

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 695**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2005 E 05724726 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 1725586**

54 Título: **Anticuerpos cargados parcialmente y métodos para su conjugación**

30 Prioridad:

02.03.2004 US 549476 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.04.2015

73 Titular/es:

**SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)
21823 30TH DRIVE, S.E.
BOTHELL, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**ALLEY, STEPHEN CHARLES;
TORGOV, MICHAEL Y. y
SUN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 533 695 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos cargados parcialmente y métodos para su conjugación

5 **Antecedentes**

La presente divulgación se dirige a proteínas modificadas que tienen al menos un punto de conjugación con, por ejemplo, un fármaco que genera isómeros específicos del conjugado de proteína-fármaco, y a métodos para dicha conjugación que genera los isómeros específicos. Se dirige además a anticuerpos a los que se pueden conjugar agentes citotóxicos y/o agentes citostáticos, dando lugar a isómeros específicos, y a métodos para su conjugación.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) son una valiosa arma en la batalla contra el cáncer. Los mAb también se usan en el tratamiento de trastornos inmunes. Para seguir avanzando en el uso de terapias basadas en mAb contra el cáncer y los trastornos inmunes, se ha explorado una serie de nuevas metodologías. Una metodología es aumentar el potencial citotóxico de los mAb contra las células tumorales mediante la unión de cargas útiles de destrucción celular. Se han conjugado moléculas tales como toxinas, radionúclidos, proteínas y fármacos contra el cáncer a ciertos mAb para generar inmunotoxinas, radioinmunoconjugados y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), respectivamente.

Los factores que se han considerado previamente en el desarrollo de ADC han incluido la elección del anticuerpo y la optimización de la potencia del componente de fármaco, la estabilidad del enlazador y el método mediante el que el fármaco se une covalentemente al mAb. La convención común para la producción de ADC conjugados a través de los enlaces disulfuro ha sido mediante la reducción de todos los enlaces disulfuro intercatenarios de un anticuerpo y la reacción de todos los tioles de mAb reducidos con un compuesto capaz de la interaccionar con todos los tioles reducidos, formando ADC uniformemente sustituidos con 8 fármacos/mAb, es decir, "completamente cargados", sin la capacidad de obtenerse especificidad para un determinado sitio de conjugación.

Por ejemplo, el antígeno CD30 se expresa a un alto nivel en cánceres tales como la enfermedad de Hodgkin (EH) y los linfomas anaplásicos de células grandes (LACG). Esta expresión de CD30, junto con la expresión limitada en las células normales, lo convierte en una atractiva diana para la terapia con ADC. El mAb quimérico dirigido a CD30, cAC10, tiene actividad antitumoral contra la EH tanto *in vitro* como en modelos de xenoinjerto de ratón SCID subcutáneos y difundidos. La actividad antitumoral de cAC10 se mejoró mediante la generación de ADC completamente cargados en los que los ocho tioles intercatenarios estaban enlazados a derivados del agente citotóxico auristatina E como el componente de fármaco. Estos ADC fueron muy eficaces en modelos de xenoinjerto murinos a dosis bien toleradas.

Francisco *et al.*, 2003. "Blood", 102(4), 1458-1465 describen un conjugado que comprende el anticuerpo monoclonal contra CD30 quimérico cAC10 acoplado covalentemente al agente citotóxico monometil-auristatina E (MMAE) a través del enlazador peptídico de valina y citrulina. Los autores informan que el conjugado tenía una actividad antitumoral significativamente superior a la de cAC10 solo, ensayada en un modelo de xenoinjerto de ratones SCID de la enfermedad de Hodgkin.

El documento EP0403225 desvela un método de radiomarcaje de una proteína con un radioisótopo de tecnecio o renio, método que comprende las etapas de poner en contacto una solución de una proteína que contiene una pluralidad de grupos sulfhidrilo libres adyacentes o, en determinados casos, proteína intacta que contiene al menos un grupo disulfuro, con iones estaño, y luego con radiopertecnetato o radioperrenato, siendo la cantidad de ión estaño suficiente para reducir de manera sustancialmente completa el radiopertecnetato o radioperrenato y recuperar la proteína radiomarcada.

Schroeder *et al.*, 1981. *Vox Sang*, 40, 373-382 desvelan una globulina sérica inmunológica (GSI), preparada mediante fraccionamiento con alcohol frío de Cohn de plasma humano combinado reducido con ditiotretol (DTT) y alquilado con yodoacetamida y otros agentes de alquilación. Los autores informan que hay unos cuantos enlaces disulfuro entre cadenas pesadas lábiles en la GSI que reaccionan rápidamente en condiciones moderadas de no disociación. Se informa que el grado de escisión de los disulfuros está controlado principalmente por la proporción del DTT con respecto a la GSI hasta que se produce la reducción de aproximadamente 4-5 enlaces disulfuro. Los autores detallan estudios sobre las variables de la concentración de GSI, la proporción del DTT con respecto a la GSI, el pH y el tiempo, que conducen a una GSI modificada químicamente que tiene un número controlado y limitado de enlaces disulfuro reducidos y alquilados.

Debido a que la convención en la producción de ADC ha sido cargarlos completamente con fármaco, no se ha apreciado anteriormente que los ADC cargados parcialmente podrían tener una eficacia terapéutica similar o superior. Además, no existían métodos que pudieran tener en cuenta que otros patrones de sustitución de anticuerpos podrían producir eficacia terapéutica igual o mejor con una toxicidad igual o inferior. Estas y otras limitaciones y problemas del pasado se resuelven mediante la presente invención.

65

Breve resumen

En su sentido más amplio, la invención se refiere a la materia objeto según lo definido por las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación describe conjugados de proteína-fármaco y métodos de fabricación de conjugados de proteína-fármaco y marcados con proteínas. También se proporcionan proteínas que tienen puntos de conjugación para recibir un fármaco o marcador. Los conjugados se pueden usar a nivel terapéutico o de diagnóstico (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*), o para la formación de imágenes *in vivo*, y para otros usos.

En general, se proporcionan proteínas modificadas, parcialmente cargadas, que tienen puntos de conjugación asignables. Las proteínas modificadas generalmente incluyen una región de unión para la interacción con una pareja de unión y al menos dos puntos de conjugación, estando cada punto de conjugación unido covalentemente a un fármaco o marcador. Por lo general, no todos los posibles puntos de conjugación que tienen una accesibilidad o capacidad de activación similares están enlazados a un fármaco o marcador. La proteína modificada puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor, un ligando de receptor, una hormona, una citoquina o similares. Los puntos de conjugación pueden ser, por ejemplo, grupos amino, grupos hidroxilo próximos, grupos hidroxilo, grupos carboxilo o grupos tiol. La proteína puede ser, por ejemplo, un receptor, un ligando de receptor, una hormona, una citoquina o similares.

En realizaciones adicionales, se proporciona un método de preparación de un conjugado de una proteína que tiene uno o más enlaces disulfuro y un fármaco reactivo con tioles libres. El método generalmente incluye reducir parcialmente la proteína con un agente reductor; y conjugar el fármaco reactivo con tioles libres a la proteína parcialmente reducida. En otra realización más, se proporciona un método de preparación de un conjugado de una proteína que tiene uno o más enlaces disulfuro y un fármaco reactivo con tioles libres. El método generalmente incluye reducir totalmente la proteína con un agente reductor; reoxidar parcialmente la proteína con un agente reoxidante; y conjugar el fármaco reactivo con tioles libres al anticuerpo.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo parcialmente cargado. El anticuerpo incluye una región de unión al antígeno, al menos un enlace disulfuro intercatenario y al menos dos fármacos o marcadores, estando cada fármaco o marcador conjugado a un tiol intercatenario. Opcionalmente, los puntos de la conjugación del fármaco o marcador son fácilmente asignables. En un ejemplo, el anticuerpo puede tener al menos cuatro fármacos citotóxicos o citostáticos, estando cada fármaco conjugado a un tiol intercatenario. En ciertas realizaciones, el anticuerpo tiene la configuración de las especies 4A, 4B, 4C, 4D, 4E o 4F.

El anticuerpo parcialmente cargado puede ser, por ejemplo, un anticuerpo murino, humanizado, humano o quimérico. El fármaco puede ser, por ejemplo, un agente citotóxico o citostático tal como, por ejemplo, MMAF, MMAE o AFP. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos parcialmente cargados.

En otra realización, se proporcionan anticuerpos que tienen al menos un punto de conjugación para un agente citotóxico o citostático, en la que el punto de conjugación para el agente citotóxico o citostático en el anticuerpo se puede asignar fácilmente. En el anticuerpo, no todos los puntos posibles de conjugación están disponibles para la conjugación con el agente citotóxico o citostático. Los puntos de conjugación pueden ser, por ejemplo, tioles intercatenarios. Los puntos de conjugación pueden ser, por ejemplo, al menos una de las especies 4A a 4F.

También se proporciona una composición de anticuerpos modificados que tienen puntos de conjugación asignables. La composición puede tener, por ejemplo, al menos dos, al menos cuatro, al menos 6, al menos 7, al menos 10 o más especies de anticuerpo modificado. En un ejemplo, cada especie puede tener al menos un par de conjugación especificado que tiene dos tioles intercatenarios y al menos un enlace disulfuro intercatenario. Las especies de anticuerpos pueden tener, por ejemplo, 4A, 4B, 4C, 4D, 4E y/o 4F. En ejemplos adicionales, el par de conjugación especificado puede estar en un enlace disulfuro entre una cadena ligera constante y una cadena pesada constante y/o en un enlace disulfuro entre una cadena pesada constante y una cadena pesada constante. El par de conjugación especificado puede estar próximo al extremo N-terminal de la región bisagra y/o próximo al extremo C-terminal de la región bisagra. En otro ejemplo, el par de conjugación especificado está en el enlace disulfuro entre una cadena ligera constante y una cadena pesada constante y en la región bisagra situada más cerca del extremo N-terminal del anticuerpo modificado, o en el enlace disulfuro entre una cadena ligera constante y una cadena pesada constante y en la región bisagra situada más cerca del extremo C-terminal del anticuerpo modificado.

Opcionalmente, cada especie de anticuerpo puede incluir al menos dos pares de conjugación especificados en los enlaces disulfuro entre la cadena ligera constante y la cadena pesada constante o al menos dos pares de conjugación especificados en los enlaces disulfuro intercatenarios de la región bisagra. Opcionalmente, la composición puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización más, se proporciona un anticuerpo parcialmente cargado. El anticuerpo incluye al menos un dominio de unión al antígeno, al menos dos grupos reactivos en el anticuerpo y al menos dos fármacos o

marcadores, estando cada fármaco o marcador conjugado a un grupo reactivo para formar un punto de conjugación. Los puntos de la conjugación del fármaco o marcador son fácilmente asignables.

5 En otras realizaciones más, se proporciona un método de reducción y conjugación de un fármaco a un anticuerpo que da lugar a selectividad en la colocación del fármaco. En general, el método incluye reducir totalmente el anticuerpo con un agente reductor; tratar el anticuerpo totalmente reducido con cantidades limitantes de un agente reoxidante para volver a formar al menos un enlace disulfuro intercatenario del anticuerpo, de modo que queden al menos dos tioles intercatenarios; y conjugar el fármaco a los tioles intercatenarios. El agente reoxidante puede ser, por ejemplo, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico, 4,4'-ditiodipiridina, 2,2'-ditiodipiridina, tetrionato de sodio o ácido yodosobenzoico. El fármaco puede ser, por ejemplo, un agente citotóxico o citostático o un agente inmunosupresor. En algunos ejemplos, el fármaco puede ser un aglutinante de surco menor, AEB, AENB, MMAF, MMAE o AFP. El agente reductor puede ser, por ejemplo, DTT o TCEP.

15 En realizaciones relacionadas, se proporciona un método de reducción de enlaces disulfuro intercatenarios de anticuerpos y de conjugación de un fármaco a los tioles intercatenarios resultantes que da lugar a selectividad en la colocación de los fármacos en el anticuerpo. En general, el método incluye reducir totalmente el anticuerpo con un agente reductor para formar tioles intercatenarios; reoxidar parcialmente el anticuerpo con un agente reoxidante para volver a formar al menos un enlace disulfuro intercatenario; y conjugar el fármaco a los tioles intercatenarios. El agente reoxidante puede ser, por ejemplo, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico, 4,4'-ditiodipiridina, 2,2'-ditiodipiridina, tetrionato de sodio o ácido yodosobenzoico. El agente reductor puede ser, por ejemplo, DTT o TCEP. El fármaco puede ser, por ejemplo, MMAF, MMAE o AFP. Opcionalmente, el anticuerpo parcialmente reoxidado se puede purificar antes de la conjugación.

25 En otras realizaciones relacionadas más, se proporciona un método de reducción de enlaces disulfuro intercatenarios de anticuerpos y de conjugación de un fármaco a los tioles intercatenarios resultantes para ubicar selectivamente fármacos en el anticuerpo. En general, el método incluye reducir parcialmente el anticuerpo con un agente reductor para formar al menos dos tioles intercatenarios; y conjugar el fármaco a los tioles intercatenario del anticuerpo parcialmente reducido. En un ejemplo, el anticuerpo se reduce parcialmente con una concentración limitante de un agente reductor en un tampón con un agente quelante. El fármaco se puede conjugar, por ejemplo, mediante el enfriamiento de la solución de anticuerpo y la disolución del fármaco en un disolvente frío, y la mezcla con la solución de anticuerpo. El anticuerpo y la solución de fármaco se incuban durante un período de tiempo suficiente para formar uno o varios conjugados de anticuerpo-fármaco parcialmente cargados. La reacción se puede inactivar inactivando el exceso de fármaco con un reactivo que contenga tiol. El conjugado se puede purificar adicionalmente. En un ejemplo específico, el anticuerpo se reduce parcialmente durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 37 °C. El anticuerpo reducido se puede enfriar, por ejemplo, hasta aproximadamente 0 °C. La solución de anticuerpo y fármaco se puede incubar, por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 0 °C.

40 El reactivo que contiene tiol puede ser, por ejemplo, cisteína o *N*-acetil-cisteína. El agente reductor puede ser, por ejemplo, DTT o TCEP. El tampón puede ser, por ejemplo, una solución de borato de sodio, y el agente quelante es ácido dietilentríaminopentaacético. El agente quelante también puede ser, por ejemplo, ácido etilentríaminopentaacético o EDTA. El disolvente puede ser, por ejemplo, acetonitrilo, alcohol o DMSO. El fármaco puede ser, por ejemplo, un agente citotóxico o un citostático.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo reducido se puede purificar antes de la conjugación usando, por ejemplo, cromatografía en columna, diálisis o diafiltración. La columna usada en la cromatografía de columna puede ser, por ejemplo, una columna de desalación, tal como una columna PD-10. Como alternativa, el anticuerpo reducido no se purifica después de la reducción parcial ni antes de la conjugación.

50 El conjugado se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía en columna, diálisis o diafiltración. La columna usada en la cromatografía de columna puede ser, por ejemplo, una columna de desalación, tal como una columna PD-10.

55 En otra realización más, se proporciona un método de producción de un anticuerpo con la conjugación selectiva de fármaco. En general, el método incluye reducir totalmente el anticuerpo durante un período de tiempo suficiente para producir tioles intercatenarios, según lo determinado mediante, por ejemplo, titulación con DTNB, mediante la adición de un gran exceso de un agente reductor, e incubar la solución a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 30 minutos; purificar el anticuerpo; reoxidar parcialmente el anticuerpo usando un agente oxidante para formar al menos un enlace disulfuro intercatenario mediante el enfriamiento del anticuerpo reducido a 0 °C; tratar el anticuerpo reducido y enfriado con 1,5 a 2,5 equivalentes molares del agente oxidante; mezclar la solución por inversión; dejar que la solución se incube a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 10 minutos; purificar el anticuerpo parcialmente reoxidado; conjugar el fármaco a los tioles intercatenarios del anticuerpo parcialmente reoxidado para formar un anticuerpo conjugado; y purificar el anticuerpo conjugado.

65 El agente reductor puede ser, por ejemplo, DTT o TCEP. Opcionalmente, el anticuerpo parcialmente reducido se puede purificar, por ejemplo, usando cromatografía en columna, diálisis o diafiltración. La columna usada en la

cromatografía de columna puede ser, por ejemplo, una columna de desalación tal como una columna PD-10. El anticuerpo conjugado se puede purificar, por ejemplo, usando cromatografía en columna, diálisis o diafiltración. La columna usada en la cromatografía de columna puede ser, por ejemplo, una columna de desalación tal como una columna PD-10. El agente reoxidante puede ser, por ejemplo, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico, 4,4'-ditiodipiridina, 2,2'-ditiodipiridina, tetrionato de sodio o ácido yodosobenzoico.

La siguiente información es descriptiva, ilustrativa y a modo de ejemplo, y no se debe considerar como limitante del alcance definido por ninguna de las reivindicaciones adjuntas.

10 Breve descripción de varias vistas de las figuras

La Figura 1 muestra los isómeros "E4" (isómeros con cuatro fármacos unidos por anticuerpo) de un anticuerpo de una viñeta. Los enlaces disulfuro intercatenarios se muestran como líneas continuas entre las cadenas pesada-pesada del anticuerpo o las cadenas pesada-ligera de anticuerpo. Los fármacos y sus puntos de conjugación con el anticuerpo se muestran como círculos. Debajo de cada isómero, se muestran los fragmentos generados en condiciones no reductoras ("no rojo") y reductoras ("rojo") (con el número de fármacos por fragmento entre paréntesis).

La Figura 2 muestra un cromatograma del perfil de elución de un análisis de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de conjugado de vcMMAE-cAC10 preparado mediante un aspecto del método 2a: reoxidación parcial con DTNB, purificación con PD-10 y conjugación de vcMMAE. "E0", "E2", "E4", "E6" y "E8" se refieren a los isómeros del anticuerpo cAC10 con 0, 2, 4, 6 y 8 moléculas de MMAF unidas por anticuerpo, respectivamente.

La Figura 3 muestra un cromatograma HIC para otro aspecto del método 2b: reoxidación con DTNB en un solo recipiente y conjugación de vcMMAE. "E0", "E2", "E4", "E6" y "E8" se refieren a los isómeros del anticuerpo cAC10 con 0, 2, 4, 6 y 8 moléculas de MMAF unidas por anticuerpo, respectivamente. Se recogió E4 puro de aproximadamente 34-38 min (indicado por la flecha).

La Figura 4 muestra la comparación en gráfico de barras del porcentaje de composición de conjugados de anticuerpo-fármaco incluso para las especies cargadas con fármaco de los métodos 1, 2a y 2b. Para cada especie, los conjugados de anticuerpo-fármaco se prepararon mediante los métodos de conjugación de reducción parcial con DTT (barra izquierda), reoxidación con DTNB (barra intermedia) o reoxidación con DTNB de un solo recipiente (barra de la derecha).

La Figura 5 muestra un rastro de bioanalizador para el material E4 recogido como se indica en el cromatograma HIC de la Figura 3 (método 2b). "L" indica cadenas ligeras libres. "H" indica cadenas pesadas libres. "HL" indica cadenas pesada y ligera asociadas. "HH" indica cadenas pesada y pesada asociadas. "HHL" indica cadenas pesada y pesada, y pesada y ligera asociadas.

La Figura 6 muestra el análisis PLRP del material recogido a partir del cromatograma HIC de la Figura 3 (método 2b). "L0" y "L1" indican una cadena ligera con ninguna o una molécula de fármaco unida, respectivamente. "H0", "H1", "H2" y "H3" indican una cadena pesada con cero, una, dos o tres moléculas de fármaco unidas.

La Figura 7 muestra una representación en una viñeta de las principales especies de conjugado obtenidas por reducción, total o parcial, de los enlaces disulfuro intercatenarios, seguida de la conjugación con un fármaco. La reducción total y la conjugación producen principalmente las especies cargadas totalmente con 8 fármacos por anticuerpo, mientras que la reducción parcial y la conjugación pueden conducir a la generación de todas las especies que se muestran. Solo hay un isómero de cada para las especies cargadas con 0 y 8 fármacos, mientras que las especies cargadas con 2, 4 y 6 fármacos contienen 3, 4 y 3 isómeros, respectivamente. (En referencia a la Figura 1, cabe señalar que la especie 4A es una imagen especular de la especie 4C y que la especie 4B es una imagen especular de la especie 4D. En la Figura 7, las especies 4A y 4C se denominan 4A, y las especies 4B y 4D se denominan especie 4B). Los enlaces disulfuro intercatenarios se muestran como líneas continuas entre las cadenas pesada y pesada o las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Los fármacos y su punto de conjugación al anticuerpo se muestran en forma de círculos.

La Figura 8 es un diagrama de flujo de proceso para un aspecto de un proceso de conjugación por "reducción parcial" con DTT para producir isómeros mixtos E4 (E4M). Se ajusta el pH del anticuerpo cAC10 a 7,5 con fosfato de sodio dibásico, y se añade EDTA a una concentración final de 5 mM. Luego se calienta la solución de anticuerpo hasta 37 °C. Para reducir parcialmente el anticuerpo, se añaden 2,95 equivalentes molares de DTT a la solución de anticuerpo y se dejan reducir durante 105 min a 37 °C. Tras la reducción, se enfría la solución de anticuerpo hasta 2-8 °C, y se elimina el exceso de DTT por ultrafiltración/diafiltración de volumen constante (UF/DF), obteniéndose el cAC10 purificado, reducido. Se toma una muestra del cAC10 purificado, reducido, y se determinan la concentración de tiol, la concentración de anticuerpo y la proporción molar del tiol con respecto al anticuerpo mediante ensayos de A280 y DTNB. A continuación, se añade un ligero exceso del enlazador de fármacos vcMMAE (normalmente, un exceso del 2 al 15 % en forma de una solución de DMSO) a la solución de

anticuerpo para iniciar la reacción de conjugación. Se deja que la reacción de conjugación transcurra durante 30 min a 2-8 °C, obteniéndose el E4M en bruto. Al final de la reacción de conjugación, se inactiva cualquier exceso de enlazador de fármacos vcMMAE mediante la reacción con un gran exceso de cisteína durante 15 min a 2-8 °C, obteniéndose el E4M en bruto inactivado. Se realiza el intercambio de tampón y la eliminación del fármaco libre y de otras especies de bajo peso molecular mediante UF/DF de volumen constante (normalmente, de 6 a 10 diavolumenes), obteniéndose la sustancia de fármaco E4M.

La Figura 9 es un diagrama de flujo de proceso para otro aspecto de un proceso de conjugación por "reducción parcial" con TCEP, en el que no se usa una etapa de purificación intermedia, para producir isómeros mixtos E4 (E4M). Se ajusta el pH del anticuerpo cAC10 a 7,5 con fosfato de sodio dibásico, y se añade EDTA a una concentración final de 5 mM. Luego se calienta la solución de anticuerpo hasta 37 °C. Para reducir parcialmente el anticuerpo, se añaden 2,20 equivalentes molares de TCEP a la solución de anticuerpo y se dejan reducir durante 105 min a 37 °C. Se toma una muestra de la reacción de reducción y se determinan la concentración de tiol, la concentración de anticuerpo y la proporción molar del tiol con respecto al anticuerpo mediante ensayos de A280 y DTNB. Tras la reducción, se enfría la solución de anticuerpo hasta 2-8 °C. A continuación, se añade un ligero exceso del enlazador de fármacos vcMMAE (normalmente, un exceso del 2 al 15 % en forma de una solución de DMSO) a la solución de anticuerpo para iniciar la reacción de conjugación. Se deja que la reacción de conjugación transcurra durante 20 min a 2-8 °C, obteniéndose el E4M en bruto. Al final de la reacción de conjugación, se inactiva cualquier exceso de enlazador de fármacos vcMMAE mediante la reacción con un gran exceso de *N*-acetil-cisteína durante 20 min a 2-8 °C, obteniéndose el E4M en bruto inactivado. Se realiza el intercambio de tampón y la eliminación del fármaco libre y de otras especies de molécula pequeña mediante UF/DF de volumen constante (normalmente, de 6 a 10 diavolumenes), obteniéndose la sustancia de fármaco E4M.

La Figura 10 muestra un gráfico de la internalización del anticuerpo conjugado con cAC10 por células Karpas-299 CD30⁺. Se combinaron las células con 1 µg/ml de cAC10 marcado fluorescentemente y diluciones en serie bien de cAC10, cAC10-E2, cAC10-E4 o cAC10-E8 de 20 µg/ml a 9 µg/ml. Tras la incubación de las células con el anticuerpo, se lavaron las células marcadas con medio de tinción y se midió la fluorescencia. Se representaron gráficamente las intensidades de fluorescencia normalizadas frente a la concentración de mA b como se describe en el Ejemplo 8.

Las Figuras 11A y 11B muestran gráficos de la internalización de cAC10 y anticuerpos conjugados con cAC10 por células CD30⁺. Se incubaron células A) Karpas-299 y B) L540cy con diluciones en serie de cAC10 y las especies E2, E4 y E8 de ADC de cAC10. Después de una incubación de 96 horas con las muestras, se añadió [³H]-TdR y se midió su incorporación. Se normalizó la radiactividad de las muestras tratadas con respecto a los controles no tratados y se representó frente a la concentración.

Las Figuras 12A y 12B muestran la eficacia *in vivo* de cAC10 y anticuerpos conjugados con cAC10 en ratones SCID que portan xenoinjertos subcutáneos. La Figura 12A muestra los resultados con ratones SCID que portan tumores subcutáneos de Karpas-299 inyectados con cAC10-E2 a 0,5 mg/kg o 1,0 mg/kg cada cuatro días para cuatro inyecciones. cAC10-E4 y cAC10-E8 se administraron bien a 0,25 o 0,5 mg/kg cada cuatro días en cuatro inyecciones. La Figura 12B muestra los resultados con ratones SCID con tumores subcutáneos Karpas-299 que fueron tratados con una sola dosis de E2, E4 o E8 a 1,0 mg/kg.

Las Figuras de 13A-D muestran rastros HPLC de cromatografía de interacción hidrófoba de (A) mezcla de E4; (B) E2 puro preparado mediante HIC preparativa; (C) E4 puro preparado mediante HIC preparativa; y (D) E6 puro preparado mediante HIC preparativa, respectivamente. Las muestras se prepararon por reducción parcial con DTT seguida de conjugación con MMAE. Los cromatogramas se normalizaron con respecto a la altura del pico más alto de cada cromatograma. Las inyecciones fueron 50 µl de 5-10 mg/ml de cAC10-vcMMAE en PBS mezclado con 50 µl de NaCl 2,0 M y fosfato de sodio 50 mM a pH 7. Las separaciones se realizaron a 30 °C.

La Figura 14 muestra los rastros HPLC de PLRP-S de (A) mezcla de E4 preparada mediante reducción parcial con DTT seguida de conjugación con MMAE (rastros superior); (B) mezcla de E4 preparada mediante reoxidación parcial con DTNB seguida de conjugación con MMAE (segundo rastro empezando por arriba); (C) E4 puro preparado mediante reducción parcial con DTT seguida de conjugación con MMAE y purificado por HIC preparativa (segundo rastro empezando por abajo); y (D) E4 puro preparado por reoxidación parcial con DTNB seguida de conjugación con MMAE y purificado por HIC preparativa (rastros inferior). Los cromatogramas se normalizaron con respecto a la altura del pico más alto de cada cromatograma. Las inyecciones fueron 20 µl de 1 mg/ml de cAC10-vcMMAE tratado con DTT 20 mM durante 15 min a 37 °C. Las separaciones se realizaron a 80 °C.

La Figura 15 muestra rastros de bioanalizador (electroforesis capilar) de (A) mezcla de E4 preparada por reducción parcial con DTT seguida de conjugación con MMAE (rastros superior); (B) mezcla de E4 preparada mediante reoxidación parcial con DTNB seguida de conjugación con MMAE (segundo rastro empezando por arriba); (C) E4 puro preparado mediante reducción parcial con DTT seguida de conjugación con MMAE y

purificado por HIC preparativa (segundo rastro empezando por abajo); y (D) E4 puro preparado por reoxidación parcial con DTNB seguida de conjugación con MMAE y purificado por HIC preparativa (rastro inferior). Las muestras se prepararon en condiciones no reductoras según lo indicado por el fabricante.

5 Descripción detallada

Para mayor claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada se divide en los siguientes apartados.

10 I. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto habitual en la materia relativa a los métodos y composiciones descritos. Como se usan en el presente documento, los siguientes términos y las siguientes expresiones tendrán el significado que se les atribuye, a menos que se especifique lo contrario.

15 El término "fármaco", como se usa en el presente documento, significa un elemento, un compuesto, un agente o una entidad molecular, incluyendo, por ejemplo, un compuesto farmacéutico, terapéutico o farmacológico. Los fármacos pueden ser naturales o sintéticos, o una combinación de los mismos. Un "fármaco terapéutico" es un agente que ejerce un efecto terapéutico (por ejemplo, beneficioso) sobre las células cancerosas o células inmunes (por ejemplo, células inmunes activadas), bien solo o en combinación con otro agente (por ejemplo, una enzima convertora de profármacos en combinación con un profármaco). Por lo general, los fármacos terapéuticos útiles de acuerdo con los métodos y las composiciones descritos en el presente documento son aquellos que ejercen un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor. En ciertas realizaciones, un fármaco no es un elemento radiactivo.

25 "Agente citotóxico", en referencia al efecto de un agente en una célula, significa muerte de la célula.

"Agente citostático" significa una inhibición de la proliferación celular.

30 El término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y su equivalente, y no se refiere a una longitud específica de un producto. Por lo tanto, "péptidos" y "proteínas" están incluidos dentro de la definición de un polipéptido. También se incluyen dentro de la definición de polipéptidos los "anticuerpos" como se definen en el presente documento. Una "región polipeptídica" se refiere a un segmento de un polipéptido, segmento que puede contener, por ejemplo, uno o más dominios o motivos (por ejemplo, una región polipeptídica de un anticuerpo puede contener, por ejemplo, una o más CDR). El término "fragmento" se refiere a una porción de un polipéptido que normalmente tiene al menos 20 aminoácidos contiguos o al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido. Un "derivado" incluye un polipéptido o fragmento del mismo que tiene sustituciones de aminoácidos conservadoras con respecto a un segundo polipéptido; o un polipéptido o fragmento del mismo que se modifica mediante unión covalente de una segunda molécula tal como, por ejemplo, mediante la unión de un polipéptido heterólogo o mediante glucosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, se incluyen, por ejemplo, análogos de polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (por ejemplo, aminoácidos no naturales y similares), polipéptidos con enlaces no sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto naturales como no naturales. Los análogos de polipéptido incluyen, por ejemplo, miméticos de proteínas y bombesina.

45 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a (a) polipéptidos de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de polipéptidos de inmunoglobulina, es decir, polipéptidos de la familia de las inmunoglobulinas, o fragmentos de los mismos, que contienen un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un determinado antígeno; o (b) derivados sustituidos de manera conservadora de dichos polipéptidos de inmunoglobulina o fragmentos que se unen inmunoespecíficamente al antígeno. Los anticuerpos se describen de manera general, por ejemplo, en Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988).

50 Un "derivado de anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo, como se ha definido anteriormente, que está modificado por la unión covalente de una molécula heteróloga tal como, por ejemplo, mediante la unión de un polipéptido heterólogo, o mediante glucosilación, acetilación o fosforilación no asociada normalmente con el anticuerpo, y similares.

60 La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon celular, incluyendo cualquier clon celular eucariota o procariota, o un clon de fago, y no el método mediante el que se produce. Por lo tanto, la expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, no se limita a anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridomas.

65 La expresión "enlace disulfuro intercatenario", en el contexto de un anticuerpo, se refiere a un enlace disulfuro situado entre dos cadenas pesadas o entre una cadena pesada y una cadena ligera.

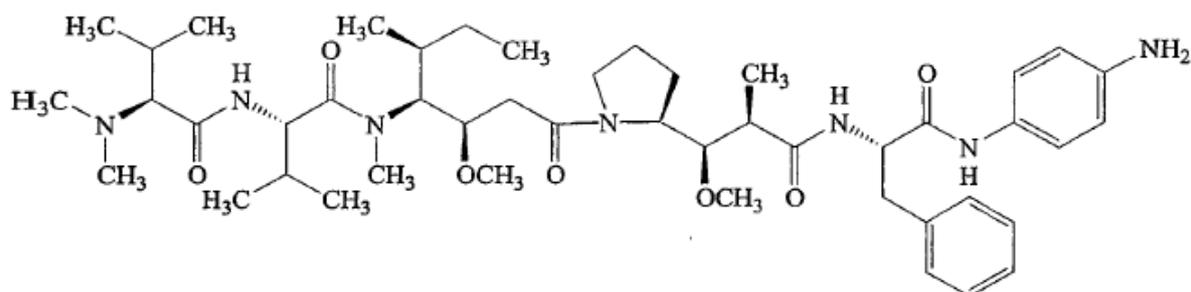
La expresión "tiol intercatenario" se refiere a un grupo tiol de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que puede participar en la formación de un enlace disulfuro intercatenario.

5 Una proteína se denomina "totalmente cargada" cuando todos los puntos de conjugación de un determinado tipo y/o de reactividad similar se conjugan con fármacos, dando lugar a una población homogénea de conjugado de proteína-fármaco. Una proteína se denomina "parcialmente cargada" cuando solo algunos de los posibles puntos de conjugación de un determinado tipo y/o de una reactividad similar se conjugan a los fármacos, dando lugar a la formación de un determinado isómero o isómeros del conjugado de proteína-fármaco.

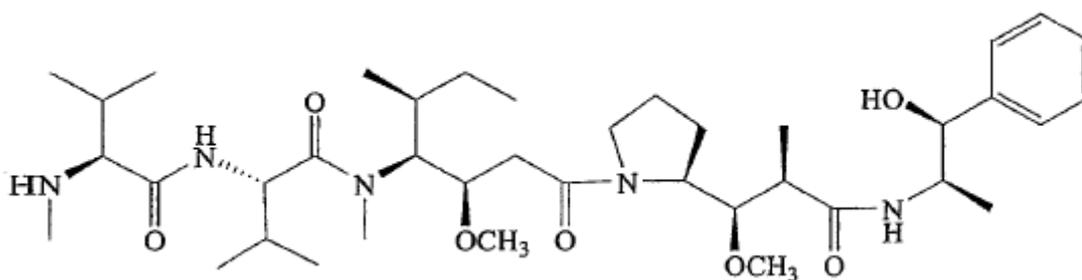
10 El término "aislado/a", en el contexto de una molécula o macromolécula (por ejemplo, un anticuerpo), es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con el uso deseado (por ejemplo, de diagnóstico o terapéutico) de la molécula, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, se purificará una molécula o macromolécula aislada (1) hasta más del 95 % o más del 99 % en peso de la molécula o macromolécula según lo determinado mediante, por ejemplo, los métodos de Lowry o Bradford; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria; o (3) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. Las moléculas y macromoléculas aisladas incluyen la molécula y macromolécula *in situ* de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La abreviatura "AFP" se refiere a dimetilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina-*p*-fenilendiamina que tiene la fórmula general que se muestra a continuación:

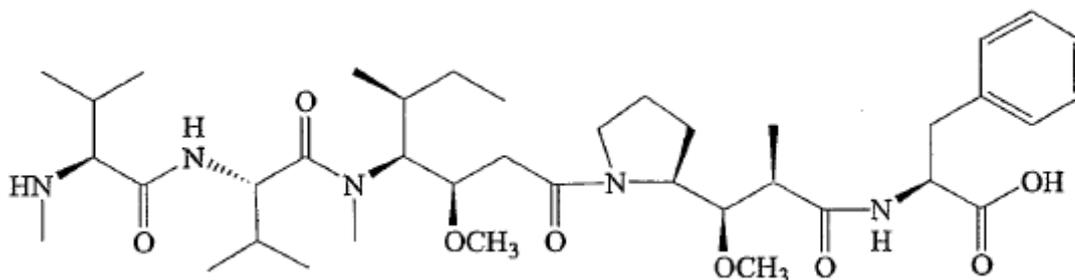
25



La abreviatura "MMAE" se refiere a monometil-auristatina E que tiene la fórmula general que se muestra a continuación:



30 La abreviatura "MMAF" se refiere a dovalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina que tiene la fórmula general que se muestra a continuación:



La abreviatura "AEB" se refiere a un éster producido mediante la reacción de auristatina E con ácido paraacetilbenzoico. La abreviatura "AEVB" se refiere a un éster producido mediante la reacción de auristatina E con

ácido benzoilvalérico.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de una molécula o macromolécula. Las sales de adición de ácido se pueden formar con grupos amino. Las sales de ejemplo incluyen, pero sin limitación, sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ión acetato, un ión succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga en el compuesto precursor. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que hay múltiples átomos cargados formando parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

"Solvato farmacéuticamente aceptable" o "solvato" se refieren a una asociación de una o más moléculas de disolvente y una molécula o macromolécula. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

II. Polipéptidos, proteínas, anticuerpos

La presente divulgación describe conjugados de proteína-fármaco y métodos de preparación de conjugados de proteína-fármaco. También se proporcionan proteínas que tienen puntos de conjugación para recibir un fármaco. Los conjugados de proteína-fármaco se pueden usar a nivel terapéutico y de diagnóstico (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*), para la formación de imágenes *in vivo* y para otros usos.

Se pueden conjugar varias clases de proteínas, incluyendo anticuerpos, enzimas, proteínas glucosiladas, lectinas, varios receptores biológicos, hormonas proteicas y otras proteínas que pueden servir como agente de unión para una pareja de unión. Las proteínas contienen al menos un sitio reactivo tal como un enlace disulfuro, un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo carboxilo, donde se puede producir la conjugación de un fármaco a la proteína.

El sitio reactivo es accesible y capaz de realizar la activación, tal como por medios químicos. En algunas realizaciones, la proteína que se va a activar químicamente con fines de conjugación es aquella que contiene enlaces disulfuro no esenciales para el uso previsto de la proteína y/o aquella que no interferiría con la proteína (tal como, pero sin limitación, provocando la degradación de la proteína o interfiriendo con la función de unión u otras funciones (por ejemplo, la función efectora)). En dicha proteína, hay un enlace disulfuro presente como resultado de la oxidación de los grupos laterales tiol (--SH) de dos restos de cisteína. Estos restos pueden estar en diferentes cadenas polipeptídicas o en la misma cadena polipeptídica. Como resultado de la oxidación, se forma un enlace disulfuro (--S--S--) entre los carbonos β de los restos de cisteína originales. Tras la reducción, los restos se suelen denominar indistintamente medias cistinas y cistina. El tratamiento del enlace disulfuro con un agente reductor provoca la escisión reductora de los enlaces disulfuro para dejar los grupos tiol libres. Los ejemplos de proteínas que contienen enlaces disulfuro incluyen anticuerpos, muchas enzimas, algunas hormonas y ciertos receptores.

En algunas realizaciones, el enlace disulfuro puede ser de origen natural. En algunas realizaciones, también se pueden introducir químicamente uno o varios grupos sulfhidrilo en una proteína (por ejemplo, un anticuerpo). Los métodos adecuados para la introducción de grupos sulfhidrilo incluyen medios químicos (por ejemplo, usando un agente de tiolación tal como 2-IT) o usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, se pueden introducir restos de cisteína en una proteína por mutagénesis de un ácido nucleico que codifica la proteína. Véase en general Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", III ed., Cold Spring Harbor Publish., Cold Spring Harbor, Nueva York (2001); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", IV ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1999) Se pueden introducir grupos sulfhidrilo en una proteína, por ejemplo, en el polipéptido o en el extremo carboxi-terminal.

En algunas realizaciones, la proteína es un anticuerpo. Dicho anticuerpo se puede usar en el diagnóstico *in vitro* o *in vivo*, la formación de imágenes *in vivo* o el tratamiento de enfermedades o afecciones con antígenos distintivos. La unidad básica de la estructura de un anticuerpo es un complejo de cuatro polipéptidos-dos cadenas idénticas de bajo peso molecular ("ligeras") y dos cadenas idénticas de alto peso molecular ("pesadas"), unidas entre sí tanto por asociaciones no covalentes como por enlaces disulfuro. Los diferentes anticuerpos tendrán en cualquier parte de una a cinco de estas unidades básicas. El anticuerpo se puede representar esquemáticamente como una "Y". Cada rama de la "Y" está formada por la parte amino terminal de una cadena pesada y una cadena ligera asociada. La base de la "Y" está formada por las porciones carboxi terminales de las dos cadenas pesadas. El nodo de la "Y" se denomina región bisagra.

Se reconocen cinco clases de anticuerpos humanos (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), y dentro de estas clases, varias

subclases (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclases de moléculas de inmunoglobulina, basadas en diferencias estructurales tales como el número de unidades de inmunoglobulina de una sola molécula de anticuerpo, la estructura del puente disulfuro de las unidades individuales, y diferencias en la longitud de la cadena y la secuencia. La clase y subclase de un anticuerpo es su isotipo.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo intacto o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno tal como, por ejemplo, un Fab, un F(ab'), un F(ab')₂, una cadena Fd, un Fv monocatenario (scFv), un anticuerpo monocatenario, un Fv unido por enlace disulfuro (sdFv), un fragmento que comprende un dominio bien V_L o V_H, o fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Los fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, incluyendo los anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la/s región/es variable/s sola/s o en combinación con la totalidad o una parte de los siguientes: región bisagra, dominios C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4} y C_L. Además, los fragmentos de unión al antígeno pueden comprender cualquier combinación de una o varias regiones variables con una región bisagra, dominios C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4} y C_L. En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo comprende al menos un dominio, o parte de un dominio, que incluye enlaces disulfuro intercatenarios.

Por lo general, los anticuerpos son de ser humano, roedor (por ejemplo, ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camélido, caballo o pollo. Como se usan en el presente documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas, de linfocitos B humanos o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas, como se describe más adelante y, por ejemplo en las patentes de EE.UU. N° 5.939.598 y 6.111.166. Los anticuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad.

En algunas realizaciones, los dominios constantes tienen función efectora. La expresión "función efectora de anticuerpo" o AEC, como se usa en el presente documento, se refiere a una función aportada por uno o varios dominios Fc de una Ig. Dicha función se puede efectuar, por ejemplo, mediante la unión de uno o varios dominios efectores Fc a un receptor Fc en una célula inmune con actividad fagocítica o lítica, o mediante la unión de uno o varios dominios efectores Fc a componentes del sistema del complemento. Por lo general, el/los efecto/s mediado/s por las células de unión a Fc o componentes del complemento generan la inhibición y/o el agotamiento de la célula dirigida a CD70. La función efectora puede ser, por ejemplo, "citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo" o ADCC, "fagocitosis celular dependiente del anticuerpo" o ADCP, "citotoxicidad dependiente del complemento" o CDC. En otras realizaciones, el dominio constante carece de una o más funciones efectoras.

Los anticuerpos pueden estar dirigidos contra el antígeno de interés, tal como de interés médico y/o terapéutico. Por ejemplo, el antígeno puede ser uno asociado con patógenos (tales como, pero sin limitación, virus, bacterias, hongos y protozoos), parásitos, células tumorales o determinadas afecciones. En el caso de un antígeno asociado a un tumor (TAA), el cáncer puede ser del sistema inmunitario, pulmón, colon, recto, mama, ovario, próstata, cabeza, cuello, hueso o cualquier otra ubicación anatómica. Los antígenos de interés incluyen, pero sin limitación, CD30, CD40, Lewis Y y CD70. En algunas realizaciones, el antígeno es CD2, CD20, CD22, CD33, CD38, CD40, CD52, HER2, EGFR, VEGF, CEA, HLA-DR, HLA-Dr10, CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis X, α -fetoproteína, CA 242, fosfatasa alcalina placentaria, antígeno específico de la próstata, fosfatasa ácida prostática, factor de crecimiento epidérmico, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, anti-receptor de transferrina, p97, MUC1-KLH, gp100, MART1, receptor de IL-2, gonadotropina coriónica humana, mucina, P21, MPG y producto del oncogén Neu.

Algunos anticuerpos útiles específicos incluyen, pero sin limitación, mAb BR96 (Trail *et al.* (1993), *Science* 261:212-215), BR64 (Trail *et al.* (1997), *Cancer Research* 57:100-105), mAb contra el antígeno CD40, tales como mAb S2C6 (Francisco *et al.* (2000) *Cancer Res.* 60:3225-3231) y mAb contra el antígeno CD30, tales como AC10 (Bowen *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:5896-5906). Se pueden usar muchos otros anticuerpos de internalización que se unen a antígenos específicos de tumores, y se han revisado (véase, por ejemplo, Franke *et al.* (2000), *Cancer Biother Radiopharm.* 15:459-76; Murray (2000), *Semin Oncol.* 27:64-70; Breitling *et al.*, "Recombinant Antibodies", John Wiley, and Sons, Nueva York, 1998).

La expresión "antígeno específico de un tumor", como se usa en el presente documento, se entenderá que tiene la connotación de un antígeno característico de un determinado tumor o muy correlacionado con dicho tumor. Sin embargo, los antígenos específicos de tumores no son necesariamente únicos del tejido tumoral, es decir, que los anticuerpos contra ellos pueden reaccionar de forma cruzada con antígenos de tejido normal. Cuando un antígeno específico de un tumor no es único para las células tumorales, frecuentemente ocurre que, en la práctica, los anticuerpos que se unen a antígenos específicos de tumores son suficientemente específicos de las células tumorales para llevar a cabo los procedimientos deseados sin asumir un riesgo injustificado o una interferencia como consecuencia de reacciones cruzadas. Son muchos los factores que contribuyen a esta especificidad práctica. Por ejemplo, la cantidad de antígeno en la célula tumoral puede superar en gran medida la cantidad del antígeno de reacción cruzada que se encuentra en las células normales, o el antígeno sobre las células tumorales se puede presentar de forma más eficaz. Por lo tanto, la expresión "antígeno específico de un tumor" se refiere, en el presente documento, a una especificidad de utilidad práctica, y no pretende indicar una especificidad absoluta ni implicar que un antígeno es único del tumor.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Cuando el sujeto es un sujeto humano, el anticuerpo se puede obtener mediante la inmunización de cualquier animal capaz de generar una respuesta inmune de utilidad hacia antígeno. El animal puede ser un ratón, una rata, una cabra, una oveja, un conejo u otro animal experimental adecuado. El antígeno se puede presentar en forma de un inmunógeno de origen natural o un conjugado inmunogénico sintético de un hapteno y un vehículo inmunogénico. En el caso de un anticuerpo monoclonal, se pueden fusionar células productoras de anticuerpos del animal inmunizado con células humanas o animales "inmortales" o "inmortalizadas" para obtener un hibridoma que produzca el anticuerpo. Si se desea, se pueden clonar los genes que codifican una o más de las cadenas de inmunoglobulina de manera que el anticuerpo se pueda producir en diferentes células huésped, y si se desea, los genes se pueden mutar con el fin de modificar la secuencia y, por tanto, las características inmunológicas del anticuerpo producido. Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar mediante cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, Teng *et al.* (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80, 7308-7312; Kozbor *et al.* (1983) *Immunology Today* 4, 72-79; y Olsson *et al.* (1982), *Meth. Enzymol.* 92, 3-16).

El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, humanizado o totalmente humano producido mediante técnicas bien conocidas para un experto en la materia. Los anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, que se pueden producir usando técnicas de ADN recombinante convencionales, son anticuerpos útiles. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales tales como los que tienen una región variable derivada de regiones constantes de inmunoglobulina monoclonal murina y humana. (Véase, por ejemplo, Cabilly *et al.*, patente de EE.UU. Nº 4.816.567; y Boss *et al.*, patente de EE.UU. Nº 4.816.397). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de las especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Queen, patente de EE.UU. Nº 5.585.089). Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia, por ejemplo, usando métodos que se describen en la publicación internacional Nº WO 87/02671; publicación de patente europea Nº 184.187; publicación de patente europea Nº 171496; publicación de patente europea Nº 173494; publicación internacional Nº WO 86/01533; publicación de patente europea Nº 12.023; Berter *et al.* (1988), *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987), *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987), *Cancer. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985), *Nature* 314:446-449; y Shaw *et al.* (1988), *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison (1985), *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986), *BioTechniques* 4:214; patente de EE.UU. Nº 5.225.539; Jones *et al.* (1986), *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988), *Science* 239:1534; y Beidler *et al.* (1988), *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos se pueden producir, por ejemplo, usando ratones transgénicos que sean incapaces de expresar genes endógenos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, pero que puedan expresar genes humanos de cadena pesada y ligera. Se inmunizan los ratones transgénicos de la forma habitual con un antígeno seleccionado o una parte del mismo. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno usando tecnología convencional de hibridomas. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados en los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de los linfocitos B y, posteriormente, experimentan un intercambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para obtener una visión de conjunto de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93). Para consultar un análisis detallado de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.625.126; Nº 5.633.425; Nº 5.569.825; Nº 5.661.016; Nº 5.545.806. Es posible adquirir otros anticuerpos humanos en el mercado, por ejemplo, en Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA).

También se pueden generar anticuerpos totalmente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En esta metodología, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo totalmente humano que reconoce el mismo epítipo. Véase Jaspers *et al.* (1994), *Biotechnology* 12:899-903. Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo las bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom y Winter (1991), *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.* (1991), *J. Mol. Biol.* 222:581; Quan y Carter (2002), "The rise of monoclonal antibodies as therapeutics". en *Anti-IgE and Allergic Disease*, Jardieu, P. M. y Fick Jr., R. B, eds., Marcel Dekker, Nueva York, NY, Capítulo 20, pág. 427-469.

El anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. En la técnica, se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud total se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein *et al.*, 1983, *Nature* 305: 537-539). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas diferentes de anticuerpo, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. En la publicación internacional Nº WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, (1991) *EMBO J.* 10: 3655-3659, se desvelan procedimientos similares.

De acuerdo con una metodología diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_{H2} y C_{H3}. Se prefiere que tenga la primera región constante de cadena pesada (C_{H1}) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ácidos nucleicos con secuencias que codifican las fusiones de cadenas pesadas de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales genera altos rendimientos o cuando las proporciones no son particularmente significativas.

En una realización de esta metodología, los anticuerpos biespecíficos tienen una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par híbrido de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, pues la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina solo en una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo de separación fácil (publicación internacional N^o WO 94/04690).

Para más información sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véanse, por ejemplo, Suresh *et al.* (1986), *Methods in Enzymology* 121:210; Rodrigues *et al.* (1993), *J. Immunology* 151:6954-6961; Carter *et al.* (1992), *Bio/Technology* 10:163-167; Carter *et al.* (1995), *J. of Hematotherapy* 4:463-470; Merchant *et al.* (1998), *Nature Biotechnology* 16:677-681. Usando dichas técnicas, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos para su uso en el tratamiento o en la prevención de enfermedades.

Los anticuerpos bifuncionales también se describen en la publicación de patente europea N^o EPA 0 105 360. Como se desvela en dicha referencia, los anticuerpos híbridos o bifuncionales se pueden derivar bien biológicamente, es decir, mediante técnicas de fusión celular, o químicamente, especialmente con agentes de reticulación o reactivos formadores de puentes disulfuro, y pueden comprender anticuerpos enteros o fragmentos de los mismos. Los métodos de obtención de dichos anticuerpos híbridos se desvelan, por ejemplo, en la publicación internacional WO 83/03679, y en la publicación de patente europea N^o EPA 0 217 577.

En otras realizaciones, el anticuerpo es una proteína de fusión de un anticuerpo, o un fragmento funcionalmente activo de la misma, por ejemplo, en la que el anticuerpo se fusiona mediante un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), bien en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o una parte de la misma, preferentemente partes de al menos 10, 20 o 50 aminoácidos de una proteína) que no es el anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento del mismo se une covalentemente a la otra proteína en el extremo N-terminal del dominio constante.

En otras realizaciones más, la proteína puede ser una proteína de fusión de la parte de unión de una molécula no-anticuerpo fusionada mediante un enlace covalente al dominio de la región constante de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo, incluyendo opcionalmente una región bisagra. Dicha proteína de fusión puede incluir opcionalmente al menos un, normalmente al menos dos, enlaces disulfuro intercatenarios. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir las regiones C_{H1} y C_L y una región bisagra.

III. Métodos de activación

En general, un fármaco se puede acoplar a una proteína o a otra molécula adecuada en un sitio activable. Los sitios activables adecuados incluyen puntos de conjugación tales como grupos tiol, grupos amino (por ejemplo, el grupo ε-amino de restos de lisina o en el extremo N-terminal de proteínas), grupos hidroxilo próximos (1,2-dioles) (por ejemplo, hidratos de carbono oxidados) y grupos carboxilo (por ejemplo, el extremo C-terminal de proteínas, restos de ácido aspártico y ácido glutámico, e hidratos de carbono tales como restos de ácido siálico).

Un fármaco se puede acoplar directamente a un punto de conjugación. Por ejemplo, un fármaco se puede unir por alquilación del grupo ε-amino de las lisinas de anticuerpos, aminación reductora de hidratos de carbono oxidados o reacción con una hidrazida, transesterificación entre grupos hidroxilo y carboxilo, amidación en los grupos amino o grupos carboxilo, y conjugación con tioles (por ejemplo, tioles intercatenarios) o tioles introducidos mediante, por ejemplo, alquilación de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut). Los métodos adecuados de conjugación de fármacos en los puntos de conjugación se describen en, por ejemplo, "Current Protocols in Protein Science" (John Wiley & Sons, Inc.), Capítulo 15 ("Chemical Modifications of Proteins").

Un fármaco también se puede acoplar indirectamente a través de otra molécula, tal como un enlazador. Por ejemplo, un fármaco también se puede conjugar a través de un grupo maleimida acoplado a un grupo sulfhidrilo en, por ejemplo, pero sin limitación, la región bisagra de un anticuerpo. Los conjugados de anticuerpos se pueden preparar

haciendo reaccionar una forma derivatizada de maleimida del fármaco con el anticuerpo. Más concretamente, los conjugados de anticuerpos se pueden preparar mediante la reducción de un anticuerpo para producir el anticuerpo reducido, produciendo un fármaco de amina, la derivatización del fármaco de amina con maleimida para producir un fármaco derivatizado de maleimida y la reacción del fármaco derivatizado con maleimida con el anticuerpo.

En una realización ilustrativa, una IgG₁, tal como cAC10, posee muchos enlaces disulfuro, siendo solo cuatro de ellos intercatenarios. Debido a que los cuatro enlaces disulfuro intercatenarios se agrupan en la región bisagra altamente flexible y son mucho más accesibles al disolvente que otros enlaces disulfuro (intracatenarios), la reducción con un exceso de, por ejemplo, un agente reductor tal como, pero sin limitación, ditioneitol (DTT), Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) o 2-mercaptoetanol, rompe los cuatro enlaces y genera ocho cisteínas (es decir, que contienen el grupo tiol libre). La conjugación de las ocho cisteínas con el enlazador de fármacos genera un conjugado totalmente cargado con aproximadamente ocho fármacos por anticuerpo, como se muestra en la Fig. 7.

La presente divulgación demuestra que, sorprendentemente, es posible mejorar las propiedades biológicas de los ADC con anticuerpos que tienen un promedio de 2, 2,5, 4 o 6 fármacos por anticuerpo, lo que produce una menor toxicidad mientras se mantiene la eficacia de los conjugados totalmente cargados, es decir, conjugados que tienen 8 fármacos por anticuerpo. La ventana terapéutica (la concentración de conjugado de fármaco-anticuerpo a la que se observa por primera vez que la toxicidad se divide entre la mínima dosis eficaz) de conjugados parcialmente cargados de fármacos es superior a la de los anticuerpos con 8 fármacos. Hay una serie de maneras de conjugar las 8 cisteínas con 4 fármacos, produciendo un gran número de posibles especies cargadas con fármaco (9 en total, con de 0 a 8 fármacos por anticuerpo, véanse las Figuras 1 y 7). Para aquellos anticuerpos que tienen 4 fármacos, hay 6 maneras posibles de distribuir los 4 fármacos, produciendo 6 isómeros (véanse las Figuras 1 y 7). La homogeneidad de las especies cargadas con 8 fármacos se pierde cuando se desean 4 fármacos por anticuerpo. Para los anticuerpos con 2 o 6 fármacos por anticuerpo, hay tres formas posibles de distribuir los fármacos en las moléculas.

Los métodos de producción de ADC parcialmente cargados (por ejemplo, con 4 (E4) en lugar de 8 fármacos por anticuerpo) incluyen los siguientes: método 1 ("reducción parcial") reducción parcial del anticuerpo mediante un agente reductor tal como, pero sin limitación, DTT o TCEP seguida de conjugación; y método 2 ("reducción completa y reoxidación") reducción completa del anticuerpo con un agente reductor tal como, pero sin limitación, DTT o TCEP, seguida de la reoxidación parcial del anticuerpo con un agente reoxidante (por ejemplo, pero sin limitación, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), 4,4'-ditiodipiridina, 2,2'-ditiodipiridina, tetratiónato de sodio o ácido yodosobenzoico) y, finalmente, la conjugación. En el método de reducción total y reoxidación, hay dos aspectos: 2a, la purificación después de la reoxidación con DTNB; y 2b, la no purificación después de la reoxidación con DTNB (reoxidación en un solo recipiente y conjugación de fármacos). Estos métodos producen diferentes porcentajes de diferentes especies (por ejemplo, para E4, del 25 al 40 %) y también producen diferentes mezclas isoméricas de las posibles especies. En la divulgación, se engloban híbridos y variaciones de los métodos anteriores que serían conocidas para un experto en la materia.

Como ejemplo de conjugados de anticuerpo y fármaco, la Figura 1 muestra las 6 posibles especies E4 (denominadas especies 4A a 4F) que se pueden generar durante una reacción de conjugación. Las especies 4A-D no se pueden distinguir entre sí mediante determinados métodos analíticos; sin embargo, es posible distinguir las tanto de 4E como de 4F.

En una realización del método 1 de reducción parcial, se pueden preparar conjugados con, por ejemplo, 4 fármacos por anticuerpo mediante la reducción total del anticuerpo con, por ejemplo, pero sin limitación, DTT, para producir 8 cisteínas de anticuerpos, seguida de la conjugación a 4 equivalentes de fármaco. Esto conduce a una mezcla en la que los anticuerpos tienen de 0 a 8 fármacos. Como alternativa, si el anticuerpo se reduce mediante cantidades limitantes de, por ejemplo, DTT, de manera que un promedio de solo 2 de los 4 disulfuros se reduce (liberando 4 cisteínas), seguido de la conjugación total de los fármacos, solo se formarán las especies cargadas con un número par de fármacos (0, 2, 4, 6 y 8 fármacos por anticuerpo). Esto reduce la complejidad de la mezcla, que puede reducirse todavía más mediante purificación para aislar estas diferentes especies cargadas con fármaco.

En algunas realizaciones, es posible activar selectivamente ciertos puntos potenciales de conjugación en una proteína. Esta activación selectiva permite la fácil asignación del/de los sitio/s de conjugación de un fármaco en la proteína. Por ejemplo, el tratamiento de un anticuerpo (por ejemplo, cAC10) con cantidades limitantes de los potentes agentes reductores DTT o TCEP produce la reducción selectiva de los disulfuros de la cadena pesada-ligera. En otro ejemplo, la reducción total con DTT de un anticuerpo seguida de la reoxidación parcial usando un potente agente oxidante de tiol, tal como DTNB, produce la reoxidación selectiva de los disulfuros bisagra de cadena pesada-ligera, lo que conduce a fármaco conjugado predominantemente en la cadena pesada de la región bisagra. Las poblaciones de isómeros de E2 y E6 producidos mediante ambos métodos pueden aproximarse al 90 % de homogeneidad isomérica.

Después de la conjugación del fármaco con el anticuerpo, se pueden separar las especies de fármaco-anticuerpo conjugadas. En algunas realizaciones, las especies de anticuerpos conjugadas se pueden separar basándose en las características del anticuerpo, del fármaco y/o del conjugado. Por ejemplo, la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) ha dado resultados satisfactorios en el aislamiento y la separación de especies correspondientes a 0, 2, 4, 6 y

8 fármacos por anticuerpo. Los rendimientos de cada uno de estos isómeros cargados con fármaco mediante el método 1 están cerca de lo que cabría esperar mediante una distribución estadística. La especie cargada con 4 fármacos normalmente es el 30 % del material total.

5 Se han desarrollado métodos analíticos para determinar la carga de fármaco y la ubicación de los fármacos en el anticuerpo (véase también *infra*). La caracterización de los conjugados cargados con 4 fármacos puros preparados mediante la reducción parcial con DTT mediante bioanálizador (electroforesis capilar) y HPLC en una columna de divinilbenceno reticulado (PLRP) reveló que los fármacos se encuentran predominantemente en cisteínas que originalmente formaban disulfuros entre las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo. No cabe esperar la especificidad de la ubicación de los fármacos, donde uno de los isómeros se ve favorecido frente a los otros cinco isómeros, a diferencia de la convención.

15 En otra realización, el método 2, en la reducción total con la reoxidación parcial, para preparar conjugados de fármaco-anticuerpo con, por ejemplo, 4 fármacos, el anticuerpo se redujo totalmente con, por ejemplo, pero sin limitación, DTT, y después se trató con cantidades limitantes de, por ejemplo, pero sin limitación, DTNB, para volver a formar algunos de los disulfuros de manera que quedaran 4 tioles de cisteína por anticuerpo. Se conjugaron estas cisteínas con fármaco y se analizaron mediante los métodos descritos en el presente documento. El rendimiento de los anticuerpos cargados con 4 fármacos en la mezcla aumentó hasta tanto como el 40 % y, una vez purificados, la ubicación del fármaco favoreció la colocación sobre las cisteínas que originalmente formaban disulfuros entre las cadenas pesadas de la región bisagra. No cabe esperar el rendimiento de los anticuerpos cargados con 4 fármacos ni la selectividad en comparación con la convención común, que favorece un isómero diferente de ciertos métodos de reducción parcial. Usando diversos medios químicos, se puede asignar fácilmente la ubicación de los fármacos en el anticuerpo para la producción de diferentes isómeros.

25 Si la reducción se controla mediante la adición de cantidades limitantes de agente reductor, se produce la reducción parcial en la que, como media, se rompen menos de cuatro enlaces disulfuro intercatenarios por anticuerpo. Debido a que los cuatro enlaces disulfuro intercatenarios están muy expuestos, la reducción se produce a través de diversas vías y produce anticuerpo parcialmente reducido compuesto de una mezcla de especies con 0, 2, 4, 6 o 8 cisteínas. Por lo tanto, la conjugación del anticuerpo parcialmente reducido puede generar una mezcla de conjugados con 0, 2, 4, 6 o 8 fármacos por anticuerpo, como se muestra en las Figuras 1 y 7. Dependiendo de la extensión de la reducción parcial, la distribución de las cargas de fármaco (es decir, el porcentaje de especies cargadas con 0, 2, 4, 6 o 8 fármacos) varía.

35 La reducción parcial no solo produce una mezcla que contiene especies con un número variable de fármacos por anticuerpo, también crea mayor heterogeneidad como resultado de las múltiples ubicaciones de unión de los fármacos. La Figura 7 muestra que existe más de un isómero posible para las especies cargadas con 2, 4 y 6 fármacos.

40 Tras la conjugación del fármaco a una proteína, la especie de fármaco-proteína conjugada se puede separar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las especies de anticuerpos conjugados se pueden separar basándose en las características del anticuerpo, del fármaco y/o del conjugado. Por ejemplo, la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) ha obtenido resultados satisfactorios en el aislamiento y la separación de especies correspondientes a 0, 2, 4, 6 y 8 fármacos por anticuerpo.

45 **IV. Métodos analíticos**

Se pueden usar diversos métodos analíticos para determinar los rendimientos y las mezclas isoméricas de los conjugados. Por ejemplo, en una realización, HIC es el método analítico usado para determinar los rendimientos y las mezclas isoméricas de los conjugados resultantes (por ejemplo, para conjugados E4). Esta técnica es capaz de separar los anticuerpos cargados con varios números de fármacos. El nivel de carga de fármaco se puede determinar basándose en la relación de absorbancias, por ejemplo, a 250 nm y 280 nm. Por ejemplo, si un fármaco puede absorber a 250 nm, mientras que el anticuerpo absorbe a 280 nm. Por consiguiente, la relación 250/280 aumenta con la carga de fármaco. Usando los métodos de conjugación descritos en el presente documento, en general, se observaron anticuerpos con números pares de fármacos para su conjugación con el anticuerpo, ya que la reducción de disulfuros produce números pares de tioles de cisteína libres. Las Figuras 2 y 3 muestran las separaciones por HIC para cAC10-vcMMAE producido mediante los métodos 2a y 2b, respectivamente. La Figura 4 muestra el porcentaje de composición para las diversas sustituciones de estos cromatogramas, así como del método 1. El método 1 produce aproximadamente el 30 % de E4, mientras que el método 2b produce aproximadamente el 40 % de E4.

60 La HIC también se puede usar de forma preparativa a niveles de miligramos a gramos para purificar E4 de una mezcla de niveles de sustitución. El E4 puro de la Figura 3 (tiempo de recogida de 34-38 min indicado) se obtuvo y se analizó mediante dos métodos para determinar la mezcla isomérica de E4. En primer lugar, se usó un bioanálizador Agilent, que desnaturaliza interacciones no covalentes y separa basándose en la masa de proteína, produciendo los siguientes componentes de anticuerpos por orden de elución: cadena ligera (L), cadena pesada (H), pesada-ligera (HL), pesada-pesada (HH), pesada-pesada-ligera (HHL) y pesada-pesada-ligera-ligera (HHLL). Las

especies más pequeñas se forman cuando los disulfuros se reducen y los tioles libres se conjugan con vcMMAE.

La Figura 1 también describe qué componentes de anticuerpo se observarán de la desnaturalización de los diversos isómeros E4. Como puede verse en la Figura 5, el E4 puro preparado mediante el método 2b está dominado por HL, con una pequeña cantidad de L y HHL. Este resultado se puede explicar por la presencia de especies, en su mayoría, 4F (que produce exclusivamente HL) con algunas especies 4A-D (que producen HHL y L). Curiosamente, el mismo análisis de cAC10-vcMMAE realizado mediante el método 1 produce cantidades aproximadamente iguales de L, HL y HH, lo que coincidiría con una mezcla de especies, en su mayoría, 4E y algunas especies 4F.

Otra realización de una herramienta analítica es la cromatografía sobre una columna PLRP de fase inversa; el soporte de la columna se compone de divinilbenceno reticulado, en lugar de una columna de fase inversa típica construida sobre un soporte de sílice que puede retener proteínas de forma inespecífica. Esta técnica de desnaturalización y reductiva separa limpiamente las 6 especies que consisten en cadena ligera con 0 y 1 fármaco (L0 y L1) y cadena pesada con 0 a 3 fármacos (H0 a H3). La Figura 1 muestra los niveles de carga de fármaco que se pueden observar para las diferentes especies E4. E4 puro del método 2b se separó mediante PLRP en la Figura 6. La cadena ligera sin modificar (L0) y la cadena pesada con dos fármacos (H2) son las especies que se esperan de 4F, mientras que L1 y H1 se esperan de 4A-D. Junto con el bioanalizador, estos datos coinciden con el método 1 que produce aproximadamente una mezcla 2:1 de 4E a 4F, mientras que el método 2b produce 2:1 de 4F:4A-D. Por lo tanto, usando diferentes condiciones químicas, tanto el rendimiento de E4 como la distribución de isómeros E4 son significativamente diferentes entre el método 1 y 2b.

V. Compuesto capaz de conjugarse a proteínas

Una proteína se puede conjugar con cualquier fármaco de interés, incluyendo un agente citostático o agente citotóxico, un agente inmunosupresor, una toxina, un quelato, un compuesto, una molécula, un radionucleótido o similares.

Agentes citotóxicos y agentes citostáticos

Los fármacos citotóxicos y citostáticos incluyen antibióticos (por ejemplo, adriamicina), agentes antitumorales tales como auristatinas y derivados de auristatina, metotrexato, mitomicina C, daunorrubicina, doxorubicina y vinblastina, 5-fluorouracilo, ligandos de unión al surco menor de ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como cisplatino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), agentes antiparasitarios (por ejemplo, isetionato de pentamidina), antraciclinas, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores a la quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nifrosoureas, platinoles, compuestos de preformación, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores a la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de la vinca, agentes antimicrobianos, agentes antimicrotúbulos, o similares. Cuando un anticuerpo se conjuga a dicho fármaco, sirve para dirigir el fármaco a los sitios donde se produce el antígeno correspondiente. Se conocen otros agentes y fármacos que se pueden acoplar al anticuerpo, o pueden ser fácilmente determinados por los expertos en la materia.

Los agentes citotóxicos o citostáticos individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, sulfoximina de butionina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente, actinomicina), daunorrubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazoles, paclitaxel, plicamicina, procarbina, estreptozotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tiotepa, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

Otros agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, dolastatinas (véase *infra*), ligandos de unión al surco menor de ADN tales como los enedíinas (por ejemplo, caliqueamicina) y lexitropsinas (véase también la patente de EE.UU. N° 6.130.237), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A, B o D, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina y mitoxantrona.

En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico tal como, por ejemplo, doxorubicina, melfalán, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, se pueden unir a proteínas agentes potentes tales como análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina.

En realizaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocida en la técnica como dolastatina-10) o un derivado de la misma. Por lo general, el derivado de auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E se puede hacer reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados de

auristatina típicos incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y la estructura de la auristatina E y sus derivados se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/845.786 (publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 20030083263) y 10/001.191; solicitud de patente internacional N° PCT/US03/24209; solicitud de patente internacional N° PCT/US02/13435; y las patentes de EE.UU. N° 6.323.315; 6.239.104 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es un agente antitubulina. Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, pero sin limitación, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) y dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de bacatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimid, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida y eleuterobina.

En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari *et al.*, (1992), *Cancer Res.* 52:127-131).

En algunas realizaciones, el agente terapéutico no es un radioisótopo.

En algunas realizaciones, el agente citotóxico o inmunosupresor es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (por ejemplo, azotioprina o micofenilato mofetilo), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, ganciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, azidotimidina, arabinósido de citidina, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarnet o trifluridina.

En otras realizaciones, el agente citotóxico o inmunosupresor es tacrolimus, ciclosporina o rapamicina. En realizaciones adicionales, el agente citotóxico es aldesleuquina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, darbepoetina α , denileuquina diftiox, dexrazoxano, propionato de dromostanolona, epirubicina, epoetina α , estramustina, exemestano, Filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, goserelina, idarubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, interferón α -2a, irinotecán, lefrozol, leucovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza de nitrógeno, megestrol, mesna, metotrexato, metoxaleno, mitomicina C, mitotano, fenpropionato de nandrolona, oprelvequina, oxaliplatino, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatina, pipobromano, plicamicina, sodio porfímero, procarbazona, quinacrina, rasburicasa, sargramostim, estreptozaocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, toremifeno, tretinoína, mostaza de uracilo, valubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina y zoledronato.

En algunas realizaciones, el agente es un agente inmunosupresor. El agente inmunosupresor puede ser, por ejemplo, ganciclovir, tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenilato mofetilo o metotrexato. Como alternativa, el agente inmunosupresor puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (por ejemplo, cortisol o aldosterona) o un análogo de glucocorticoides (por ejemplo, prednisona o dexametasona).

En algunas realizaciones, el agente inmunosupresor es un agente antiinflamatorio tal como derivados arilcarboxílicos, derivados que contienen pirazol, derivados de oxicam y derivados de ácido nicotínico. Las clases de agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, inhibidores de la ciclooxigenasa, inhibidores de 5-lipoxigenasa y antagonistas de los receptores de leucotrienos.

Los inhibidores de la ciclooxigenasa adecuados incluyen ácido meclufenámico, ácido mefenámico, carprofeno, diclofenaco, diflunisal, fenbufeno, fenoprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, nabumetona, naproxeno, sulindac, tenoxicam, tolmetina y ácido acetilsalicílico.

Los inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores rédox (por ejemplo, derivados de butano de catecol, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), masoprocol, fenidona, lanopalén, indazolinonas, nafazatrom, benzofuranol, alquilhidroxilamina) e inhibidores no rédox (por ejemplo, hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y sus derivados, metoxitetrahidropirano, ácidos boswélicos y derivados acetilados de ácidos boswélicos, y ácidos quinolinmetoxifenilacéticos sustituidos con radicales cicloalquilo), y precursores de los inhibidores rédox.

Otros inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen antioxidantes (por ejemplo, fenoles, galato de propilo, flavonoides y/o sustratos naturales que contienen flavonoides, derivados hidroxilados de las flavonas, flavonol, dihidroquercetina, luteolina, galangina, orobol, derivados de chalcona, 4,2',4'-trihidroxichalcona, orto-aminofenoles, N-hidroxiureas, benzofuranos, ebselén y especies que aumentan la actividad de las selenoenzimas reductoras), agentes quelantes de hierro (por ejemplo, ácidos hidroxámicos y sus derivados, N-hidroxiureas, 2-bencil-1-naftol, catecoles, hidroxilaminas, carnosol Trolox C, catecol, naftol, sulfasalazina, zileutón, ácido 5-hidroxiantranílico y ácidos 4-(omega-arilalquil)fenilalcanoicos), compuestos que contienen imidazol (por ejemplo, ketoconazol e itraconazol), fenotiazinas y derivados de benzopirano.

Otros inhibidores de la lipoxigenasa adecuados más incluyen inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, ácidos octadecatetraenoico, eicosatetraenoico, docosapentaenoico, eicosahexaenoico y docosaheptaenoico y sus ésteres, PGE1 (prostaglandina E1), PGA2 (prostaglandina A2), viprostol, ácidos 15-monohidroxi-eicosatetraenoico, 15-monohidroxi-eicosatrienoico y 15-monohidroxi-eicosapentaenoico, y leucotrienos B5, C5 y D5), compuestos de interferencia con los flujos de calcio, fenotiazinas, difenilbutilaminas, verapamilo, fuscósida, curcumina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ETYA), hidroxifenilretinamida, lonapalén, esculina, dietilcarbamazina, fenantrolina, baicaleína, proxicromil, tioéteres, sulfuro de dialilo y di-(1-propenil)sulfuro.

Los antagonistas del receptor de leucotrienos incluyen calcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselén, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingelheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionoogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK&F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 y Teijin TEI-1338.

20 Toxinas

Las toxinas se conjugan útilmente con anticuerpos específicos de antígenos asociados a células tumorales, parasitarias o microbianas. La toxina puede proceder, por ejemplo, de una planta (por ejemplo, la ricina o abrina), de un animal (por ejemplo, un veneno de serpiente) o un microbio (por ejemplo, la toxina de la difteria o del tétanos).

Además de a anticuerpos, los fármacos o las toxinas se pueden conjugar a otras proteínas transportadoras tales como la albúmina.

30 Conjugación de fármacos a la proteína

El fármaco tiene, o se ha modificado para que incluya, un grupo reactivo con un punto de conjugación en la proteína. Por ejemplo, un fármaco se puede unir por alquilación (por ejemplo, en el grupo ϵ -amino de las lisinas del anticuerpo o el extremo N-terminal de la proteína), aminación reductora de hidratos de carbono oxidados, transesterificación entre grupos hidroxilo y carboxilo, amidación en grupos amino o grupos carboxilo, y conjugación con tioles. Para obtener ejemplos de composiciones químicas que se pueden usar para la conjugación, véase, por ejemplo, "Current Protocols in Protein Science" (John Wiley & Sons, Inc.), Capítulo 15 ("Chemical Modifications of Proteins").

Por ejemplo, cuando la activación química de la proteína genera la formación de grupos tiol libres, la proteína se puede conjugar con un agente reactivo de sulfhidrilo. En un aspecto, el agente es aquel que es sustancialmente específico para los grupos tiol libres. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, maleimida, haloacetamidas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haloésteres (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), halometilcetonas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haluros bencílicos (por ejemplo, yoduro, bromuro o cloruro), sulfona de vinilo y piridiltio.

45 Agentes reactivos de sulfhidrilo

Los agentes reactivos de sulfhidrilo incluyen compuestos de α -haloacetilo tales como yodoacetamida, maleimiditas tales como *N*-etilmaleimida, derivados de mercurio tales como 3,6-bis-(mercurimetil)dioxano con contraiones de acetato, cloruro o nitrato, y derivados de disulfuro tales como derivados de dióxido de disulfuro, reactivos de polimetilén-bismetano-tiosulfonato y crabescéina (un derivado fluorescente de fluoresceína que contiene dos grupos sulfhidrilo libres que se ha observado que se añaden a través de enlaces disulfuro de anticuerpo reducido).

Los compuestos de α -haloacetilo tales como el yodoacetato reaccionan fácilmente con grupos sulfhidrilo para formar amidas. Estos compuestos se han usado para carboximetilar tioles libres. No son estrictamente específicos de SH y reaccionarán con las aminas. La reacción implica el ataque nucleófilo del ión tiolato que resulta en un desplazamiento del haluro. El resto haloacetilo reactivo, X-CH₂CO-, se ha incorporado en los compuestos con diversos fines. Por ejemplo, se ha usado bromotrifluoroacetona para la incorporación de F-19, y se ha empleado *N*-cloroacetilydotiramina para la introducción de yodo radiactivo en proteínas.

Las maleimiditas tales como la *N*-etilmaleimida se consideran bastante específicas de los grupos sulfhidrilo, especialmente a valores de pH inferiores a 7, donde otros grupos son protonados. Los tioles se someten a reacciones de Michael con maleimiditas para producir exclusivamente el aducto al doble enlace. El enlace tioéter resultante es muy estable. También reaccionan a un ritmo mucho más lento con grupos amino e imidazolo. A pH 7, por ejemplo, la reacción con tioles simples es aproximadamente 1.000 veces más rápida que con las aminas correspondientes. El cambio de absorbancia característico en la región de 300 nm asociado con la reacción proporciona un método conveniente para controlar la reacción. Estos compuestos son estables a pH bajo, pero son susceptibles a la hidrólisis a pH alto. Véase, en general, Wong, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking";

CRC Press, Inc., Boca Raton, 1991: Capítulos 2 y 4).

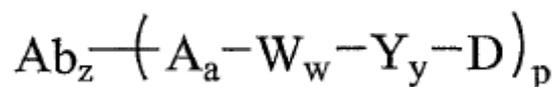
Todavía se puede conjugar una molécula (tal como un fármaco) que no sea inherentemente reactiva con sulfhidrilos a las proteínas activadas químicamente por medio de un agente de reticulación bifuncional que porte tanto un grupo reactivo con la molécula de interés como un grupo reactivo con sulfhidrilo. Este agente se puede hacer reaccionar simultáneamente tanto con la molécula de interés (por ejemplo, a través de un grupo amino, carboxi o hidroxilo) como con la proteína activada químicamente, o se puede usar para derivatizar la molécula de interés para formar una molécula de pareja que luego sea reactiva con sulfhidrilo en virtud de un resto derivado del agente, o se puede usar para derivatizar la proteína activada químicamente para hacerla reactiva con la molécula de interés.

Enlazadores

El fármaco se puede unir a una proteína a través de un enlazador. Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores escindibles y no escindibles. Un enlazador escindible normalmente es susceptible a la escisión en condiciones intracelulares. Los enlazadores escindibles adecuados incluyen, por ejemplo, un enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular, tal como la proteasa lisosomal, o una proteasa endosomal. En realizaciones ilustrativas, el enlazador puede ser un enlazador dipeptídico, tal como un enlazador de valina-citrulina (val-cit) o de fenilalanina-lisina (phe-lys). Otros enlazadores adecuados incluyen enlazadores hidrolizables a un pH inferior a 5,5, tales como un enlazador de hidrazona. Los enlazadores escindibles adecuados adicionales incluyen enlazadores de disulfuro.

Un enlazador puede incluir un grupo para la unión a la proteína. Por ejemplo, el enlazador puede incluir un amino, hidroxilo, carboxilo o grupos reactivos sulfhidrilo (por ejemplo, maleimida, haloacetamidas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haloésteres (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), halometilcetonas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haluros bencílicos (por ejemplo, yoduro, bromuro o cloruro), vinilsulfona y piridiltio). Véase, en general, Wong, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking"; CRC Press, Inc., Boca Raton, 1991.

En ciertas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo o el conjugado de proteína y fármaco pueden tener la siguiente fórmula:



o sales farmacéuticamente aceptables o solvatos de los mismos.
en la que:

Ab es un anticuerpo u otra proteína,
A es una unidad extensora,
a es 0 o 1,
cada W es, de manera independiente, una unidad enlazadora,
w es un número entero que varía de 0 a 12,
Y es una unidad espaciadora e
y es 0, 1 o 2,
p varía de 1 a aproximadamente 20 y
D es un fármaco, un marcador u otra molécula,
z es el número de posibles sitios de conjugación de la proteína, en la que $p < z$.

En otras realizaciones, p puede ser, por ejemplo, 2, 4, 8, 10, 12, 16, 25 o más.

Una unidad extensora puede ser capaz de enlazar una unidad enlazadora a un anticuerpo o a otra proteína. La unidad extensora tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional del anticuerpo o de otra proteína. Los grupos funcionales útiles incluyen, pero sin limitación, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato y carboxilo.

La unidad enlazadora es normalmente una unidad de aminoácido tal como, por ejemplo, una unidad dipeptídica, tripeptídica, tetrapeptídica, pentapeptídica, hexapeptídica, heptapeptídica, octapeptídica, nonapeptídica, decapeptídica, undecapeptídica o dodecapeptídica. La unidad enlazadora puede ser escindible o no escindible dentro de la célula.

Una unidad espaciadora, si está presente, une una unidad enlazadora al fármaco; como alternativa, una unidad espaciadora puede unir una unidad extensora a un resto de fármaco cuando la unidad enlazadora esté ausente. La unidad espaciadora también puede unir un fármaco a un anticuerpo o a una proteína cuando tanto la unidad enlazadora como la unidad extensora estén ausentes.

VI. Conjugados y sus usos

Inmunodiagnóstico *in vitro*

5 En una realización, se conjuga una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) a un marcador detectable para su uso en el inmunodiagnóstico *in vitro*. El marcador puede ser un radiomarcador, un fluoróforo o una enzima que se pueda conjugar directa o indirectamente al punto de conjugación (por ejemplo, un grupo tiol libre) del anticuerpo activado químicamente. La muestra puede ser de naturaleza clínica (por ejemplo, sangre, orina, semen o líquido cefalorraquídeo, o un tejido sólido u órgano) o no clínica (por ejemplo, suelo, agua, alimentos). El ensayo puede ser
10 cualitativo o cuantitativo, y en cualquier formato deseado, incluyendo formatos de tipo sándwich y competitivos. Numerosos formatos de inmunoensayo, marcadores, técnicas de inmovilización, etc., se desvelan en las siguientes publicaciones: O'Sullivan (1976), *Annals Clin. Biochem.* 16:221-240; McLaren (1981), *Med. Lab. Sci.* 38:245-51; Ollerich (1984), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22:895-904; Ngo y Lenhoff (1982), *Mol. Cell. Biochem.*, 44:3-12.

15 Formación de inmunoimágenes

También se puede usar un inmunoconjugado para la formación de inmunoimágenes *in vivo*. Con este fin, la proteína (por ejemplo, un anticuerpo) se marca por medios que permiten la visualización externa de su posición o ubicación dentro de un sujeto o parte del mismo, tal como un órgano. Por lo general, un agente de formación de
20 inmunoimágenes será un anticuerpo marcado directamente (como con tecnecio) o indirectamente (como con quelato de indio) con un radioisótopo adecuado. Después de la inyección en el paciente, se puede seguir la ubicación del conjugado por un detector sensible a las partículas emitidas por el radiomarcador, por ejemplo, una cámara de centelleo γ en el caso de un emisor γ .

25 Inmunoterapia

Para la inmunoterapia, se puede conjugar una proteína a un fármaco adecuado, tal como un agente citotóxico o citostático, un agente inmunosupresor, un radioisótopo, una toxina o similares. El conjugado se puede usar para
30 inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa, provocando la apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, o para el tratamiento del cáncer en un paciente. Por consiguiente, el conjugado se puede usar en varios entornos para el tratamiento de cánceres en animales. El conjugado se puede usar para administrar un fármaco a una célula tumoral o cancerosa. Sin quedar ligados a la teoría, en algunas realizaciones, el conjugado se une a o se asocia con un antígeno asociado a una célula cancerosa o a un tumor, pudiendo ser el conjugado y/o el fármaco absorbidos en el interior de una célula tumoral o célula cancerosa a través de endocitosis mediada por receptores. El
35 antígeno se puede unir a una célula tumoral o célula cancerosa, o puede ser una proteína de la matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias peptídicas específicas del interior del conjugado (por ejemplo, de un enlazador) son escindidas hidrolíticamente por una o más proteasas asociadas a la célula tumoral o cancerosa, produciendo la liberación del fármaco. El fármaco liberado es entonces libre para migrar dentro de la célula e inducir actividades citotóxicas o citostáticas u otras actividades. En
40 algunas realizaciones, el fármaco se escinde del anticuerpo fuera de la célula tumoral o cancerosa, y el fármaco penetra posteriormente en la célula o actúa en la superficie celular.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el conjugado u otra proteína se unen a la célula tumoral o célula cancerosa. En algunas realizaciones, el conjugado se une a un antígeno de célula tumor o célula cancerosa que está en la
45 superficie de la célula tumoral o célula cancerosa. En otras realizaciones, el conjugado se une a un antígeno de célula tumor o célula cancerosa que es una proteína de la matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa.

La especificidad de la proteína por una determinada célula tumoral o célula cancerosa puede ser importante para la
50 determinación de aquellos tumores o cánceres que se tratan con mayor eficacia. Por ejemplo, los anticuerpos que tienen un anticuerpo anti-CD30 o anti-CD40 u otra proteína de unión pueden ser útiles para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas.

Otros tipos particulares de cánceres que se pueden tratar con los conjugados de proteína-fármaco incluyen, pero sin
55 limitación, tumores sólidos, incluyendo, pero sin limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabiomiomasarcoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de huesos, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer oral, cáncer nasal, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer de útero, cáncer testicular, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, cáncer de pulmón, carcinoma epitelial,
60 glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, cáncer de piel, melanoma, neuroblastoma,

retinoblastoma, cáncer de transmisión sanguínea (incluyendo, pero sin limitación, leucemia linfoblástica aguda "ALL", leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, leucemia mieloblástica aguda "AML", leucemia promielocítica aguda "APL", leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroleucémica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia indiferenciada aguda, leucemia mieloide crónica "CML", leucemia linfocítica crónica "CLL", leucemia de células pilosas, mieloma múltiple), leucemias agudas y crónicas (por ejemplo, leucemias linfoblástica, mielogenosa, linfocítica y mieloide) y linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadena pesada y policitemia vera). Las proteínas proporcionan la dirección hacia el tumor o el cáncer específica de la conjugación.

Terapia de modalidad múltiple para el cáncer

Como se ha descrito anteriormente, los cánceres, incluyendo, pero sin limitación, un tumor, metástasis, u otra enfermedad o trastorno caracterizado por el crecimiento celular descontrolado, se pueden tratar o prevenir mediante la administración de un conjugado de proteína-fármaco.

En otras realizaciones, se proporcionan métodos de tratamiento o prevención del cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado y un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es aquel con el que no se ha encontrado que el tratamiento del cáncer sea resistente. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es aquel con el que se ha encontrado que el tratamiento del cáncer es resistente. El conjugado se puede administrar a un paciente que también se haya sometido a tratamiento tal como a cirugía para el tratamiento del cáncer. En otra realización, el método adicional de tratamiento es la radioterapia.

En una realización ilustrativa, el conjugado de proteína-fármaco se administra simultáneamente con el agente quimioterapéutico o con radioterapia. En otra realización ilustrativa, el agente quimioterapéutico o la radioterapia se administra antes o después de la administración del conjugado de proteína-fármaco, en un aspecto, al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, en aspectos adicionales, varios meses (por ejemplo, hasta tres meses), antes o después de la administración del conjugado.

Un agente quimioterapéutico se puede administrar durante una serie de sesiones. Se puede administrar uno cualquiera o una combinación de los agentes quimioterapéuticos que se enumeran más adelante. Con respecto a la radiación, se puede usar cualquier protocolo de radioterapia dependiendo del tipo de cáncer que se vaya a tratar. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, se puede administrar radiación de rayos X; en particular, se puede usar megavoltaje de alta energía (radiación superior a 1 MeV de energía) para tumores profundos, y se pueden usar radiación de haz de electrones y de rayos X de ortovoltaje para los cánceres de piel. Además, se pueden administrar radioisótopos que emiten rayos γ , tales como isótopos radiactivos de radio, cobalto y otros elementos.

Además, se proporcionan métodos de tratamiento del cáncer con un conjugado de proteína-fármaco como una alternativa a la quimioterapia o a la radioterapia cuando se haya demostrado, o se pueda demostrar, que la quimioterapia o la radioterapia es demasiado tóxica, por ejemplo, que produce efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto que se está tratando. Opcionalmente, el animal que se está tratando se puede tratar con otro tratamiento contra el cáncer tal como cirugía, radioterapia o quimioterapia, dependiendo de qué tratamiento se encuentra aceptable o soportable.

El conjugado de proteína-fármaco se puede usar de forma *in vitro* o *ex vivo*, tal como para el tratamiento de determinados cánceres, incluyendo, pero sin limitación, leucemias y linfomas, implicando dicho tratamiento trasplantes de células madre autólogas. Esto puede implicar un proceso en múltiples etapas en el que las células madre hematopoyéticas autólogas del animal se cosechan y se purgan de todas las células cancerosas, a continuación se erradica la población de células de médula ósea restantes del animal mediante la administración de una dosis elevada de un conjugado con o sin radioterapia de dosis elevada adjunta, y se vuelve a infundir el injerto de células madre en el animal. A continuación, se proporcionan cuidados de apoyo mientras se restablece la función de la médula ósea y el animal se recupera.

Terapia de múltiples fármacos contra el cáncer

Los métodos de tratamiento del cáncer incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado de proteína-fármaco y otro agente terapéutico que es un agente anticancerígeno. Los agentes anticancerígenos adecuados incluyen, pero sin limitación, metotrexato, taxol, L-asparaginasa, mercaptopurina, tioguanina, hidroxurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazona, topotecán, mostazas de nitrógeno, citoxano, etopósido, 5-fluorouracilo, BCNU, irinotecán, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel y docetaxel.

El agente anticancerígeno incluye, pero sin limitación, un fármaco tal como un agente de alquilación tal como mostaza de nitrógeno (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, trofosfamida, clorambucilo, melfalano), nitrosoureas

(por ejemplo, carmustina (BCNU) lomustina (CCNU)), alquilsulfonatos (por ejemplo, busulfán, treosulfán), triazenos (por ejemplo, decarbazina), compuestos que contienen platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino); alcaloides vegetales, tales como alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina), taxoides (por ejemplo, paclitaxel, docetaxol); inhibidores de la ADN topoisomerasa tales como epipodofilinas (por ejemplo, etopósido, tenipósido, topotecán, 9-aminocamptotecina, camptotecina, crisnatol), mitomicinas (por ejemplo, mitomicina C); anti-metabolitos tales como antifolatos tales como inhibidores de DHFR (por ejemplo, metotrexato, trimetrexato), inhibidores de la IMP deshidrogenasa (ácido micofenólico, tiazofurina, ribavirina, EICAR) e inhibidores de la ribonucleótido reductasa (por ejemplo, hidroxurea, deferoxamina), análogos de pirimidina tales como análogos de un acilo (5-fluorouracilo, floxuridina, doxifluridina, ratitrexed), análogos de citosinas (por ejemplo, citarabina (ara C), arabinósido de citosina, fludarabina) y análogos de purina (por ejemplo, mercaptopurina, tioguanina); terapias hormonales tales como antagonistas de receptores, tales como antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, megestrol), agonistas de LHRH (por ejemplo, goserilina, acetato de leuprolida) y antiandrógenos (por ejemplo, flutamida, bicalutamida); retinoides/deltoides tales como análogos de vitamina D3 (por ejemplo, EB 1089, CB 1093, KH 1060), terapias fotodinámicas (por ejemplo, vertoporfina (BPD-MA), ftalocianina, fotosensibilizador Pc4, demetoxi-hipocrellina A (2BA-2-DMHA)), citoquinas (por ejemplo, interferón- α , interferón- γ , factor de necrosis tumoral), así como otros fármacos tales como gemcitabina, velcade, revamid, talamid, inhibidores de la isoprenilación (por ejemplo, lovastatina), neurotoxinas dopaminérgicas (por ejemplo, ión de 1-metil-4-fenilpiridinio), inhibidores del ciclo celular (por ejemplo, estaurosporina), actinomicinas (por ejemplo, actinomicina D, dactinomicina), bleomicinas, (por ejemplo, bleomicina A2, bleomicina B2, peplomicina), antraciclinas (daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina), idarrubicina, epirubicina, pirarubicina, zorubicina, mtoxantrona), inhibidores de MDR (por ejemplo, verapamilo) e inhibidores de ATPasa Ca^{2+} (por ejemplo, tapsigargina).

Tratamiento de enfermedades autoinmunes

Los conjugados de proteína-fármaco son útiles para destruir o inhibir la replicación de una célula que produce una enfermedad autoinmune o para tratar una enfermedad autoinmune. Por consiguiente, los conjugados se pueden usar en varios entornos para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un paciente. Los conjugados se pueden usar para administrar un fármaco a una célula diana. Sin quedar ligados a teoría alguna, en una realización, los conjugados se asocian con un antígeno en la superficie de una célula diana, y el conjugado se recoge a continuación dentro de una célula diana a través de endocitosis mediada por receptores. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias peptídicas específicas (por ejemplo, del interior de un enlazador) se escinden enzimática o hidrolíticamente, generando la liberación de un fármaco. Entonces, el fármaco liberado es libre para migrar en el citosol e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. En una realización alternativa, el fármaco se escinde del conjugado fuera de la célula diana, y el fármaco penetra posteriormente en la célula.

En algunas realizaciones, el conjugado de proteína-fármaco se une a un antígeno autoinmune. En un aspecto, el antígeno está en la superficie de una célula implicada en una afección autoinmune. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une a un antígeno autoinmune que está en la superficie de una célula. En una realización ilustrativa, un anticuerpo se une a linfocitos activados que están asociados con el estado de enfermedad autoinmune. En una realización adicional, los conjugados matan o inhiben la multiplicación de células que producen un anticuerpo autoinmune asociado con una determinada enfermedad autoinmune.

Los tipos de enfermedades autoinmunes en particular que se pueden tratar con el conjugado de proteína-fármaco incluyen, pero sin limitación, trastornos relacionados con los linfocitos Th2 (por ejemplo, dermatitis atópica, asma atópico, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica y enfermedad de injerto frente a huésped); trastornos relacionados con los linfocitos Th1 (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjorgren, tiroiditis de Hashimoto, Enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener y tuberculosis); y trastornos relacionados con los linfocitos B activados (por ejemplo, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes de tipo I). Otras enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitación, hepatitis activa crónica, enfermedad de Addison, alveolitis alérgica, reacción alérgica, rinitis alérgica, síndrome de Alport, anafilaxis, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, artritis, ascariasis, aspergilosis, alergia atópica, dermatitis atópica, rinitis atópica, enfermedad de Behcet, pulmón de Bird-Fancier, asma bronquial, síndrome de Caplan, cardiomiopatía, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, glomerulonefritis crónica, síndrome de Cogan, enfermedad de aglutinina fría, infección por rubéola congénita, síndrome CREST, enfermedad de Crohn, crioglobulinemia, síndrome de Cushing, dermatomiositis, lupus discoide, síndrome de Dressler, síndrome de Eaton-Lambert, infección por ecovirus, encefalomielitis, oftalmopatía endocrina, infección por virus Epstein-Barr, vómitos equinos, eritematosis, síndrome de Evan, síndrome de Felty, fibromialgia, ciclición de Fuch, atrofia gástrica, alergia gastrointestinal, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de goodpasture, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedad de graves, enfermedad de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein, atrofia adrenal idiopática, fibritis pulmonar idiopática, nefropatía de IgA, enfermedades intestinales inflamatorias, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis juvenil, diabetes mellitus juvenil (tipo I), síndrome de Lambert-Eaton, laminitis, liquen plano, hepatitis lupoides, lupus, linfopenia, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conjuntivo mixto, esclerosis múltiple, miastenia gravis, anemia perniciosa, síndromes poliglandulares, demencia presenil, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriática, fenómeno de Raynauds, aborto recurrente, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, síndrome de Sampter, esquistosomiasis, síndrome de Schmidt, esclerodermia,

síndrome de Shulman, síndrome de Sjorgen, síndrome de stiff-man, oftalmia simpática, lupus sistémico eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, tiroiditis, trombocitopenia, tirotoxicosis, necrólisis epidérmica tóxica, resistencia a insulina de tipo B, diabetes mellitus de tipo I, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo, macroglobulemia de Waldenstrom y granulomatosis de Wegener.

5 Terapia con múltiples fármacos de enfermedades autoinmunes

También se desvelan métodos de tratamiento de una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado de proteína-fármaco solo o en combinación con otro agente terapéutico conocido para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. El agente contra la enfermedad autoinmune puede incluir, pero sin limitación, los siguientes: ciclosporina, ciclosporina A, micofenilato mofetilo, sirolimus, tacrolimus, enanercept, prednisona, azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida, ácido aminocaproico, cloroquina, hidroxiclороquina, hidrocortisona, dexametasona, clorambucilo, DHEA, danazol, bromocriptina, meloxicam e infliximab.

15 Tratamiento de enfermedades infecciosas

Los conjugados de proteína-fármaco son útiles para destruir o inhibir la multiplicación de una célula que produce una enfermedad infecciosa o para tratar una enfermedad infecciosa. Por consiguiente, los conjugados se pueden usar en varios entornos para el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un paciente. Los ADC se pueden usar para administrar un fármaco a una célula diana. En una realización, el anticuerpo se une a la célula de la enfermedad infecciosa. En algunas realizaciones, el conjugado destruye o inhibe la multiplicación de células que producen una determinada enfermedad infecciosa. Los tipos de enfermedades infecciosas en particular que se pueden tratar con los conjugados incluyen, pero sin limitación, las siguientes: enfermedades bacterianas tales como difteria, pertussis, bacteremia oculta, infección del tracto urinario, gastroenteritis, celulitis, epiglotitis, traqueitis, hipertrofia adenoide, absceso retrofaríngeo, impétigo, ectima, neumonía, endocarditis, artritis séptica, pneumococos, peritonitis, bacteremia, meningitis, meningitis purulenta aguda, uretritis, cervicitis, proctitis, faringitis, salpingitis, epididimitis, gonorrea, sífilis, listeriosis, carbunco, nocardiosis, salmonela, fiebre tifoidea, disentería, conjuntivitis, sinusitis, brucelosis, tularemia, cólera, plaga bubónica, tétano, enteritis necrotizante y actinomicosis; infecciones anaerobias mixtas tales como sífilis, fiebre recurrente, leptospirosis, enfermedad de lyme, fiebre por mordedura de rata, tuberculosis, linfadenitis, lepra, clamidia, neumonía por clamidia, tracoma, conjuntivitis por inclusión; enfermedades fúngicas sistémicas tales como histoplasmosis, coccidioidomicosis, blastomicosis, esporotricosis, criptococosis, candidiasis sistémica, aspergilosis, mucormicosis, micetoma y cromomicosis; enfermedades por rickettsia tales como tifus, fiebre maculada de las montañas rocosas, ehrlichiosis, rickettsiosis oriental transmitida por garrapatas, rickettsiosis pustulosa, fiebre Q y bartonelosis; enfermedades, parasitarias tales como malaria, babesiosis, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, fiebre Dum-Dum, toxoplasmosis, meningoencefalitis, queratitis, entamebiasis, giardiasis, criptosporidiasis, isosporiasis, ciclosporiasis, microsporidiosis, ascariasis, infección por tricocéfalos, infección por anquilostomas, infección por lombrices, larva, migratoria ocular, triquinosis, enfermedad del gusano de Guinea, filarías linfática, loiasis, oncocercosis, dirofilariasis, esquistosomiasis, urticaria del nadador, distoma pulmonar, distoma hepático, fascioliasis, fasciolopsiasis, opistorquiasis, infecciones por tenia, enfermedad hidatídica y enfermedad hidatídica alveolar; enfermedades víricas tales como sarampión, panencefalitis esclerososante subaguda, resfriado común, paperas, rubeola, roseola, enfermedad de Fifth, varicela, infección por el virus sincitial respiratorio, crup, bronquiolitis, mononucleosis infecciosa, poliomielitis, herpangina, enfermedad de manos, pies y boca, enfermedad de Bornholm, herpes genital, verrugas genitales, meningitis aséptica, miocarditis, pericarditis, gastroenteritis, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, (SIDA), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), síndrome de Reye, síndrome de Kawasaki, gripe, bronquitis, neumonía vírica del "caminante", enfermedad respiratoria febril aguda, fiebre faringoconjuntiva aguda, queratoconjuntivitis epidémica, virus del herpes simplex 1 (VHS-1), virus del herpes simplex 2 (VHS-2), herpes, enfermedad de inclusión citomegálica, rabia, leucoencefalopatía multifocal progresiva, kuru, insomnio familiar fatal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, paraparesis espástica tropical, encefalitis equina occidental, encefalitis de California, encefalitis de st. Louis, fiebre amarilla, dengue, coriomeningitis linfocítica, fiebre de Lassa, fiebre hemorrágica, síndrome pulmonar por hantvirus, infecciones por el virus de Marburg, infecciones por el virus del Ébola y viruela.

55 Terapia con múltiples fármacos de enfermedades infecciosas

Se desvelan métodos para tratar una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita un conjugado de proteína-fármaco solo o en combinación con otro agente terapéutico que sea un agente contra enfermedades infecciosas. El agente contra enfermedades infecciosas puede ser, pero sin limitación, los siguientes: antibióticos de β-lactama tales como penicilina G, penicilina V, cloxacilina, dicloxacilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, azlocilina, carbenicilina, mezlocilina, piperacilina y ticarcilina; aminoglicósidos tales como amicacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina y tobramicina; macrólidos tales como azitromicina, claritromicina, eritromicina, lincomicina y clindamicina; tetraciclinas tales como demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina y tetraciclina; quinolonas tales como cinoxacina y ácido nalidíxico; fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina, enoxacina, grepafloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, norfloxacina, ofloxacina, esparfloxacina y trovafloxacina; polipéptidos tales como bacitracina, colistina y polimixina B;

sulfonamidas tales como sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfametizol y sulfacetamida; y otros agentes antibacterianos tales como trimetoprim, sulfametazol, cloramfenicol, vancomicina, metronidazol, quinupristina, dalfopristina, rifampina, espectinomicina y nitrofurantoína; y agentes antivirales tales como agentes antivirales generales tales como yoxuradina, vidarabina, trifluridina, aciclovir, famciclovir, penciclovir, valaciclovir, ganciclovir, foscarnet, ribavirina, amantadina, rimantadina, cidofovir; oligonucleótidos antisentido, inmunoglobulinas e interferones; y fármacos para la infección por VIH tales como tenofovir, emtricitabina, zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, nevirapina, delavirdina, saquinavir, ritonavir, indinavir y nelfinavir.

VII. Composiciones farmacéuticas

En el uso *in vivo*, por lo general, ya sea para la formación de inmunoimágenes, para inmunoterapia o para otros usos, el conjugado se introduce en un sujeto. La composición puede comprender un solo isómero, o uno o más isómeros parcialmente cargados, del conjugado. Por ejemplo, si la proteína es un anticuerpo, la composición puede comprender un solo isómero E2, E4 o E6, una mezcla de isómeros E2, E4 o E6 seleccionados, todos los isómeros E2, E4 o E6 solos, o una mezcla de isómeros E2, E4 y E6. En algunas realizaciones, una composición que contiene determinado/s isómero/s puede estar sustancialmente exenta de otros isómeros. En este contexto, "sustancialmente exenta" significa que la composición contiene menos del aproximadamente 20 %, menos del aproximadamente 10 %, menos del aproximadamente 5 %, menos del aproximadamente 2 % o menos del aproximadamente 1 % de los otros isómeros.

Las composiciones pueden estar en cualquier forma que permita la administración de la composición a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las vías típicas de administración incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular, intratumoral e intranasal. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, o técnicas de inyección o infusión intravenosa, intramuscular o infrasternal. En un aspecto, las composiciones se administran por vía parenteral. En otro aspecto más, el conjugado o las composiciones se administran por vía intravenosa.

El conjugado se puede introducir por inyección. Por lo general, el conjugado se administra por vía intravascular (por vía intravenosa o intraarterial) o intratecal, a menudo por infusión. Además, en los casos apropiados, el conjugado se puede introducir por vía subcutánea, submucosa, intramuscular, intracraneal, o por otras vías de administración de fármacos aceptadas.

En otras realizaciones, la composición incluye una cantidad eficaz de un conjugado y un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones son adecuadas para la administración veterinaria o humana.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para permitir que un conjugado sea biodisponible tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones pueden adoptar la forma de una o más unidades de dosificación, donde, por ejemplo, un comprimido puede ser una sola unidad de dosificación, y un recipiente de un conjugado en forma inyectable puede contener una pluralidad de unidades de dosificación.

Los materiales usados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden ser no tóxicos en las cantidades usadas. Será evidente para los expertos en la materia que la dosis óptima del principio o principios activos en la composición farmacéutica dependerá de varios factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, ser humano), la forma concreta del conjugado, la forma de administración y la composición empleada.

El portador o vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser de partículas, de modo que las composiciones estén, por ejemplo, en forma de comprimido o de polvo. El vehículo o vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral o un líquido inyectable. Además, el vehículo o vehículos pueden ser gaseosos o de partículas, con el fin de proporcionar una composición de aerosol útil, por ejemplo, en administración por inhalación.

Cuando está destinada a la administración oral, la composición está preferentemente en forma sólida o líquida, en la que se incluyen las formas semisólida, semilíquida, suspensión y gel dentro de las formas que se consideran en el presente documento como sólida o líquida.

Como composición sólida para la administración oral, la composición se puede formular en forma de polvo, gránulo, comprimido fabricado por compresión, píldora, cápsula, goma de mascar, oblea o similares. Por lo general, dicha composición sólida contiene uno o más diluyentes inertes. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas; agentes disgregantes tales como ácido algínico, alginato sódico, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; agentes deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina, un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja, y un agente colorante.

Cuando la composición está en forma de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, esta puede contener,

además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol, ciclodextrina o un aceite graso.

La composición puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, un jarabe, una solución, una emulsión o una suspensión. El líquido puede ser útil para la administración oral o para la administración por inyección. Cuando está destinado para la administración oral, una composición puede comprender uno o más de entre un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del sabor. En una composición para la administración por inyección, también se puede incluir uno o más de entre un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.

Las composiciones líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, también pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro sódico isotónico, aceites fijos tales como mono- o diglicéridos sintéticos que pueden servir como medio disolvente o de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes de quelación tales como ácido etilendiamintetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes de ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. Una composición parenteral puede estar incluida en ampolla, una jeringa desechable o un vial multidosis de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante a modo de ejemplo. Una composición inyectable es preferentemente estéril.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo medio salino y tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de líquidos y nutrientes, reforzadores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer) y similares. También puede haber conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares.

La cantidad del conjugado que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o una afección en particular dependerá de la naturaleza del trastorno o de la afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Los intervalos de dosis para la administración de los conjugados de proteína-fármaco desvelados son suficientemente amplios para producir el efecto deseado en el que se mejoren los síntomas de la afección o del trastorno. La dosis no debe ser tan elevada como para producir efectos secundarios adversos tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas y similares. Además, opcionalmente, se pueden emplear ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos.

La dosis exacta por emplear en las composiciones también dependerá de la edad, del estado, del sexo y del grado de la enfermedad en el paciente, de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o del trastorno, y se debería decidir de acuerdo con el criterio del médico en cada una de las circunstancias del paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un conjugado de modo que se obtenga una dosis adecuada. Por lo general, esta cantidad es del al menos aproximadamente 0,01 % de un conjugado en peso de la composición. Cuando se pretende que sea para la administración oral, esta cantidad se puede variar al intervalo del aproximadamente 0,1 % al aproximadamente 80 % en peso de la composición. En un aspecto, las composiciones orales pueden comprender del aproximadamente 4 % al aproximadamente 50 % del conjugado en peso de la composición. En otro aspecto más, las presentes composiciones se preparan de modo que una unidad de dosificación parenteral contenga del aproximadamente 0,01 % al aproximadamente 2 % en peso del conjugado.

Para la administración intravenosa, la composición puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de un conjugado por kg de peso corporal del animal. En un aspecto, la composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de un conjugado por kg de peso corporal del animal. En otro aspecto, la cantidad administrada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal del conjugado.

En general, la dosis de un conjugado administrada a un paciente normalmente es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 2.000 mg/kg del peso corporal del animal. En un aspecto, la dosis administrada a un paciente es de entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal. En otro aspecto, la dosis administrada a un paciente es de entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 250 mg/kg del peso corporal del animal. En otro aspecto más, la dosis administrada a un paciente es de entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del animal. En otro aspecto más, la dosis administrada es de entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal. En otro aspecto más, la dosis administrada es de entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal.

Los conjugados se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diversos sistemas de administración, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y se pueden usar para administrar un conjugado o una composición. En ciertas realizaciones, se administra más de un conjugado o composición a un paciente.

En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más conjugados o composiciones localmente en la zona con necesidad de tratamiento. Esto se puede realizar, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante la cirugía; aplicación tópica, por ejemplo, de manera conjunta con un apósito para heridas después de la cirugía; por inyección; por medio de un catéter; por medio de un supositorio; o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un cáncer, tumor, o tejido neoplásico o preneoplásico. En otra realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de una manifestación de una enfermedad autoinmune.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable introducir uno o más conjugados o composiciones en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluyendo la inyección intraventricular e intratecal. La inyección intraventricular se puede facilitar a través de un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya.

También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulaciones con un agente de aerosol, o a través de perfusión en un tensioactivo pulmonar de fluorocarbono o sintético.

En otra realización más, los conjugados se pueden administrar en un sistema de liberación controlada tal como, pero sin limitación, una bomba, o se pueden usar diversos materiales poliméricos. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana de los conjugados, por ejemplo, en el cerebro, necesitándose de este modo solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en "Medical Applications of Controlled Release", *supra*, vol. 2, pág. 115-138 (1984)). Se pueden usar otros sistemas de liberación controlada que se analizan en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

En algunas realizaciones, se puede combinar un conjugado de proteína con un vehículo para formar una composición. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el que se administra un conjugado. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los procedentes del petróleo, o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos pueden ser solución salina, goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea, y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una realización, cuando se administran a un paciente, el conjugado o las composiciones y los vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un vehículo a modo de ejemplo cuando el conjugado se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como vehículos líquidos, particularmente para las soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Si se desea, las composiciones también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH.

Las composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizados, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

En una realización ilustrativa, el conjugado se formula de acuerdo con procedimientos habituales en forma de una composición farmacéutica adaptada a la administración intravenosa en animales, particularmente, en seres humanos. Por lo general, los portadores o vehículos para la administración intravenosa son soluciones tampón acuosas isotónicas estériles. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para la administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un envase cerrado herméticamente tal como una ampolla o un sobrecito que indique la cantidad del agente activo. Cuando se va a administrar un conjugado por infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con una botella de infusión que contenga agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando el conjugado se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Las composiciones para la administración oral pueden estar en forma de comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires, por ejemplo. Las composiciones administradas por vía oral pueden contener uno o más agentes opcionales como, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes saborizantes tales como menta, aceite de gaulteria o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente agradable al paladar. Además, cuando están en forma de comprimido o píldora, las composiciones se pueden recubrir para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando así una acción sostenida durante un período de tiempo prolongado. Las membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto de dirección osmóticamente activo también son adecuadas para los compuestos administrados por vía oral. En estas últimas plataformas, el fluido del entorno que rodea la cápsula es bebido por el compuesto de dirección, que se hincha para desplazar el agente o la composición de agente a través de un orificio. Estas plataformas de administración pueden proporcionar un perfil de liberación básicamente de orden cero al contrario de los perfiles con adiciones de formulaciones de liberación inmediata. También se puede usar un material de retardo a lo largo del tiempo tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol.

Las composiciones pueden estar destinadas a la administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede estar en forma de una solución, emulsión, pomada o base de gel. Si están destinadas a la administración transdérmica, la composición puede estar en forma de un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden comprender una concentración de un conjugado del aproximadamente 0,05 % al aproximadamente 50 % en p/v (peso por volumen unitario de la composición); en otro aspecto, del 0,1 % al 10 % en p/v.

La composición puede estar destinada a la administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio que se fundirá en el recto y liberará el conjugado.

La composición puede incluir diversos materiales que modifiquen la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que formen una cubierta de recubrimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la cubierta de recubrimiento, normalmente, son inertes, y se pueden seleccionar entre, por ejemplo, azúcar, goma laca y otros agentes de recubrimiento entérico. Como alternativa, los principios activos se pueden encerrar en una cápsula de gelatina.

Las composiciones pueden consistir en unidades de dosificación gaseosa, por ejemplo, pueden estar en forma de un aerosol. El término aerosol se usa para indicar varios sistemas que varían de los de naturaleza coloidal a los sistemas que consisten en envases presurizados. La administración puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bombeo adecuado que dispense los principios activos.

Ya sea en forma sólida, líquida o gaseosa, las presentes composiciones pueden incluir un agente farmacológico usado en el tratamiento del cáncer, de una enfermedad autoinmune o de una enfermedad infecciosa.

VIII. Farmacocinética

Se ha realizado la caracterización *in vivo* de la toxicidad y la eficacia de conjugados de 4 fármacos de cAC10-vcMMAE purificados en ratones, y se describe en más detalle en los ejemplos (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 7 y 9). En resumen, estos estudios han demostrado que las mezclas con un promedio de 4 fármacos por anticuerpo son igual de eficaces que aquellos conjugados con 8 fármacos (dosis única de 1 mg/kg para ambos), mientras que son menos tóxicas (DMT de 100 mg/kg para 4 fármacos por anticuerpo frente a 50 mg/kg para 8 fármacos por anticuerpo). El material purificado con 4 fármacos por anticuerpo del método de DTT tiene una eficacia y una toxicidad similares, mientras que el material purificado con 4 fármacos por anticuerpo del método de DTNB tiene una DMT ligeramente superior a 120 mg/kg, mientras que es eficaz a la mitad de la dosis de los otros conjugados (0,5 mg/kg).

La carga de cAC10 con dos, cuatro u ocho fármacos por anticuerpo no tuvo ningún efecto sobre la unión al antígeno diana CD30. La potencia *in vitro* de los cAC10-ADC resultó depender directamente de la carga de fármaco y, por lo tanto, de la exposición total a MMAE.

cAC10-E4 demostró una actividad antitumoral comparable a cAC10-E8 en un modelo de xenoinjerto de Karpas-299 a la misma dosis de anticuerpo, la mitad de la dosis de MMAE. Basándose en el hallazgo *in vitro* de que la potencia era directamente proporcional a la carga de fármaco, no cabía esperar la actividad antitumoral *in vivo* equivalente de cAC10-E4 y cAC10-E8. La investigación de la farmacocinética de los ADC reveló que el aclaramiento era directamente proporcional a la carga de fármaco de los ADC, y la exposición (área bajo la curva - AUC) era inversamente proporcional a la carga de fármaco. La AUC de cAC10-E4 resultó ser 3 veces superior a la de cAC10-E8. La mayor AUC de cAC10-E4 en comparación con cAC10-E8 fue aparentemente suficiente para compensar la reducción de la potencia, dando lugar a una eficacia equivalente. Los intentos por mejorar la eficacia desacelerando la semivida de eliminación plasmática para aumentar AUC se han realizado mediante métodos que incluyen la construcción de proteínas de fusión de albúmina para el interferón- α y la administración liposomal del fármaco anticancerígeno Lurtotecán. A diferencia de estos ejemplos en los que el objetivo era alargar la semivida plasmática, la mayor exposición de cAC10-E4 resultó ser una consecuencia valiosa de la reducción de la carga de MMAE.

Como se desvela en el Ejemplo 8, la administración de cAC10-E2 con 1,0 mg/kg/dosis cada 4 días un total de 4 veces produjo diez de las curaciones habituales. Aunque cAC10-E2 no demostró tener actividad antitumoral equivalente en comparación con cAC10-E4 a la misma dosis de mAb, la dosis de cAC10-E2 para lograr la actividad antitumoral equivalente en comparación con cAC10-E4 es probablemente inferior al doble, basándose en los experimentos *in vivo* de eficacia. Al igual que cAC10-E4, la exposición mejorada de cAC10-E2 puede desempeñar un papel importante en el hecho de que la potencia *in vitro* inferior se vea comprometida.

Para maximizar el potencial terapéutico de los ADC de cAC10-val-cit-MMAE, se necesita un alto índice terapéutico. La reducción de la cantidad de moléculas MMAE por mAb de ocho a cuatro aumentó el índice terapéutico de 100 a 200. Dadas las curvas de dosis-respuesta pronunciadas de los reactivos quimioterapéuticos, una diferencia del doble en el índice terapéutico puede ser significativa en términos de las implicaciones clínicas generales en lo que respecta a las toxicidades.

Al reducir la cantidad de MMAE de ocho a cuatro moléculas por mAb, hubo una disminución de la actividad *in vitro*, aunque se demostró una actividad antitumoral equivalente *in vivo*. Si bien una reducción adicional de la carga de fármaco a dos moléculas de MMAE por anticuerpo redujo aún más la actividad *in vitro*, cAC10-E2 tuvo una eficacia equivalente o mejor que cAC10-E4 y cAC10-E8 al doble de la dosis en un entorno de múltiples dosis. La ventana terapéutica se aumentó el doble mediante la reducción de la carga de fármaco de ocho moléculas de MMAE a cuatro, y mantenida, como mínimo, con una reducción adicional de dos fármacos por anticuerpo. Hay un valor considerable en la optimización de la sustitución de los fármacos de los ADC.

Ejemplos

Ejemplo 1 del Método 1

Se redujo parcialmente cAC10 con concentración limitada de DTT de la siguiente manera: se trató cAC10 (8 mg/ml o 53,8 μ M) con 3,5 equivalentes molares de DTT (188,4 μ M; Sigma) en borato de sodio 0,05 M, pH 8, NaCl 0,05 M y ácido dietilentiainminopentaacético 1 mM (DTPA; Aldrich) durante 1 h a 37 °C. A continuación, se purificó el anticuerpo reducido por desalación en una columna PD-10 (Amersham Biosciences). Se equilibró la columna PD-10 con 25 ml solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4 (GIBCO) con DTPA 1 mM (PBS-D), se aplicó 1 ml de la solución anterior a la columna, se lavó la columna con 1,8 ml de PBS-D y se eluyó la columna con 1,4 ml de PBS-D. Se cuantificó la concentración de proteína usando un valor de absorbancia de 1,58 a 280 nm para una solución de 1,0 mg/ml, y se determinó la concentración molar usando un peso molecular de 150.000 g/mol. Se determinó la concentración de tioles de cisteína producidos del anticuerpo por titulación con ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB; Pierce), resultando ser normalmente ligeramente superior a 4 tioles de cisteína por anticuerpo usando este método.

A continuación, se conjugó el fármaco vcMMAE a cAC10 reducido de la siguiente manera: en primer lugar, se enfrió cAC10 reducido (normalmente, concentración final de anticuerpo 30 μ M y tioles de cisteína de anticuerpo 120 μ M) hasta 0 °C. Se disolvió vcMMAE en acetonitrilo frío y se mezcló rápidamente con la solución de anticuerpo. La concentración de acetonitrilo final fue del 20 %, mientras que la concentración de fármaco final fue de 135 a 150 μ M (4,5 a 5 equivalentes molares, que es un ligero exceso frente a los tioles de cisteína del anticuerpo). Se dejó incubar esta solución durante 30 min a 0 °C, se inactivó el exceso de vcMMAE con cisteína (concentración final de 1 mM), y se purificó el conjugado usando una columna PD-10 como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 2 del Método 1

Se preparó cAC10 con 4 vcMMAE por anticuerpo (mezcla de E4) con cantidades limitantes de DTT de la siguiente manera: se trató cAC10 con 3,25 equivalentes molares de DTT en borato de sodio 0,025 M, pH 8, NaCl 0,025 M, DTPA 1 mM durante 2 horas a 37 °C. Se diluyó esta mezcla 5 veces con agua y se aplicó a una columna de hidroxapatita (Macroprep de cerámica de tipo I de 40 μ m, BioRad, Hercules, CA) a un caudal de 10 ml/min. El tamaño de la columna fue de 1 ml por 10 mg de cAC10. La columna se equilibró previamente con 5 volúmenes de columna de fosfato de sodio 0,5 M, pH 7, NaCl 10 mM y 5 volúmenes de columna de fosfato de sodio 10 mM, pH 7, NaCl 10 mM. Después de la aplicación, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de fosfato de sodio 10 mM, pH 7, NaCl 10 mM y después se eluyó con fosfato de sodio 100 mM, pH 7, NaCl 10 mM. Se añadió DTPA a 1 mM después de la elución. Se cuantificó la concentración de proteína usando un valor de absorbancia de 1,58 a 280 nm de una solución de 1,0 mg/ml, y se determinó la concentración molar usando un peso molecular de 148.449 g/mol. Se determinó la concentración de tioles de cisteína producidos del anticuerpo por titulación con DTNB, dando lugar, normalmente, a 4,0 a 4,5 tioles por anticuerpo.

Se sometió cAC10 reducido a alquilación con un ligero exceso de vcMMAE frente a los tioles de cisteína del anticuerpo (1,1 equivalentes molares). Para mantener vcMMAE soluble, había DMSO al 10 % en la mezcla de reacción final. Como alternativa, el vcMMAE se podría mantener en una solución que comprendiera el 5 % en volumen de un alcohol, tal como etanol y alcohol isopropílico. Se realizó la reacción de alquilación a 0 °C durante 30 min. Se usó cisteína (1 mM final) para inactivar cualquier vcMMAE sin reaccionar. Se purificó el cAC10-vcMMAE por cromatografía de hidroxapatita como se ha descrito anteriormente. Tras la elución, se cambió el tampón a solución

salina tamponada con fosfato (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando dispositivos de concentración por centrifugación de corte 30 K Ultrafree de Amicon (Millipore, Bedford, MA). Se cuantificó la concentración de proteína usando un valor de absorbancia de 1,62 a 280 nm para una solución de 1,0 mg/ml.

5 Ejemplo 3 del Método 2a

Se redujo totalmente cAC10 mediante la adición de un gran exceso de DTT. Las concentraciones finales de reacción fueron de 8 mg/ml de cAC10, borato de sodio 0,05 M, pH 8, NaCl 0,05 M, DTT 10 mM y DTPA 1 mM. Se incubó esta solución a 37 °C durante 30 min y se purificó el anticuerpo por desalación en una columna PD-10 como se ha descrito anteriormente. Se produjeron poco más de 8 tioles de cisteína por anticuerpo según lo determinado por titulación con DTNB usando estas condiciones.

La reoxidación parcial se realizó usando DTNB como agente oxidante. Se enfrió cAC10 reducido (normalmente, 30 µM) hasta 0 °C y luego se trató con 1,5 a 2,5 equivalentes molares de DTNB (concentración final de 45 y 75 µM; los rendimientos más altos de E4 se obtuvieron usando 2,0 equivalentes). Se mezcló rápidamente la solución por inversión y se dejó incubar a 0 °C durante 10-20 min. La extensión de la reacción se puede observar, pues el TNB⁻ liberado es de color amarillo. Por lo general, la reacción pareció completarse en unos cuantos segundos. Se añadió cisteína (concentración final de 1 mM) para garantizar que todo el TNB estaba presente como TNB⁻ en lugar de en disulfuros mixtos con cisteínas de anticuerpo. A continuación, se purificó el anticuerpo en una columna PD-10 o una columna de hidroxiapatita como se ha descrito anteriormente. Por lo general, se observaron 4 tioles de cisteína por anticuerpo mediante titulación de DTNB tras este procedimiento de reoxidación parcial. Finalmente, se conjugó el fármaco vcMMAE a estos tioles de cisteína de anticuerpo y se purificó mediante PD-10 como se ha descrito anteriormente para el Método 1.

25 Ejemplo 4 del Método 2b

Se preparó cAC10 totalmente reducido como se ha descrito anteriormente para el Método 2a. Se enfrió cAC10 totalmente reducido (normalmente, 30 µM) hasta 0 °C y luego se trató con 1,5 a 2,5 equivalentes de DTNB (concentración final de 45 y 75 µM). Se mezcló rápidamente la solución por inversión y se dejó incubar a 0 °C durante 10 min. Sin mayor purificación, se mezcló rápidamente el cAC10 parcialmente reoxidado con 5 equivalentes de vcMMAE disueltos en acetonitrilo frío. Al igual que con el Método 1, la concentración final de acetonitrilo fue del 20 %. En la reacción de conjugación, la concentración final de cAC10 era 24 µM (tioles de cisteína por anticuerpo 96 µM o 4 por anticuerpo) y la concentración final de vcMMAE fue de 120 µM (5 equivalentes molares). Se incubó esta solución durante 30 min a 0 °C antes de la inactivación con cisteína y la purificación por PD-10 como se ha descrito anteriormente.

Purificación preparativa de la mezcla de E4 por hidroxiapatita. Se cambió el tampón de cAC10 (citrate de sodio 25 mM, pH 6,5, NaCl 250 mM y Tween-80 al 0,02 %) a PBS usando varios dispositivos de concentración por centrifugación de corte 30 K Ultrafree de Amicon de 15 ml. Se redujeron totalmente 1,09 g de cAC10 en PBS con DTT en un volumen final de 89 ml de la siguiente manera: se trató cAC10 (82,3 µM) con DTT 10 mM en borato de sodio 0,025 M, pH 8, NaCl 0,025 M durante 1 hora a 37 °C. Se diluyó esta mezcla hasta 250 ml con agua y se aplicó a una columna de 70 ml de hidroxiapatita (Macrorep de cerámica de tipo I 40 µm, BioRad) a un caudal de 10 ml/min. La columna se equilibró previamente con 5 volúmenes de columna de fosfato de sodio 0,5 M, pH 7, NaCl 10 mM y 5 volúmenes de columna de fosfato de sodio 10 mM, pH 7, NaCl 10 mM. Tras la aplicación, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de fosfato de sodio 10 mM, pH 7, NaCl 10 mM y después se eluyó con fosfato de sodio 100 mM, pH 7, NaCl 10 mM.

Se volvió a oxidar cAC10 totalmente reducido con DTNB de la siguiente manera: se enfrió el material eluido anteriormente (6,02 mg/ml o 40,2 mM, 1,02 g en 170 ml) hasta 0 °C y después se trató con 2,0 equivalentes de DTNB (solución madre 10 mM) durante 20 min. Sin purificación adicional, se conjugó el cAC10 reoxidado con vcMMAE. Se trató el cAC10 frío (31,9 µM final) con 5 equivalentes de vcMMAE (159,5 µM final) disueltos en DMSO (20 % final) en un volumen final de 214 ml. Después de 40 min a 0 °C, se añadieron 1,07 ml de cisteína 100 mM para inactivar cualquier vcMMAE sin reaccionar y se diluyó la mezcla hasta 750 ml con agua. Se purificó el conjugado en una columna de hidroxiapatita como se ha descrito anteriormente para la reducción con DTT. Se concentró la mezcla de E4 de cAC10-vcMMAE recuperada (0,99 g o 91 % de rendimiento global basado en cAC10) y se cambió el tampón a PBS usando varios dispositivos de concentración por centrifugación de corte 30 K Ultrafree de Amicon de 15 ml.

Se realizó la purificación preparativa de E4 puro por HIC en una columna de HIC Toyopearl Fenil-650M de 45 ml a un caudal de 10 ml/min a temperatura ambiente. El disolvente A era NaCl 2 M y fosfato de sodio 50 mM, pH 7. El disolvente B era fosfato de sodio 50 mM al 80 % v/v, pH 7, y acetonitrilo al 20 % v/v. La columna se equilibró previamente con 5 volúmenes de columna de disolvente A. Se mezclaron hasta 400 mg de mezcla de E4 de cAC10-vcMMAE purificada por hidroxiapatita (anterior) con 1 volumen de NaCl 4 M y fosfato de sodio 50 mM, pH 7 y se aplicaron a la columna. E0 no quedó retenido por la columna. Se eluyeron las diferentes especies cargadas con fármaco por gradientes de etapas secuenciales: E2 se eluyó con disolvente B al 35 %, E4 se eluyó con disolvente B

al 70 %, E6 se eluyó con disolvente B al 95 % y E8 se eluyó con disolvente B al 100 %. Se concentró E4 purificado y se cambió el tampón a PBS usando varios dispositivos de concentración por centrifugación de corte 30 K Ultrafree de Amicon de 15 ml, obteniéndose 235 mg de E4 puro a partir de dos purificaciones 400 mg. El análisis de pureza por HIC analítica (más adelante) mostró una pureza de E4 superior al 90 %.

5

Ejemplo 5 del Método 1

Se realizó la reducción limitada con TCEP seguida de alquilación sin purificación intermedia mediante el tratamiento de cAC10 con 2,75 equivalentes molares de TCEP en borato de sodio 0,025 M, pH 8, NaCl 0,025 M, DTPA 1 mM durante 2 horas a 37 °C. Véase también la Figura 9. A continuación, se enfrió la mezcla hasta 0 °C, y se sometió a alquilación el cAC10 parcialmente reducido con vcMMAE como se ha descrito anteriormente. Se desaló cAC10-vcMMAE usando columnas PD-10 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) equilibradas con solución salina tamponada con fosfato. (La reducción parcial también se puede realizar con una etapa de purificación intermedia del anticuerpo parcialmente reducido, como se muestra en la Figura 8.)

15

Las muestras usadas para determinar la cinética de la distribución de los isómeros se prepararon de la siguiente manera: se redujo cAC10 con 3,0 equivalentes de DTT en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5 y EDTA 5 mM a 37 °C. En los puntos temporales indicados, se extrajeron las muestras, se inactivaron con un volumen igual de citrato de sodio 200 mM, pH 5, y se purificaron usando columnas PD-10 equilibradas con solución salina tamponada con fosfato que contenía EDTA 5 mM. Se trató el cAC10 reducido con vcMMAE como se ha descrito anteriormente y se purificó usando columnas PD-10 equilibradas con solución salina tamponada con fosfato.

20

Se realizó la purificación de E2, E4 y E6 puros por HIC en una columna de HIC Toyopearl Fenil-650M (Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA) a un caudal de 10 ml/min a temperatura ambiente. El tamaño de la columna era de 1 ml por 7,5 mg de cAC10-vcMMAE. El disolvente A era NaCl 2,0 M y fosfato de sodio 50 mM, pH 7. El disolvente B era fosfato de sodio 50 mM al 80 % v/v, pH 7, y acetonitrilo al 20 % v/v. La columna se equilibró previamente con 5 volúmenes de columna de disolvente A. Se mezcló cAC10-vcMMAE con 0,67 volúmenes de NaCl 5 M (2,0 M final) y se aplicaron a la columna. E0 no quedó retenido por la columna. Se eluyeron las diferentes especies cargadas con fármaco por gradientes de etapas secuenciales: E2 se eluyó con disolvente B al 35 %, E4 se eluyó con disolvente B al 70 %, E6 se eluyó con disolvente B al 95 % y E8 se eluyó con disolvente B al 100 %. Se concentró E4 purificado y se cambió el tampón a solución salina tamponada con fosfato usando dispositivos de concentración por centrifugación de corte 30 K Ultrafree de Amicon.

25

30

Ejemplo 6 de métodos analíticos.

35

Se determinó la carga de fármaco midiendo la relación de la absorbancia a 250 y 280 nm (A_{250}/A_{280}). El número de vcMMAE por cAC10 se ha determinado empíricamente en $(A_{250}/A_{280} - 0,36)/0,0686$.

40

Se analizaron los conjugados en cuanto al porcentaje de pureza de E4 mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una columna 5PW de éter Tosoh Bioscience (parte 08641) a un caudal de 1 ml/min y una temperatura de columna de 30 °C. El disolvente A era fosfato de sodio 50 mM, pH 7 y NaCl 2,0 M. El disolvente B era fosfato de sodio 50 mM al 80 %, pH 7, 2-propanol al 10 % y acetonitrilo al 10 %. B isocrático al 0 % durante 15 min, un gradiente lineal de 50 min de B del 0 al 100 % un gradiente lineal de 0,1 min de B del 100 al 0 % y B isocrático al 0 % durante 14,9 min. Las inyecciones (normalmente, de 90 a 100 μ l) fueron de 1 volumen de conjugado vcMMAE-cAC10 purificado (concentración de al menos 3 mg/ml) y 1 volumen de fosfato de sodio 50 mM, pH 7 y NaCl 4 M.

45

Se analizaron los ADC, incluyendo el E4 puro de la cromatografía HIC, en condiciones desnaturalizantes y no reductoras usando un bioanalizador Agilent. Se usó un chip de proteína de 200 en condiciones desnaturalizantes pero no reductoras según lo descrito por el fabricante. En resumen, se mezclaron 4 μ l de 1 mg/ml de cAC10-vcMMAE con 2 μ l de tampón de carga no reductor y se calentó hasta 100 °C durante 5 min. Se añadió agua (84 μ l) y se cargaron 6 μ l de esta mezcla en cada pocillo del chip.

50

Finalmente, se analizó E4 puro en una columna PLRP-S (Polymer Laboratories). El caudal fue de 1 ml/min y la temperatura de la columna fue de 65 °C. El disolvente A era ácido trifluoroacético al 0,05 % en agua y el disolvente B era ácido trifluoroacético al 0,04 % en acetonitrilo. B isocrático al 25 % durante 3 min, un gradiente lineal de 15 min hasta B al 50 %, un gradiente lineal de 2 min hasta B al 95 %, un gradiente lineal de 1 min hasta B al 25 % y B isocrático al 25 % durante 2 min. Las inyecciones eran de 10 μ l de cAC10-vcMMAE previamente reducido con DTT 20 mM a 37 °C durante 20 min para escindir los disulfuros intercatenarios.

55

60

Los ADC también se analizaron en condiciones desnaturalizantes y reductoras sobre una columna PLRP-S (Polymer Laboratories) (2,1 x 150 mm, 8 μ , 1000 Å). El caudal fue de 1 ml/min y la temperatura de la columna fue de 80 °C. El disolvente A era ácido trifluoroacético al 0,05 % en agua y el disolvente B era ácido trifluoroacético al 0,04 % en acetonitrilo. B isocrático al 25 % durante 3 min, un gradiente lineal de 25 min hasta B al 50 %, un gradiente lineal de 2 min hasta B al 95 %, un gradiente lineal de 1 min hasta B al 25 % y B isocrático al 25 % durante 2 min. Las

65

inyecciones eran de 10-20 µl de 1 mg/ml de cAC10-vcMMAE previamente reducido con DTT 20 mM a 37 °C durante 15 min para escindir el resto de disulfuros intercatenarios. Se determinó la fracción molar de cada cadena usando los siguientes coeficientes de extinción molar: cadena ligera con 0 vcMMAE: 30.160 M⁻¹ cm⁻¹; cadena ligera con 1 vcMMAE: 31.660 M⁻¹ cm⁻¹; cadena pesada con 0 vcMMAE: 86.915 M⁻¹ cm⁻¹; cadena pesada con 1 vcMMAE: 88.415 M⁻¹ cm⁻¹; cadena pesada con 2 vcMMAE: 89.915 M⁻¹ cm⁻¹; cadena pesada con 3 vcMMAE: 91.415 M⁻¹ cm⁻¹.

Se determinó la distribución isomérica para E2 y E6 usando únicamente los datos de HPLC de PLRP-S. Para el isómero E2 A (para estos análisis, "isómero A" se refiere tanto al isómero 2A como al isómero 2B de la Figura 7), la fracción molar de cadena ligera con 0 vcMMAE (L0) es igual a la fracción molar de cadena pesada con 1 vcMMAE (H1), mientras que para el isómero E2 C, la fracción molar de cadena ligera con 0 y 1 vcMMAE y la fracción molar de cadena pesada con 0 y 1 vcMMAE son iguales. Puesto que solo la cadena ligera con 1 vcMMAE (L1) y la cadena pesada con 0 vcMMAE (H0) contribuyen al porcentaje de isómero C, el porcentaje de isómero C se puede expresar de la siguiente manera:

$$\%C = 2L1 + 2H0 \quad (1)$$

Se supone que el porcentaje de isómero A es 100 - % C. A menudo, se observan pequeñas cantidades (inferiores al 3 % total) de cadena pesada con 2 o 3 vcMMAE en los datos de HPLC PLRP-S. Estas se deben probablemente a la contaminación de E4 o E6 en la muestra de E2. Con el fin de calcular el porcentaje de isómeros E2 A y C, la suma del porcentaje molar de L0, L1, H1 y H2 se fijó en el 100 %).

De manera similar, para el isómero E6 A (para estos análisis, "isómero A" se refiere tanto al isómero 6A como al isómero 6B de la Figura 7), la fracción molar de H2 es igual a la fracción molar de L1, mientras que para el isómero E6 C, las fracciones molares de L0, L1, H2 y H3 son iguales. Dado que solo L0 y H3 contribuyen al porcentaje de isómero C, el porcentaje de isómero C se puede expresar de la siguiente manera:

$$\%C = 2L0 + 2H3 \quad (2)$$

Se supone que el porcentaje de isómero A es 100 - % C. Como con E2, la suma del porcentaje molar de L0, L1, H2 y H3 se fijó en el 100 %.

Los porcentajes de los isómeros E4 no se pueden obtener únicamente a partir de los datos de HPLC de PLRP-S, porque no hay una solución única. Se necesita fijar al menos un isómero antes de poderse usar los datos de PLRP para resolver los otros dos isómeros. Se determinó el porcentaje molar de HHL, HH y HL a partir de los datos del bioanalizador, usando los siguientes pesos moleculares: 124.720,8 (HHL), 100.992,6 (HH) y 74.224,5 (HL) g/mol. El bioanalizador usa la fluorescencia del colorante unido para la lectura del instrumento, y se supone que HHL, HH y HL se unen al colorante igualmente por peso molecular unitario, aunque es poco probable que esta suposición sea cierta. Para minimizar el error que resultaría de esta suposición, solo se calculó el isómero E4A a partir de los datos del bioanalizador usando las áreas de los picos de HHL, HH y HL de la siguiente manera (el área del pico de HL se divide entre 2, ya que cada anticuerpo produciría 2 HL si se escindieran los disulfuros de cadena pesada-pesada):

$$\%A = \frac{\frac{HHL}{124720,8}}{\frac{HHL}{124720,8} + \frac{HH}{100992,6} + \frac{HL}{2*74224,5}} \quad (3)$$

Luego se usaron los datos de HPLC PLRP-S para resolver la contribución restante de los isómeros E4 E y F usando las siguientes fórmulas:

$$\%E = H1 + L1 - A \text{ al } 0,5 \% \quad (4)$$

$$\%F = H2 + L0 - A \text{ al } 0,5 \% \quad (5)$$

El isómero E4 A contribuye igualmente a las poblaciones de L0, L1, H1 y H2, y las contribuciones a H1 y L1 del isómero A (la mitad de su contribución total) se deben restar de la cantidad total observada de H1 y L1 para obtener la cantidad restante de H1 y L1 que debe haber debido a la presencia del isómero E. Una sustracción similar para la

contribución de H2 y L0 para el isómero A producirá la cantidad presente debida al isómero F. Como con E2 y E6, la suma de los porcentajes molares de L0, L1, H1 y H2 se fijó en el 100 %.

Ejemplo 7 de estrategias para la carga parcial de proteínas

5 Se usaron dos estrategias diferentes para preparar ADC parcialmente cargados de fármacos. En primer lugar, la reducción parcial de cAC10 con cantidades limitantes de DTT o TCEP produce menos de 8 cisteínas de anticuerpo. Aproximadamente 3,25 y 2,75 equivalentes de DTT y TCEP, respectivamente, escindirán 2 enlaces disulfuro intercatenarios para producir un promedio de 4 cisteínas de cAC10 por anticuerpo (una mezcla de 0, 2, 4, 6 y 8 cisteínas de anticuerpo). La cantidad de agente reductor se puede determinar empíricamente: cBR96 requiere solo 2,1 equivalentes de DTT o TCEP para producir 4 cisteínas de anticuerpo, mientras que los anticuerpos IgG1 murinos a menudo pueden ser extremadamente resistentes a la reducción (datos no mostrados). Una ventaja de usar TCEP en lugar de DTT es que las fosfinas reaccionan mal con las maleimidadas, y no es necesario eliminar ningún agente reductor restante antes de añadir vcMMAE. El exceso de DTT reacciona fácilmente con vcMMAE y competiría con las cisteínas de los anticuerpos por el fármaco. Después de la reducción de los anticuerpos, el tratamiento de cisteínas de anticuerpos con un ligero exceso molar de vcMMAE (1,1 equivalentes molares por cisteína) produce cAC10 con una carga media de fármaco de 4 MMAE por anticuerpo (mezcla de E4).

20 Como alternativa, se puede reducir totalmente cAC10 con DTT 10 mM y luego reoxidarlo parcialmente con DTNB. Este proceso de reoxidación es muy eficaz, requiriendo 2,0 equivalentes de DTNB para reoxidar 8 cisteínas de anticuerpo a 4. El tratamiento de este anticuerpo reoxidado con un tiol tal como cisteína no libera ningún ácido tionitrobenzoico unido, lo que sugiere que las cisteínas reoxidadas están en forma de disulfuros de anticuerpo en lugar de disulfuros de cisteína-TNB mixtos. Los métodos analíticos descritos a continuación también muestran la presencia de disulfuros de anticuerpos. Las cisteínas de anticuerpos restantes se pueden conjugar con vcMMAE como se ha descrito anteriormente para producir la mezcla de E4.

30 Para determinar la población isomérica de cada una de las especies cargadas con fármaco, E2, E4 y E6, se separan y se aíslan, produciendo E2, E4 y E6 puros. La Figura 13A muestra un rastro de HPLC de interacción hidrófoba (HIC) de la mezcla de E4 preparada mediante la reducción parcial con DTT. Todas las especies cargadas con número par de fármacos se pueden separar entre sí, pudiéndose observar pequeñas cantidades de especies cargadas con número impar de fármacos en la depresión entre las especies de número par. La carga de fármaco de estas especies se puede asignar mediante el examen de los espectros UV de los picos. El grupo PABA del enlazador de fármacos tiene una absorbancia máxima cerca de 248 nm, mientras que el anticuerpo tiene una absorbancia mínima a la misma longitud de onda. Usando los coeficientes de extinción de los fármacos y los anticuerpos a 248 y 280 nm, se puede asignar el número de fármacos por anticuerpo para la mezcla de ADC de partida y cada uno de los picos observados (Hamblett *et al* (2004), *Clin Cancer Res.* 10: 7063-70).

40 La Tabla 1 muestra los porcentajes de las especies cargadas con número par de fármacos preparadas por reducción parcial con DTT, reducción parcial con TCEP y reoxidación parcial con DTNB. El método de reducción parcial con DTNB produce un porcentaje ligeramente mayor de E4 (38 %) que los métodos de reducción parcial (30 % para DTT y 33 % para TCEP). Esto se logra a costa de principalmente E6 y E8, que suman aproximadamente el 34 % para la reducción parcial con DTT y el 31 % para la reducción parcial con TCEP, mientras que solo el 24 % para la reoxidación parcial con DTNB. Las especies cargadas con número impar de fármacos no se muestran en la tabla y representan el 7-10 % del material total.

Tabla 1. Composición porcentual de la mezcla de E4.^a

Método de producción	E0	E2	E4	E6	E8
Reducción parcial con DTT	9 ± 2	20 ± 3	30 ± 1	24 ± 3	10 ± 3
Reducción parcial con TCEP	8 ± 1	20 ± 3	33 ± 2	22 ± 2	9 ± 1
Reoxidación parcial con DTNB	10 ± 4	18 ± 3	38 ± 2	20 ± 4	4 ± 2

^aSe integraron cromatogramas HPLC de HIC para la composición porcentual. Los valores son ± la desviación estándar para 4 (reducción parcial con DTT), 3 (reducción parcial con TCEP) o 6 (reoxidación parcial con DTNB) lotes separados. Las contribuciones de las especies de número impar no se muestran, haciendo que el total sea inferior al 100 %.

50 Este método de HPLC de HIC se puede usar para aislar unos cuantos miligramos de E2, E4 y E6 puros. Como alternativa, se puede usar la HIC preparativa usando gradientes escalonados para aislar cientos de miligramos de E2, E4 y E6 puros, como se muestra en la Figura 13B, C, D. La pureza de estos materiales, con respecto a sus niveles de carga de fármaco, es al menos del 95 %.

Estos materiales purificados se sometieron a dos métodos de análisis para determinar la distribución de los fármacos en el anticuerpo (véase el Ejemplo 6). En primer lugar, se usó la HPLC reductora y desnaturalizante en una columna PLRP-S para determinar el número de fármacos por cadena de anticuerpo. El pretratamiento del ADC con un exceso de DTT rompe los disulfuros intercatenarios restantes y permite la separación de la cadena ligera con 0 o 1 fármacos (L0 y L1) de la cadena pesada con 0, 1, 2 o 3 fármacos (H0, H1, H2 y H3) (Figura 4). En segundo lugar, la electroforesis capilar no reductora y desnaturalizante permite la separación de cadenas de anticuerpo con los disulfuros intercatenarios restantes intactos, lo que resulta en 6 posibles especies: L, H, HL, HH, HHL y HHLL (Figura 15).

La cuantificación de las especies observadas por HPLC de PLRP-S y electroforesis capilar permite la asignación de las poblaciones isoméricas. Las Figuras 1 y 7 ilustran los fragmentos de anticuerpos y el número de fármacos asociados para cada uno de los isómeros. Las poblaciones isoméricas de E2 y E6 se pueden determinar fácilmente por HPLC de PLRP-S sola o electroforesis capilar sola, porque cada isómero produce un patrón único. Por ejemplo, el isómero E2C solo produce L1 y H0 en condiciones desnaturalizantes y reductoras, mientras que E2A solo produce L0 y H1, y en condiciones desnaturalizantes y no reductoras, el isómero E2A produce HHL, mientras que E2C produce L y HHL. Para E4, ni la HPLC de PLRP-S ni la electroforesis capilar por sí solas son suficientes para calcular las poblaciones isoméricas, de modo que los dos métodos se deben usar en combinación para determinar la composición. La Tabla 2 muestra la composición porcentual para cada uno de estos isómeros. Los datos de la HPLC de PLRP-S se usaron exclusivamente para calcular la composición isomérica de los isómeros E2 y E6 usando las Ecuaciones 1 y 2 (véase el Ejemplo 6). La electroforesis capilar se usó para calcular la cantidad de E4A usando la Ecuación 3, y la HPLC de PLRP-S se usó para calcular la cantidad de E4B y E4C usando las Ecuaciones 4 y 5 que restan la contribución de E4A (véase el Ejemplo 6).

Tabla 2. Composición de la población de los isómeros E2, E4 y E6 purificados

Método de producción	E2A ^a	E2C ^a	E4A ^b	E4E ^c	E4F ^c	E6A ^d	E6C ^d
Reducción parcial con DTT	8	92	10	59	31	2	98
Reoxidación parcial con DTNB	77	23	17	8	75	4	96
Reducción parcial con AET a pH 5	17	83	13	46	41	2	98

^aDeterminada a partir de los datos de HPLC de PLRP-S usando la Ecuación 1.
^bDeterminada a partir de los datos del bioanalizador usando la Ecuación 3.
^cDeterminada a partir de los datos de HPLC de PLRP-S usando las Ecuaciones 4 y 5.
^dDeterminada a partir de los datos de HPLC de PLRP-S usando la Ecuación 2.

Los datos de la Tabla 2 son sorprendentes debido a que el método de producción afecta significativamente a la ubicación de los fármacos, lo que sugiere que los disulfuros de anticuerpos se pueden reducir selectivamente. La reducción parcial con DTT produce el 92 % de isómero E2C, que resulta de la reducción de uno de los disulfuros de la cadena pesada-ligera, el 59 % de isómero E4E, que resulta de la reducción de ambos disulfuros de cadena pesada-ligera, y el 98 % de isómero E6C, que resulta de la reducción de ambos disulfuros de cadena pesada-pesada y un disulfuro de cadena pesada-ligera. Los isómeros con un disulfuro de cadena pesada-pesada reducido son una gran minoría. Por otro lado, la reoxidación parcial con DTNB produce casi el resultado opuesto para los isómeros E2 y E4, el 77 % de isómero E2A y el 75 % de E4A, donde un disulfuro de cadena pesada-pesada está intacto, y el mismo resultado para E6, el 96 % de E6C. La reducción ácida con AET produce una población de isómeros que es muy similar a la reducción parcial con DTT, y favorece la escisión de los disulfuros de cadena pesada-ligera.

La cinética de la distribución de los isómeros para la reducción parcial con DTT se muestra en la Tabla 3. Se redujo cAC10 con 3,0 equivalentes de DTT, y se retiraron muestras periódicamente y se alquilaron con vcMMAE. Se obtuvieron E2, E4 y E6 puros mediante HPLC de HIC, y se determinó la distribución de los isómeros por HPLC de PLRP-S y bioanalizador. Las composiciones de los isómeros son idénticas en el transcurso del experimento, que abarca de 10 a 120 min de tiempo de reducción y una carga de fármaco total de 1,3 a 3,9 fármacos por anticuerpo. Estos resultados muestran que las poblaciones de isómeros de reducción parcial con DTT mostradas en la Tabla 2, preparadas mediante la reducción de cAC10 durante 2 h con una cantidad limitante de DTT, son representativas de la población isomérica a lo largo de toda la reacción de reducción.

Tabla 3. Cinética de la distribución de los isómeros para la reducción parcial con DTT

Tiempo (min) ^a	Fármacos/mAb ^b	E2A ^c	E2C ^c	E4A ^d	E4E ^e	E4F ^e	E6A ^f	E6C ^f
10	1,3	12	88	9	63	28	N/D	N/D
20	2,1	9	91	7	65	29	7	93
35	2,7	9	91	7	63	31	6	94
55	3,3	9	91	7	63	30	8	92
80	3,6	9	92	7	61	32	6	94
120	3,9	11	90	8	61	31	7	93

^aTiempo de reducción. Una vez reducidos, todos los anticuerpos se trataron con vcMMAE durante períodos de tiempo idénticos. ^bDeterminada mediante HPLC de HIC. ^cDeterminada a partir de los datos de HPLC de PLRP-S usando la Ecuación 1. ^dDeterminada a partir de los datos del bioanalizador usando la Ecuación 3. ^eDeterminada a partir de los datos de HPLC de PLRP-S usando las Ecuaciones 4 y 5. ^fDeterminada a partir de los datos de HPLC de PLRP-S usando la Ecuación 2. N/D, no determinada. En este punto temporal, se produjo muy poco E6, y este material no fue suficiente para la determinación de la población isomérica.

Tabla 4. Unión *in vitro* y citotoxicidad de cAC10-vcMMAE

ADC	Cl ₅₀ de la unión (mg/ml) ^a	Cl ₅₀ de Karpas 299 (ng/ml) ^b
E0 (cAC10)	2,70 ± 1,91	N/D
DTT de mezcla de E2	N/D	11,4 ± 2,4
DTT de E2 puro	3,57 ± 2,41	13,8 ± 3,6
DTNB de mezcla de E2	N/D	11,7 ± 4,5
DTNB de E2 puro	2,02 ± 1,22	13,2 ± 2,7
DTT de mezcla de E4	N/D	3,4 ± 1,2
DTT de E4 puro	7,76 ± 3,93	4,8 ± 0,7
DTNB de mezcla de E4	N/D	5,0 ± 0,0
DTNB de E4 puro	7,69 ± 4,42	4,3 ± 0,9
E8	6,53 ± 3,09	2,7 ± 0,2

^aUnión a Karpas 299, en mg de componente de anticuerpo/ml, determinada a partir de 4-7 mediciones independientes ± la desviación estándar. N/D, no determinado.
^bCitotoxicidad *in vitro*, en ng de componente de anticuerpo/ml, determinada a partir de 3 mediciones independientes ± la desviación estándar. N/D, no determinado. cAC10 solo presenta una baja potencia frente a Karpas 299.

- 5 La Tabla 4 enumera los resultados de los experimentos de unión *in vitro* y de citotoxicidad que se realizaron para los ADC de varios niveles de carga de fármaco. Se ensayaron la mezcla de E2 y E4, así como E2 y E4 puros de la reducción parcial con DTT y la reoxidación parcial con DTNB. El conjugado completamente cargado con 8 fármacos por anticuerpo resultó ser el más citotóxico, con un valor de Cl₅₀ en la línea celular Karpas 299 positiva en CD30 de 2,7 ng/ml (calculado basado en el peso del anticuerpo). Los ADC con 4 fármacos por anticuerpo resultaron ser ligeramente menos citotóxicos, con valores de Cl₅₀ de entre 3,4 y 5,0 ng/ml, y los ADC con 2 fármacos por anticuerpo resultaron ser los menos citotóxicos, con valores de Cl₅₀ de entre 11,4 y 13,8 ng/ml. La química usada para producir los ADC no mostró diferencias significativas en la citotoxicidad, ni hubo diferencias significativas entre las mezclas y los ADC purificados mediante HIC. La citotoxicidad *in vitro* parece depender solo de la dosis total de fármaco. La unión a células positivas en CD30 fue muy similar para E0, E2 y E4, viéndose E8 ligeramente afectado, lo que demuestra que la conjugación no interfiere en la unión al antígeno. Las citotoxicidades *in vitro* de los ADC (que miden el componente de anticuerpo) muestran la tendencia esperada: cuanto mayor es el número de fármacos,
- 10
- 15

menor es el valor de CI_{50} . En el error experimental, la ubicación de los fármacos no parece influir en la citotoxicidad *in vitro*.

5 Ejemplo 8 de los efectos de la carga de fármacos sobre la actividad antitumoral del conjugado de anticuerpo monoclonal y fármaco

10 Células y reactivos. Se adquirió la línea Karpas-299 de ALCL positiva en CD30 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganism und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Alemania). L540cy, un derivado de la línea HD L540 adaptado al crecimiento de xenoinjertos, fue amablemente proporcionado por el Dr. Harald Stein (Institut für Pathologie, Univ. Veinikum Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlín, Alemania). Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) suplementado con suero bovino fetal al 10 %.

15 Construcción y purificación de ADC de **cAC10-Val-Cit-MMAE**. En resumen, se produjo cAC10 con 8 fármacos por anticuerpo mezclando cAC10 con ditiotreitól (DTT) a 37 °C durante 30 min, y se intercambiò el tampón mediante elución a través de resina de Sephadex G-25 con PBS que contenía ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 1 mM. Se añadió PBS que contenía DTPA 1 mM (PBS/D) al mAb reducido (concentración final de 2,5 mg/ml). Se añadió un exceso molar de 9,5 de maleimidocaproyl-Val-Cit-MMAE, denominado Val-Cit-MMAE, al anticuerpo reducido a 4 °C durante 1 h y se inactivó la reacción de conjugación mediante la adición de un exceso de 20 veces de cisteína. Se concentró la mezcla de reacción por ultrafiltración centrífuga y se intercambiò el tampón a través de Sephadex G25 equilibrada en PBS a 4 °C. A continuación, se filtró el conjugado a través de un filtro de 0,2 µm en condiciones estériles.

25 La generación de ADC de cAC10 con dos y cuatro moléculas de MMAE por anticuerpo implicó una reducción parcial seguida de la reacción con Val-Cit-MMAE. El anticuerpo cAC10 (10 mg/ml) se redujo parcialmente mediante la adición de DTT a una relación molar final de DTT:mAb de 3,0 seguido de la incubación a 37 °C durante ~ 2 h. A continuación, se enfrió la reacción de reducción hasta ~ 10 °C y se purificó el cAC10 reducido alejado del exceso de DTT mediante diafiltración. Tras la diafiltración, se determinó la concentración de tiol en el cAC10 parcialmente reducido mediante el ensayo de DTNB (de Ellman). De esta manera, se redujo un promedio de aproximadamente 2 enlaces disulfuro, exponiendo así aproximadamente 4 Cys:mAb reducidos. Para conjugar toda la Cys reducida, se añadió Val-Cit-cMMAE a una proporción molar final de Val-Cit-MMAE:Cys reducida de aproximadamente 1,15. La reacción de conjugación se llevó a cabo en presencia del 15 % v/v de DMSO y se dejó proceder a aproximadamente 10 °C durante aproximadamente 30 min. Después de la reacción de conjugación, se añadió un exceso de Cys libre (2 mol de Cys por mol de Val-Cit-MMAE) para inactivar el Val-Cit-MMAE sin reaccionar para producir el aducto de Cys-Val-Cit-MMAE. La reacción de inactivación de Cys se dejó proceder a aproximadamente 10 °C durante aproximadamente 30 min. Se purificó la mezcla de reacción inactivada de Cys y se intercambiò el tampón en PBS por diafiltración, obteniéndose cAC10-Val-Cit-MMAE parcialmente cargado.

40 Fraccionamiento por HIC preparativa. Todas las etapas cromatográficas se realizaron a temperatura ambiente. Se empaquetó una columna de 1,6 x 25 cm (~ 50 ml) con la resina de HIC Toyopearl Fenil-650M (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA) y se equilibró con > 5 volúmenes de columna de tampón A (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 2 M, pH 7,0) a un caudal de 15 ml/min. Para preparar la muestra para la carga en la columna, se combinaron 39 ml de cAC10-vcMMAE parcialmente cargado (12,9 mg/ml) con 39 ml de Tampón A' (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 4 M, pH 7,0). Se cargó la muestra en la columna a 10 ml/min; todas las etapas posteriores se realizaron a un caudal de 10 ml/min. Después de cargar la muestra, se lavó la columna con tampón A hasta alcanzarse una línea basal A_{280} . Se eluyó cAC10-E2 y se recogió con un gradiente escalonado que consistía en tampón A al 65 %/tampón B al 35 % (fosfato de sodio 50 mM al 80 % v/v, pH 7,0, acetonitrilo al 20 % v/v). Tras alcanzarse de nuevo la línea basal, se eluyó cAC10-E4 y se recogió con un gradiente escalonado que consistía en tampón A al 30 %/tampón B al 70 %. Se recogieron ambos picos de cAC10-E2 y cAC10-E4 al ~ 20 % de sus respectivas alturas de pico. Se intercambiò el tampón en las fracciones de interés a PBS usando dispositivos de filtración centrífuga Ultrafree-15 con un corte de peso molecular de 30 kDa (Millipore, Billerica, MA).

55 Análisis de conjugados. El análisis de los conjugados se realizó por HPLC de HIC usando una columna de Éter-5PW (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA). El método consistió en un gradiente lineal de Tampón A al 100 % a Tampón C al 100 % (fosfato de sodio 50 mM al 80 % v/v, pH 7,0, acetonitrilo al 10 % v/v, isopropanol al 10 % v/v) en 50 min. El caudal se fijó en 1 ml/min, la temperatura se fijó en 30 °C y la detección se siguió tanto a 248 como a 280 nm. La identidad de los picos de cAC10-E8 y cAC10 sin modificar se confirmó mediante la inyección de patrones de cAC10-E8 y cAC10. Dado que el anticuerpo y el fármaco tienen distintos máximos de absorbancia ($\lambda_{\text{máx}} = 280$ y 248 nm, respectivamente), fue posible identificar picos correspondientes a los conjugados de cAC10 con 2, 4 y 6 fármacos por anticuerpo mediante la superposición de los espectros de los picos.

65 Caracterización *in vitro* de ADC de **cAC10-Val-Cit-MMAE**. Se realizó la unión de competición en los ADC para determinar si la conjugación o la presencia de fármaco afectaban a la unión al antígeno. Para comparar la unión de saturación de mAb y ADC, se combinaron 5×10^5 células Karpas-299 con diluciones seriadas de cAC10, cAC10-E2, cAC10-E4 o cAC10-E8 en presencia de 1 µg/ml de cAC10 marcado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) en medio de tinción durante 30 min en hielo, y se lavaron dos veces con medio de tinción enfriado con hielo. Se

examinaron las células marcadas por un lector de microplacas Fusion (Perkin-Elmer, Boston, MA). Se corrigió el fondo de los datos de las muestras y se presentaron como el porcentaje de fluorescencia máxima calculada por la fluorescencia de la muestra dividida entre la fluorescencia de las células teñidas con 1 µg/ml de cAC10-Alexa Fluor® 488 solo.

Se determinaron las actividades inhibitoras del crecimiento de los conjugados de cAC10 midiendo la síntesis de ADN. Se incubaron los conjugados con células Karpas-299 o L540cy CD30⁺ o células WSU-NHL CD30⁻. Después de 92 h de incubación con cAC10 o ADC de cAC10, se marcaron las células con [³H]-timidina, 0,5 µCi/pocillo, durante 4 horas a 37 °C. Se recogieron las células sobre filtros usando un recolector, se mezclaron con fluido de centelleo y se midió la radiactividad con un contador de centelleo Topcount (Packard Instruments, Meriden, CT). Se representó gráficamente el porcentaje sin tratar frente a la concentración para cada molécula con el fin de determinar la CI₅₀ (definida como la concentración de mAb que dio el 50 % de inhibición de la síntesis de ADN).

Modelos de xenoinjertos de ALCL humana. Para establecer un modelo de enfermedad subcutánea de ALCL, se implantaron 5 x 10⁶ células Karpas-299 en el flanco derecho de ratones CB-17 SCID (Harlan, Indianápolis, IN). La terapia con ADC se inició cuando el tamaño tumoral de cada grupo de 6-10 animales alcanzó una media de aproximadamente 50-100 mm³. El tratamiento consistió bien en una sola inyección o en múltiples inyecciones i.v. usando el programa de una inyección cada 4 días para 4 inyecciones. El volumen del tumor se calculó usando la fórmula (longitud x anchura²)/2. Un tumor que disminuye de tamaño, tal modo que era impalpable se definió como una regresión completa (RC). Una regresión completa que duró ≥ 10 tiempos de duplicación tumoral se definió como una curación. La inhibición del crecimiento del tumor (ICT) se calculó cuando los tumores del grupo de control alcanzaron los 750-1.000 mm³ de tamaño de la siguiente manera:

$$ICT = 1 - \frac{(\text{Volumen tumoral medio del grupo tratado})}{(\text{Volumen tumoral medio del grupo de control})} \times 100$$

Dosis máxima tolerada. Grupos de tres ratones BALB/c (Harlan, Indianápolis, IN) recibieron por inyección 30-60 mg/kg de cAC10-E8, 60-120 mg/kg de cAC10-E4 o 200-250 mg/kg de cAC10-vcMMAE2 a través de la vena de la cola para determinar la dosis máxima tolerada (DMT) de una sola dosis. Los ratones fueron controlados diariamente durante 14 días, y se registraron el peso y las observaciones clínicas. Los ratones que desarrollaron signos significativos de angustia fueron sacrificados de acuerdo con las directrices de ACUC. Se definió la dosis máxima tolerada como la dosis más alta que no causó una toxicidad grave manifiesta o una pérdida de peso superior al 20 por ciento en las dos semanas de la inyección en ninguno de los animales.

Farmacocinética. Las farmacocinéticas de cAC10, cAC10-E2, cAC10-E4 y cAC10-E8 se evaluaron en ratones SCID. Los ratones SCID (n = 3) recibieron 10 mg/kg del material de ensayo (basándose en el componente de anticuerpo) por inyección en la vena de la cola. Se recogieron muestras de sangre de cada ratón a través de la vena safena a 1 h, 4 h, 1 d, 2 d, 4 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d, 35 d, 42 d y 49 días de la inyección. La sangre se recogió en tubos recubiertos de heparina, tras lo que se centrifugaron (14.000xg, 3 min) para aislar el plasma. Las concentraciones plasmáticas de cAC10 y ADC se midieron por ELISA.

En resumen, el ELISA consistió en las siguientes etapas: recubrimiento de las placas, bloqueo, unión de las muestras, mAb secundario, TMB y la detención con ácido. Después de cada etapa, se lavaron los pocillos con tampón de lavado (PBS, Tween-20 al 0,05 %, pH = 7,4) tres veces. En la etapa del recubrimiento de las placas, se recubrió con mAb anti-cAC10 las placas de 96 pocillos a 2 µg/ml en tampón de carbonato (carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH = 9,6) a 4 °C durante una noche. Tras el recubrimiento de las placas, se añadió tampón de bloqueo (PBS, BSA al 1 %, Tween-20 al 0,05 %) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se añadieron 100 µl de muestra de plasma patrón o diluido a pocillos por triplicado durante 1 h a temperatura ambiente. La segunda etapa consistió en la incubación de un conjugado de IgG-HRP antihumano de ratón (Southern Biotech, Birmingham, AL) durante 1 h. Posteriormente, se añadieron 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma, St. Louis, MO) a cada pocillo y tras desarrollarse color, la reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 1 N. La densidad óptica se midió usando un lector de microplacas cinético VMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 450 nm y un espacio en blanco a 630 nm. Los parámetros farmacocinéticos no compartimentales se calcularon con WinNonlin (Pharsight, Mountain View, CA).

Caracterización *in vitro*. Se realizaron experimentos de unión de competencia para evaluar si la conjugación de MMAE en cAC10 interfería con la capacidad de unión a CD30 de los ADC. Se incubaron células Karpas-299 CD30⁺ con 1 µg/ml de cAC10 marcado fluorescentemente combinado con diluciones seriadas de anticuerpo no marcado, cAC10-E2, cAC10-E4 o cAC10-E8. Como se muestra en la Figura 10, cada una de las variantes de ADC compitió eficazmente con cAC10 marcado fluorescentemente equivalente a cAC10 sin marcar. Por lo tanto, la conjugación con MMAE no redujo la unión al antígeno.

Las actividades citotóxicas *in vitro* de los ADC se evaluaron mediante un ensayo de incorporación de [³H]-TdR con células Karpas-299 y L540cy CD30⁺ y células WSU-NHL CD30⁻. cAC10-E8 demostró actividad significativa contra las células Karpas-299 con una CI₅₀ de 1,0 ng/ml (Figura 11a). La disminución de la cantidad de fármaco en la mitad a cuatro moléculas de MMAE por mAb (cAC10-E4) aumentó CI₅₀ a 2,9 ng/ml. La reducción de nuevo a la mitad de la carga de fármaco aumentó más la CI₅₀ a 6,2 ng/ml con cAC10-E2. Al contrario de la línea HD L540cy, los ADC resultaron tener una tendencia similar con valores de CI₅₀ de 1,4, 4,5 y 9,2 ng/ml para cAC10-E8, cAC10-E4 y cAC10-E2, respectivamente (Figura 11b). La selectividad de los ADC se evaluó con la línea celular WSU-NHL CD30⁻, que resultó ser insensible a todos los ADC de cAC10 con valores de CI₅₀ de > 1.000 ng/ml (datos no mostrados).

Modelos de xenoinjerto de **ALCL** humana. El efecto de la carga de fármaco sobre la actividad antitumoral *in vivo* se evaluó con un modelo de xenoinjerto subcutáneo en Karpas-299. La terapia se administró cada cuatro días para un total de 4 inyecciones, comenzando cuando los volúmenes tumorales hubieron alcanzado los 50-100 mm³. Usando este programa, se encontró previamente que cAC10-E8 a 1 mg/kg produjo 100 % de CR, a la misma dosis, cAC10-E4 obtuvo el 100 % de CR (datos no mostrados). Con el objetivo de comparar la actividad de los ADC, se usaron dosis más bajas para cAC10-E4 y cAC10-E8. Las cohortes de ratones portadores de xenoinjertos subcutáneos de Karpas-299 se trataron con múltiples dosis de cAC10-E2 (0,5 mg/kg/dosis o 1 mg/kg/dosis), cAC10-E4 (0,25 o 0,5 mg/kg/dosis) o cAC10-E8 (0,25 o 0,5 mg/kg/dosis). La Tabla 5 muestra un resumen de los resultados de eficacia.

Tabla 5

Programa	ADC	Dosis (mg/kg)	Regresiones completas	Curaciones	ICT
Cada 4 días x 4	cAC10-E2	0,5	0/10	0/10	68 %
		1,0	10/10	10/10	97 %
	cAC10-E4	0,25	1/10	1/10	56 %
		0,50	5/10	3/10	91 %
	cAC10-E8	0,25	0/10	0/10	47 %
		0,50	6/10	6/10	90 %
	cAC10-E2	1,0	4/6	4/6	96 %
x 1	cAC10-E4	1,0	6/6	5/6 ^a	100 %
	cAC10-E8	1,0	5/6	5/6	100 %
x 1	cAC10-E4	1,0	9/10	7/10	99,2 %

Tabla 5: Actividad antitumoral de cAC10-E2, cAC10-E4, mezcla de cAC10-E4 y cAC10-E8 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de Karpas-299. Se trataron los animales con ADC una vez que volúmenes de los tumores hubieron alcanzado 50-100 mm³. Las dosis se administraron una vez (x 1) o cuatro veces cada cuatro días. Se presentan el número de regresiones completas, las curaciones y la inhibición del crecimiento del tumor (ICT). ^aun ratón con una curación fue encontrado muerto el día 72 y no hay indicios de masa tumoral.

Aunque cAC10-E8 tenía el doble de la cantidad de MMAE que cAC10-E4 a la misma dosis de mAb, fueron igualmente eficaces a ambos niveles de dosis (Figura 12A). A 0,5 mg/kg/dosis, de los diez animales tratados con cAC10-E4, cinco lograron regresiones completas (RC) y cAC10-E8 indujo seis de diez RC. Los tumores no tratados alcanzaron un volumen tumoral medio de 986 mm³ 19 días después del implante. La inhibición del crecimiento tumoral de cAC10-E4 fue del 91 % en comparación con el 90 % para cAC10-E8. A 0,25 mg/kg/dosis los dos ADC indujeron un retraso similar en el crecimiento del tumor en comparación con los animales de control sin tratar, pero no regresiones completas. cAC10-E2 a 1,0 mg/kg/dosis, una dosis que contenía la misma cantidad de MMAE que cAC10-E4 a 0,5 mg/kg/dosis y cAC10-E8 a 0,25 mg/kg, indujeron 10/10 curaciones. El efecto sobre el crecimiento tumoral con cAC10-E2 a 0,5 mg/kg/dosis fue comparable al observado con cAC10-E4 y cAC10-E8 a 0,25 mg/kg/dosis, generando una ICT del 68 %. Una mezcla física del fármaco MMAE con cAC10, equivalente a cAC10-E8 a la dosis de 0,5 mg/kg, produjo solo un ligero retraso en el crecimiento del tumor en comparación con la falta de tratamiento, destacando que la unión del fármaco al anticuerpo es fundamental para lograr actividad antitumoral.

A continuación se comparó el tratamiento con una sola dosis de cAC10-E2, cAC10-E4 y cAC10-E8 en este mismo modelo a 1,0 mg/kg (Figura 12B). Cinco de los seis animales tratados con cAC10-E8 se lograron curar. De los seis animales tratados con cAC10-E4, todos lograron regresiones completas con cinco curaciones a los 108 días, el final del estudio, un animal fue encontrado muerto el día 72 sin ningún signo de masa tumoral. A pesar de que cAC10-E2 a 1,0 mg/kg contenía la mitad como mucho de MMAE que cAC10-E4, cuatro de los seis ratones alcanzaron la RC. El grupo de control que consistía en 1 mg/kg de cAC10 más 0,037 mg/kg de MMAE libre, equivalente a la cantidad de

fármaco contenido en 1 mg/kg de cAC10-E8, tuvo poco efecto sobre el crecimiento tumoral en comparación con los ratones no tratados.

La conjugación inicial del ADC cargado parcialmente resultó en una mezcla de especies que contenían 0-8 fármacos/mAb. Para evaluar la actividad de esta mezcla (Mezcla de cAC10-E4), se comparó la actividad antitumoral alcanzada con una sola dosis de Mezcla de cAC10-E4 con cAC10-E4 purificado a 1,0 mg/kg. De manera similar al anterior experimento de una sola dosis, nueve de diez ratones tratados con cAC10-E4 lograron la RC. La regresión completa se generó en ocho de los diez ratones tratados con mezcla de cAC10-E4, con una relación molar media de 4,0. A pesar de que contenía una población de ADC con diferentes cargas de fármaco, la mezcla de cAC10-E4 parcialmente cargada demostró una actividad antitumoral equivalente al cAC10-E4 purificado.

Dosis máxima tolerada y ventana terapéutica. Se evaluó la tolerabilidad de una sola dosis de cAC10-E2, cAC10-E4 y cAC10-E8 en ratones Balb/c con tres por grupo. La dosis máxima tolerada (DMT) se definió como la dosis más alta que no indujo la pérdida de peso superior al 20 % o signos graves de angustia o toxicidades manifiestas en ninguno de los animales. Para cAC10-E8, los ratones fueron dosificados en intervalos de 10 mg/kg de 30-60 mg/kg. A una dosis de 50 mg/kg, los ratones tuvieron una pérdida máxima de peso del 14 % a los seis días de la inyección, tras lo que la pérdida de peso se recuperó. Una dosis de 60 mg/kg indujo una pérdida de peso del 23 % seis días después de la inyección en un animal. Con cAC10-E4 a 100 mg/kg, los ratones alcanzaron una pérdida de peso máxima del aproximadamente 10 %. A 120 mg/kg de cAC10-E4, un animal presentó signos de angustia significativa y el 17 % de pérdida de peso, y el animal fue sacrificado. Los ratones tratados con cAC10-E2 a dosis de hasta 250 mg/kg, la dosis más alta, experimentaron una pérdida máxima de peso del 10,5 % 6 días después de la inyección, sin signos de angustia. Basándose en las observaciones de los presentes inventores, DMT de cAC10-E2 fue de al menos de 250 mg/kg, cAC10-E4 fue de 100 mg/kg y cAC10-E8 fue de 50 mg/kg. El índice terapéutico se define como la proporción de la DMT de una sola dosis con respecto a la dosis eficaz de múltiples dosis, produciendo 100 para cAC10-E8, 200 para cAC10-E4 y al menos 250 para cAC10-E2.

Farmacocinética. Se administraron cAC10, cAC10-E2, cAC10-E4 y cAC10-E8 a ratones SCID para determinar cómo afecta la carga de fármaco a la farmacocinética. Tabla 6 ilustra los parámetros farmacocinéticos establecidos por el análisis no compartimental.

La Tabla 6 ilustra los parámetros farmacocinéticos establecidos mediante análisis no compartimental

Nombre	t1/2 (días)	AUC (µg-día/ml)	CL (ml/día/kg)	Vz (ml/kg)
cAC10	16,7	2.638	3,8	91
cAC10-E2	16,9	2.313	4,4	107
cAC10-E4	14,0	1.689	6,0	121
cAC10-E8	14,9	520	19,2	414

Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos de cAC10 y los ADC de cAC10 en ratones SCID a una dosis de 10 mg/kg. Se calcularon la semivida (t1/2), el área bajo la curva (AUC), el aclaramiento (CL), el volumen de distribución (Vz) y el área bajo la curva desde la inyección hasta el día 14 (AUC t(0-14d)) usando el análisis no compartimental.

Las curvas de tiempo-concentración del cAC10, cAC10-E2, cAC10-E4 y cAC10-E8 siguieron descensos biexponenciales. Las semividas terminales fueron 16,7, 16,9, 14,0 y 14,7 días, respectivamente y, por tanto, no fueron directamente proporcionales a la carga de fármaco. Sin embargo, la exposición de los ADC según lo determinado por la AUC aumentó a medida que la carga de fármaco disminuyó, variando de 2.638 µg-día/ml para cAC10 no modificado a 520 µg-día/ml para cAC10-E8. Por el contrario, los valores de aclaramiento aumentaron de 3,8 ml/día/kg para cAC10 a 4,4, 6,0 y 19,2 ml/día/kg para cAC10-E2, cAC10-E4 y cAC10-E8, respectivamente. Del mismo modo, el volumen de distribución resultó ser directamente proporcional a la carga de fármaco.

Ejemplo 9 de estudio adicional de la eficacia *in vivo*

Se realizaron experimentos de eficacia *in vivo* usando la línea de células Karpas 299 positivas de CD30, y se muestran en la Tabla 7. Se desarrollaron tumores subcutáneos de Karpas-299 en ratones CB-17 SCID, administrándose los artículos de ensayo cuando los tumores hubieron alcanzado aproximadamente 100 mm³ (longitud x anchura²). Se separaron los animales en grupos de 5-10 animales, y se inyectó a cada grupo por vía intravenosa ADC. Las dosis se prepararon en diluciones seriadas del doble (0,5, 1,0 y 2,0 mg/kg) y los tumores que se redujeron hasta un tamaño no medible se definieron como remisiones completas. La dosis que produjo ≥ 80 % de remisiones completas en varios experimentos (3-8, con 5-15 animales por dosis excepto E6P, que era un solo grupo de 4 animales) fue asignada como la dosis eficaz. Para todos los ADC ensayados, la dosis eficaz fue de 1 mg/kg, a pesar del hecho de que la cantidad de componente de fármaco inyectado cambió con la carga de fármaco. En la precisión del experimento (diluciones seriadas del doble), la distribución isomérica de los fármacos no influyó en la eficacia.

Para evaluar la tolerancia de los ADC, se administraron ADC a ratones BALB/c (cepa original de los CB17 SCID). Se midieron los pesos de los animales y se registraron observaciones clínicas durante un período de 14 días. La DMT

5 fue asignada como la dosis individual más alta administrada a un ratón BALB/c que no generó una pérdida de peso $\geq 20\%$ ni mostró signos de angustia. Para E8, las dosis fueron de 40, 50 y 60 mg/kg, para E4, las dosis fueron de 80, 100 y 120 mg/kg, y para E2, las dosis fueron de 200 y 250 mg/kg. Como se ha observado previamente (véase el Ejemplo 8), el nivel de carga de fármaco absoluto sí influyó en la DMT, teniendo los niveles de carga de fármaco superiores valores más bajos de DMT. Para E4 puro preparado mediante la reoxidación parcial con DTNB, la DMT fue ligeramente superior a la del E4 puro preparado mediante la reducción parcial con DTT (120 frente a 100 mg/kg).

Tabla 7. Eficacia *in vivo* en ratones sobre células Karpas 299 CD30+ y DMT para cAC10-vcMMAE.

ADC	Dosis eficaz (mg/kg) ^a	DMT (mg/kg) ^a
E2P con DTT	1	>250
E4P con DTT	1	100
E4P con DTNB	1	120
E6P con DTT	1	80
E8	1	50

^aLas dosis *in vivo* se basaron en mg de componente de anticuerpo por kg de peso corporal.

10 La información anterior es descriptiva, ilustrativa y de ejemplo, y no se debe considerar una limitación del alcance definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de conjugación de un fármaco a un anticuerpo que da lugar a selectividad en la colocación del fármaco, que comprende:

reducir totalmente el anticuerpo con un agente reductor;

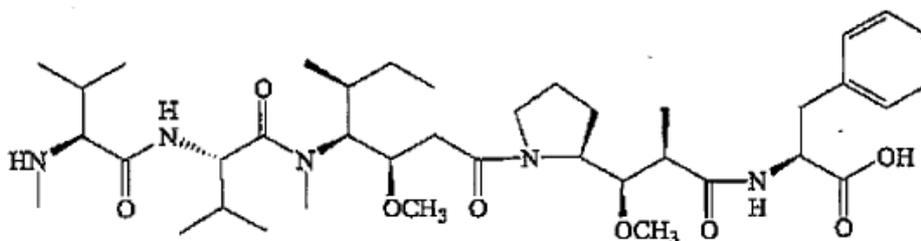
tratar el anticuerpo totalmente reducido con cantidades limitantes de un agente reoxidante para volver a formar al menos un enlace disulfuro intercatenario del anticuerpo, de modo que queden al menos dos tioles intercatenarios; y

conjugarse el fármaco a los tioles intercatenarios.

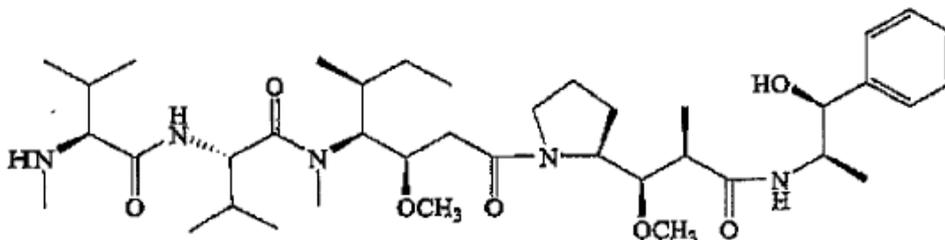
2. El método de la reivindicación 1, en el que el agente reoxidante es ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico, 4,4'-ditiodipiridina, 2,2'-ditiodipiridina, tetrationato de sodio o ácido yodosobenzoico.

3. El método de la reivindicación 2, en el que el fármaco es un agente citostático o citotóxico, o un agente inmunosupresor.

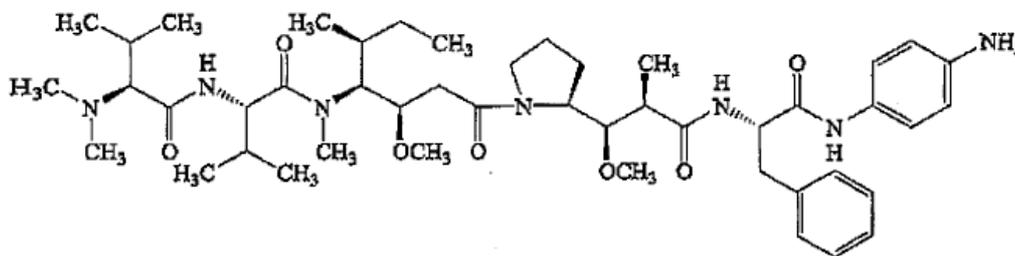
4. El método de la reivindicación 3, en el que el agente citostático o citotóxico es un enlazador del surco menor, un éster producido por la reacción de auristatina E con ácido paraacetilbenzoico (AEB), un éster producido mediante la reacción de auristatina E con ácido benzoilvalérico (AEVB),



(MMAF),



(MMAE) o



(AFP).

5. El método de la reivindicación 1, en el que el agente reductor es DTT o TCEP.

6. El método de la reivindicación 1, que comprende además purificar el anticuerpo parcialmente reoxidado.

7. Un método de producción de un anticuerpo con conjugación selectiva de fármaco, que comprende:

reducir totalmente el anticuerpo durante un período de tiempo suficiente para producir tioles intercatenarios, según lo determinado por titulación con DTNB, mediante la adición de un gran exceso de un agente reductor y la incubación de la solución a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 30 minutos;

purificar el anticuerpo;

volver a oxidar parcialmente el anticuerpo usando un agente oxidante para formar al menos un enlace disulfuro

- intercatenario mediante el enfriamiento del anticuerpo reducido hasta 0 °C;
tratar el anticuerpo reducido y enfriado con de 1,5 a 2,5 equivalentes molares del agente oxidante;
mezclar la solución por inversión;
dejar que la solución se incube a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 10 minutos;
5 purificar el anticuerpo parcialmente reoxidado;
conjuguar el fármaco a los tioles intercatenarios del anticuerpo parcialmente reoxidado para formar un anticuerpo conjugado; y
purificar el anticuerpo conjugado.
- 10 8. El método de la reivindicación 1, en el que el fármaco es MMAE y está conjugado al anticuerpo parcialmente reoxidado a través de un enlazador de maleimidocaproil-valina-citrulina.
9. Un método de preparación de una mezcla de conjugados de anticuerpo y fármaco, que comprende:
- 15 reducir totalmente anticuerpos con un agente reductor para formar anticuerpos totalmente reducidos;
volver a oxidar parcialmente los anticuerpos totalmente reducidos con un agente reoxidante para volver a formar al menos un enlace disulfuro intercatenario de los anticuerpos, formando así anticuerpos parcialmente reoxidados; y
20 conjuguar un fármaco a un tiol intercatenario de los anticuerpos parcialmente reoxidados para formar conjugados de anticuerpo y fármaco.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el fármaco es un agente citotóxico o citostático.
- 25 11. El método de la reivindicación 10, en el que el agente citotóxico o citostático es un enlazador del surco menor, AEB, AEVB, MMAF, MMAE o AFP.
12. El método de la reivindicación 9, en el que al menos dos fármacos están conjugados al anticuerpo conjugado y cada fármaco está conjugado a un tiol intercatenario.
- 30 13. El método de la reivindicación 9, en el que el número medio de fármacos por anticuerpo de la mezcla de conjugados de anticuerpo y fármaco es de dos.
14. El método de la reivindicación 9, en el que el número medio de fármacos por anticuerpo de la mezcla de conjugados de anticuerpo y fármaco es de cuatro.
- 35 15. El método de la reivindicación 9, en el que el fármaco es MMAE y está conjugado al anticuerpo parcialmente reoxidado a través de un enlazador de maleimidocaproil-valina-citrulina

Figura 1

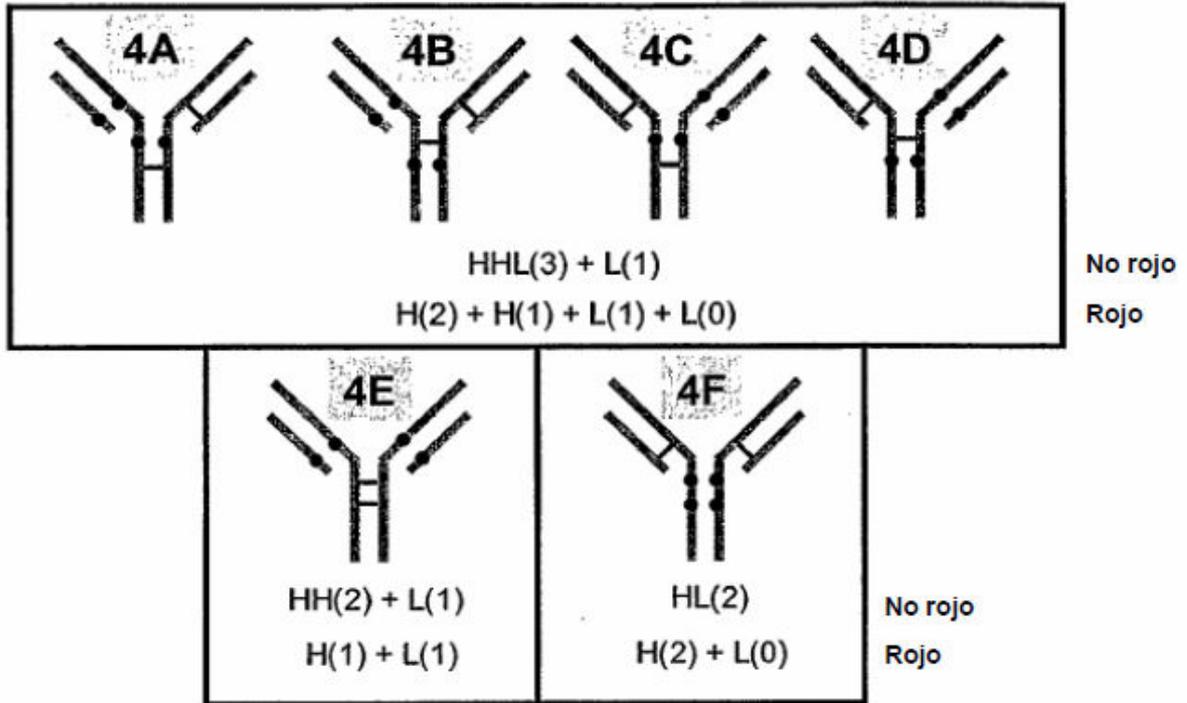


Figura 2

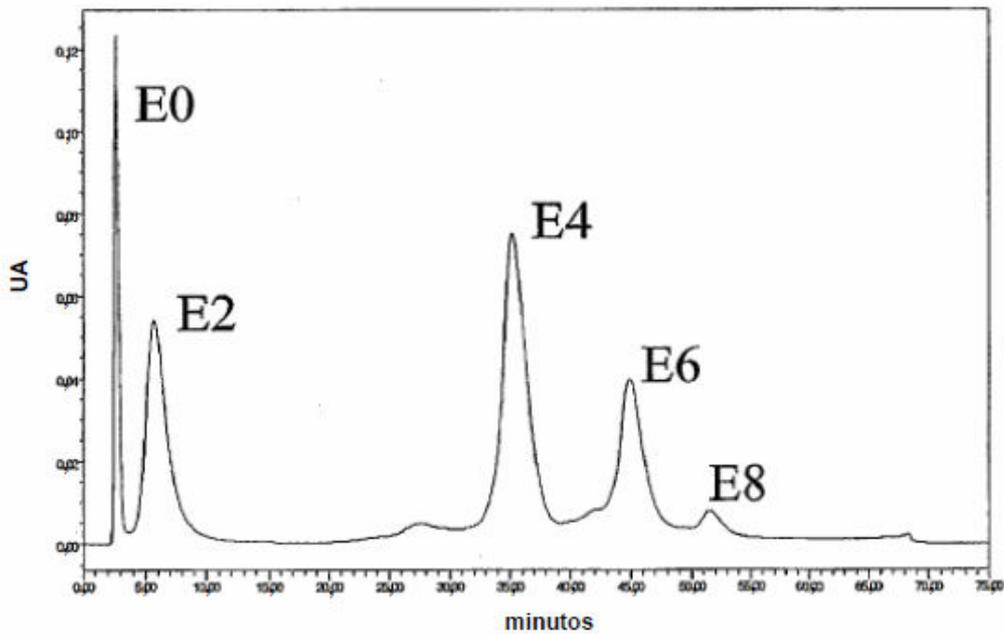


Figura 3

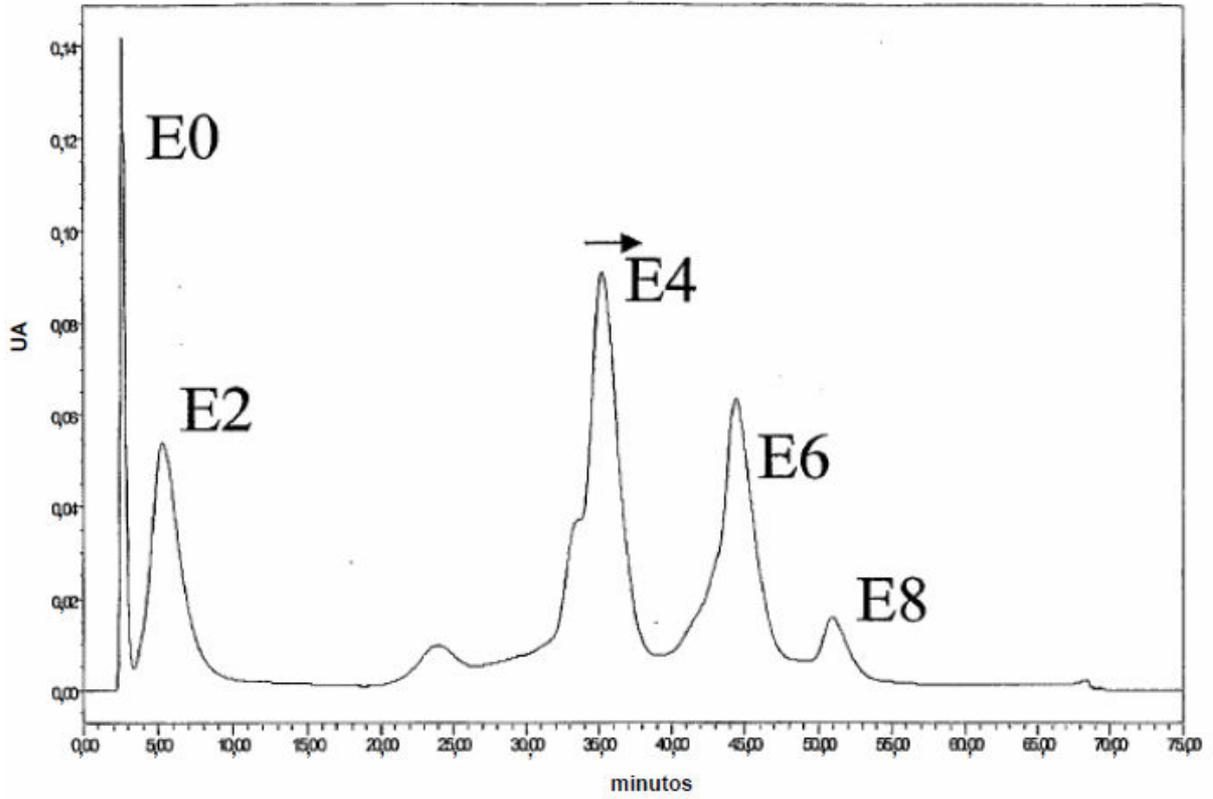


Figura 4

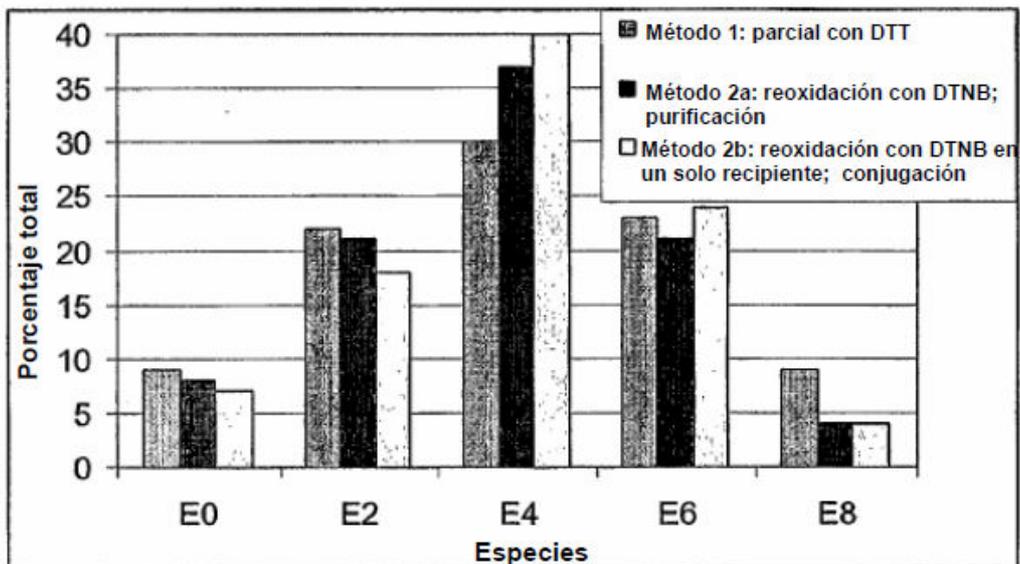
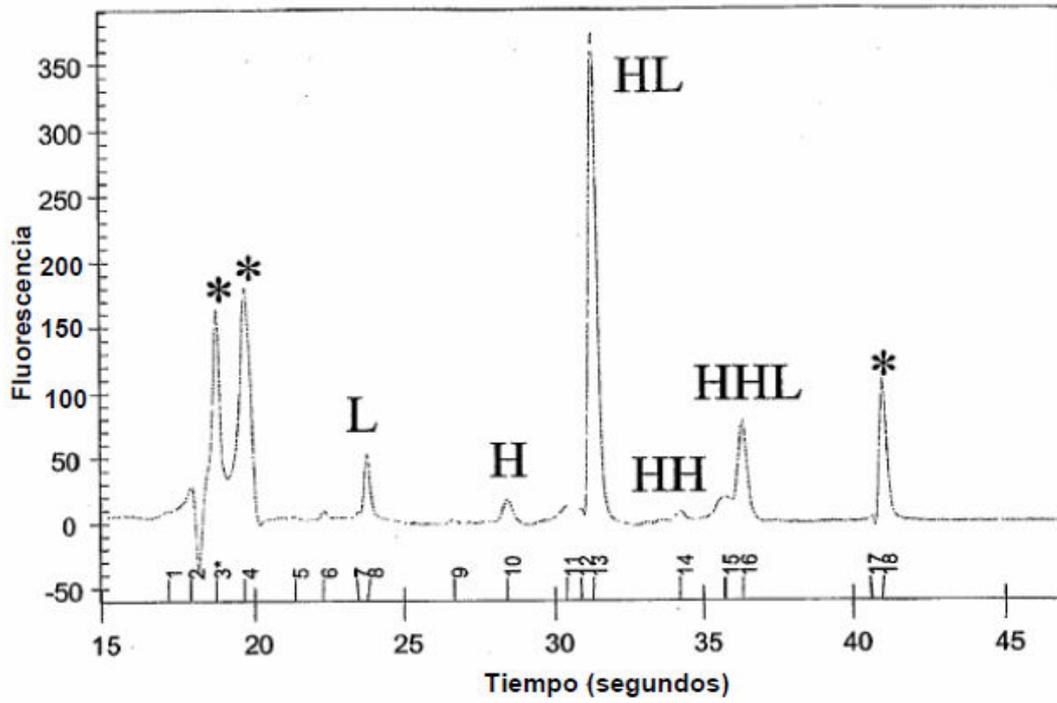


Figura 5



*Picos de control interno.

Figura 6

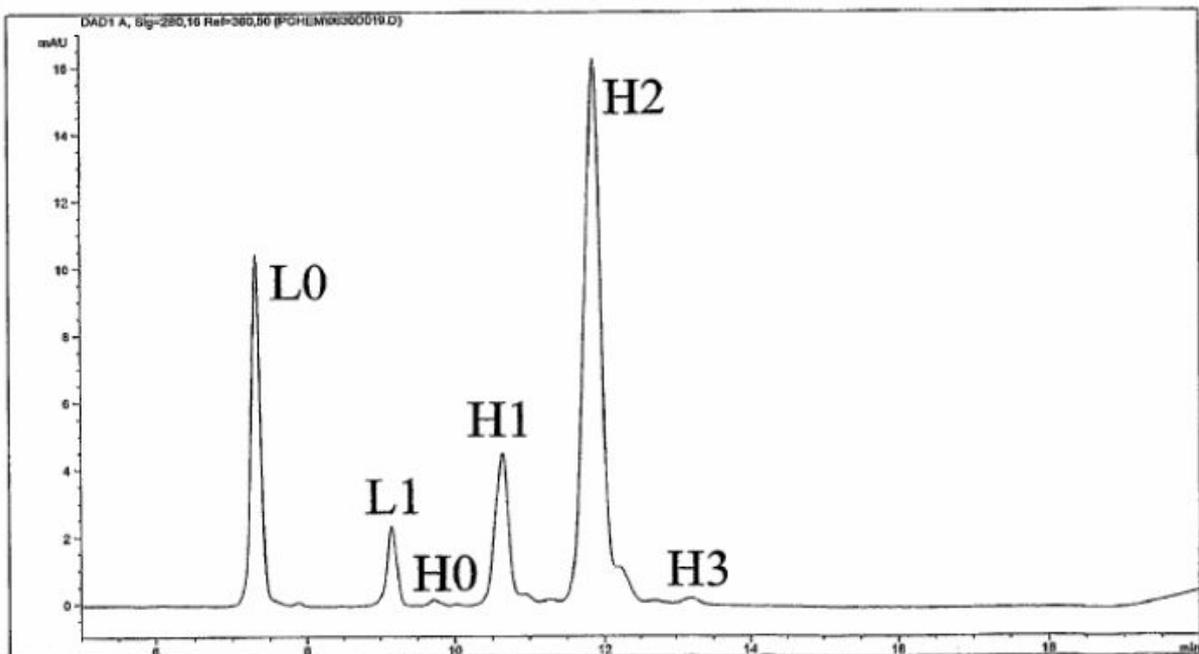


Figura 7

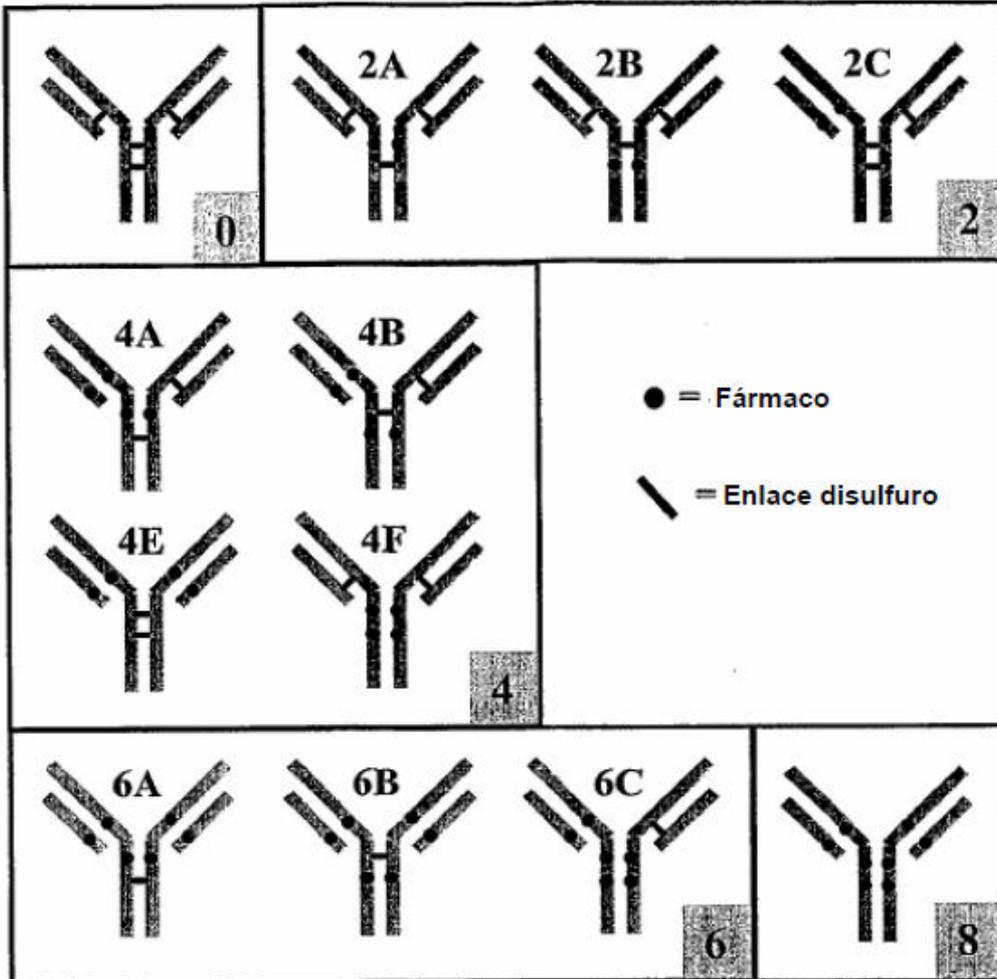


Figura 8

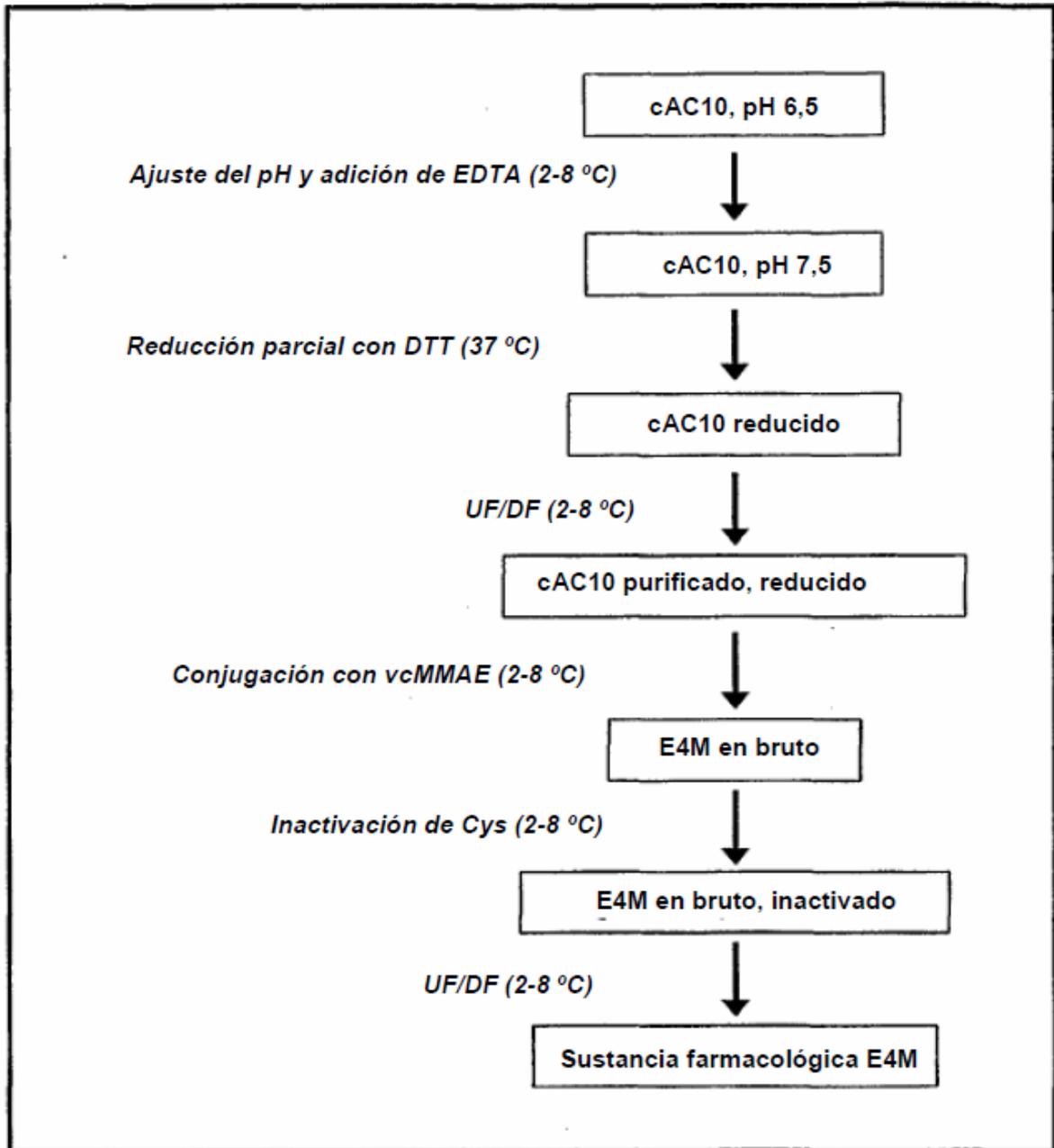


Figura 9

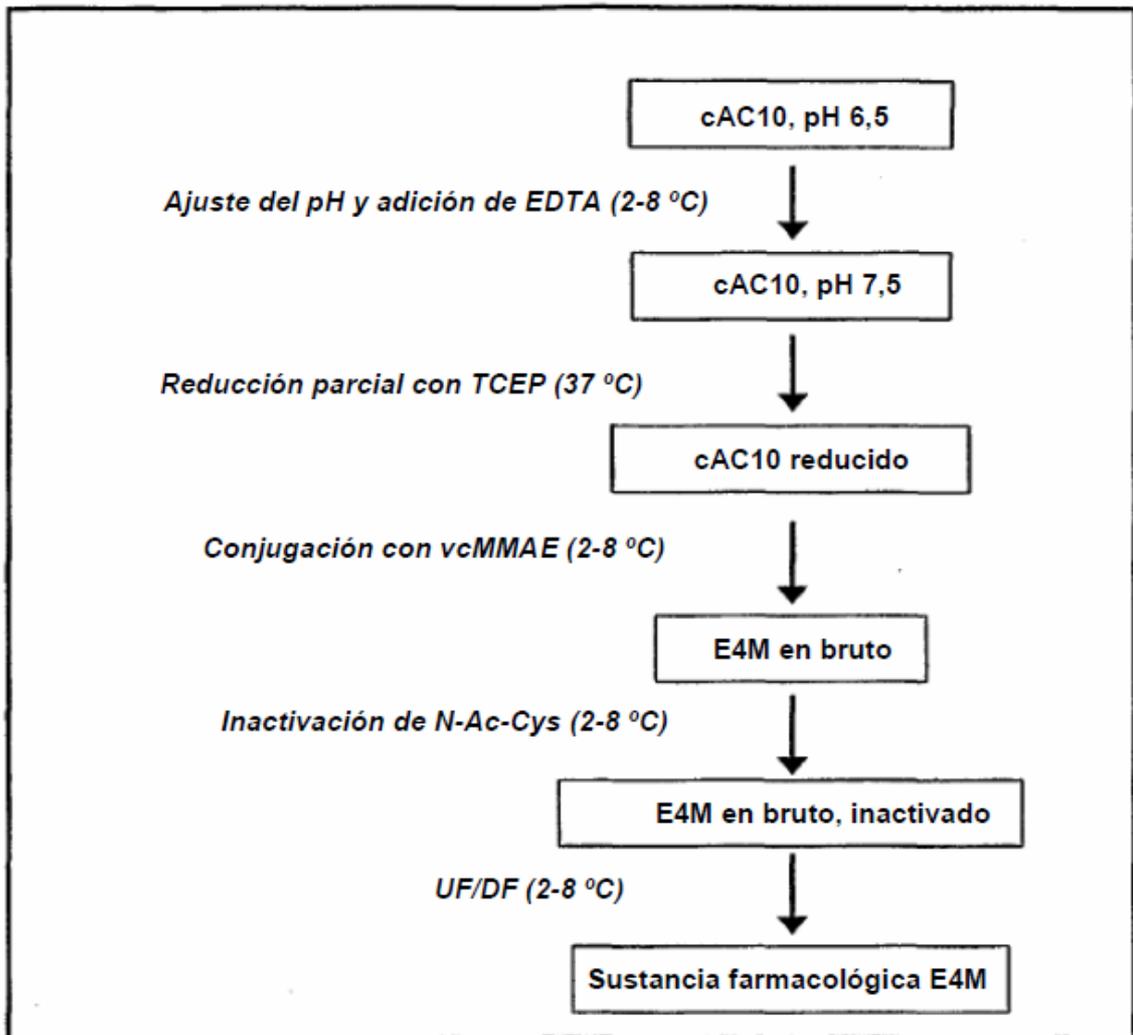


Figura 10

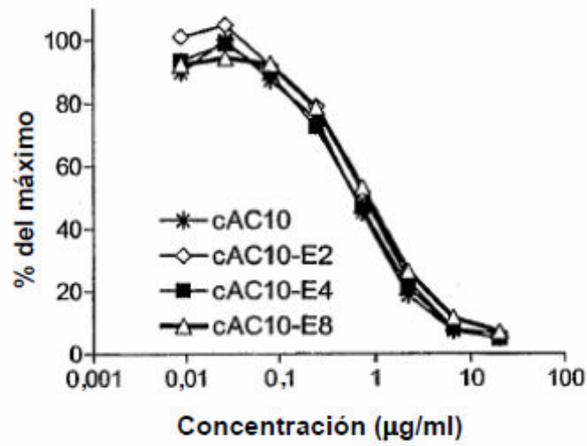


Figura 11A

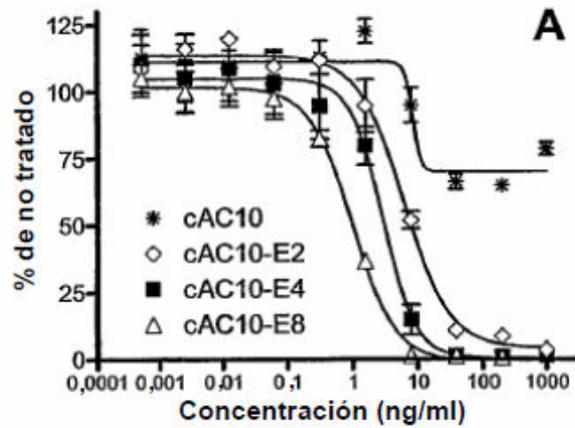


Figura 11B

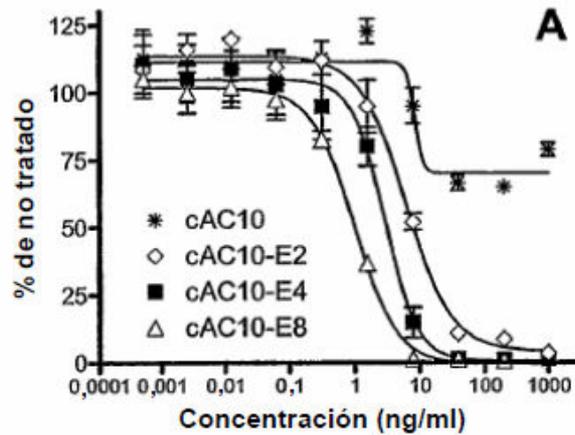


Figura 12A

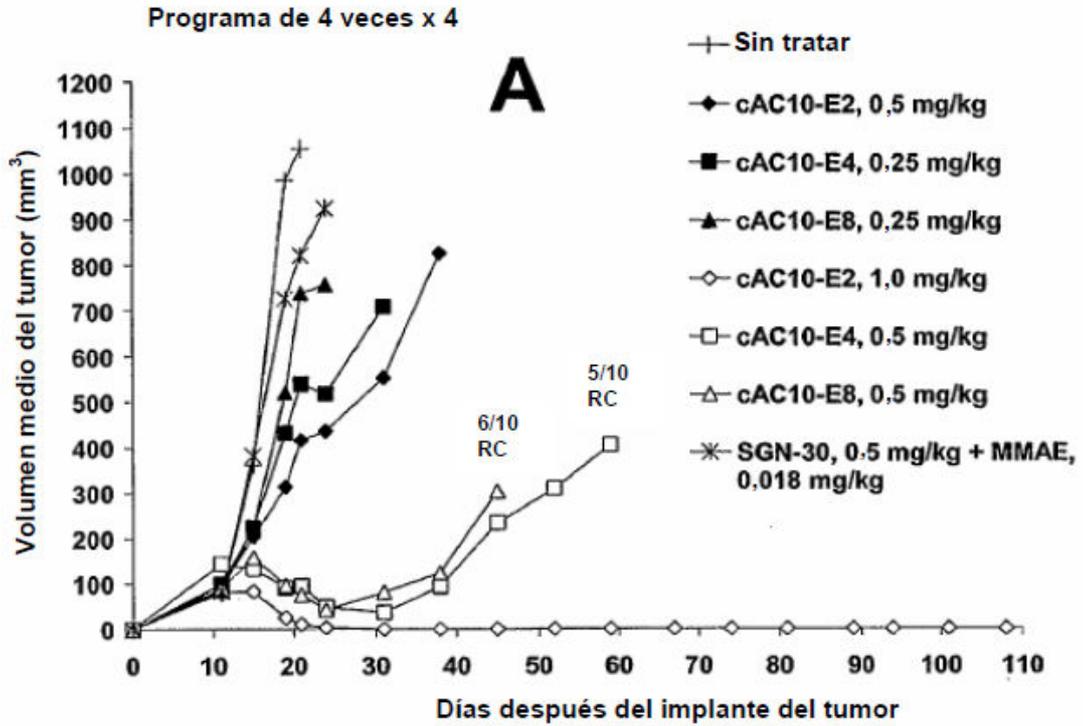


Figura 12B

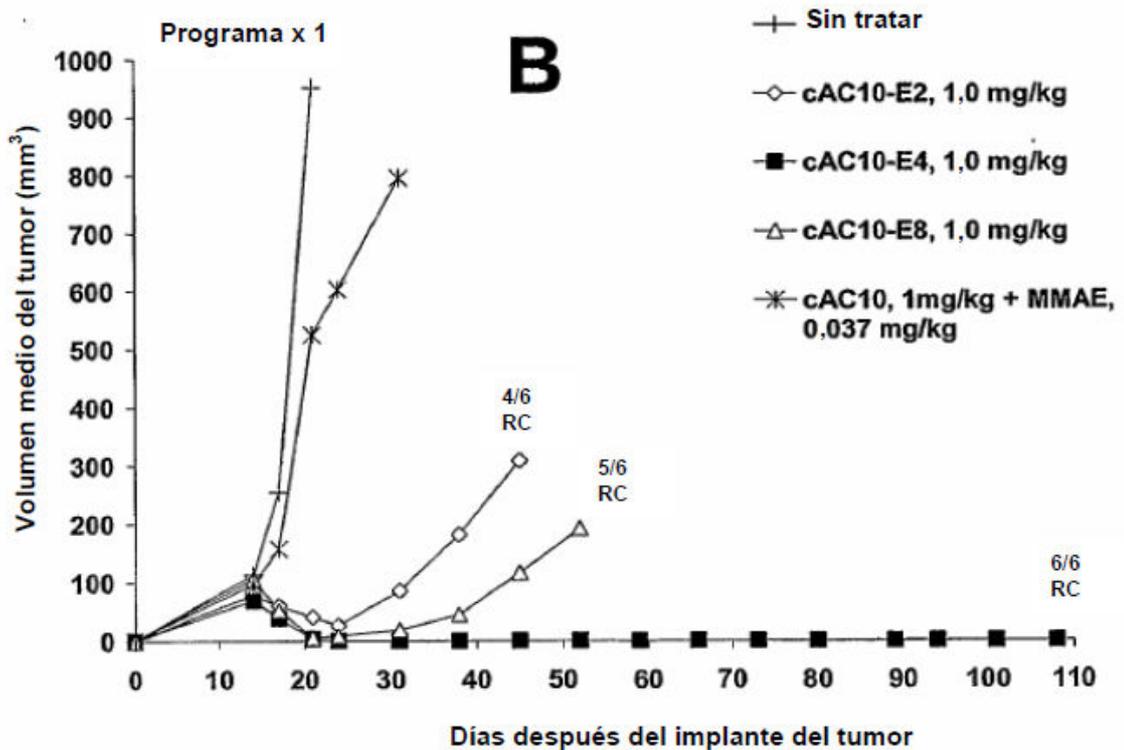


Figura 13

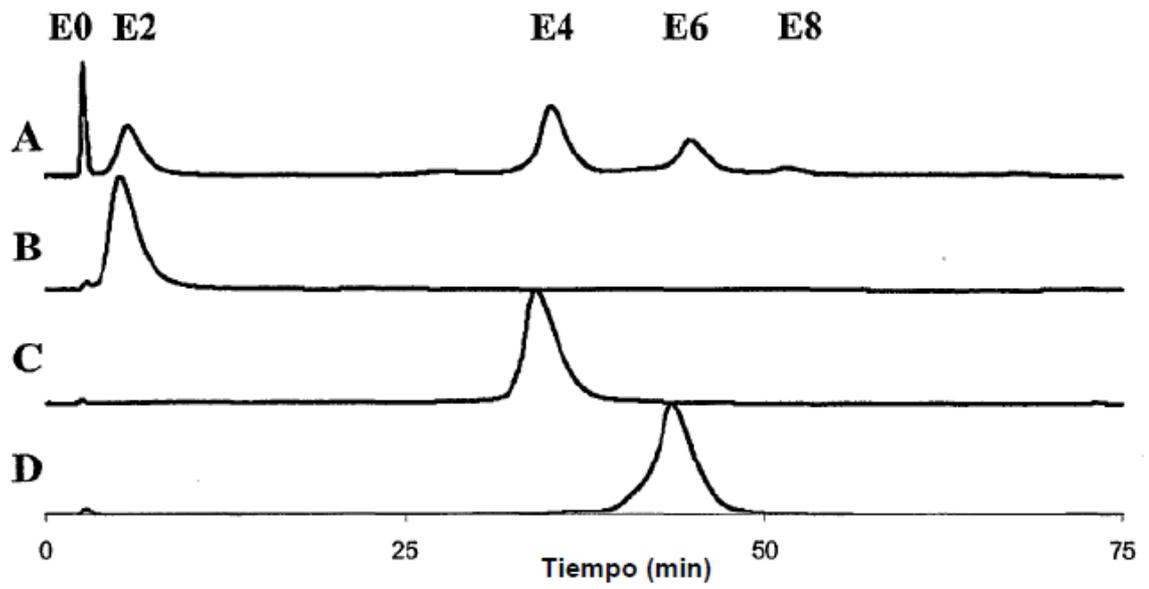


Figura 14

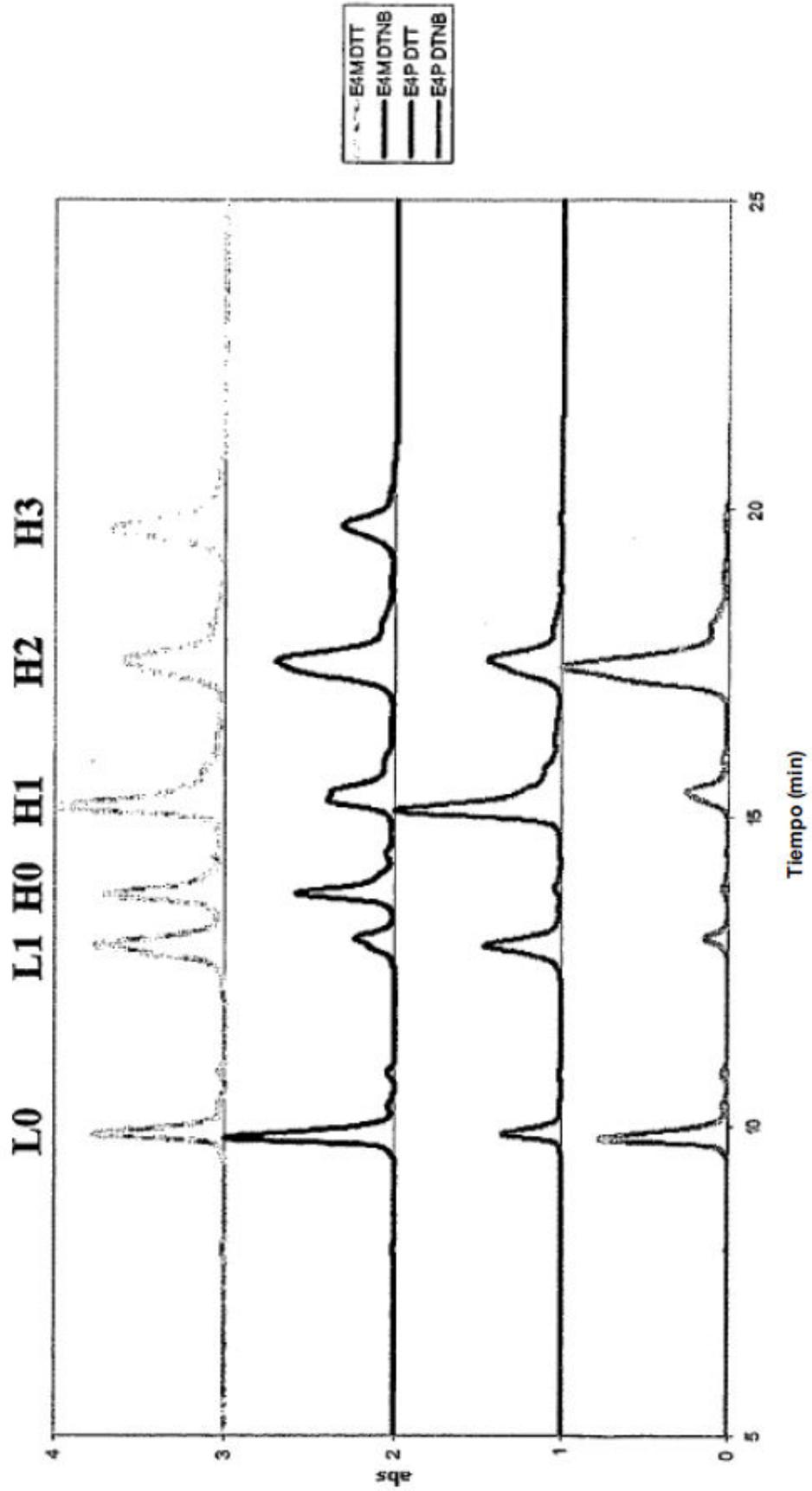


Figura 15

