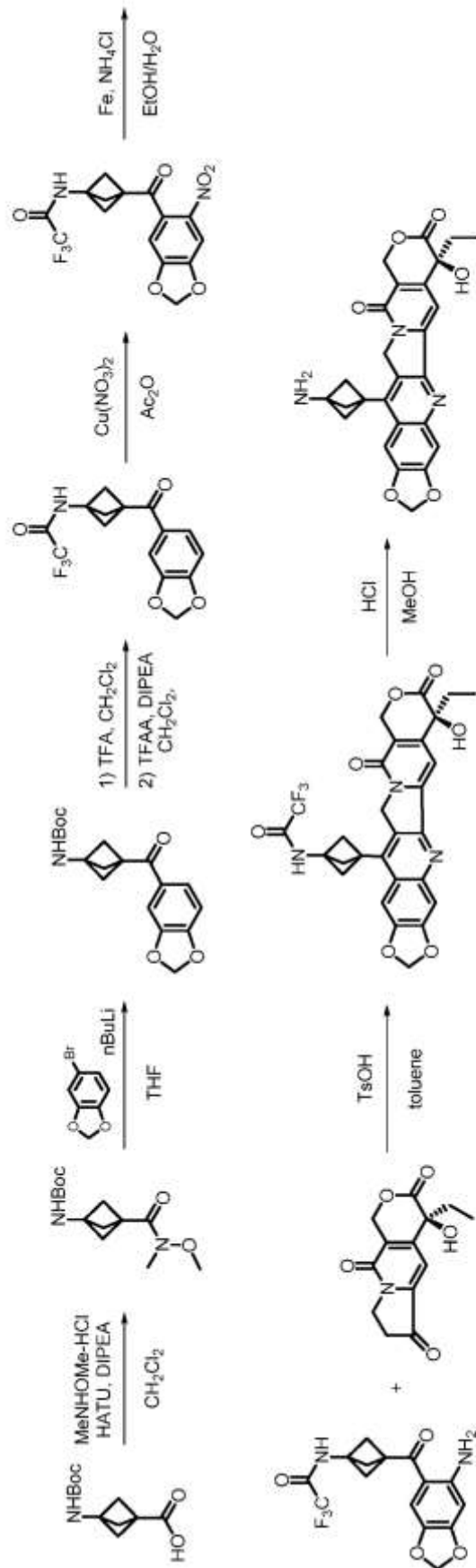
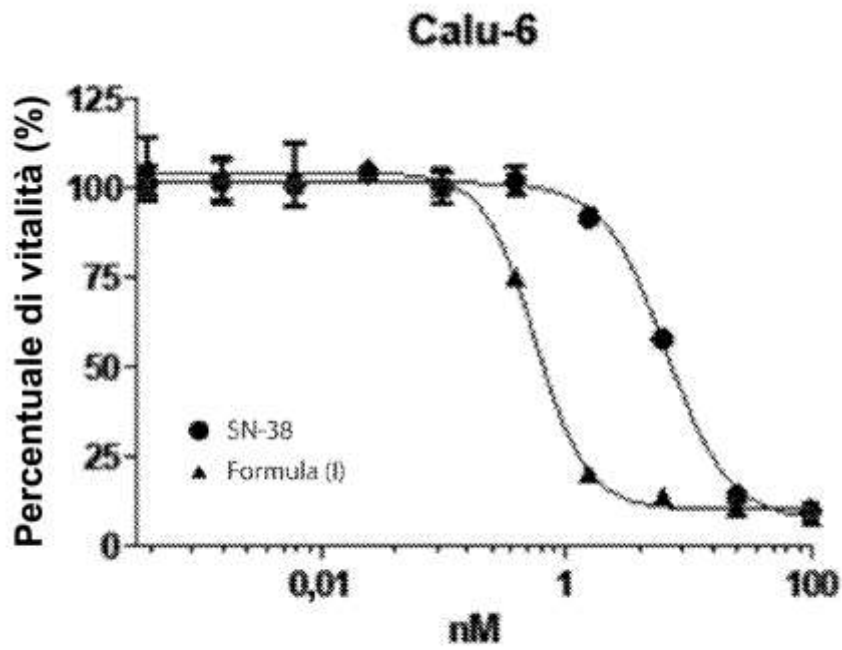
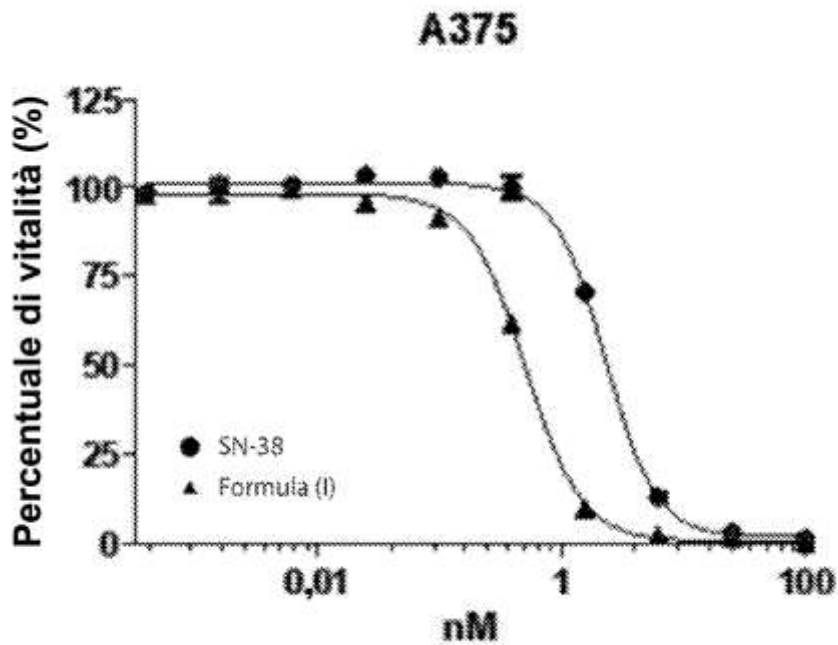
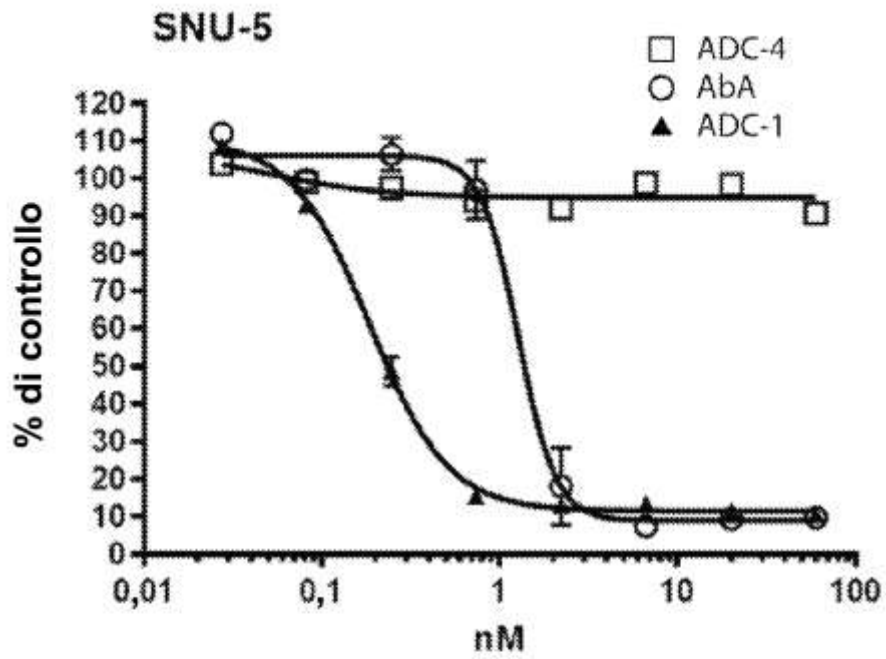
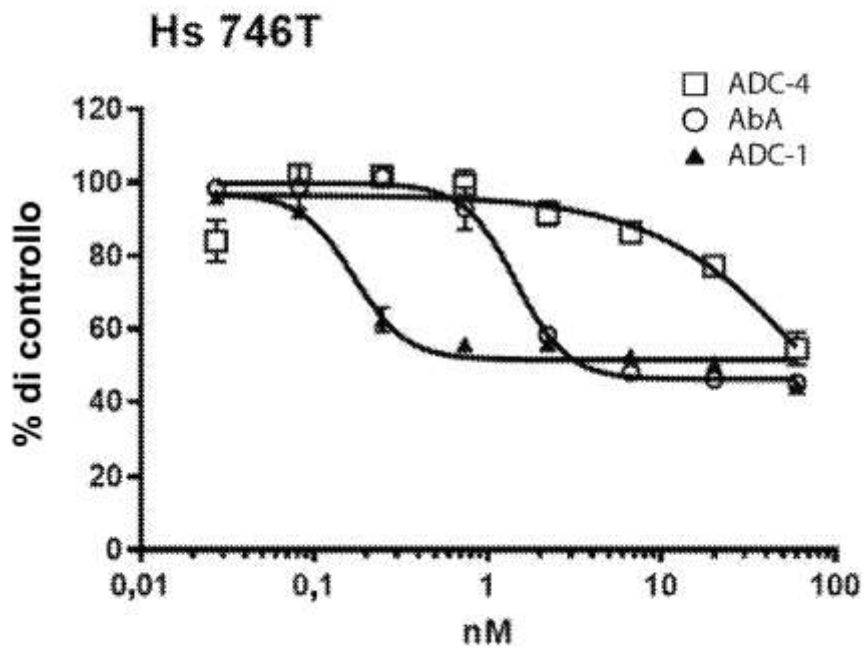
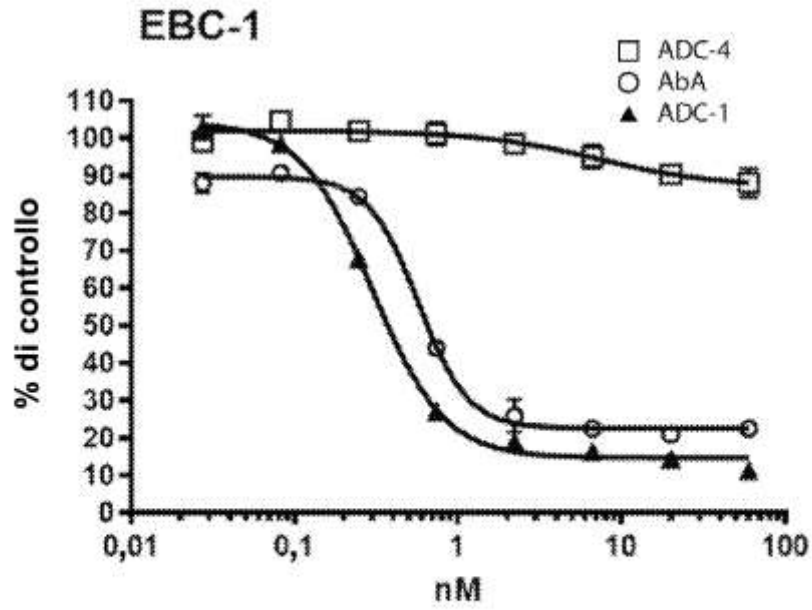
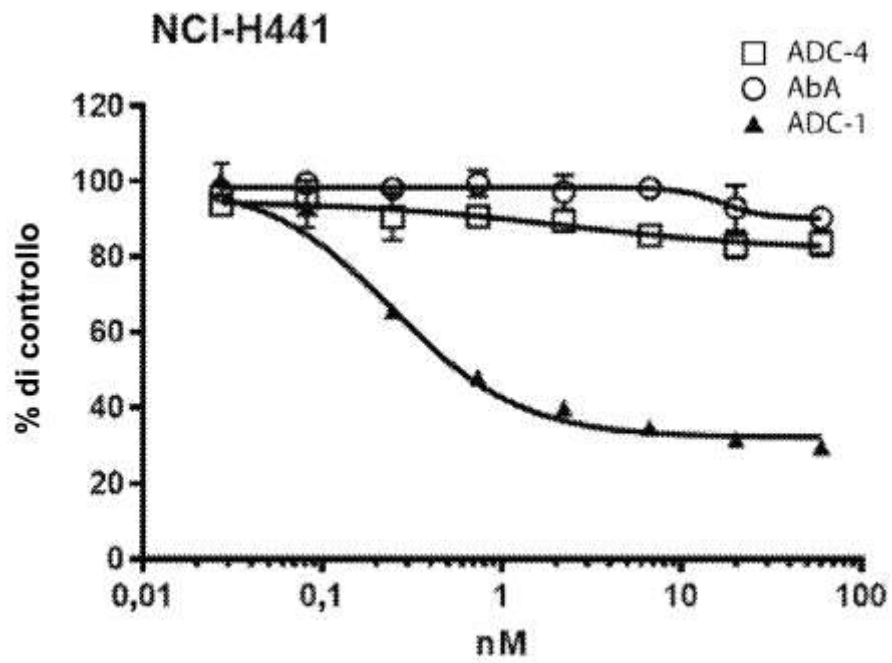
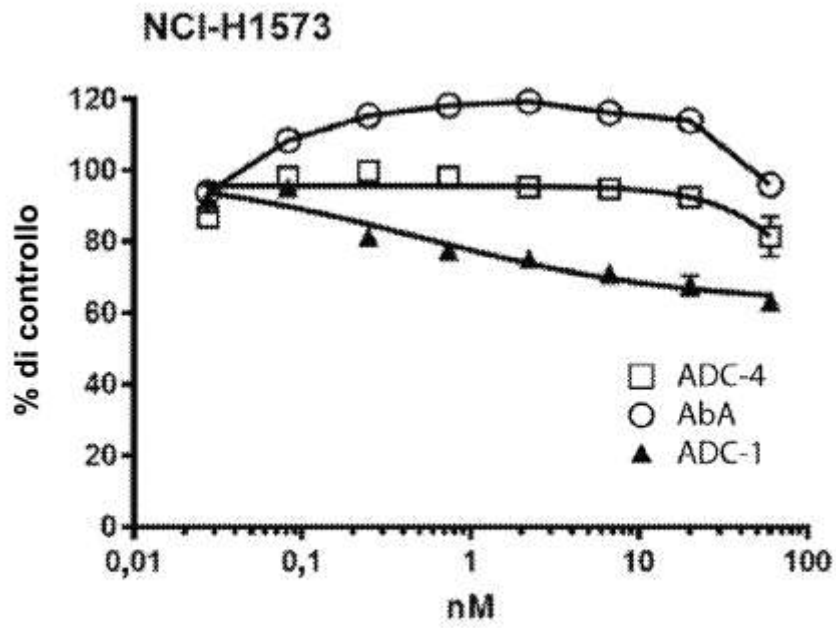
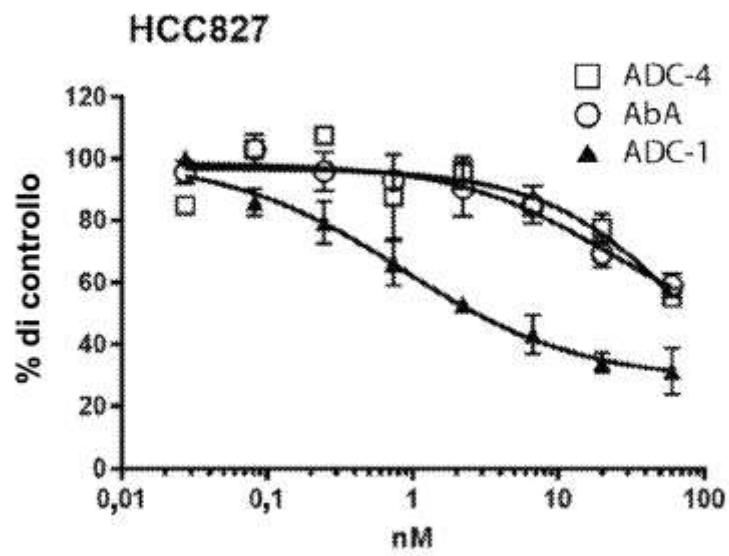


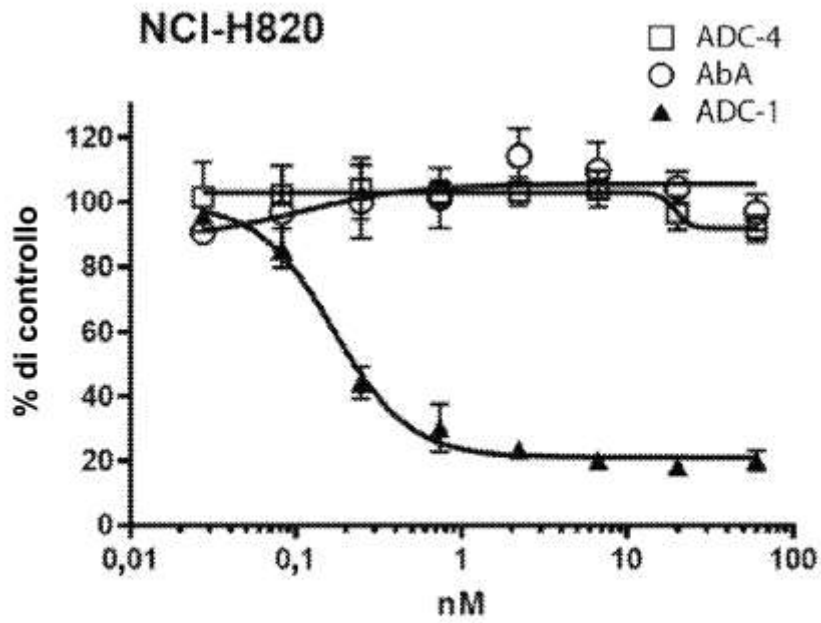
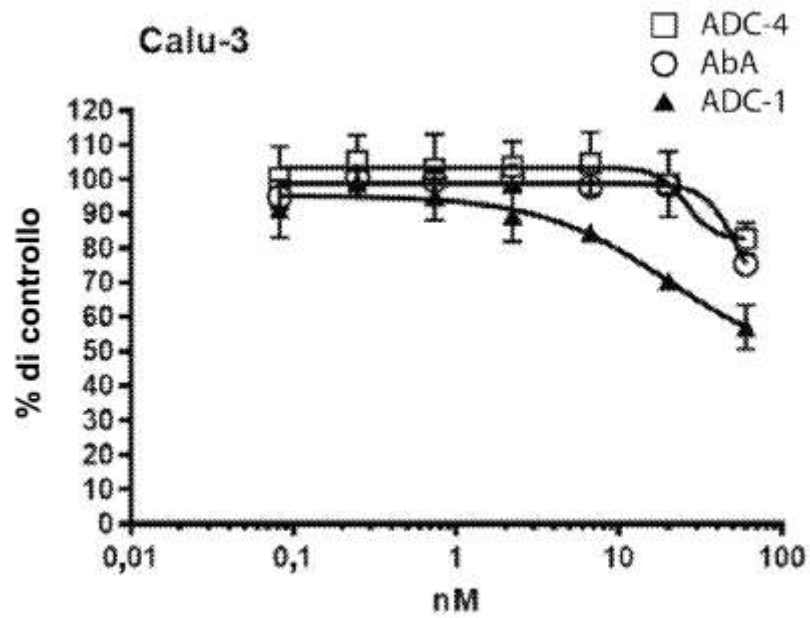
FIG. 1

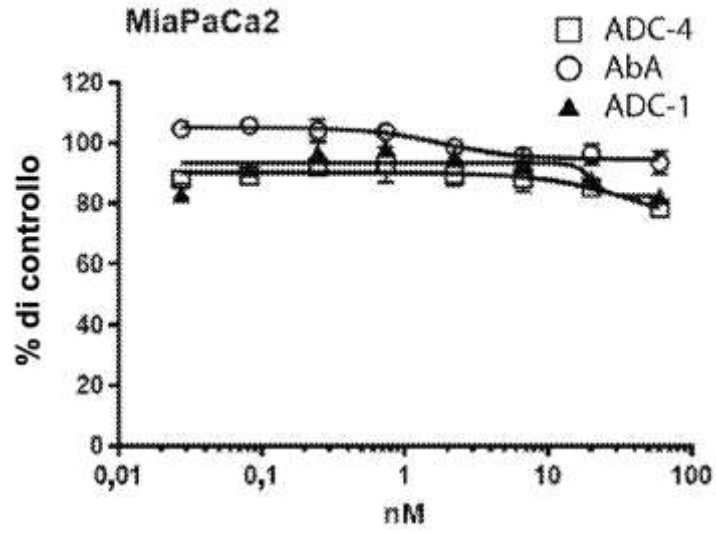
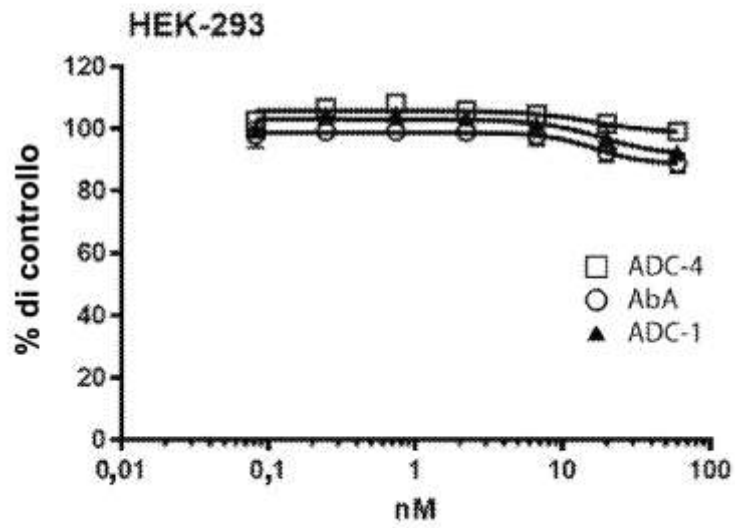
**FIG. 2A****FIG. 2B**

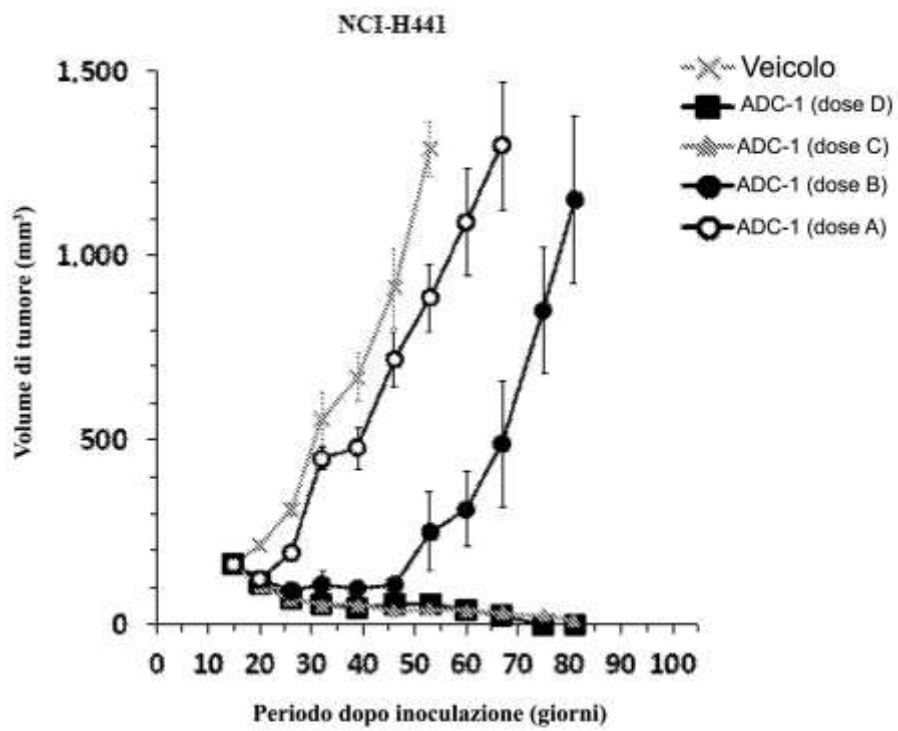
**FIG. 3A****FIG. 3B**

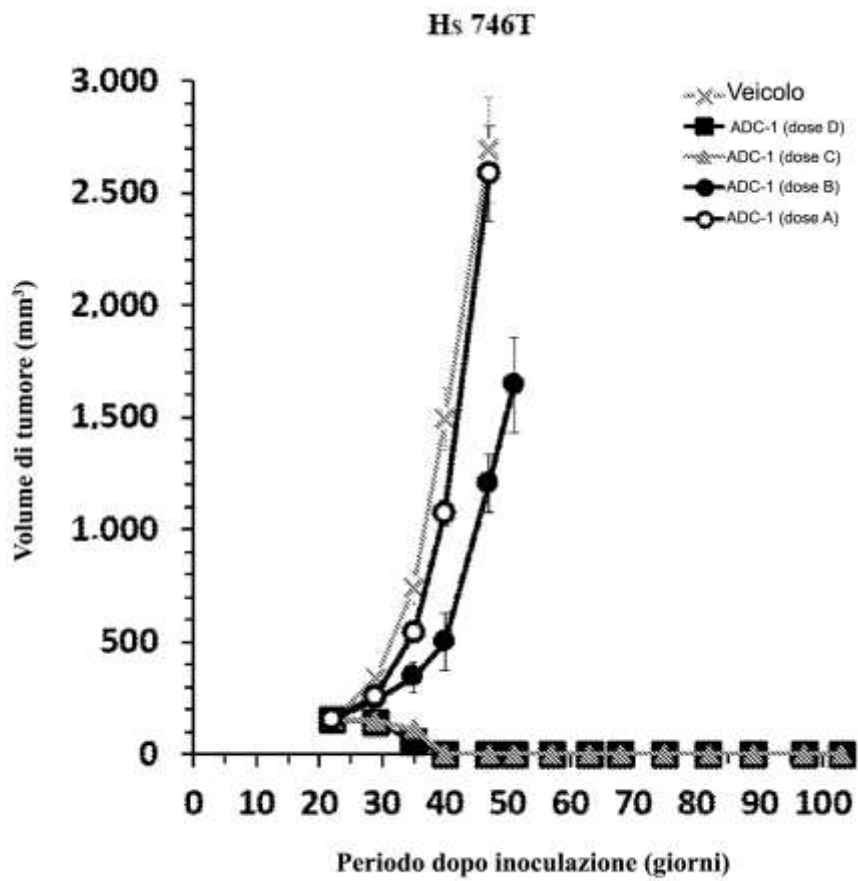
**FIG 3C****FIG. 3D**

**FIG. 3E****FIG. 3F**

**FIG. 3G****FIG. 3H**

**FIG. 3I****FIG. 3J**

**FIG. 4A**

**FIG. 4B**