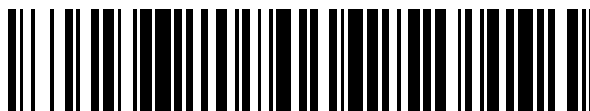


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 314**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2011** **E 11751155 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2542576**

54 Título: **Métodos de cribado de anticuerpos**

30 Prioridad:

02.03.2010 US 309725 P
13.04.2010 US 323433 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.09.2016

73 Titular/es:

SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)
21823 30th Drive, S.E.
Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

LYON, ROBERT;
BENJAMIN, DENNIS y
RYAN, MAUREEN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 581 314 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

Métodos de cribado de anticuerpos

5 Antecedentes de la invención

La actividad de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, acrónimo de *antibody-drug conjugates*) sobre células cancerosas puede estar afectada por una multitud de factores, tales como la afinidad de unión, tasa de internalización, tráfico subcelular, y eficaz liberación de fármaco dentro de la población de células diana. Por consiguiente, las propiedades de un anticuerpo ideal para la administración de fármaco no son necesariamente las mismas que aquellas para un anticuerpo no conjugado terapéutico. Además, ensayos indirectos que implican el uso de anticuerpos secundarios para el cribado de ADC óptimos pueden ser confusos, ya que la reticulación sobre la superficie celular puede conducir a eventos aguas abajo alterados, y la afinidad del anticuerpo secundario limita el intervalo dinámico del ensayo. Cuando se buscan anticuerpos candidatos dirigidos contra un antígeno novedoso para terapia de ADC, lo más deseable es, por tanto, cribar un gran panel de anticuerpos en forma de ADC y evaluar sus actividades citotóxicas, ya que estos resultados proporcionan una medición directa de parámetros que pueden afectar la actividad citotóxica. Sin embargo, cuando se trata con cantidades de microgramo de un gran número de anticuerpos como es típico de una campaña de descubrimiento de anticuerpos, los rendimientos de las metodologías de conjugación convencionales son limitantes. Existe la necesidad de métodos mejorados de cribado de anticuerpos para su uso como ADC. Esta presente invención trata esta y otras necesidades.

Los documentos US2005/0276812 A1, US2010/0021474 A1, US2009/0280056 A1, US2009/0047296 A1, US2009/0136526 A1, US2007/0160617 A1, US2009/0226465 A1 y US2010/0034837 A1 se refieren a anticuerpos e inmunoconjugados y a su uso en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

Carter et al, "Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy", The Cancer Journal, 2008. 14(3), 154-169 se refiere al concepto general de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) y revisiones de ADC en ensayos clínicos para terapia del cáncer.

Tallian et al, "A Rapid Procedure for Preparing Fluorescein-labeled Specific Antibodies from Whole Antiserum: Its Use in Analyzing Cytoskeletal Architecture" se refiere a un método para la conjugación directa de anticuerpos purificados con fluoresceína, que implica la inmovilización de anticuerpos como complejos de antígeno-anticuerpo sobre transferencias de nitrocelulosa.

35 Sumario de la invención

La invención proporciona métodos de preparación de conjugados de anticuerpo para su uso en ensayos de cribado de anticuerpos y conjugados de anticuerpo producidos por los métodos reivindicados.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden las etapas de proporcionar una primera y segunda muestra que contiene anticuerpo en el que la primera y segunda muestra que contiene anticuerpo varían con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo a condición de que sustancialmente todo el anticuerpo presente en la primera muestra sea de la misma secuencia y sustancialmente todo el anticuerpo presente en la segunda muestra sea de la misma secuencia; inmovilizar los anticuerpos sobre un soporte sólido para proporcionar una primera y segunda muestra que comprende anticuerpos inmovilizados; reducir completamente los enlaces disulfuro reducibles de los anticuerpos inmovilizados para proporcionar una primera muestra que comprende anticuerpos inmovilizados reducidos y segunda muestra que comprende anticuerpos inmovilizados reducidos, en el que la reducción es selectiva para los enlaces disulfuro reducibles; hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con agente de terminación, fármaco o conector de fármaco, y opcionalmente un agente de detección, para proporcionar conjugados de anticuerpo inmovilizado, en el que el agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional reaccionan selectivamente con tioles reactivos, el agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional se proporcionan en exceso molar, y la relación de agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de fármaco; y eluir los conjugados de anticuerpo para proporcionar una primera muestra de conjugados de anticuerpo libre y segunda muestra de conjugados de anticuerpo libre.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden las etapas de proporcionar una pluralidad de muestras de sobrenadante de hibridoma no purificado que comprende anticuerpo no cuantificado producido a partir de una pluralidad de clones de hibridoma, en el que la pluralidad de muestras varían con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo, a condición de que, en una mayoría de la pluralidad de las muestras, sustancialmente todo el anticuerpo presente en cada muestra sea de un único clon de hibridoma; inmovilizar los anticuerpos no cuantificados sobre un soporte sólido para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados; reducir completamente los disulfuros intercatenarios de los anticuerpos inmovilizados para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados reducidos; hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y un agente de detección para proporcionar conjugados de anticuerpo inmovilizado, en el que el agente de terminación,

fármaco o conector de fármaco y el agente de detección reaccionan selectivamente con tioles reactivos, el agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional se proporcionan en exceso molar, y la relación de agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de fármaco; y eluir los conjugados de anticuerpo de los soportes sólidos para proporcionar una pluralidad de composiciones de conjugado de anticuerpo.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden las etapas de proporcionar una pluralidad de muestras que contienen anticuerpo que varían con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo a condición de que, en una mayoría de la pluralidad de las muestras que contienen anticuerpo, sustancialmente todo el anticuerpo presente en una única muestra sea de la misma secuencia; inmovilizar los anticuerpos sobre un soporte sólido para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados; reducir completamente los enlaces disulfuro reducibles de los anticuerpos inmovilizados para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados reducidos, en el que la reducción es selectiva para enlaces disulfuro reducibles; hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con agente de terminación, fármaco o conector de fármaco, y opcionalmente un agente de detección, para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden conjugados de anticuerpo inmovilizado, en el que el agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional reaccionan selectivamente con tioles reactivos, el agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional se proporcionan en exceso molar, y la relación de agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de fármaco; y eluir los conjugados de anticuerpo para proporcionar una pluralidad de composiciones de conjugado de anticuerpo que comprenden conjugados de anticuerpo libre.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden las etapas de proporcionar una pluralidad de muestras que contienen anticuerpo que varían con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo a condición de que, en una mayoría de la pluralidad de las muestras que contienen anticuerpo, sustancialmente todo el anticuerpo presente en una única muestra sea de la misma secuencia; inmovilizar los anticuerpos sobre un soporte sólido para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados; reducir completamente los enlaces disulfuro reducibles de los anticuerpos inmovilizados para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados reducidos, en el que la reducción es selectiva para enlaces disulfuro reducibles; hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con agente de terminación y un agente de detección para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden conjugados de anticuerpo inmovilizado, en el que el agente de terminación y de detección reaccionan selectivamente con tioles reactivos, el agente de terminación y el agente de detección se proporcionan en exceso molar, y la relación de agente de terminación y agente de detección está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de agente de detección y/o de agente de terminación; y eluir los conjugados de anticuerpo para proporcionar una pluralidad de composiciones de conjugado de anticuerpo que comprenden conjugados de anticuerpo libre.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden las etapas de proporcionar una pluralidad de muestras que contienen anticuerpo que varían con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo, a condición de que, en una mayoría de la pluralidad de las muestras que contienen anticuerpo, sustancialmente todo el anticuerpo presente en una única muestra sea de la misma secuencia; inmovilizar los anticuerpos sobre un soporte sólido para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados; reducir completamente los enlaces disulfuro reducibles de los anticuerpos inmovilizados para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados reducidos, en el que la reducción es selectiva para enlaces disulfuro reducibles; hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con agente de terminación, fármaco o conector de fármaco, y opcionalmente un agente de detección para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden conjugados de anticuerpo inmovilizado, en el que el agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional reaccionan selectivamente con tioles reactivos, el agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional se proporcionan en exceso molar, y la relación de agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de fármaco; eluir los conjugados de anticuerpo para proporcionar una pluralidad de composiciones de conjugado de anticuerpo que comprenden conjugados de anticuerpo libre; ensayar para una actividad de los conjugados de anticuerpo; y seleccionar un anticuerpo de la base del resultado del ensayo.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden las etapas de proporcionar una pluralidad de muestras que contienen anticuerpo que varían con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo, a condición de que, en una mayoría de la pluralidad de las muestras que contienen anticuerpo, sustancialmente todo el anticuerpo presente en una única muestra sea de la misma secuencia; inmovilizar los anticuerpos sobre un soporte sólido para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados; reducir completamente los enlaces disulfuro reducibles de los anticuerpos inmovilizados para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados reducidos, en el que la reducción es selectiva para enlaces disulfuro reducibles; hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con agente de terminación y un agente de detección para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden conjugados de anticuerpo inmovilizado, en el que el agente de terminación y de detección reaccionan selectivamente con tioles reactivos, el agente de terminación y el agente de detección se proporcionan en exceso molar, y la relación de agente de terminación y agente de detección está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de agente de detección

y/o de agente de terminación; eluir los conjugados de anticuerpo para proporcionar una pluralidad de composiciones de conjugado de anticuerpo que comprenden conjugados de anticuerpo libre; ensayar para una actividad de los conjugados de anticuerpo; y seleccionar un anticuerpo de la base del resultado del ensayo.

- 5 Estos y otros aspectos de la presente invención pueden entenderse más completamente por referencia a la siguiente descripción detallada, ejemplos no limitantes de realizaciones específicas y las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

- 10 **Figura 1.** Esta figura proporciona una transparencia de cromatogramas de interacción hidrófoba de una IgG1 murina en su forma no conjugada (discontinua), completamente reducida y conjugada con mcMMAF en solución (línea continua gruesa) y completamente reducida y conjugada con mcMMAF mientras que está inmovilizada sobre proteína G-Sepharose (línea continua fina).
- 15 **Figura 2.** Esta figura ilustra la fracción molar de mcMMAF en una mezcla de reacción a modo de ejemplo que comprende mcMMAF y N-etilmaleimida necesaria con el fin de lograr una carga de fármaco seleccionada sobre una IgG1 murina inmovilizada sobre proteína G y completamente reducida con tris(2-carboxietil)fosfina en exceso.
- 20 **Figura 3.** La figura proporciona un cromatograma de PLRP de muestra de un conjugado de anticuerpo-fármaco que ilustra la distribución de mcMMAF y NEM sobre las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo. La hidrofobia del fármaco produce tiempos de retención más tarde para especies con más fármaco; se indica el número de fármacos para cada especie.
- 25 **Figura 4.** Esta figura demuestra la salida de fluorescencia de conjugados de fármaco-Alexa Fluor® 647 en función de la carga de fluoróforo. El número de fluoróforos por anticuerpo se representa en el eje x y la fluorescencia se representa en el eje y. La fluorescencia aumenta rápidamente a un valor máximo cuando la carga es aproximadamente 2,5 a 3 fluoróforos por anticuerpo, luego disminuye con carga adicional.
- 30 **Figura 5.** Esta figura proporciona la relación de la absorbancia a 650 nm con respecto 280 nm, la relación representada en función del nivel de carga de Alexa Fluor® 647 en conjugados mixtos de fluoróforo - anticuerpo mcMMAF.
- 35 **Figura 6.** Esta figura demuestra la consistencia de la carga de Alexa Fluor® 647 a través de 65 muestras. La carga de fluoróforo se determinó obteniendo la relación de absorbancia 650 nm / 280 nm de cada muestra de conjugado de anticuerpo y refiriéndose de nuevo a la Figura 5 para determinar la carga de fluoróforo asociada a la relación de absorbancia.
- 40 **Figura 7.** Esta figura proporciona un cromatograma de PLRP de un conjugado mixto de mcMMAF - AF647 - NEM. El anticuerpo tiene 5 disulfuros reducibles. Esta figura proporciona una transparencia de dos longitudes de onda analíticas. La longitud de onda a 280 nm representada por una línea continua fina detecta todos los picos que contienen proteína y la longitud de onda de 620 nm representada por una línea continua gruesa detecta todos los picos que contienen al menos un Alexa Fluor® 647.
- 45 **Figura 8.** Esta figura ilustra la consistencia de carga de mcMMAF a través de 34 muestras.
- Figura 9.** Esta figura proporciona un cromatograma de PLRP de un conjugado mixto de mcMMAF - AF647 - NEM. El anticuerpo tiene 6 enlaces disulfuro reducibles (por ejemplo, una IgG2b murina). La longitud de onda de 280 nm se representa por una línea continua fina y la longitud de onda de 620 nm se representa por una línea continua gruesa.
- 50 **Figura 10.** Esta figura proporciona un esquema a modo de ejemplo para la síntesis en fase sólida basada en placa de ADC.
- 55 **Figura 11.** Esta figura proporciona un esquema a modo de ejemplo para la aplicación de tecnología de conjugación en fase sólida al descubrimiento de ADC con propiedades deseables.

Descripción detallada de la invención

60 Definiciones

- El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a (a) polipéptidos de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de polipéptidos de inmunoglobulina, es decir, polipéptidos de la familia de la inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos o (b) derivados conservativamente sustituidos de tales polipéptidos de inmunoglobulina o fragmentos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno diana. Los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) para su uso en la presente invención contienen (i) un sitio de unión al
- 65

antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno diana, (ii) al menos un enlace disulfuro reducible (por ejemplo, enlace disulfuro intercatenario) y (iii) un dominio capaz de unirse reversiblemente a una fase sólida. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprenderá una región Fc de longitud completa y la unión a la fase sólida será mediante la región Fc. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprenderá uno o más dominios Fc de un anticuerpo y la unión a la fase sólida será mediante el uno o más dominios Fc. En algunas realizaciones, el dominio capaz de unirse reversiblemente a una fase sólida no será una región Fc, pero será un dominio manipulado en el anticuerpo, tal como, por ejemplo, una marca de afinidad. El término anticuerpo incluye anticuerpos que están no fucosilados o tienen fucosilación del núcleo reducida. Los anticuerpos se describen generalmente en, por ejemplo, Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). La unidad básica de una estructura de anticuerpo intacto es un complejo de cuatro polipéptidos, dos cadenas de bajo peso molecular idénticas ("ligeras") y dos cadenas de alto peso molecular idénticas ("pesadas"), asociadas juntas por tanto asociaciones no covalentes como por enlaces disulfuro. La clase y subclase de un anticuerpo es su isotipo. Los anticuerpos pueden estar, por ejemplo, en su forma tetrámera natural (2 cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas) y pueden ser de cualquiera de los isotipos conocidos IgG, IgA, IgM, IgD e IgE y sus subtipos, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanas e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 de ratón. Los anticuerpos son preferentemente monoclonales.

En el contexto de un anticuerpo, el término "enlace disulfuro reducible" se refiere a un enlace disulfuro que es (i) reducible mientras que el anticuerpo está reversiblemente unido a un soporte sólido, y (ii) reducible bajo condiciones reductoras suaves. Condiciones reductoras suaves son aquellas condiciones que generalmente no producen ninguna desnaturalización sustancial del anticuerpo y generalmente no afectan la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo. Un ejemplo de condiciones reductoras suaves es reducción bajo condiciones acuosas a pH casi neutro con un agente reductor débil. Un ejemplo de agentes reductores débiles son TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) y DTT (ditiotreitól). Por consiguiente, un ejemplo de condiciones reductoras suaves es reducción en un exceso de TCEP o DTT a una temperatura de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 37 °C y a pH de aproximadamente 5 a 8. Debido a que los codisolventes orgánicos pueden desnaturalizar sustancialmente las proteínas, si van a usarse codisolventes orgánicos en la desnaturalización y/o etapas de conjugación posteriores, debe ser una cantidad mínima de codisolventes (por ejemplo, inferior al 20 %, preferentemente inferior al 15 %, 10 %, o incluso del 5 %) de forma que no se produzca desnaturalización sustancial del anticuerpo. Normalmente, los enlaces disulfuro reducibles son aquellos que están accesibles por el disolvente, es decir, no están enterrados dentro de los dominios plegados del anticuerpo. (El experto entenderá que cuando se reducen los enlaces disulfuro reducibles de una población de anticuerpos dentro de una muestra según los métodos descritos en el presente documento, puede haber una cantidad menor de anticuerpos que llegan a desnaturalizarse irreversiblemente (por ejemplo, generalmente menos del 10 %, incluso menos del 5 % o del 3 %)). Normalmente, en un anticuerpo, un enlace disulfuro está presente como resultado de la oxidación de los grupos laterales tiol (–SH) de dos residuos de cisteína. Estos residuos pueden encontrarse sobre diferentes cadenas de polipéptidos (intercatenarios), o sobre la misma cadena de polipéptidos (intracatenarios). Como resultado de la oxidación, se forma un enlace disulfuro (–S–S–) entre los carbonos beta de los residuos de cisteína originales. El tratamiento del enlace disulfuro con un agente reductor produce la escisión reductora de los enlaces disulfuro para generar dos grupos tiol libres, es decir, tioles reactivos. En algunas realizaciones, el enlace disulfuro reducible existe de forma natural. En algunos aspectos, el término "enlace disulfuro reducible" se refiere a los enlaces disulfuro intercatenarios de origen natural de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un grupo(s) sulfhidrilo se introduce(n) químicamente en el anticuerpo. Métodos adecuados para introducir grupos sulfhidrilo incluyen tecnología de ADN recombinante. Los grupos sulfhidrilo pueden introducirse en un anticuerpo, por ejemplo, dentro del anticuerpo o en el extremo carboxi. Debido a que es preferible que los métodos descritos en el presente documento no interfieran con la actividad de unión del antígeno de los conjugados de anticuerpo resultantes, es preferible que los grupos sulfhidrilo introducidos se introduzcan en un sitio distinto del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Preferentemente, los grupos sulfhidrilo introducidos se introducen en un sitio distinto de las regiones variables de la cadena pesada o ligera, por ejemplo, preferentemente en la región constante de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un residuo de cisteína se manipula en un anticuerpo. El grupo sulfhidrilo de la cisteína normalmente formará un enlace disulfuro que puede entonces reducirse usando los métodos descritos en el presente documento.

En el contexto de una proteína de fusión, el término "enlace disulfuro reducible" se refiere a un enlace disulfuro de una proteína de fusión que es (i) reducible mientras que la proteína de fusión está reversiblemente unida a un soporte sólido, y (ii) reducible bajo condiciones reductoras suaves. Para que una proteína de fusión sea de uso en los presentes métodos, debe permanecer generalmente intacta tras la reducción del (de los) enlace(s) disulfuro reducible(s). Un ejemplo de condiciones reductoras suaves es la reducción bajo condiciones acuosas a pH próximo a neutro con un agente reductor débil. En algunas realizaciones preferidas, el enlace disulfuro reducible estará en el dominio Ig de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, el enlace disulfuro existe de forma natural y se refiere a los enlaces disulfuro intercatenarios de origen natural del dominio Ig de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, un grupo(s) sulfhidrilo se introduce(n) químicamente en el dominio Ig de la proteína de fusión.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon celular, que incluye cualquier clon de células eucariotas o procariotas, o un clon de fago, y no el método por el que se produce. Así, el término "anticuerpo monoclonal" no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridomas.

El término "región Fc" se refiere a una región constante de un anticuerpo, por ejemplo, un dominio C_{H1} -bisagra- C_{H2} - C_{H3} , que opcionalmente tiene un dominio C_{H4} , o un derivado conservativamente sustituido de una región Fc tal.

El término "dominio Fc" se refiere al dominio de la región constante de un anticuerpo, por ejemplo, un dominio C_{H1} , bisagra, C_{H2} , C_{H3} o C_{H4} , o un derivado conservativamente sustituido de un dominio Fc tal.

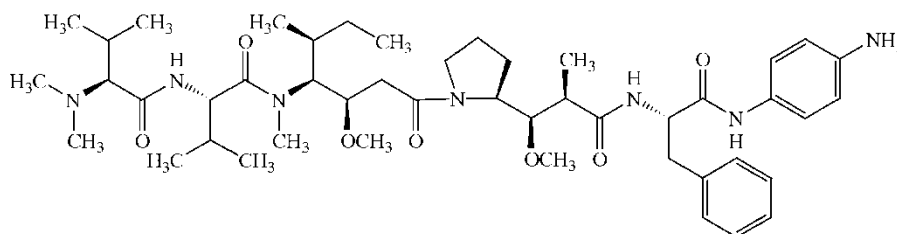
Un "antígeno" es una molécula a la que un anticuerpo se une específicamente.

Un "agente citotóxico" se refiere a un agente que tiene un efecto citotóxico y/o citostático sobre una célula. Un "efecto citotóxico" se refiere al agotamiento, eliminación y/o a la destrucción de una célula(s) diana. Un "efecto citostático" se refiere a la inhibición de la proliferación celular.

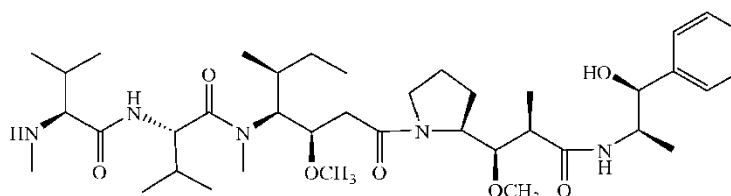
El término "enlace disulfuro intercatenario", en el contexto de un anticuerpo, se refiere a un enlace disulfuro entre dos cadenas pesadas, o una cadena pesada y una ligera de un anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, "conjugados de anticuerpo libre" se refiere a conjugados de anticuerpo que no están inmovilizados sobre un soporte sólido, por ejemplo, los anticuerpos se han liberado de un soporte sólido.

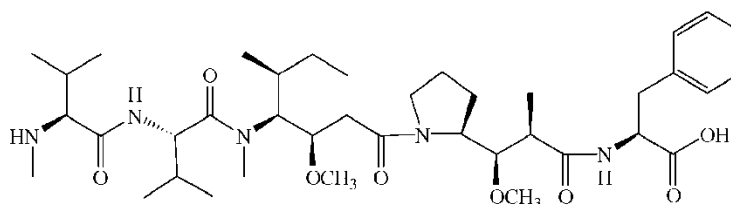
La abreviatura "AFP" se refiere a dimetilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproinafenilalanina-p-fenilendiamina que tiene la fórmula general mostrada inmediatamente a continuación:



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



La abreviatura "MMAF" se refiere a dovalina-valina-dolaisoleucina-dolaproinafenilalanina que tiene la fórmula general mostrada inmediatamente a continuación:



La abreviatura "AEB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar auristatina E con ácido para-acetilbenzoico. La abreviatura "AEVB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar 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. Pueden formarse sales de adición de ácido con grupos amino. Sales a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, las sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, ácido fosfato, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tannato, 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 estabilice la carga sobre el

compuesto parental. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

5

General

Se ha inventado un método de cribar directamente anticuerpos basándose en su rendimiento como ADC o como anticuerpos no conjugados (es decir, anticuerpos desnudos). Se ha desarrollado una técnica de marcado que es insensible a la concentración de anticuerpo presente en una muestra y aplicable a pequeñas cantidades de anticuerpo que permiten una comparación de las actividades de anticuerpos individuales de una población heterogénea de anticuerpos.

10

El ensayo de cribado es útil para identificar anticuerpos con características deseadas. Los anticuerpos pueden generarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica para generar anticuerpos, a condición de que los anticuerpos que van a cribarse comprendan (i) un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno específico, (ii) al menos un enlace disulfuro reducible (por ejemplo, enlace disulfuro intercatenario) y (iii) un dominio capaz de unirse a una fase sólida.

15

En un aspecto de la invención se proporciona una pluralidad de muestras que contienen anticuerpo. La expresión "una pluralidad de muestras" se refiere a dos o más muestras. Debido a que los métodos proporcionados en el presente documento son idealmente aptos para el cribado de alto rendimiento, en un aspecto de la invención, los métodos se realizan simultáneamente en al menos decenas o al menos cientos de muestras. Una de las fortalezas de los métodos proporcionados en el presente documento es que puede hacerse una comparación entre anticuerpos aún cuando las muestras que contienen el anticuerpo puedan no contener la misma cantidad de anticuerpo. Por consiguiente, en un aspecto, las muestras varían con respecto a la cantidad de anticuerpo y con respecto a la secuencia de anticuerpo. Por ejemplo, en un aspecto, una primera muestra comprenderá un primer anticuerpo en una primera cantidad y una segunda muestra comprenderá un segundo anticuerpo en una segunda cantidad. La primera y segunda cantidades variarán y el primer y segundo anticuerpos variarán. En realizaciones en las que se desea comparar anticuerpos que se dirigen al mismo antígeno, los anticuerpos se unirán inmunoespecíficamente al mismo antígeno. Con el fin de aclaración, la expresión "en el que la pluralidad de muestras varían con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo" no requiere que todas las muestras dentro de una pluralidad de muestras varíen con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo, solo que haya cierto nivel de heterogeneidad entre las muestras. Aunque hay una varianza en la secuencia de anticuerpo (por ejemplo, una primera muestra contendrá un anticuerpo diferente que una segunda muestra), es preferible que una única muestra contenga un anticuerpo, es decir, que el anticuerpo presente en una única muestra sea de la misma secuencia. La expresión "sustancialmente todo el anticuerpo presente en una única muestra sea de la misma secuencia" refleja la preferencia de que una única muestra contenga un anticuerpo con el reconocimiento de que, en algunas muestras, pueda haber algo de contaminación con otro anticuerpo. Preferentemente, en aquellas muestras que tienen alguna contaminación con otro anticuerpo, hay menos del 30 %, preferentemente menos del 20 %, preferentemente menos del 15 %, más preferentemente menos del 10 %, e incluso más preferentemente menos del 5 %, menos del 4 %, o menos del 3 % de contaminación con otro anticuerpo. En realizaciones preferidas, la mayoría de las muestras que contienen anticuerpo (más del 50 % de las muestras e incluso más preferentemente más del 60 %, más del 70 %, más del 75 %, o incluso más del 80 % de las muestras) en una pluralidad de muestras que contienen anticuerpo contienen un anticuerpo con ninguna cantidad o con cantidades menores de contaminación con otro anticuerpo (por ejemplo, inferior al 15 %, preferentemente incluso inferior al 10 % o inferior al 5 % de contaminación con otro anticuerpo). En algunas realizaciones preferidas, la mayoría de las muestras que contienen anticuerpo comprenderán anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente al mismo antígeno.

20

25

30

35

40

45

Los anticuerpos que van a cribarse usando los presentes métodos pueden dirigirse a cualquier antígeno. En realizaciones a modo de ejemplo, un anticuerpo que va a cribarse por los presentes métodos se unirá inmunoespecíficamente a un antígeno seleccionado de CD19, CD20, CD21, CD22, CD30, CD33, CD38, CD40, CD70, CD74, CD83, CD133, CD138, CD200 o CD276. En otras realizaciones, el anticuerpo se unirá inmunoespecíficamente a BMPR1B, LAT1 (SLC7A5), STEAP1, MUC16, MUC1, factor potenciador de megacariocitos (MPF), Napi3b, Sema 5b, PSCA hlg, ETBR (receptor tipo B de endotelina), STEAP2, TrpM4, CRIPTO, CD21, CD79a, CD79b, FcRH2, HER2, HER3, HER4, NCA, MDP, IL20R α , brevicano, Ephb2R, ASLG659, PSCA, PSMA, TMPRSS2, TMPRSS4, GEDA, BAFF-R, CXCR5, HLA-DOB, P2X5, CD72, LY64, FCRH1, VEGF, PLAC1, VEGFR1, VEGFR2 o IRTA2. En otras realizaciones, el anticuerpo se unirá inmunoespecíficamente a CD2, CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD16, CD18, CD19, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD40L, CD51, CD52, CD54, CD56, CD70, CD80, CD123, CD133, CD138, CD147, CD227 o CD276. En otras realizaciones, el anticuerpo se unirá inmunoespecíficamente a IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18 o IL-23. En otras realizaciones, el anticuerpo se unirá inmunoespecíficamente a una proteína de la familia de transportadores de soluto de proteínas (por ejemplo, familia de transportadores de soluto 44, miembro 4 (proteína codificada por el gen SLC44A4) o familia de transportadores de soluto 34, miembro 2 (proteína codificada por el gen SLC34A2)); LIV-1 (proteína codificada por el gen SLC39A6); proteína de la familia SLAM de proteínas (por ejemplo, miembros de la familia SLAM 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9); proteína de la familia mucina de proteínas (por ejemplo,

55

60

65

MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC10, MUC11, MUC12, MUC13, MUC14, MUC15 o MUC16); proteína de la familia STEAP de proteínas (por ejemplo, STEAP1, STEAP2, STEAP3 o STEAP4); una proteína de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF-RI, TNF-RII, DR1, DR2, DR3, DR4, DR5); proteína MN; proteína mesotelina; proteína codificada por la familia Slitrk de proteínas (por ejemplo, SLITRK1, SLITRK2, SLITRK3, SLITRK4, SLITRK5 o SLITRK6), o una proteína codificada por el gen GPNMB.

Las muestras que contienen anticuerpo pueden generarse de muchas formas diferentes. Hay muchas técnicas conocidas en la técnica para generar anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos que son útiles en los presentes métodos pueden producirse por técnicas de expresión recombinante, técnica de presentación en fagos, a partir de hibridomas, a partir de mielomas, a partir de otras células de mamífero que expresan anticuerpo, y a partir de combinaciones de los mismos. Los anticuerpos que van a usarse en la presente invención puede ser de cualquier especie (por ejemplo, humana, murina, rata) y pueden ser de especies mixtas, por ejemplo, quiméricas. Los anticuerpos que van a usarse en la presente invención pueden comprender regiones variables de longitud completa o fragmentos de las mismas.

Puede utilizarse varias células de mamífero y líneas celulares para expresar un anticuerpo. Por ejemplo, pueden usarse células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, DG44, Dxb11, CHO-K, CHO-K1 y CHO-S). En algunas realizaciones se usan líneas celulares humanas. Líneas de células de mieloma adecuadas incluyen SP2/0 e IR983F y líneas de células de mieloma humanas tal como Namalwa. Otras células adecuadas incluyen células de riñón embrionario humano (por ejemplo, HEK293), células de riñón de mono (por ejemplo, COS), células epiteliales humanas (por ejemplo, HeLa), PERC6, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, BHK y K6H6. Otras células huésped adecuadas incluyen células YB2/O.

Puede usarse cualquier técnica de generación de anticuerpos para generar las muestras que contienen anticuerpo descritas en el presente documento a condición de que los anticuerpos generados puedan inmovilizarse sobre un soporte sólido y contener al menos un enlace disulfuro reducible. En algunas realizaciones, el anticuerpo se generará por un método conocido en la técnica y se modificará con el fin de ponerlo en condición para su uso en los presentes métodos. Por ejemplo, los anticuerpos generados por presentación en fagos u otros métodos pueden modificarse para contener una marca de afinidad y/o pueden formatearse para expresar una región Fc. Para una visión general de la tecnología de presentación en fagos para producir anticuerpos véase Schmitz et al., 2000, Placenta 21, Suplemento A, S106-112. Véase también Lightwood et al., 2006, Journal of Immunological Methods 316, 133-143.

En algunos aspectos, los anticuerpos que van a ensayarse se generan usando técnicas de hibridomas muy conocidas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células huésped son de un hibridoma. Las técnicas de hibridomas se tratan generalmente en, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988); y Hammerling, et al., en *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Los anticuerpos también pueden generarse usando líneas celulares inmortales o condicionalmente inmortales distintas de líneas celulares de hibridoma, que incluyen, por ejemplo, anticuerpos generados a partir de líneas celulares condicionalmente inmortales de ratones H-2K^b-tsA58 (Pasqualin y Arap, PNAS, 2004, 101(1), 257-259). Estas tecnologías pueden usarse para generar anticuerpos completamente de roedor, quiméricos de roedor-humano, o humanos. Por ejemplo, para una visión general de una tecnología para producir anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridomas véase Lonberg y Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93.

Además, pueden involucrarse empresas tales como Amgen, Inc. (Thousand Oaks, CA) y BEM (Princeton, NJ) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la citada anteriormente. Pueden producirse anticuerpos completamente humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de las cadenas pesadas y ligeras humanas. Los ratones transgénicos se inmunizan en el modo normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido diana. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse usando tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente experimentan conmutación de clase y mutación somática. Así, usando una técnica tal, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos véase Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93).

Los presentes métodos no requieren una etapa de purificación antes de la inmovilización del anticuerpo sobre un soporte sólido. En algunos aspectos, el anticuerpo proporcionado en la muestra que contiene anticuerpo no está purificado. En algunas realizaciones, el sobrenadante de cultivo celular no purificado o los medios acondicionados no purificados se proporcionan como la muestra que contiene anticuerpo. Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que la tecnología de hibridomas se usa para generar anticuerpos, las muestras que contienen anticuerpo son muestras de sobrenadante de hibridoma no purificado. En algunos aspectos, las muestras de sobrenadante varían con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo. Es preferible que una única muestra de

sobrenadante de hibridoma contenga anticuerpo de un único clon de hibridoma, aunque las muestras que contienen anticuerpo pueden contener contaminación con otros anticuerpos. Métodos de recogida de poblaciones clonales de hibridomas se conocen en la técnica, ya que son métodos de generación de sobrenadante de hibridoma. Por ejemplo, en un aspecto, hibridomas recién fusionados se siembran en medio semi-sólido, por ejemplo, metilcelulosa) con un medio selectivo (por ejemplo, un medio que promueve la supervivencia y proliferación de células de hibridoma y la eliminación de linfocitos B no fusionados y células de mieloma. Ejemplos de un medio tal incluyen uno que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Las colonias productoras de IgG clonales se seleccionan y se ponen en pocillos individuales que contienen medio para soportar la expansión de la línea celular y la producción de anticuerpos. El sobrenadante de hibridoma resultante puede ensayarse por los presentes métodos. En otro aspecto, las células de hibridoma se clonan usando un enfoque de dilución limitada. En algunas realizaciones, antes de la inmovilización y la conjugación, los sobrenadantes de cultivo de hibridoma no purificados se criban para la presencia de anticuerpos con especificidad por antígenos deseada. En algunas realizaciones, se proporciona de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 5 ml de sobrenadante de hibridoma.

En algunas realizaciones, el sobrenadante de cultivo celular no purificado es distinto del sobrenadante de hibridoma, por ejemplo, sobrenadante de cultivo de células CHO (por ejemplo, líneas celulares DG44, Dxb11, CHO-K1 y CHO-S), u otro sobrenadante de cultivo celular.

En algunas realizaciones, el anticuerpo en las muestras que contienen anticuerpo se produce en medios de cultivo que carecen de IgG endógena, y, en particular, medios de cultivo que carecen de IgG bovina. En algunas realizaciones, el medio de cultivo se agota en IgG endógena antes de uso (véase, por ejemplo, el Ejemplo 8). Medios de cultivo adecuados incluyen aquellos que contienen, por ejemplo, sales, fuente de carbono (por ejemplo, azúcares), fuente de nitrógeno, aminoácidos, oligoelementos, antibióticos, agentes de selección, y similares, según se requiera para el crecimiento. Pueden usarse medios comercialmente disponibles, además de medios de clonación comercialmente disponibles, que incluyen medios de clonación con empobrecimiento de IgG. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, serán evidentes para el experto en la materia.

Los presentes métodos usan un soporte sólido para la conjugación de los anticuerpos con una entidad química deseada. Debido a que los presentes métodos se realizan en fase sólida y no en solución, los presentes métodos pueden realizarse con muestras que contienen cantidades muy pequeñas (por ejemplo, 1 a 500 µg) de anticuerpo. En algunas realizaciones, habrá de 1 µg a 100 µg, de 1 µg a 50 µg, de 1 µg a 20 µg, de 3 µg a 100 µg, de 3 µg a 50 µg, de 3 µg a 20 µg, de 5 µg a 100 µg, de 5 µg a 50 µg, o de 5 µg a 20 µg de anticuerpo presente en una única muestra. En un aspecto, al menos una de las muestras en una pluralidad de muestras tendrá de 1 µg a 100 µg, de 1 µg a 50 µg, de 1 µg a 20 µg, de 3 µg a 100 µg, de 3 µg a 50 µg, de 3 µg a 20, de 5 µg a 100 µg, de 5 µg a 50 µg, o de 5 µg a 20 µg de anticuerpo presente.

Un soporte sólido se refiere a un material funcionalizado insoluble al que los anticuerpos pueden unirse reversiblemente, tanto directamente como indirectamente, permitiéndoles separarse de materiales no deseados, por ejemplo, exceso de reactivos, contaminantes y disolventes. Ejemplos de soportes sólidos incluyen, por ejemplo, materiales poliméricos funcionalizados, por ejemplo, agarosa, o su forma de perla Sepharose®, dextrano, poliestireno y polipropileno, o mezclas de los mismos; discos compactos que comprenden estructuras de canal microfluídico; chips de matriz de proteína; puntas de pipeta; membranas, por ejemplo, membranas de nitrocelulosa o PVDF; y micropartículas, por ejemplo, perlas paramagnéticas o no paramagnéticas. En algunas realizaciones, un medio de afinidad se unirá al soporte sólido y el anticuerpo se unirá indirectamente al soporte sólido mediante el medio de afinidad. En un aspecto, el soporte sólido comprende un medio de afinidad de proteína A o medio de afinidad de proteína G. Un "medio de afinidad de proteína A" y un "medio de afinidad de proteína G" se refieren cada uno a una fase sólida sobre la que está unida una proteína natural o sintética que comprende un dominio de unión a Fc de proteína A o proteína G, respectivamente, o una variante mutada o fragmento de un dominio de unión a Fc de proteína A o proteína G, respectivamente, variante o fragmento que retiene la afinidad por una porción Fc de un anticuerpo.

Los presentes métodos comprenden una etapa de inmovilizar anticuerpo sobre un soporte sólido para proporcionar anticuerpos inmovilizados. En algunas realizaciones, el soporte sólido tendrá la capacidad de unir más anticuerpo que la cantidad presente en la muestra que contiene anticuerpo o, en otras palabras, la cantidad de anticuerpo unido al soporte sólido tras la etapa de inmovilización será inferior a la capacidad del soporte sólido. Debido a que las muestras generalmente varían con respecto a la cantidad de anticuerpo, habrá variabilidad correspondiente en la cantidad de anticuerpo inmovilizado de una muestra en comparación con otra.

En algunas otras realizaciones, podría desearse limitar la cantidad de anticuerpo unido y el soporte sólido solo tendrá la capacidad de unir hasta una cierta cantidad de anticuerpo (por ejemplo, hasta 5 µg, hasta 10 µg, o hasta 15 µg de proteína). En estas realizaciones, aunque habrá un límite en cuanto a la cantidad máxima de anticuerpo que puede unirse al soporte sólido, todavía puede haber variabilidad en la cantidad de anticuerpo inmovilizado en una muestra en comparación con otra. Esto es debido a que una o más de las muestras podrían contener una pequeña cantidad de anticuerpo, inferior a la capacidad de carga máxima del soporte sólido. Un enfoque para preparar un soporte sólido que tiene capacidad limitada para unir anticuerpo es preparar una resina de capacidad muy baja de forma que un mayor volumen de suspensión de resina (20 µl por ejemplo) contenga solo capacidad suficiente para

unir 5 ug de anticuerpo. Un enfoque alternativo es reducir la capacidad eficaz de una resina diluyendo la resina con un volumen apropiado de resina no funcionalizada. Por ejemplo, una resina de proteína G-Sepharose con una capacidad de unión de 20 ug/ul podría convertirse en una resina mixta con una capacidad de unión eficaz de 0,5 ug/ul mezclando 1 parte de proteína G-Sepharose con 40 partes de Sepharose no funcionalizada. En la realización de una solución de resina tal, en algunas realizaciones, el diluyente será una resina que se construye a partir del mismo material que la resina de afinidad, tiene tamaños de poro lo suficientemente pequeños para excluir anticuerpos, y carece de cualquier funcionalidad superficial que pueda interaccionar con anticuerpos o los reactivos químicos usados para preparar los conjugados de anticuerpo.

En algunos aspectos de la invención, los anticuerpos se inmovilizan sobre un soporte sólido por la etapa de aplicar una muestra que contiene anticuerpo a un soporte sólido. Si se desea, puede realizarse una etapa de lavado tras la inmovilización para separar los anticuerpos inmovilizados del sobrenadante de cultivo celular u otros componentes de las muestras que contienen anticuerpo.

Una vez los anticuerpos se inmovilizan sobre el soporte sólido, se realiza una etapa de reducción con el fin de reducir completamente los enlaces disulfuro reducibles de los anticuerpos inmovilizados y de generar tioles reactivos. Los anticuerpos se reducen en condiciones que son favorables para una reducción completa de los enlaces disulfuro reducibles. Normalmente, los anticuerpos se reducen con un exceso de agente reductor con el fin de garantizar una reducción sustancialmente completa de los enlaces disulfuro reducibles. Por la expresión “reducir completamente los enlaces disulfuro reducibles del anticuerpo” se indica que sustancialmente todos (por ejemplo, superior al 70 %, preferentemente superior al 80 %, incluso más preferentemente superior al 85 %, 90 %, o 95 %) los anticuerpos en una muestra están completamente reducidos en cuanto a sus enlaces disulfuro reducibles. En otras palabras, para una cantidad sustancial de los anticuerpos en una muestra, todos los enlaces disulfuro reducibles de los anticuerpos se escindirán durante la etapa de reducción. Por ejemplo, si los anticuerpos en una muestra tienen 4 enlaces disulfuro reducibles, después de la etapa de reducción, los 4 enlaces disulfuro reducibles de una cantidad sustancial de los anticuerpos se escindirán para generar 8 tioles reactivos. La reducción es una que es selectiva para los enlaces disulfuro reducibles. Por la expresión “selectiva para los enlaces disulfuro reducibles” indica que los enlaces disulfuro reducibles son sustancialmente los únicos enlaces que se reducen. En algunas realizaciones de la invención, los enlaces disulfuro reducibles son los disulfuros intercatenarios de origen natural del anticuerpo, los anticuerpos se reducen en condiciones que son favorables para una reducción completa de los disulfuros intercatenarios de origen natural, y la reducción es una que es selectiva para los disulfuros intercatenarios de origen natural. Por la expresión “selectivo para disulfuros intercatenarios” se indica que los disulfuros intercatenarios están selectivamente reducidos. En otras palabras, los disulfuros intercatenarios son sustancialmente los únicos enlaces que están reducidos. Debido a que los anticuerpos se ponen en contacto con un exceso de agente reductor y el agente reductor es selectivo para los enlaces disulfuro reducibles, la generación de tioles reactivos por anticuerpo generalmente será independiente de la cantidad de anticuerpo en la muestra.

En un aspecto, el agente reductor usado en la etapa de reducción es TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) y la TCEP se añade en exceso durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por ejemplo, 250 ul de una solución 10 mM de TCEP a pH 7,4 reducirán fácilmente los disulfuros intercatenarios de 1 a 100 ug de anticuerpo en 30 minutos a temperatura ambiente. Sin embargo, pueden usarse otros agentes reductores y condiciones. Ejemplos de otros agentes reductores incluyen DTT (ditiotretitol), mercaptoetanol y mercaptoetilamina. Ejemplos de condiciones de reacción incluyen temperaturas de 5 °C a 37 °C durante un intervalo de pH de 5 a 8. La conjugación de los tioles de anticuerpos resultantes y el análisis por cromatografía de interacción hidrófoba o de fase inversa (por ejemplos, véanse las Figuras 1 y 3, respectivamente) proporciona un indicador del grado de reducción de disulfuros lograda bajo diversas condiciones reductoras. Tras la reducción, puede realizarse una etapa de lavado con el fin de eliminar agente reductor y cualquier otro componente que pueda haberse unido no específicamente al soporte sólido durante la etapa de captura del anticuerpo, por ejemplo, componentes del medio de cultivo.

En algunos aspectos de la presente invención, aunque las muestras variarán con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo, la mayoría de los anticuerpos no variará sustancialmente con respecto al número de enlaces disulfuro reducibles. Por ejemplo, en algunas realizaciones, sustancialmente todo el anticuerpo contenido en la primera y segunda muestra tendrán la misma cantidad de enlaces disulfuro reducibles. En algunas de tales realizaciones, los enlaces disulfuro reducibles serán disulfuros intercatenarios. Si los anticuerpos en la primera y segunda muestra tienen 4 enlaces disulfuro intercatenarios (por ejemplo, IgG1 humana), después de la reducción, los anticuerpos inmovilizados reducidos en ambas muestras tendrán cada uno 8 tioles reactivos. Este nivel de reducción a 8 tioles reactivos por anticuerpo es independiente de la cantidad de anticuerpo en las muestras debido al exceso de agente reductor, la selectividad de la etapa de reducción y el número uniforme de enlaces reducibles en cada anticuerpo. Similarmente, si el anticuerpo en la primera y segunda muestras tienen 5 enlaces disulfuro intercatenarios, después de la reducción, los anticuerpos inmovilizados reducidos en ambas muestras tendrán cada uno 10 tioles reactivos. Este nivel de reducción a 10 tioles reactivos por anticuerpo también es independiente de la cantidad de anticuerpo debido al exceso de agente reductor, la selectividad de la etapa de reducción y el número uniforme de disulfuros reducibles en cada anticuerpo. En algunas realizaciones en las que está siendo cribado un panel de anticuerpos murinos, por ejemplo, un panel de anticuerpos murinos de hibridomas, la mayoría de los anticuerpos será una cualquiera de las isoformas murinas principales IgG1 e IgG2a. Las isoformas IgG1 y IgG2a murinas contienen ambas 5 enlaces disulfuro intercatenarios y, después de la reducción, cada

anticuerpo tendrá 10 tioles reactivos. Por consiguiente, la mayoría de los anticuerpos tendrá la misma cantidad de enlaces disulfuro reducibles. Aunque la mayoría de las isoformas en estas realizaciones pueden ser IgG1 e IgG2a, también pueden estar presentes otras isoformas. Por ejemplo, también pueden estar presentes isoformas IgG2b murinas, IgG2c murinas e IgG3 murinas. En los casos en los que están presentes las isoformas IgG2b murinas, la reducción de estos anticuerpos generará 12 tioles reactivos, ya que las isoformas IgG2b tienen 6 enlaces disulfuro intercatenarios. En algunas realizaciones se usarán ratones transgénicos para la producción de anticuerpos y los ratones pueden estar genéticamente manipulados para producir anticuerpos que tienen un cierto isotipo, además de anticuerpos que tienen isotipos IgG humana. En algunas de tales realizaciones, los ratones pueden manipularse para solo expresar isotipos específicos. En algunas realizaciones, los ratones pueden manipularse para solo expresar solo un isotipo o dos isotipos principales.

Tras la etapa de reducción, los anticuerpos se cargan con la entidad química deseada (en otras palabras, se conjugan con la entidad química deseada). La selección de las entidades químicas que van a usarse depende en parte del fin del ensayo. En algunas realizaciones, los anticuerpos se cribarán con el fin de seleccionar un anticuerpo para su uso como ADC. En estas realizaciones se desea que los anticuerpos se conjuguen con un fármaco. Los anticuerpos pueden conjugarse directamente con el fármaco o indirectamente mediante un conector. El fármaco y el conector de fármaco pueden ser cualquier fármaco o conector de fármaco que sea eficaz para su uso como ADC y que sea reactivo con tiol. Por la expresión "reactivo con tiol" se indica que la entidad química reaccionará con un tiol reactivo generado mediante la reducción de un enlace disulfuro reducible y formará un enlace covalente con el mismo. Los fármacos y conectores de fármaco reactivos con tiol incluyen aquellos fármacos o conectores de fármaco que no son naturalmente reactivos con tiol, pero que se han derivatizado con un agente reactivo con tiol para hacerlos reactivos con tiol. Las condiciones usadas para la conjugación son tales que el fármaco reaccionará selectivamente con un tiol reactivo (tanto directamente como mediante su conector). Ejemplos de grupos reactivos con tiol que son altamente selectivos para tioles reactivos incluyen, por ejemplo, maleimidas, tales como N-etilmaleimida. Se considera que las maleimidas tales como N-etilmaleimida son bastante específicas para grupos sulfhidrilo, especialmente a valores de pH inferiores a 7, en los que otros grupos están protonados. A pH 7, por ejemplo, la reacción con tioles simples es aproximadamente 1.000 veces más rápida que con las aminas correspondientes. Las reacciones de tioles con maleimidas son muy rápidas a temperatura ambiente a pH 7,4, y 30 minutos son adecuados para garantizar la reacción completa sin arriesgar la conjugación de los grupos maleimida con amina. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el fármaco se ligará al anticuerpo mediante un grupo maleimida. Otros grupos reactivos que son altamente selectivos para tioles reactivos incluyen, por ejemplo, yodoacetamidas, vinilsulfonas y aziridinas.

En algunas realizaciones se deseará cargar completamente un anticuerpo con fármaco. En tales realizaciones, el nivel de carga de fármaco deseable será igual al número de tioles reactivos por anticuerpo. Por ejemplo, en algunas de tales realizaciones, la carga de fármaco deseada será 10 fármacos por anticuerpo y el número de tioles reactivos por anticuerpo será 10. En algunas realizaciones en las que se desea un nivel de carga de fármaco que es igual al número de tioles reactivos, el fármaco reactivo con tiol o conector de fármaco se proporcionará en exceso suficiente a los anticuerpos inmovilizados con el fin de reaccionar con todos los tioles reactivos disponibles. Debido a que la reacción se establece de forma que los fármacos y conectores de fármaco que van a usarse en esta etapa sean reactivos con tiol y las condiciones usadas sean selectivas para la conjugación con tioles reactivos, el fármaco o conector de fármaco reacciona selectivamente con los tioles reactivos (es decir, el fármaco y los conectores de fármaco no reaccionan sustancialmente con otros sitios sobre el anticuerpo, que incluyen, por ejemplo, otros aminoácidos (por ejemplo, residuos de lisina)). Debido a esta selectividad, es posible controlar la carga de fármaco y diseñar el experimento de forma que haya una carga de fármaco uniforme sustancial entre las muestras. Por la expresión "carga de fármaco uniforme sustancial entre las muestras" se indica que la carga de fármaco promedio entre las muestras es sustancialmente la misma o, en otras palabras, el número promedio de moléculas de fármaco por anticuerpo en la muestra uno será sustancialmente el mismo que el número promedio de moléculas de fármaco por anticuerpo en la muestra dos. Puede esperarse alguna varianza en la carga de fármaco, pero generalmente estará dentro de una varianza de aproximadamente el 25 %, preferentemente dentro de una varianza del 20 % o incluso del 10 %. Por consiguiente, en algunas realizaciones en las que la mayoría de las muestras contienen anticuerpos de los subtipos IgG1 e IgG2a murinas, si un fármaco o conector de fármaco reactivo con tiol se añade a las muestras en exceso suficiente para reaccionar con todos los tioles reactivos disponibles, habrá un promedio de 10 moléculas de fármaco por anticuerpo en la mayoría de las muestras. Debido a que estas muestras tienen una carga de fármaco uniforme sustancial, una vez eluida, la concentración de los ADC purificados puede determinarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, métodos espectrofotométricos, y sus actividades pueden compararse para determinar qué anticuerpos son más o menos activos en un ensayo. Esta comparación puede realizarse aunque los anticuerpos a comparar se proporcionen a concentraciones variables y en algunas realizaciones a concentraciones variables desconocidas. Una comparación entre anticuerpos proporcionados a concentración variable desconocida se ayuda por la capacidad de cargarlos sustancialmente uniformemente con fármaco o conector de fármaco.

En algunas realizaciones no se desea cargar completamente un anticuerpo con fármaco o conector de fármaco. En algunas de tales realizaciones, si se desea un menor nivel de carga de fármaco, los anticuerpos inmovilizados pueden hacerse reaccionar con tanto un fármaco o conector de fármaco como un agente de terminación de tiol. El término "agente de terminación de tiol" se usa en el presente documento para referirse a un agente que bloquea

selectivamente un tiol reactivo. El fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación de tiol se proporcionarán en una relación de fármaco o conector de fármaco con respecto a agente de terminación de tiol que produzca la carga de fármaco deseada. Al igual que el fármaco o conector de fármaco, el agente de terminación será altamente selectivo por tioles reactivos. Los agente de terminación reactivos con tiol incluyen aquellos agentes de terminación que no son naturalmente reactivos con tiol, pero que se han derivatizado con un agente reactivo con tiol para hacerlos reactivos con tiol. Ejemplos de agentes de terminación de tiol que pueden usarse incluyen agentes de terminación de maleimida tales como, por ejemplo, N-etilmaleimida. Otros agentes de terminación incluyen, por ejemplo, yodoacetamida y ácido yodoacético. En algunas realizaciones, tanto el fármaco o el conector de fármaco como el agente de terminación de tiol tienen el mismo tipo de agente reactivo con tiol. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, si el fármaco va a ligarse al anticuerpo mediante un grupo maleimida, el agente de terminación también se ligará al anticuerpo mediante el mismo tipo de grupo maleimida. Esto ayuda a garantizar que las tasas de reacción relativas del conector de fármaco y el agente de terminación sean similares. Preferentemente, no habrá más de aproximadamente 100 veces de diferencia en las tasas de reacción relativas, más preferentemente no más de 10 veces, e incluso más preferentemente no más de 5 veces de diferencia en las tasas de reacción relativas.

En un aspecto, la relación de agente de terminación y fármaco o conector de fármaco elegida dependerá del nivel de carga de fármaco deseado. En algunas realizaciones, la relación de conector de fármaco o fármaco con respecto al agente de terminación proporcionado a los anticuerpos inmovilizados se reflejará en la relación a la que estos reactivos están conjugados con los anticuerpos. En realizaciones cuando el fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación se proporcionan en exceso molar, la relación de conector de fármaco o fármaco con respecto al agente de terminación proporcionado se reflejará en la relación a la que estos reactivos están conjugados con los anticuerpos si las tasas de reacción de tiol intrínsecas de estos dos componentes son las mismas. Por ejemplo, si una mezcla de reacción que va a usarse para la conjugación tiene una mezcla 1:1 de conector de fármaco o fármaco con respecto a agente de terminación, en realizaciones en las que las tasas de reactivo de tiol intrínseco del fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación son las mismas y la mayoría de las muestras comprenden anticuerpos que tienen 5 enlaces disulfuro reducibles (por ejemplo, anticuerpos de los subtipos IgG1 y IgG2a murinas), tras la reacción, habrá un promedio de 5 moléculas de fármaco por anticuerpo y 5 agentes de terminación por anticuerpo en la mayoría de las muestras. Se ha observado, sin embargo, por los presentes inventores que las tasas de reacción de tiol intrínsecas del fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación no son generalmente las mismas, y por consiguiente, si el fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación se proporcionan en exceso, la relación a la que el fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación se proporcionan a las muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados no será la misma relación a la que están conjugadas con los anticuerpos. En tales realizaciones, la relación apropiada de fármaco o conector de fármaco con respecto al agente de terminación puede determinarse experimentalmente con el fin de lograr el nivel de carga de fármaco deseado. En particular, en tanto que el fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación se proporcionen en exceso (generalmente, un exceso de al menos aproximadamente 3 veces) y los anticuerpos presentes en las muestras tengan sustancialmente el mismo número de enlaces disulfuro reducibles, la relación producirá niveles de carga de fármaco consistentes (es decir, sustancialmente uniformes) a través de las muestras independientemente de la cantidad de anticuerpo presente en el soporte sólido.

En algunas realizaciones preferidas, la reacción de conjugación del anticuerpo con el fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación será bajo control cinético, no control termodinámico. Por ejemplo, en las condiciones en las que los moles totales de fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación proporcionados a una muestra que contiene los anticuerpos inmovilizados es igual o inferior al número de moles de tiol reactivo en la muestra, entonces la relación de fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación proporcionado a la muestra que comprende los anticuerpos reducidos inmovilizados se reflejará en la relación de conjugación real de los anticuerpos con respecto al fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación. Puede decirse que una reacción de conjugación tal está bajo control termodinámico. Por ejemplo, si 100 pmoles de un anticuerpo IgG1 murina (aproximadamente 15 ug) se redujeron con exceso de agente reductor para producir 10 tioles por anticuerpo, entonces 1 nmol de tiol reactivo estaría presente. Si se preparó una mezcla 1:1 de fármaco o conector de fármaco con respecto al agente de terminación tal que la concentración de cada uno fuera 0,5 mM y la concentración total fuera 1 mM, la adición de 1 ul de esta solución al anticuerpo reducido presentaría un total de 1 nmol de fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación. Suponiendo que la reacción de fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación y tiol es una altamente favorable (por ejemplo, tanto el fármaco o conector de fármaco como los agentes de terminación son derivados de maleimido), el conjugado preparado por este procedimiento tendría una mezcla 1:1 de los dos compuestos (la reacción de tiol-maleimida es altamente favorable y termodinámicamente llevaría esta reacción eficazmente a completitud). Esto sería cierto incluso si uno de los compuestos reaccionara a una tasa sustancialmente más rápida que el otro. En realizaciones en las que se desea cargar uniformemente una pluralidad de muestras, este enfoque requeriría generalmente que la cantidad de anticuerpo presente en cada una de las muestras fuera conocida. Además, en realizaciones en las que hay variabilidad en la cantidad de anticuerpo entre las muestras (tal como un panel de anticuerpos de hibridomas), requeriría un gran esfuerzo adaptar la cantidad de fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación que van a añadirse a cada muestra con el fin de llegar a muestras que están cargadas sustancialmente uniformemente. En realizaciones en las que la cantidad de anticuerpo en las muestras es desconocida y/o hay variabilidad entre muestras, es generalmente preferible manipular la reacción de manera que esté bajo el control cinético y, por consiguiente, proporcione las muestras que

contienen anticuerpo con un exceso de fármaco total o conector de fármaco y el agente de terminación.

En algunas realizaciones de la presente invención, las entidades químicas que van a conjugarse con los tioles reactivos de los anticuerpos reducidos se proporcionarán en exceso molar (exceso molar en cuanto a los tioles reactivos). En estas realizaciones, si el fármaco o conector de fármaco reacciona más rápidamente con un tiol reactivo que el agente de terminación, el fármaco o conector de fármaco se representará desproporcionadamente en el conjugado final. Esto es debido a que el fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación están eficazmente compitiendo entre sí para reaccionar con un número limitante de tioles reactivos disponibles. Si el fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación están presentes a concentraciones iguales en la solución de reacción, solo se conjugarán a concentraciones iguales si sus tasas de reacción son las mismas. Alterando la composición de una mezcla de reacción de forma que las concentraciones del fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación no sean iguales, la relación a la que reaccionan con los tioles disponibles puede controlarse. Por ejemplo, un fármaco o conector de fármaco de reacción lenta está desproporionalmente infrarrepresentado en un conjugado preparado con una mezcla 1:1 con un agente de terminación que reacciona más rápido. Cambiando la relación a 2:1 en favor del fármaco o conector de fármaco que reacciona más lento, su representación sobre el conjugado aumentará. Así, por la modulación de la relación del fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación proporcionado a las muestras que comprenden los anticuerpos reducidos inmovilizados, puede lograrse una relación deseada de fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación en el conjugado final. En condiciones en las que el fármaco total o conector de fármaco y el agente de terminación están presentes en exceso con respecto a los tioles reactivos disponibles, su distribución al producto final será independiente de la cantidad de tiol de partida. De este modo, una pluralidad de muestras puede cargarse sustancialmente uniformemente incluso cuando la cantidad de anticuerpo en las muestras sea desconocida y/o haya variabilidad entre las muestras. En algunas realizaciones, un volumen apropiado de fármaco o conector de fármaco y agente de terminación se proporciona a las muestras tal que esté presente un exceso molar de aproximadamente 2 veces (e incluso más preferentemente, un exceso molar de 3 veces o más) de reactantes totales con respecto a tioles totales. Si la cantidad de anticuerpo en las muestras es desconocida, cada muestra puede tratarse como si tuviera la máxima cantidad de anticuerpo. Para muchas de las muestras estará presente significativamente menos de la cantidad máxima y el exceso será superior a 2 veces. Esta provisión de exceso de reactantes que tienen una relación establecida permite cantidades variables de anticuerpos a través de un panel que va a tratarse con un cantidad fija grande de fármaco total o conector de fármaco y agente de terminación para producir un panel de conjugados con carga comparable de cada fármaco o conector de fármaco y el agente de terminación presente. El hecho de que el tratamiento igual de muestras produzca niveles comparables de carga, independientemente de la cantidad de anticuerpo inicialmente presente en la muestra, hace que este método sea conveniente para aplicaciones de alto rendimiento en las que están conjugados grandes números de anticuerpos.

Como se trata en el presente documento, aunque es preferible que la mayoría de las muestras que van a ensayarse no varíen con respecto al número de enlaces disulfuro reducibles presentes en los anticuerpos contenidos en ellas, en algunas realizaciones, habrá alguna variación. En algunas realizaciones, a pesar de la variación, las muestras se tratarán con la misma relación de entidades químicas. Cuando se interpretan los datos, el experto reconocerá que un cierto subconjunto de las muestras difirieron en la cantidad de enlaces disulfuro reducibles. Si se desea, el experto puede determinar el isotipo del anticuerpo antes de o tras la conjugación para ayudar en la interpretación de los datos.

En algunas realizaciones, antes de la etapa de conjugación, pueden usarse métodos convencionales para determinar el isotipo del anticuerpo en cada una de las muestras y, por tanto, el número de enlaces disulfuro reducibles por anticuerpo en cada una de las muestras. En algunas de tales realizaciones, las muestras que contienen anticuerpos que tienen el mismo número de enlaces disulfuro reducibles se pondrán en contacto con una mezcla de reacción que tiene una relación de fármaco o conector de fármaco con respecto al agente de terminación para llegar a una carga de fármaco deseada y muestras que contienen anticuerpos que tienen un número diferente de enlaces disulfuro reducibles se pondrán en contacto con una mezcla de reacción que tiene una relación diferente de fármaco o conector de fármaco con respecto al agente de terminación para llegar a esa misma carga de fármaco deseada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, si la carga de fármaco promedio deseada es 4, las muestras que contienen anticuerpos de IgG1 y IgG2a murinas (10 tioles reactivos por anticuerpo cuando están completamente reducidas) se pondrán todas en contacto con una mezcla de reacción que tiene una relación de fármaco o conector de fármaco con respecto al agente de terminación para llegar a una carga de fármaco promedio de 4 y carga de agente de terminación promedio de 6. Las muestras que contienen anticuerpos de IgG2b murina (12 tioles reactivos por anticuerpo cuando están completamente reducidas) se pondrán en contacto con una mezcla de reacción que tiene una relación de fármaco o conector de fármaco diferente al agente de terminación (por ejemplo, una mayor fracción de agente de terminación) para llegar a la misma carga de fármaco promedio de 4. En otras realizaciones, aunque puede haber variación entre isotipos y número de disulfuros intercatenarios, se aceptara que haya alguna variación en la carga y todas las muestras recibirán la misma relación de fármaco o conector de fármaco con respecto al agente de terminación.

En algunas realizaciones, antes de la etapa de conjugación y tras la etapa de reducción, habrá una etapa de reoxidación parcial. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los enlaces disulfuro reducibles consistirán en enlaces disulfuro intercatenarios de origen natural, además de enlaces disulfuro formados de grupos sulfhidrilo introducidos.

En algunas de estas realizaciones se deseará conjugar las entidades químicas seleccionadas con los sulfhidrilos introducidos, pero no con los grupos sulfhidrido de los enlaces disulfuro intercatenarios de origen natural. En estas realizaciones, tras la reducción completa de los enlaces disulfuro reducibles, puede haber una etapa de reoxidación parcial para reoxidar los enlaces disulfuro intercatenarios de origen natural, quedando los sulfhidrilos introducidos disponibles para unirse a las entidades químicas deseadas. La reoxidación de los disulfuros nativos puede lograrse, por ejemplo, por tratamiento de los anticuerpos reducidos con un gran exceso molar de ácido deshidroascórbico a pH 6,5, dejando que la reacción avance durante 1 hora a temperatura ambiente.

En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, en lugar de, o además del agente de terminación, se proporciona un agente de detección para la conjugación. Los agentes de detección pueden ser, por ejemplo, marcas primarias o marcas secundarias. En algunas realizaciones, el agente de detección será uno que se detecta directamente. En otras realizaciones, el agente de detección será uno que se detecta indirectamente. En algunas realizaciones, el agente de detección será, por ejemplo, cualquier marca reactiva de tiol que puede usarse para la cuantificación de anticuerpos y/o como indicador para un ensayo de unión o cualquier otro ensayo deseable. Las marcas reactivas de tiol incluyen aquellas marcas que no son naturalmente reactivas con tiol, pero que se han derivatizado con un agente reactivo con tiol para hacerlas reactivas con tiol. En algunas realizaciones, el mismo tipo de agente reactivo con tiol se usará para enlazar las diversas entidades químicas (agente de detección y/o fármaco o conector de fármaco y/o agente de terminación) al anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente de detección será un compuesto radioactivo, un agente quimioluminiscente, un agente fluorescente, o un cromógeno. En algunas realizaciones, el agente de detección será una molécula fluorescente tal como un fluoróforo. En algunas realizaciones, el agente de detección será biotina. En un aspecto, el agente de detección será un fluoróforo y el fluoróforo se derivatizará con un grupo maleimida con el fin de hacerlo reactivo con tiol. Las enseñanzas descritas en el presente documento pueden usarse para evaluar el nivel de carga preferido de un agente de detección seleccionado. En algunas realizaciones, se usa un fluoróforo como agente de detección y el fluoróforo se carga a una carga promedio de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3 fluoróforos por anticuerpo. Los Ejemplos 3 y 4 proporcionan descripciones a modo de ejemplo de cómo adaptar la relación de entidades químicas con el fin de lograr un nivel deseado de fármaco y/o carga de fluoróforo.

La presente invención engloba realizaciones en las que los anticuerpos se criban no con el fin de seleccionar un anticuerpo para su uso como un ADC, sino con el fin de seleccionar un anticuerpo para su uso como un anticuerpo no conjugado. En estas realizaciones, los anticuerpos inmovilizados se pondrán en contacto con un agente de detección y el agente de terminación a una relación seleccionada y no habrá uso de fármaco o conector de fármaco. Usando las enseñanzas descritas en el presente documento, que incluyen las enseñanzas de los Ejemplos 3 y 4, puede determinarse la relación apropiada de agente de detección con respecto al agente de terminación.

Después de poner en contacto los anticuerpos reducidos con la cantidad apropiada y el tipo de entidades químicas (la selección de las entidades químicas será dependiente, por ejemplo, de si se desea cribar anticuerpos como anticuerpos no conjugados o ADC; si se desea tener una carga de fármaco completa o carga de fármaco parcial; y si se desea incluir un agente de detección en la mezcla) y dejar tiempo suficiente para la completitud de la reacción (por ejemplo, 30 minutos para las entidades químicas que contienen maleimida), se desea realizar una etapa de lavado con el fin de eliminar cualquier material sin reaccionar. Posteriormente, los conjugados de anticuerpo inmovilizado pueden eluirse del soporte sólido para proporcionar composiciones de conjugado de anticuerpo. Se conocen en la técnica métodos de elución de proteínas de soportes sólidos y el profesional habitual será capaz de seleccionar un tampón apropiado para la elución. Por ejemplo, en realizaciones en las que el soporte sólido comprende resina de proteína A o proteína G, los conjugados de anticuerpo pueden eluirse con tampones de pH bajo patrón para la elución de columnas de proteína A o de proteína G.

En algunas realizaciones de la invención, los métodos descritos en el presente documento para la preparación de conjugados de anticuerpo producirán una pluralidad de composiciones de conjugado de anticuerpo-fármaco que tienen carga de fármaco sustancialmente uniforme (el experto entenderá que puede haber algún valor atípico dependiendo de la uniformidad del número de enlaces disulfuro reducibles a través de muestras). En estas realizaciones, debido a la carga de fármaco sustancialmente uniforme entre las muestras, pueden compararse las características relativas de anticuerpos en una primera y segunda muestra. Esta comparación puede realizarse aún cuando los anticuerpos que van a compararse se proporcionen a concentraciones variables y, en algunas realizaciones, a concentraciones variables desconocidas. Una comparación entre los anticuerpos de concentración desconocida y variable se facilita con la capacidad para cargarlos sustancialmente uniformemente con fármaco o conector de fármaco.

Se conocen en la técnica métodos de determinación de carga de fármaco. Un método que se usa en el presente documento es la cromatografía de líquidos de alta resolución sobre un copolímero de poliestireno-divinilbenceno, por ejemplo, una columna de PLRP™ de fase inversa. Esta técnica desnaturizante puede separar limpiamente la especie de cadena ligera y cadena pesada carga de diversas maneras. También puede usarse cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) como método analítico usado para determinar mezclas isoméricas de conjugados resultantes. El nivel de carga de fármaco puede determinarse basándose en una relación de absorbancias, por ejemplo, a 250 nm y 280 nm. Véase, por ejemplo, la publicación de EE.UU. N.º 20090010945.

En algunas realizaciones, tras la elución de los conjugados de anticuerpo, se realizarán ensayos de actividad y/u otros ensayos con el fin de caracterizar los conjugados de anticuerpo. En algunas realizaciones se realizarán ensayos de unión a células, de afinidad y/o de citotoxicidad. Muchos métodos de determinación de si un ADC se une o no a una diana de interés o ejerce un efecto citotóxico sobre una célula son conocidos para aquellos expertos en la materia, y pueden usarse en los presentes métodos. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de viabilidad celular para determinar el efecto citotóxico de un ADC sobre una célula. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 7.659.241 y 7.498.298, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento en su totalidad y para todos los fines, para ensayos de unión a célula y de citotoxicidad a modo de ejemplo.

En algunas realizaciones, tras la elución de los conjugados de anticuerpo, se deseará determinar la cantidad de anticuerpo o conjugado de anticuerpo en las composiciones de conjugado de anticuerpo. En algunas realizaciones se deseará determinar la cantidad real de anticuerpo o conjugado de anticuerpo en una muestra. En otras realizaciones será suficiente determinar la cantidad relativa de anticuerpo o conjugado de anticuerpo en una pluralidad de muestras. Por ejemplo, puede ser suficiente saber que la muestra 1 tiene más anticuerpo que la muestra 2 que tiene más anticuerpo que la muestra 3, etc. Se conocen en la técnica muchos métodos para determinar la cantidad de proteína y pueden usarse en el presente documento. En algunas realizaciones se usará un ensayo de absorbancia para determinar la concentración de anticuerpo. En realizaciones en las que un fluoróforo es parte del conjugado de anticuerpo, la concentración de anticuerpo puede determinarse usando un ensayo de fluorescencia. En realizaciones en las que la fluorescencia se usa para la cuantificación de proteína, puede ser necesario un patrón para convertir los valores de fluorescencia sin procesar en una concentración. Se conocen en la técnica métodos de uso de fluorescencia y de generación de curvas patrón para determinar la concentración de proteína. En un ejemplo, aproximadamente 200 µg de un anticuerpo patrón se conjugará durante la etapa de conjugación después de recogerse en medios de blanco. Después de la elución, la concentración de este patrón se determinará por métodos convencionales, por ejemplo, un ensayo de absorbancia a A280 convencional, y se ensayará una curva patrón preparada por una serie de dilución para fluorescencia junto con las muestras de conjugado. Alternativamente, puede usarse un robot de manipulación de líquidos para normalizar placas, eliminando así la necesidad de diluciones sucesivas.

En algunas realizaciones, los resultados de un ensayo de citotoxicidad y el conocimiento de la concentración relativa o real de anticuerpo en las composiciones de conjugado de anticuerpo se usarán para identificar anticuerpos con características deseadas. Los métodos descritos en el presente documento de preparación de conjugados de anticuerpo permiten hacer comparaciones entre una pluralidad de anticuerpos de concentración variable y, en algunas realizaciones, cantidad desconocida. Los métodos descritos en el presente documento de preparación de conjugados de anticuerpo permiten una selección de anticuerpos con características deseables cuando se empieza con, por ejemplo, un panel de anticuerpos resultantes de una fusión de hibridomas. En algunas realizaciones preferidas, es la carga de fármaco uniforme sustancial entre muestras lo que permite hacer comparaciones relevantes entre muestras. El fallo en garantizar niveles de carga sustancialmente uniformes podría, por ejemplo, conducir a resultados erróneos de un cribado de un panel de anticuerpos para su uso como ADC. Esto es debido a que no se sabría si una muestra de ADC presentaría mayor citotoxicidad debido a las características del anticuerpo como ADC o debido a que la muestra contiene más fármaco por anticuerpo. Por ejemplo, cabría normalmente esperar que una composición de conjugado de anticuerpo que comprende el anticuerpo "A" y que tiene una carga de fármaco promedio de 4 presentara más citotoxicidad que una composición de conjugado de anticuerpo que comprende anticuerpo "B" y que tiene una carga de fármaco promedio de 1. Esta mayor citotoxicidad no sería un indicador de las características relativas de los anticuerpos A y B como ADC, sino simplemente un indicador de la mayor carga de fármaco en el anticuerpo A. Si ambas composiciones de conjugado de anticuerpo tuvieran una carga de fármaco promedio de aproximadamente 4, si una mostrara mayor citotoxicidad, podría atribuirse al anticuerpo y no simplemente a la carga de fármaco. Similarmente, la capacidad para determinar la cantidad real o relativa de anticuerpo o conjugado de anticuerpo en las muestras también permite hacer comparaciones relevantes entre muestras. Sin conocimiento de la cantidad real o relativa de anticuerpo o conjugado de anticuerpo en la muestra, no se sabría si un ADC presenta mayor citotoxicidad debido al anticuerpo particular o simplemente debido a que hay más anticuerpo o ADC en la muestra.

Además de proporcionar métodos de preparación de conjugados de anticuerpo para su uso en ensayos de cribado de anticuerpos y conjugados de anticuerpo producidos por los métodos reivindicados, la presente invención proporciona anticuerpos y/o conjugados de anticuerpo (por ejemplo, conjugados de anticuerpo-fármaco) para uso terapéutico en el que el anticuerpo se seleccionó usando los métodos descritos en el presente documento.

Como se ha tratado previamente, el fármaco o conector de fármaco usado en los presentes métodos puede ser cualquier fármaco o conector de fármaco que sea eficaz para su uso como un ADC y que sea reactivo con tiol. El fármaco puede ser cualquier fármaco citotóxico, citostático o inmunosupresor. Se conocen en la técnica métodos de selección de fármaco y conector de fármaco para su uso como ADC. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 2004010957, WO 2007/038658, la patente de EE.UU. N.º 6.214.345, la patente de EE.UU. N.º 7.498.298 y la publicación de EE.UU. N.º 2006/0024317.

Clases útiles de agentes citotóxicos o inmunosupresores incluyen, por ejemplo, agentes anti-tubulina (por ejemplo, auristatinas, maitansinoides, alcaloides de la vinca), inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, camptotecinas),

ligandos de unión al surco menor de ADN (por ejemplo, caliqueamicinas, duocarmicinas, enediínas, lexitropsinas, clorometilbenzoindolinas), inhibidores de la replicación del ADN (por ejemplo, antraciclinas), agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como cis-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino tri-nuclear y carboplatino), inhibidores de proteínas cinasas, enzimas citotóxicas y toxinas de proteína.

En algunas realizaciones, agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores a quimioterapia, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, nitrosoureas, platinos, compuestos formadores de poros, antimetabolitos de purina, sensibilizadores a la radiación, esteroides, puromicinas, doxorubicinas y criptofisinas.

Agentes citotóxicos o inmunosupresores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfan, butionina sulfoximina, gamma caliqueamicina, N-acetil-gamma-dimetilhidrazida caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, cernadotina, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, citidina arabinósido, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (antiguamente actinomicina), daunorubicina, decarbazina, discodermolida, docetaxel, doxorubicina, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, equinomicina, eleuterobina, epotilona A y B, etopósido, estramustina, un estrógeno, 5-fluorodesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, gramicidina D, hidroxiaurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecan, lomustina (CCNU), maitansina, mecloretamina, melfalan, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, netropsina, nitroimidazol, paclitaxel, palitoxina, plicamicina, procarbazona, rizoxina, estreptozotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecan, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

En algunas realizaciones, el fármaco es un agente anti-tubulina. Ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, pero no se limitan a, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)) y alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina). Otros agentes anti-tubulina incluyen, por ejemplo, derivados de la bacatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cernadotina, combretastatinas, discodermolida y eleuterobina.

En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes anti-tubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 o DM-4 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

En algunas realizaciones, el fármaco es una auristatina, otro grupo de agentes anti-tubulina. Las auristatinas incluyen, pero no se limitan a, auristatina E y derivados de la misma. AFP, AEB, AEVB, MMAF y MMAE son ejemplos de auristatinas que pueden usarse en el presente documento. La síntesis y estructura de las auristatinas se describe en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2003-0083263, 2005-0238649 y 2005-0009751; publicación de patente internacional N.º WO 04/010957, publicación de patente internacional N.º WO 02/088172, y las patentes de EE.UU. N.º 7.498.298; 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.

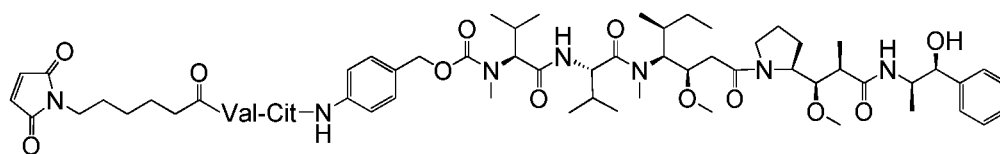
La parte de conector de un conector de fármaco es un compuesto que puede usarse para enlazar el anticuerpo con el fármaco. El conector puede comprender más de un resto químico. En algunas realizaciones, el conector es escindible bajo condiciones intracelulares, de forma que la escisión del conector libera la unidad de fármaco del anticuerpo en el entorno intracelular. En algunas realizaciones, el conector es un conector de peptidilo (por ejemplo, un conector que comprende dos o más aminoácidos) que se escinden por una peptidasa intracelular o enzima proteasa, que incluye, pero no se limita a, una proteasa lisosómica o endosómica. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales son conocidas por hidrolizar derivados de fármaco de dipéptido produciendo la liberación de fármaco activo dentro de células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). En algunas realizaciones, el conector de peptidilo escindible por una proteasa intracelular comprende un dipéptido Val-Cit o un dipéptido Phe-Lys (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 7.659.241). En todavía otras realizaciones, el conector no es escindible y el fármaco se libera por degradación del anticuerpo.

En algunas realizaciones, el conector escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH y/o escindible bajo condiciones reductoras (por ejemplo, un conector de disulfuro). Se conocen en la técnica varios conectores de disulfuro, que incluyen, por ejemplo, aquellos que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT (véase, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., en Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase también la patente de EE.UU. N.º 4.880.935).

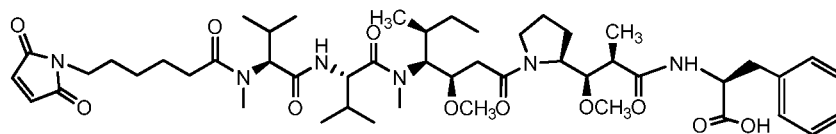
Conectores a modo de ejemplo que pueden usarse con los presentes métodos se describen en los documentos WO 2004010957, WO 2007/038658, las patentes de EE.UU. N.º 6.214.345, 7.659.241, 7.498.298 y la publicación de EE.UU. N.º 2006/0024317, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su

totalidad y para todos los fines.

En algunas realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención, el conector de fármaco es de fórmula I o fórmula II en la que Val-Cit se refiere al dipéptido valina-citrulina.



Fórmula I ("vc-MMAE")



Fórmula II ("mc-MMAF")

Proteínas

Los métodos descritos en el presente documento de preparación de conjugados de anticuerpo también pueden usarse para preparar proteínas de fusión para su uso en ensayos de cribado de proteínas de fusión. El término "proteína de fusión" se usa en el presente documento para referirse a fusiones de dominio de unión-Ig, en las que el dominio de unión puede ser, por ejemplo, un ligando, un dominio extracelular de un receptor, un péptido, un péptido que no existen de forma natural, o similares, con la condición de que el dominio de unión no incluya un dominio variable de un anticuerpo. Al igual que los anticuerpos descritos en el presente documento, la porción Ig de la proteína de fusión debe comprender al menos un enlace disulfuro reducible, y un dominio capaz de unirse a una fase sólida. En un aspecto, el dominio de Ig será la región Fc de un anticuerpo. Ejemplos de proteínas de fusión de dominio-Ig incluyen etanercept que es una proteína de fusión de sTNFRII con la región Fc (patente de EE.UU. N.º 5.605.690), alefacept que es una proteína de fusión de LFA-3 expresada en células presentadoras de antígenos con la región Fc (patente de EE.UU. N.º 5.914.111), una proteína de fusión de antígeno-4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) con la región Fc (J. Exp. Med. 181:1869 (1995)), una proteína de fusión de interleucina 15 con la región Fc (J. Immunol. 160:5742 (1998)), una proteína de fusión del factor VII con la región Fc (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:12180 (2001)), una proteína de fusión de la interleucina 10 con la región Fc (J. Immunol. 154:5590 (1995)), una proteína de fusión de interleucina 2 con la región Fc (J. Immunol. 146:915 (1991)), una proteína de fusión de CD40 con la región Fc (Surgery 132:149 (2002)), una proteína de fusión de Flt-3 (tirosina cinasa similar a fms) con la región Fc del anticuerpo (Acta. Haemato. 95:218 (1996)), una proteína de fusión de OX40 con la región Fc del anticuerpo (J. Leu. Biol. 72:522 (2002)), y proteínas de fusión con otras moléculas de CD (por ejemplo, CD2, CD30 (TNFRSF8), CD95 (Fas), CD106 (VCAM-I), CD137), moléculas de adhesión (por ejemplo, ALCAM (molécula de adhesión a células de leucocitos activadas), cadherinas, ICAM (molécula de adhesión intercelular)-1, ICAM-2, ICAM-3), receptores de citocinas (por ejemplo, interleucina-4R, interleucina-5R, interleucina-6R, interleucina-9R, interleucina-10R, interleucina-12R, interleucina-13Ralfa1, interleucina-13Ralfa2, interleucina-15R, interleucina-21Ralfa), quimiocinas, moléculas de señalización inductoras de muerte celular (por ejemplo, B7-H1, DR6 (receptor 6 de muerte), PD-1 (muerte 1 programada), TRAIL R1), moléculas coestimulantes (por ejemplo, B7-1, B7-2, B7-H2, ICOS (coestimulante inducible)), factores de crecimiento (por ejemplo, ErbB2, ErbB3, ErbB4, HGFR), factores inductores de la diferenciación (por ejemplo, B7-H3), factores activantes (por ejemplo, NKG2D) y moléculas de transferencia de señales (por ejemplo, gpl30), BCMA y TACI.

Todas las etapas descritas en el presente documento pueden adaptarse fácilmente a realizaciones en las que el material de partida no es anticuerpo, sino proteína de fusión. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporcionarían muestras que contienen proteína de fusión en vez de muestras que contienen anticuerpo. Las muestras de proteína de fusión variarían con respecto a la cantidad y secuencia. En realizaciones preferidas, sustancialmente toda la proteína de fusión presente en una única muestra sería de la misma secuencia. "Sustancialmente toda la proteína de fusión presente en una única muestra es de la misma secuencia" refleja la preferencia de que una única muestra contenga una proteína de fusión con el reconocimiento de que puede haber una cantidad menor (por ejemplo, hasta el 20 %, preferentemente inferior al 15 %, inferior al 10 %, inferior al 5 %, inferior al 4 %, o inferior al 3 %) de contaminación con otra proteína de fusión.

Al igual que con los anticuerpos, los métodos no requerirían una etapa de purificación antes de la inmovilización de las proteínas de fusión. En algunos aspectos, la proteína de fusión proporcionada en la muestra que contiene proteínas de fusión no está purificada. Al igual que con los anticuerpos, en algunas realizaciones, se proporciona sobrenadante de cultivo celular no purificado como muestra que contiene proteínas de fusión. Se conocen en la técnica métodos de generación de proteínas de fusión en cultivo celular y no se tratan en el presente documento. En

algunas realizaciones, la proteína de fusión en las muestras que contienen proteínas de fusión se cultivó en medio de cultivo con empobrecimiento de IgG, y, en particular, medio de cultivo con empobrecimiento de IgG bovina. Al igual que con los anticuerpos, los presentes métodos pueden realizarse con muestras que contienen cantidades muy pequeñas (por ejemplo, 1 a 500 µg) de proteína de fusión. En algunas realizaciones, habrá de 1 µg a 100 µg, de 1 µg a 50 µg, de 1 µg a 20 µg, de 5 µg a 100 µg, de 5 µg a 50 µg, o de 5 µg a 20 µg de proteína de fusión presente en una única muestra.

Los presentes métodos comprenden una etapa de inmovilizar la proteína de fusión sobre un soporte sólido para proporcionar proteínas de fusión inmovilizadas. En algunas realizaciones, el soporte sólido tiene la capacidad de unir más proteína de fusión que la cantidad presente en la muestra que contiene proteínas de fusión o la cantidad de proteína de fusión unida es inferior a la capacidad del soporte sólido. En otras realizaciones, el soporte sólido tendrá capacidad de unión reducida.

Una vez las proteínas de fusión se inmovilizan sobre el soporte sólido, se realiza una etapa de reducción con el fin de reducir completamente los enlaces disulfuro reducibles de la proteína de fusión inmovilizada y de generar tioles reactivos. Tras la etapa de reducción, las proteínas de fusión se cargan con la entidad química deseada (en otras palabras, se conjugan con la entidad química deseada). De nuevo, la selección de las entidades químicas que van a usarse depende en parte del fin del ensayo. En algunas realizaciones de la presente invención, las proteínas de fusión se cribarán con el fin de seleccionar proteína de fusión para su uso como conjugados de proteína de fusión-fármaco. En estas realizaciones, se desea que las proteínas de fusión se conjuguen con un fármaco. Las proteínas de fusión pueden conjugarse directamente con el fármaco o indirectamente mediante un conector. El fármaco y el conector de fármaco pueden ser cualquier fármaco o conector de fármaco descrito en el presente documento. Al igual que con los anticuerpos, las proteínas de fusión pueden ponerse en contacto con una mezcla de reacción que comprende fármaco, agente de terminación y opcionalmente un agente de detección. Al igual que con los anticuerpos, la presente invención engloba realizaciones en las que las proteínas de fusión no se criban con el fin de seleccionar una proteína de fusión para su uso como conjugado de proteína de fusión-fármaco, sino con el fin de seleccionar una proteína de fusión para su uso como una proteína de fusión no conjugada. En estas realizaciones, la mezcla de reacción de conjugación no incluirá un fármaco o conector de fármaco, sino en su lugar una mezcla de agente de detección y agente de terminación. Al igual que con los conjugados de anticuerpo, en algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento de preparación de conjugados de proteína de fusión producirán una pluralidad de composiciones de conjugado de proteína de fusión con carga uniforme sustancial entre muestras. Tras la elución de las proteínas de fusión, pueden realizarse ensayos de actividad y/u otros ensayos con el fin de caracterizar las proteínas de fusión. Los resultados de los ensayos y el conocimiento de la concentración relativa o real de proteína en las composiciones de conjugado de proteína de fusión pueden usarse para identificar proteínas de fusión que tienen propiedades deseadas bien como proteínas de fusión no conjugadas o bien como conjugados de proteína de fusión-fármaco.

Usando los métodos descritos en el presente documento, los anticuerpos que funcionan bien como anticuerpos no conjugados y las proteínas de fusión que funcionan bien como proteínas de fusión no conjugadas pueden identificarse y pueden seleccionarse para desarrollo adicional. En algunas realizaciones, los anticuerpos o las proteínas de fusión identificados por los presentes métodos se formularán para aplicaciones terapéuticas y/o no terapéuticas. Similarmente, los anticuerpos o las proteínas de fusión identificados como aquellos con actividades deseadas como conjugados de fármaco también pueden seleccionarse para desarrollo adicional. En algunas realizaciones, tales anticuerpos o proteínas de fusión se conjugarán con el fármaco o conector de fármaco deseado usando métodos conocidos y se formularán para aplicaciones terapéuticas y/o no terapéuticas. En algunas realizaciones, los anticuerpos, los conjugados de anticuerpo-fármaco, las proteínas de fusión y los conjugados de proteína de fusión se formularán como composiciones farmacéuticas y comprenderán una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del anticuerpo, conjugado de anticuerpo-fármaco, proteína de fusión o conjugado de proteína de fusión y uno o más componentes farmacéuticamente compatibles (aceptables). Por ejemplo, una composición farmacéutica o no farmacéutica normalmente incluye uno o más vehículos (por ejemplo, líquidos estériles, tales como agua y aceites). El agua es un vehículo más típico cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, aminoácidos, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similar. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones normalmente contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína, normalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporcione la forma para la administración apropiada al paciente. Las formulaciones se corresponden con el modo de administración.

Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, el fármaco también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal

como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran tanto por separado como mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un envase herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando el fármaco va a administrarse por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Cuando el fármaco se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los componentes puedan mezclarse antes de la administración.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Reducción de anticuerpos en solución y por fase sólida

Es muy reconocido que en condiciones en las que los anticuerpos retienen su estructura plegada nativa, TCEP reduce fácilmente los disulfuros intercatenarios sin reducir los disulfuros intracatenarios de los dominios de inmunoglobulina, que están inaccesibles a reactivos solubles en agua. Cuando un anticuerpo está unido a medios de afinidad por proteína G, esta selectividad por los disulfuros intercatenarios sigue sin cambiar. Esto se ilustra en la Figura 1. Esta figura muestra cromatogramas hechos reduciendo un anticuerpo murino inmovilizado en proteína G con TCEP 10 mM, seguido de conjugación con un exceso de mc-MMAF. Estos cromatogramas están superpuestos con cromatogramas del mismo anticuerpo reducido con TCEP por química en solución convencional y que ha reaccionado con mc-MMAF. Los resultados comparables entre el método en solución convencional y el método en fase sólida indican que la reactividad del anticuerpo no cambia significativamente tras la unión a medios de afinidad por la proteína G. Esta característica permite que se reduzca un gran panel de anticuerpos, todos ellos al mismo número de tioles reactivos sin considerar la cantidad de cada anticuerpo presente, usando una cantidad de TCEP que está en exceso con respecto al número de disulfuros reducibles en el anticuerpo más abundante. En ausencia de cualquier conocimiento de cuánto anticuerpo puede estar presente, el anticuerpo más abundante teóricamente puede definirse como la capacidad de la resina de afinidad (ug de anticuerpo por ul de resina) por el volumen del lecho de resina (ul).

Ejemplo 2 - Adaptación de la relación de fármaco con respecto al agente de terminación en la mezcla de reacción de conjugación de fármaco para una carga de fármaco deseable

La Figura 2 ilustra el grado de carga del fármaco de maleimido mcMMAF cuando se añade como una mezcla con N-etilmaleimida (NEM) a una IgG1 murina inmovilizada sobre proteína G y completamente reducida con exceso de TCEP. La figura ilustra la reactividad ligeramente menor de mcMMAF con respecto a NEM, de forma que, en este ejemplo, si se desea un conjugado con una fracción molar de mcMMAF promedio de 0,4 (una carga de fármaco de 4), la fracción molar de mcMMAF en la mezcla de maleimida debe ser 0,53. La carga de mcMMAF en cada conjugado se determinó por cromatografía de fase inversa con una columna de PLRP-S, que separa eficazmente las cadenas pesadas y ligeras basándose en su carga de fármaco; la hidrofobia de mcMMAF produce después tiempos de retención para las especies con grado creciente de conjugación de mcMMAF (Figura 3). Se preparó una mezcla de mcMMAF y NEM a esta relación y se aplicó a un pequeño panel de anticuerpos murinos para evaluar la generalidad de esta relación a través de los diferentes isotipos IgG. Como se muestra en la tabla a continuación, las IgG1 y IgG2a murinas, ambas de las cuales poseen 5 disulfuros intercatenarios, dieron niveles de carga de fármaco mcMMAF entre 3,9 y 4,2 como se ha determinado por cromatografía de PLRP-S. Una IgG2b murina, que posee 6 disulfuros intercatenarios, dio una carga de mcMMAF promedio correspondientemente mayor como resultado del mayor número de tioles reactivos por anticuerpo que resultan de la reducción completa. Este resultado ilustra la importancia de adaptar la mezcla de maleimida según el número de disulfuros reducibles de anticuerpo si se desea un nivel de carga específico.

Isotipo	mIgG1				mIgG2a			mIgG2b
Fármacos / Ab	3,9	4,0	3,9	4,2	4,2	4,1	3,9	5,3

Ejemplo 3 - Método de determinación del nivel de carga de fluoróforo a modo de ejemplo y de preparación de un patrón para determinar la carga de fluoróforo en conjugados de anticuerpo

Pueden prepararse conjugados mixtos con tanto fármaco como un fluoróforo presente en el conjugado de una manera controlable. La presencia de un fluoróforo puede permitir cuantificación más sensible de los conjugados resultantes de un gran panel de anticuerpos o como grupo indicador para ensayos de unión u otros ensayos realizados en el panel. Puede incluirse la maleimida Alexa Fluor® 647 en una mezcla de maleimidas, junto con mcMMAF y NEM, para crear un panel de conjugados de anticuerpo con una carga promedio deseada para Alexa Fluor® 647 y mcMMAF. Para evaluar un nivel de carga dirigido de AlexaFluor 647, se preparó una serie de conjugados de IgG1 murina usando una mezcla binaria de maleimida AlexaFluor 647 y mcMMAF. La carga promedio de mcMMAF sobre estos conjugados se determinó por cromatografía de PLRP-S, y la carga de Alexa

Fluor® 647 se calculó como (10 – carga de mcMMAF), ya que los sitios de conjugación totales en IgG1 murina completamente reducida es 10. La salida de fluorescencia de estos conjugados se determinó entonces usando un lector de placas de fluorescencia, y se representó en función de la carga de Alexa Fluor® 647 (Figura 4). La Figura 4 ilustra que la fluorescencia aumenta rápidamente al aumentar el nivel de carga hasta un valor máximo correspondiente a aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3 fluoróforos por anticuerpo, luego disminuye constantemente con carga adicional de fluoróforo. Esta disminución en la salida de fluorescencia con carga de fluoróforo creciente es supuestamente debida a la auto-extinción que surge de la estrecha proximidad espacial de los fluoróforos cuando se conjugan con los disulfuros reducidos de un anticuerpo. Basándose en este resultado, se seleccionó una carga de fluoróforo de aproximadamente 3 por anticuerpo. A este nivel de carga no solo la salida de fluorescencia sería máxima (produciendo la mayor sensibilidad en ensayos fluorescentes), sino que la variación en la fluorescencia en función de la carga de fluoróforo también será mínima. Esto garantizará que pequeñas variaciones en la carga de fluoróforo a través de un panel de anticuerpos no producirán grandes diferencias en la salida fluorescente, un punto importante si la fluorescencia va a usarse para cuantificar las concentraciones de conjugado.

También se determinó la relación de la absorbancia a 650 nm con respecto a 280 nm para cada uno de los conjugados de fluoróforo-fármaco descritos anteriormente. Estas relaciones se muestran en la Figura 5, representada contra los datos de fluoróforos por anticuerpo. En la región de 2,5 a 3 fluoróforos por anticuerpo, el cambio en la relación de absorbancia de 650 nm / 280 nm es lineal con el cambio en el nivel de carga, y la ecuación de esta línea puede usarse para determinar la carga de fluoróforo en conjugados de anticuerpo AF647 - mcMMAF mixtos a partir de los valores de absorbancia medidos.

Ejemplo 4 - Método a modo de ejemplo de adaptación de la relación de entidades químicas con el fin de lograr un nivel de carga de fármaco deseado

Como se describe en el Ejemplo 3, un número a modo de ejemplo de fluoróforos por anticuerpo es aproximadamente 3. Suponiendo que las muestras que contienen anticuerpo son de isotipos IgG1 e IgG2a murinas y el nivel de carga deseado para fluoróforos es 3, podría lograrse un nivel de carga de fármaco de 7 preparando la mezcla apropiada de maleimida AF647 y mcMMAF. Sin embargo, puede lograrse un nivel más bajo de carga de fármaco incluyendo un reactivo de terminación tal como N-etilmaleimida (NEM). Así, podría prepararse una mezcla ternaria de AF647, mcMMAF y NEM en una relación apropiada para lograr cualquier nivel deseado de carga de AF647 y de mcMMAF (a condición de que la suma de los dos no sea superior a 10 para una IgG1 o IgG2a murinas). Para determinar la correcta mezcla de estos tres reactivos necesarios para lograr un nivel de carga deseado, se determinaron sus reactividades relativas. Esto se hizo preparando mezclas 1:1 de mcMMAF : NEM y AF647 : NEM y haciendo reaccionar estas mezclas con una IgG1 murina completamente reducida inmovilizada sobre proteína G. El nivel de carga de fluoróforo en el conjugado de AF647 resultante se determinó a partir de su relación de absorbancia de 650 nm / 280 nm por referencia a la Figura 5, mientras que la carga de mcMMAF en el conjugado de fármaco resultante se determinó por cromatografía de PLRP. Estos datos se muestran en la tabla a continuación; la fracción molar en el anticuerpo es la carga de cada reactivo (AF647 o mcMMAF) dividida entre 10, el número total de maleimidias que se conjugan con la IgG1 murina reducida; la fracción molar de NEM es 1 menos la fracción molar de reactivo; y la reactividad relativa es la relación de la fracción molar de reactivo con respecto a la fracción molar de NEM. En este análisis, a NEM se le asigna un valor de reactividad relativo de 1.

Mezcla 1:1	Carga	Fracción molar en el anticuerpo	Fracción molar de NEM en el anticuerpo	Reactividad relativa
AF647 : NEM	2,88	0,288	0,712	0,404
mcMMAF : NEM	3,75	0,375	0,625	0,6

Para convertir estos valores de reactividad relativa en una relación apropiada de maleimidias para usar en la mezcla ternaria, es primero necesario definir los niveles de carga deseados de cada reactivo en el anticuerpo conjugado final. Para este ejemplo se usará una carga objetivo de 4,5 mcMMAF, 3 AF647 y 2,5 NEM, suponiendo de nuevo que el conjugado de anticuerpo tendrá 10 sitios disponibles cuando se reduzca. Esto se corresponde con una fracción molar de conjugado de 0,45, 0,3 y 0,25, respectivamente. Los cálculos necesarios se resumen entonces en la tabla a continuación.

Reactivo	Fracción molar conjugada objetivo	Reactividad relativa (véase la tabla anterior)	<u>Fracción molar</u> Reactividad relativa	Fracción molar requerida en la mezcla de maleimida
mcMMAF	0,45	0,6	0,75	0,43
AF647	0,3	0,404	0,74	0,43
NEM	0,25	1	0,25	0,14

Brevemente, el valor objetivo para la fracción molar de conjugado de cada reactivo se divide entre su factor de reactividad relativa que se determinó anteriormente usando mezclas 1:1 de los diferentes reactivos. Este valor se convierte entonces en una fracción molar requerida en la mezcla de maleimida dividiendo el valor entre la suma de los valores para todos los reactivos. Por ejemplo, para mcMMAF, $0,45/0,6 = 0,75$; $0,75 / (0,75 + 0,74 + 0,25) = 0,43$. De este modo, se predeciría una mezcla de mcMMAF, AF647 y NEM en una relación de $0,43 : 0,43 : 0,14$ para dar conjugados de anticuerpo con una carga promedio 4,5, 3 y 2,5 para los tres reactivos, respectivamente. De un modo similar, podrían calcularse diferentes relaciones de los reactivos para lograr diferentes niveles de carga en el conjugado, o podrían calcularse relaciones para otros reactivos una vez sus reactividades relativas se hubieran determinado.

Ejemplo 5 - Demostración de la consistencia de la carga de fármaco a través de muestras

Se preparó una solución de mcMMAF, maleimida AF647 y NEM en una relación de $0,43 : 0,43 : 0,14$ y se usó para conjugar un panel de anticuerpos por los presentes métodos. Estos anticuerpos se habían generado a partir de 1,5 ml de medio de cultivo de hibridomas con empobrecimiento de IgG bovina, usando hibridomas recién fusionados resultantes de una campaña de inmunización murina. Una placa de 96 pocillos de muestras se sometió a análisis para determinar la consistencia de la carga de fármaco y de fluoróforo de los conjugados mezclados resultantes. La carga de fluoróforo se determinó por la relación de absorbancia de 650 nm / 280 nm de cada muestra, medida en un lector de placas de absorbancia, por referencia a la relación lineal mostrada en la Figura 5. Los datos resultantes se muestran en la Figura 6, representados contra la cantidad de conjugado que dio cada muestra; los datos se muestran solo para aquellas muestras que dieron al menos 2,5 µg de conjugado, ya que cantidades más bajas de ésta no produjeron valores de absorbancia a 280 nm significativamente por encima del nivel inicial. Hubo 65 muestras sobre la placa que cumplieron este umbral de 2,5 µg y se representan en la Figura 6. Como puede apreciarse en la figura, la carga está dispersada entre 2 y 4 fluoróforos por anticuerpo, con un media calculada de 3,26 y un coeficiente de variación del 10,2 %. La carga media de 3,26 se diferencia en menos del 10 % de la carga objetivo de 3. Y, lo que es más importante, el intervalo de los niveles de carga de fluoróforo observados entró dentro de la región de la curva de fluorescencia frente a la carga (Figura 4) en la que la fluorescencia no cambia enormemente, debido al fenómeno auto-extintor. En otras palabras, se espera que la diferencia en la fluorescencia observada entre los anticuerpos con 2, 3 o 4 fluoróforos por anticuerpo sea inferior al 20 %. La carga de mcMMAF se determinó por cromatografía de PLRP; un cromatograma de PLRP de muestra de un conjugado de anticuerpo de mcMMAF - AF647 - NEM se muestra en la Figura 7. Esta figura es una transparencia de dos longitudes de onda analíticas, 280 nm para detectar todos los picos que contienen proteína, y 620 nm para detectar aquellos picos que contienen al menos un Alexa Fluor® 647. Como puede apreciarse en esta figura, la cadena ligera con NEM (2,2 minutos) se resuelve ligeramente a partir de la cadena ligera con Alexa Fluor® 647 (2,5 minutos), pero ambas se resuelven bien a partir de la cadena ligera con mcMMAF (3,8 minutos), que ilustra que la columna de PLRP separa bien especies basándose en la carga de mcMMAF, pero no la carga de AF647. Como la cadena ligera contiene solo una cisteína que se reduce por el tratamiento con TCEP, éstas son las únicas especies de cadena ligera presentes, y los picos de NEM y de mcMMAF no tienen absorbancia a 620 nm ya que no contienen AF647. La agrupación de pico de la cadena pesada es más complicada debido al hecho de que con 4 tioles disponibles, cada pico no es una única especie. Por ejemplo, el pico correspondiente a la cadena pesada con 2 copias de mcMMAF (7,7 minutos) es un conjunto de especies de la cadena pesada que también contienen 2 AF647, 2 NEM, o 1 AF647 y 1 NEM; estas diversas especies no se separan por la columna de PLRP. Esta característica de la separación permite usar estos datos para evaluar estrictamente la carga de mcMMAF sin afectarse por la presencia de AF647 o NEM. Usando este método, los niveles de carga de mcMMAF se determinaron para 34 muestras a partir de la placa de sobrenadante de hibridomas, y se representan en la Figura 8 contra la cantidad de conjugado que dio cada muestra. Como puede apreciarse en la figura, la carga se dispersa entre 4 y 6 copias de mcMMAF por anticuerpo, con una media calculada de 4,51 y un coeficiente de variación del 7,75 %. La carga media de 4,51 está exactamente en el nivel objetivo de 4,5. Como puede apreciarse en la figura, hay 3 valores atípicos con niveles de carga superiores a 5; los cromatogramas de PLRP de estas muestras contienen una especie de la cadena pesada con 5 copias de mcMMAF, que indica la presencia de un disulfuro reducible adicional en la cadena pesada de estos anticuerpos (véase la Figura 9 como ejemplo), sugiriendo que estos anticuerpos son del isotipo IgG2b murina. Así, la mayor carga observada en estas muestras no es debida a carga desproporcionada de mcMMAF en comparación con los otros anticuerpos, sino a que estos anticuerpos tienen el 20 % más de tioles disponibles (12 en vez de 10) y, por tanto, se esperaría que se cargaran, con cada reactivo, a niveles del 20 % superiores. Si estos tres se excluyen del análisis y solo se consideran aquellos anticuerpos con 10 tioles disponibles, la carga de mcMMAF media para los 31 anticuerpos es de 4,42 y el coeficiente de variación disminuye al 3,45 %. Estos resultados ilustran la consistencia de la carga de reactivo (mcMMAF y AF647) lograda por el presente método a través de un panel de anticuerpos de isotipo variable y en cantidades variables de un panel de hibridomas recién fusionados.

Ejemplo 6 - Método a modo de ejemplo de preparación de conjugados de anticuerpo cargados con conector de fármaco y agente de terminación

Se prepararon sobrenadantes de hibridoma como soluciones de 4,5 ml en tubos de fondo de redondo de 5 ml. Se añadieron 150 µl de suspensión de resina de proteína G (Millipore ProSep-G) a cada uno. Los tubos se taparon y se giraron durante la noche a 5 °C. También se prepararon dos tubos de control, uno con medio de crecimiento con empobrecimiento de IgG bovina (para servir de blanco) y uno con este mismo medio enriquecido con 100 µg de un

anticuerpo de control.

A la mañana siguiente se transfirió resina de los tubos a una placa filtrante de 96 pocillos de 2 ml con una frita de polipropileno de 2,5 μ m (Seahorse Bioscience) usando un pipeteador de matrices de 1250 μ l. El sobrenadante en la placa filtrante se pasó a través por breve aplicación de vacío. Después de haberse secado todos los pocillos (< 30 segundos), la placa se centrifugó a 500 x g durante 3 minutos para garantizar la completa bajada de todos los fluidos y resina. Después de la centrifugación, la placa filtrante se volvió a colocar en el colector y cada pocillo recibió 500 μ l de PBS. La placa se agitó entonces a 1200 RPM en la Thermomixer durante 30 segundos para suspender la resina. Entonces, el PBS se pasó a través por vacío. Este proceso se repitió dos veces, durante un total de 3 lavados con PBS. Este proceso se repitió entonces con 3x PBS, y luego seguido de otro lavado con PBS. Tras este lavado final, la placa se centrifugó como antes.

Después, los anticuerpos unidos se redujeron añadiendo 500 μ l de TCEP 20 mM en KPO₄ 250 mM, NaCl 150 mM, pH 7, EDTA 1 mM y agitando durante 2 horas a 37 °C en la Thermomixer. Tras la reducción, la solución de TCEP se hizo pasar a través por vacío y a continuación se centrifugó como antes, luego se lavó con PBS + EDTA 1 mM como se ha descrito anteriormente. Esto se repitió 4x, durante un total de 5 lavados.

Después, los anticuerpos unidos se conjugaron con una mezcla de NEM y mc-MMAF en una relación molar de 4:6. Se preparó una solución madre de NEM + mc-MMAF a una concentración de maleimida total de 12 mM por adelantado. Se añadieron 1,1 ml de esta solución a 55 ml de 10 % de DMSO, se transfirieron a un depósito multicanal, y se añadieron 500 μ l a cada pocillo de la placa filtrante, que luego se agitó durante 30 minutos a 22 °C. Tras la conjugación, la solución de maleimida se hizo pasar a través por vacío y luego se centrifugó como antes. La velocidad de la centrifuga aumentó a 1500x g para completar el secado. Los pocillos se lavaron entonces dos veces con 500 μ l de 10 % de DMSO en PBS, luego tres veces con PBS.

Los ADC unidos se eluyeron entonces añadiendo 200 μ l de glicina 100 mM, pH 2,0, a cada pocillo y agitando durante 3 minutos a 1200 RPM, 22 °C, en la Thermomixer. Mientras que se agitaba, se añadieron 20 μ l de tampón de neutralización (fosfato dibásico 1 M + 0,1 % de Tween-20) a cada pocillo de una placa de recogida de 350 μ l. Cuando habían transcurrido 3 minutos, los ADC se eluyeron en la placa de recogida centrifugando a 1500 x g durante 6 minutos.

Se transfirieron 200 μ l de cada solución de ADC a una placa de ensayo Costar UV. Se preparó una segunda placa con tampón de elución neutralizado para servir de blanco. Se llevaron a cabo mediciones a A280 con un lector de placas SpectraMax de Molecular Devices para determinar las concentraciones de proteína.

Finalmente, los ADC se esterizaron por filtración. En BSC, se fijó una placa filtrante de 0,2 μ m estéril (Millipore) a una placa de recogida de 1 ml estéril (Matrix) usando cinta de laboratorio. Entonces se añadieron las soluciones de ADC a la placa filtrante y se centrifugaron a 500 x g durante 3 minutos. El ensamblaje se transfirió entonces a BSC y se desensambló, a continuación se tapó la placa de recogida con una estera de tapa estéril (Matrix).

Ejemplo 7 - Método a modo de ejemplo de preparación de conjugados de anticuerpo cargados con conector de fármaco, agente de terminación y fluoróforo

Se sembraron hibridomas recién fusionados en medio de metilcelulosa (Genetix) que contenía HAT y anti-IgG de ratón fluorescentemente marcada (Genetix). Se seleccionaron colonias productoras de IgG clonales y se depositaron en una placa de 96W que contenía HSFM (InVitrogen) más factor de clonación con empobrecimiento de IgG (Roche). Se incubaron diluciones cuádruples de sobrenadantes de cultivo de hibridoma no purificado con células tumorales diana en un ensayo homogéneo que contenía 100 ng/ml de anticuerpo secundario anti-ratón marcado con Cy5 (Jackson Labs). La unión de hibridomas a las células tumorales se detectó usando un FMAT8200 (Applied Biosystems) y se expandieron pocillos positivos en placas de 48W que contenían 2 ml de HSFM (InVitrogen) más factor de clonación con empobrecimiento de IgG. Se usaron los anticuerpos de sobrenadantes extinguidos en 48W para la purificación y conjugación en fase sólida.

Se transfirieron sobrenadantes de hibridoma (1,5 ml) a placas de pocillos profundas de 96 pocillos con una frita de polipropileno de 0,45 μ m (Seahorse Bioscience). Para permitir la cuantificación de la concentración de conjugado por fluorescencia, se incluyó un anticuerpo murino patrón en la conjugación. Se dispusieron 50 μ g del anticuerpo patrón en 4 pocillos de la placa con medio de blanco (200 μ g totales). Adicionalmente, 3 pocillos contuvieron solo medio de blanco para la determinación de la fluorescencia de fondo.

Se dispusieron 100 μ l de PBS en cada pocillo de una placa filtrante de pocillos profundos de 96 pocillos ajustada a un filtro de polipropileno de 2,5 μ m (Seahorse Bioscience). Se añadieron 20 μ l de suspensión de resina de proteína G (GE Life Sciences GammaBind Plus) a cada pocillo.

Se dispuso la placa filtrante que contenía la resina de proteína G como placa receptora en un colector de vacío, y se ensambló el colector. La placa filtrante de 0,45 μ m que contenía las muestras de anticuerpo y patrones se dispuso encima del colector, y los sobrenadantes se transfirieron a él. Aplicando vacío, los sobrenadantes se filtraron

entonces a través de los filtros de 0,45 µm en la placa que contenía la resina de proteína G. La placa de resina se agitó entonces durante 2 horas a temperatura ambiente a 1200 RPM usando una Thermomixer de Eppendorf para efectuar la unión a la proteína G. El sobrenadante residual se filtró entonces en una placa receptora de pocillos profundos de 2 ml por centrifugación a 500 x g durante 5 minutos.

Se añadió a la placa una solución de tricarbometilfosfina 10 mM (TCEP) en fosfato de potasio 100 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM (150 µl por pocillo). La placa se agitó entonces como antes durante 30 minutos, luego se sacó del agitador y se centrifugó durante 2 minutos a 500 x g. La resina se lavó cuatro veces con 500 µl de PBS que contenía EDTA 1 mM, con filtración a vacío tras cada lavado. Tras el lavado final, se añadieron otros 500 µl de PBS / EDTA y se eliminaron por centrifugación durante 3 minutos a 500 x g.

Se prepararon soluciones madre individuales de conector de fármaco (mcMMAF), Alexa Fluor® 647 y NEM a 10 mM en DMSO. Estas soluciones madre se combinaron entonces en una única solución a la siguiente relación para la conjugación:

3:3:1 de mcMMAF: Alexa Fluor® 647 : NEM

Se disolvieron 140 µl de esta solución en 15 ml de PBS / EDTA, y se añadieron 150 µl a cada pocillo de la placa lavada. La placa se agitó entonces como antes durante 15 minutos, luego se sacó del agitador y se centrifugó durante 2 minutos a 500 x g. La resina se lavó cuatro veces con 500 µl de PBS, con filtración a vacío tras cada lavado. Tras el lavado final, se añadieron otros 500 µl de PBS y se eliminaron por centrifugación durante 3 minutos a 500 x g.

Se añadieron 10 µl de fosfato de potasio 1 M a pH 7,4 a cada pocillo de una placa de ensayo de fondo claro de 96 pocillos de 350 µl. La placa de resina se dispuso encima de la placa de ensayo y se añadieron 100 µl de tampón de elución (glicina 50 mM a pH 2,5 + 0,08 % de Tween-20) a cada pocillo. La placa se agitó suavemente por balanceo manual durante 2 minutos, luego se centrifugó durante 2 minutos a 500 x g para recoger los conjugados de anticuerpo eluidos en la placa de ensayo. La placa de ensayo se dispuso inmediatamente en un lector de placas de fluorescencia (Molecular Devices) y se agitó durante 10 segundos usando el agitador del lector de placas para garantizar la mezcla completa del tampón de neutralización en el tampón de elución. Entonces se midió la fluorescencia de cada pocillo a 675 nm usando una excitación de 635 nm con un filtro de corte de 665 nm. Se extrajeron las soluciones en los pocillos que contenían los patrones y se reunieron en una única solución patrón, y la concentración de este patrón se determinó por un método de absorbancia a A280 convencional en una cubeta de 1 cm. Entonces se preparó una serie de dilución de este patrón (usando tampón de elución neutralizado como diluyente) hasta una concentración de 1 µg/ml. Entonces se transfirieron 110 µl de cada patrón a una placa de ensayo de fondo claro de 350 µl limpia y la fluorescencia se midió de nuevo en el lector de placas. Se ajustó una curva polinómica de segundo orden a los valores de fluorescencia de los patrones, y las concentraciones de las muestras se asignaron por interpolación a esta curva patrón.

Finalmente, los ADC se esterilizaron por filtración. En BSC, se fijó una placa filtrante de 0,2 µm estéril (Millipore) a una placa de recogida de 1 ml estéril (Matrix) usando cinta de laboratorio. Entonces se añadieron las soluciones de ADC a la placa filtrante y se centrifugaron a 500 x g durante 3 minutos. El ensamblaje se transfirió entonces a BSC y se desensambló, a continuación se tapó la placa de recogida con una estera de tapa estéril (Matrix).

Se probaron conjugados mixtos de anticuerpo que contienen fluoróforo y fármaco en ensayos de unión a célula y de citotoxicidad. Para los ensayos de unión basados en células, el panel de anticuerpos se diluyó a 1:200 y 1:1000 en PBS + 2 % de suero y se incubó sobre células diana durante 2 horas a temperatura ambiente en placas negras de 96W. Se usó un anticuerpo de control en cada placa para generar una curva de unión de saturación para formas humanas y de cino del antígeno. Las placas se analizaron entonces en un FMAT8200 y los valores de intensidad de fluorescencia media para cada dilución se representaron en la curva de unión de saturación para estimar la afinidad por el anticuerpo de prueba en formas humanas y de cino del antígeno. Los hibridomas que mostraron unión equivalente a antígeno humano y de cino se adelantaron para estudios de citotoxicidad. Los estudios de citotoxicidad se hicieron sembrando 5.000 células por pocillo en el medio de crecimiento apropiado. Los conjugados mixtos se añadieron a una dilución final de 1:100 y 1:1000, respectivamente. Se incubaron células tumorales con conjugados de fármaco/fluoróforo durante 96 horas a 37 °C. Se usó Cell Titer Glo (Promega) para medir la viabilidad celular y se evaluó la potencia de conjugados de fármaco/fluoróforo basándose en el porcentaje de viabilidad con respecto a células de control no tratadas. Los conjugados de fármaco/fluoróforo que produjeron <70 % de viabilidad de células tumorales a concentraciones 1 nM se adelantaron para prueba adicional.

Ejemplo 8 - Agotamiento de IgG

Se usa comúnmente factor de clonación como componente de medio en la expansión de líneas celulares de hibridoma después de la fusión con linfocitos B murinos. El factor de clonación contiene mediadores celulares importantes que se recogieron del sobrenadante de células prósperas sanas y éstos ayudan a nuevas fusiones de hibridoma a recuperarse y a empezar a crecer más robustamente. Se sospecha que el sobrenadante recogido de las células prósperas sanas que constituye el factor de clonación contiene suero bovino como componente del medio que incluiría albúmina bovina, IgG y otras proteínas del suero. En este caso, es la IgG bovina la que es preocupante

debido a que incluso una pequeña cantidad de IgG contaminante puede afectar la recuperación cuantitativa de los anticuerpos y a la cuantificación de los ADC resultantes.

- 5 El método para eliminar la IgG bovina del factor de clonación se realiza del siguiente modo. Se equilibra una columna de proteína G de 5 ml con 1X PBS (5 volúmenes de columna, CV), 25 ml. Los contenidos del factor de clonación de hibridomas se cargan en una jeringa de 60 cc. Una jeringa está unida a la columna de proteína G y conectada a una bomba de jeringa. La bomba se establece a 3 ml/min, el factor de clonación se pasa sobre la columna de proteína G y se recoge el efluente. El efluente contiene el factor de clonación con empobrecimiento de IgG. La IgG bovina se unirá a la columna de proteína G. El factor de clonación de hibridomas con empobrecimiento de IgG se esteriliza por filtración en una vitrina de bioseguridad usando un filtro de jeringa de 0,22 μ m.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de conjugados de anticuerpo para su uso en ensayos de cribado de anticuerpos que comprende las etapas de:

proporcionar una pluralidad de muestras que contienen anticuerpo que varían con respecto a la cantidad de anticuerpo y a la secuencia de anticuerpo a condición de que, en una mayoría de la pluralidad de las muestras que contienen anticuerpo, sustancialmente todo el anticuerpo presente en una única muestra sea de la misma secuencia;

inmovilizar los anticuerpos sobre un soporte sólido para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados;

reducir completamente los enlaces disulfuro reducibles de los anticuerpos inmovilizados para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados reducidos, en donde la reducción es selectiva para enlaces disulfuro reducibles;

y
o bien

a) hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con un agente de terminación, un fármaco o un conector de fármaco, y opcionalmente un agente de detección, para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden conjugados de anticuerpo inmovilizado, en donde el agente de terminación, el fármaco o el conector de fármaco y el agente de detección opcional reaccionan selectivamente con tioles reactivos, el agente de terminación, el fármaco o el conector de fármaco y el agente de detección se proporcionan en exceso molar y la relación de agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de fármaco;

o bien

b) hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con un agente de terminación y un agente de detección para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden conjugados de anticuerpo inmovilizado, en donde el agente de terminación y de detección reaccionan selectivamente con tioles reactivos, en donde el agente de terminación y el agente de detección se proporcionan en exceso molar y la relación de agente de terminación y agente de detección está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de agente de terminación y/o de agente de detección; y

eluir los conjugados de anticuerpo para proporcionar una pluralidad de composiciones de conjugado de anticuerpo.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que los anticuerpos comprenden uno o más dominios Fc y la inmovilización de los anticuerpos sobre el soporte sólido comprende la unión al soporte sólido a través de uno o más dominios Fc.

3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y, opcionalmente, un agente de detección, para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden conjugados de anticuerpo inmovilizado, en donde el agente de terminación, el fármaco o el conector de fármaco y el agente de detección opcional reaccionan selectivamente con tioles reactivos, agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y agente de detección opcional se proporcionan en exceso molar y la relación de agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y el agente de detección opcional está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de fármaco.

4. Un método según la reivindicación 3 que comprende las etapas de:

proporcionar una primera y una segunda muestras que contienen anticuerpo en donde la primera y la segunda muestras que contienen anticuerpo varían con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo, a condición de que sustancialmente todo el anticuerpo presente en la primera muestra sea de la misma secuencia y sustancialmente todo el anticuerpo presente en la segunda muestra sea de la misma secuencia;

inmovilizar los anticuerpos sobre un soporte sólido para proporcionar una primera y una segunda muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados;

reducir completamente los enlaces disulfuro reducibles de los anticuerpos inmovilizados para proporcionar una primera muestra que comprende anticuerpos inmovilizados reducidos y una segunda muestra que comprende anticuerpos inmovilizados reducidos, en donde la reducción es selectiva para enlaces disulfuro reducibles;

hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y, opcionalmente, un agente de detección para proporcionar conjugados de anticuerpo inmovilizado, en donde el agente de terminación, el fármaco o el conector de fármaco y el agente de detección opcional reaccionan selectivamente con tioles reactivos, el agente de terminación, el fármaco o el conector de fármaco y el agente de detección opcional se proporcionan en exceso molar y la relación de agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y agente de detección opcional está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de fármaco; y

eluir los conjugados de anticuerpo para proporcionar una primera y una segunda composiciones de conjugado de

anticuerpo-fármaco.

5. Un método según la reivindicación 4, en el que los enlaces disulfuro reducibles son los enlaces disulfuro intercatenarios de origen natural del anticuerpo y el anticuerpo en la primera y la segunda muestras que contienen anticuerpo tienen el mismo número de enlaces disulfuro reducibles y los anticuerpos inmovilizados reducidos se ponen en contacto con la misma relación de agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y agente de detección opcional.

6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que los anticuerpos inmovilizados reducidos se hacen reaccionar con un agente de detección.

7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que tras la elución de los conjugados de anticuerpo se determina la cantidad real o relativa de anticuerpo presente en las composiciones de conjugado de anticuerpo.

8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo, presente en las muestras que contienen anticuerpo antes de la inmovilización, es impuro.

9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que no se conoce la cantidad de anticuerpo presente en las muestras que contienen anticuerpo antes de la inmovilización, la reducción, la conjugación y la elución.

10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo en las muestras que contienen anticuerpo es de la misma especie.

11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en el que la carga de conector de fármaco entre las muestras es sustancialmente uniforme.

12. Un método según la reivindicación 11, en el que las composiciones de conjugado de anticuerpo tienen una carga de conector de fármaco promedio de aproximadamente 4 conectores de fármaco por anticuerpo.

13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las muestras que contienen anticuerpo son muestras de sobrenadante de cultivo celular.

14. Un método según la reivindicación 13, en el que el sobrenadante de cultivo celular es sobrenadante de cultivo de células de hibridoma no purificado o sobrenadante de cultivo de células CHO no purificado.

15. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 14, en el que dicho método comprende además la etapa de:

ensayar una actividad de los conjugados de anticuerpo y
hacer una comparación entre los anticuerpos que constituyen las composiciones de conjugado de anticuerpo basándose en una actividad del conjugado de anticuerpo correspondiente,
en donde la actividad es citotoxicidad.

16. Un método según la reivindicación 3, en el que dicho método comprende las etapas de:

proporcionar una pluralidad de muestras de sobrenadante de hibridoma no purificado que comprende anticuerpo no cuantificado producido a partir de una pluralidad de clones de hibridoma, en donde la pluralidad de muestras varía con respecto a la cantidad de anticuerpo y la secuencia de anticuerpo a condición de que, en una mayoría de la pluralidad de las muestras, sustancialmente todo el anticuerpo presente en cada muestra sea de un único clon de hibridoma;

inmovilizar los anticuerpos no cuantificados sobre un soporte sólido para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados;

reducir completamente los disulfuros intercatenarios de los anticuerpos inmovilizados para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden anticuerpos inmovilizados reducidos;

hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y un agente de detección para proporcionar conjugados de anticuerpo inmovilizado, en donde el agente de terminación, el fármaco o el conector de fármaco y el agente de detección reaccionan selectivamente con tioles reactivos, el agente de terminación, el fármaco o el conector de fármaco y el agente de detección opcional se proporcionan en exceso molar y la relación de agente de terminación, fármaco o conector de fármaco y agente de detección está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de fármaco; y

eluir los conjugados de anticuerpo de los soportes sólidos para proporcionar una pluralidad de composiciones de conjugado de anticuerpo.

17. Un método según la reivindicación 16 que comprende además las etapas de:

determinar la cantidad real o relativa de anticuerpo presente en las composiciones de conjugado de anticuerpo;
ensayar una actividad de los conjugados de anticuerpo; y

5 basándose en los resultados del ensayo y en la cantidad real o relativa de anticuerpo presente en las composiciones de conjugado de anticuerpo, seleccionar un anticuerpo con características deseables.

18. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que sustancialmente todo el medio de cultivo celular usado para la producción de anticuerpos era medio con empobrecimiento de IgG.

10 19. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que en cada muestra de sobrenadante de cultivo celular hay presente de 1 µg a 100 µg, de 1 µg a 50 µg o de 1 µg a 20 µg de anticuerpo.

15 20. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de terminación, el fármaco o el conector de fármaco y el agente de detección comprenden un grupo maleimida.

21. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de detección es un fluoróforo.

20 22. Un método según la reivindicación 21, en el que el agente de detección es un fluoróforo y las composiciones de conjugado de anticuerpo resultantes tienen una carga de fluoróforo promedio de aproximadamente 3 fluoróforos por anticuerpo.

25 23. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 22, en el que el ensayo de cribado de anticuerpos es para seleccionar un anticuerpo para su uso en un conjugado de anticuerpo-fármaco.

30 24. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende hacer reaccionar los anticuerpos inmovilizados reducidos con agente de terminación y un agente de detección para proporcionar una pluralidad de muestras que comprenden conjugados de anticuerpo inmovilizado, en donde el agente de terminación y de detección reaccionan selectivamente con tioles reactivos, el agente de terminación y el agente de detección se proporcionan en exceso molar y la relación de agente de terminación y agente de detección está seleccionada para lograr un nivel deseado de carga de agente de terminación y/o de agente de detección.

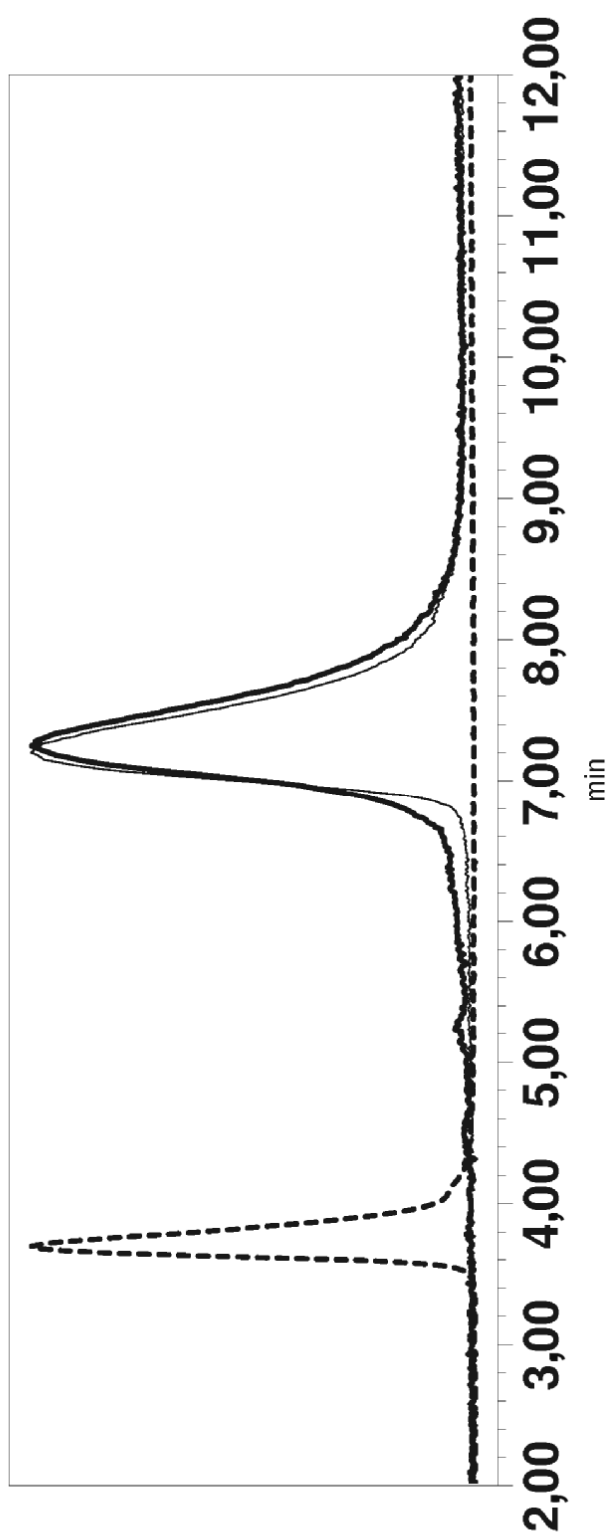


FIGURA 1

**Carga de mcMMAF frente a fracción molar de mcMMAF
en mezclas de mcMMAF / NEM fármacos / Ab**

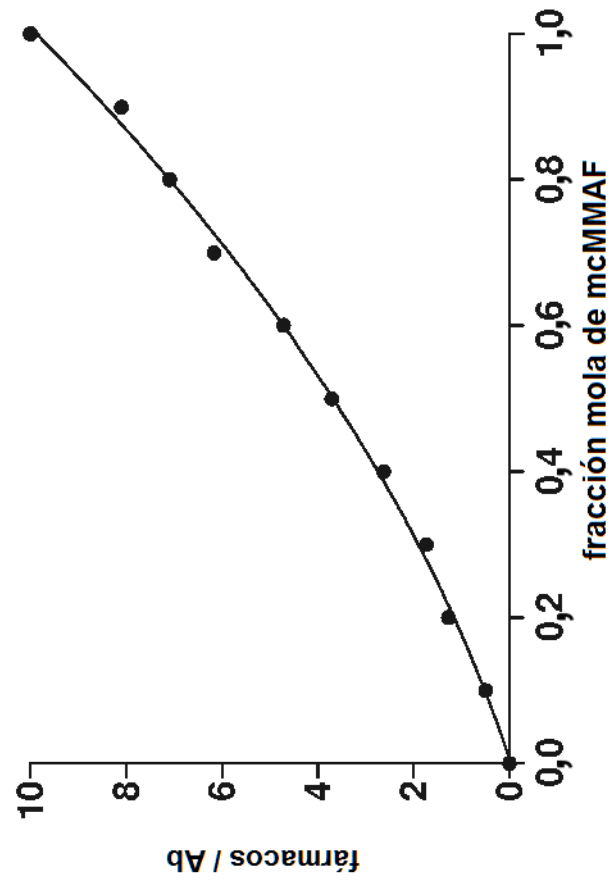


FIGURA 2

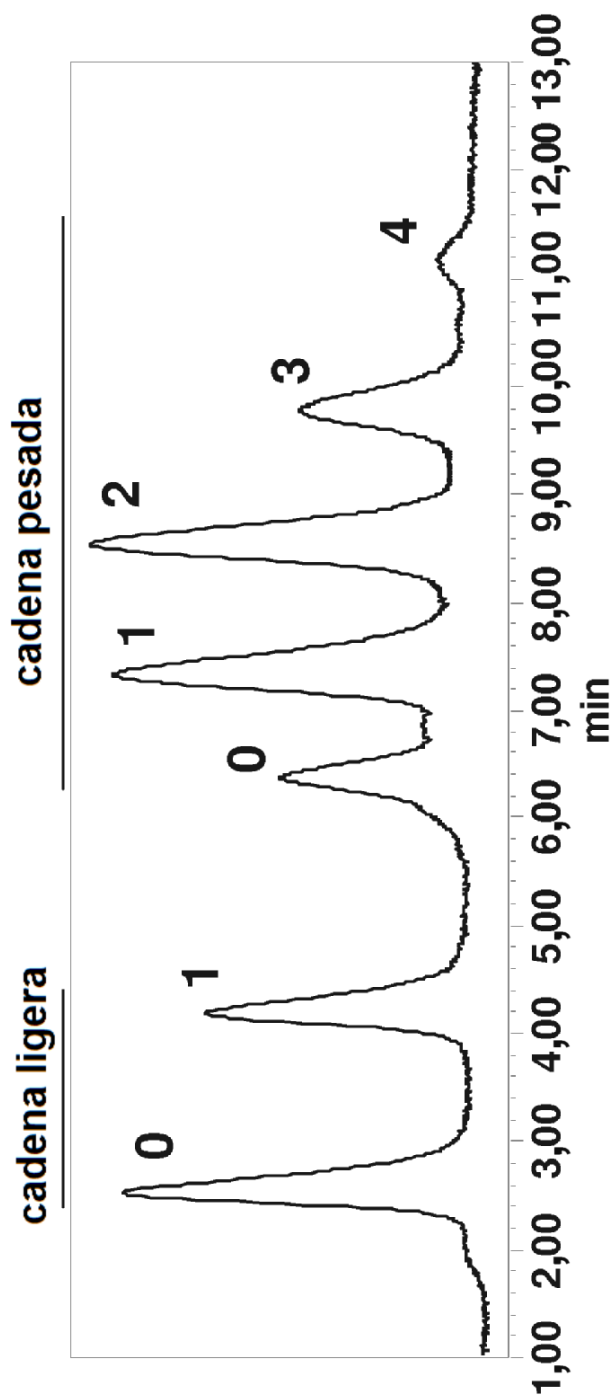


FIGURA 3

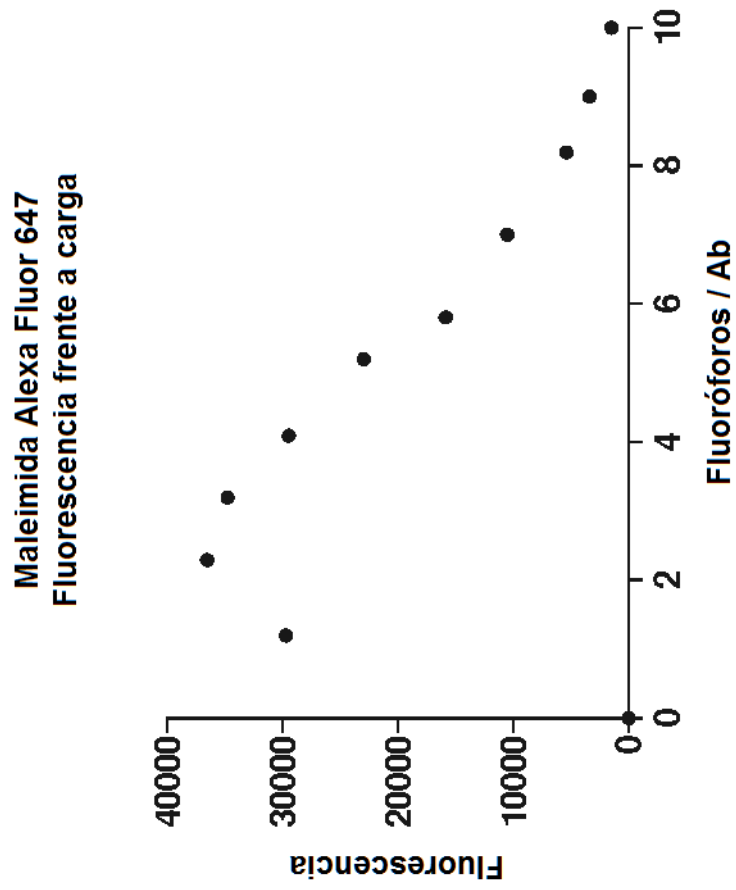


FIGURA 4

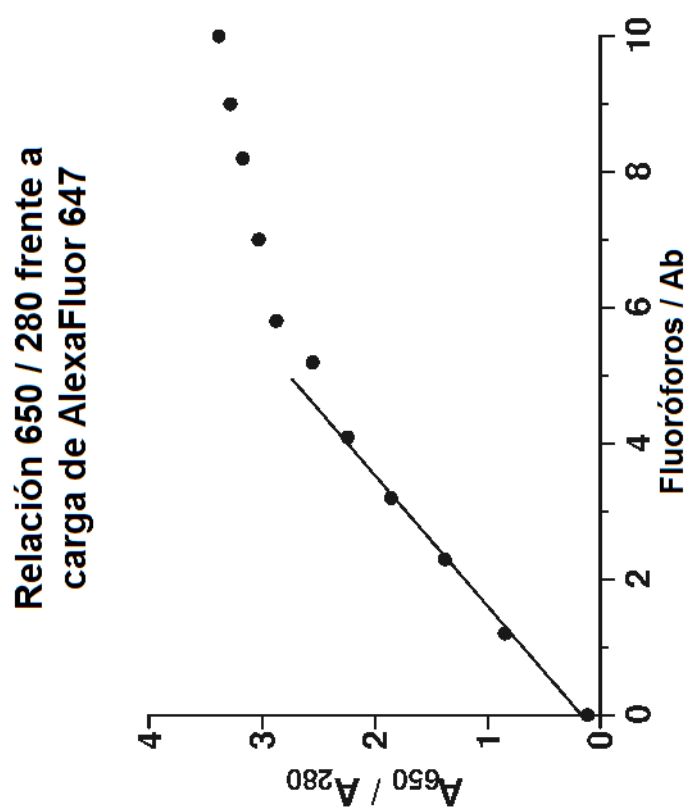


FIGURA 5

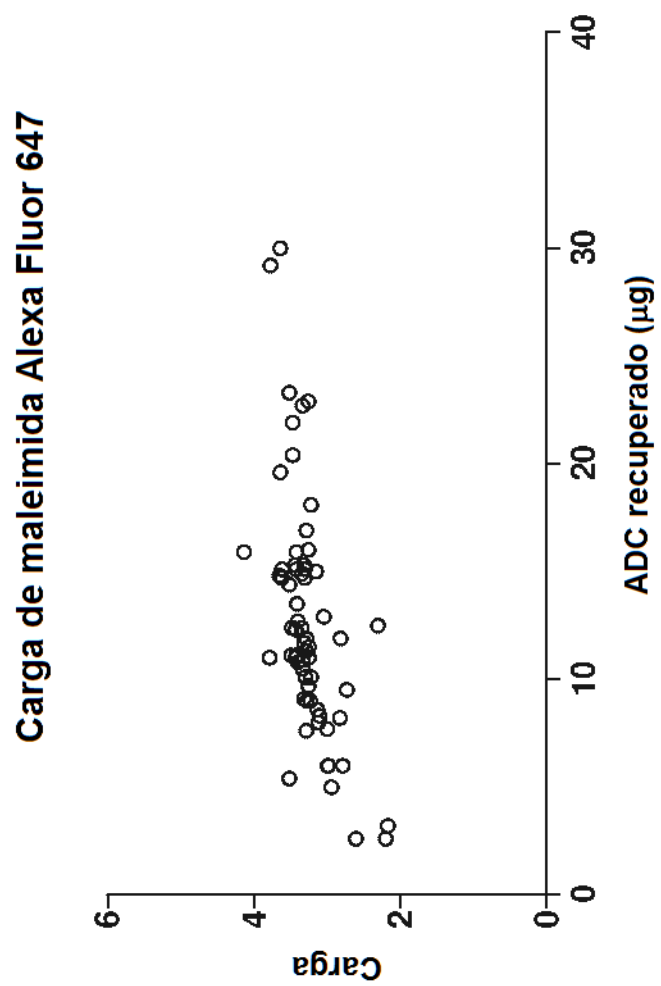


FIGURA 6

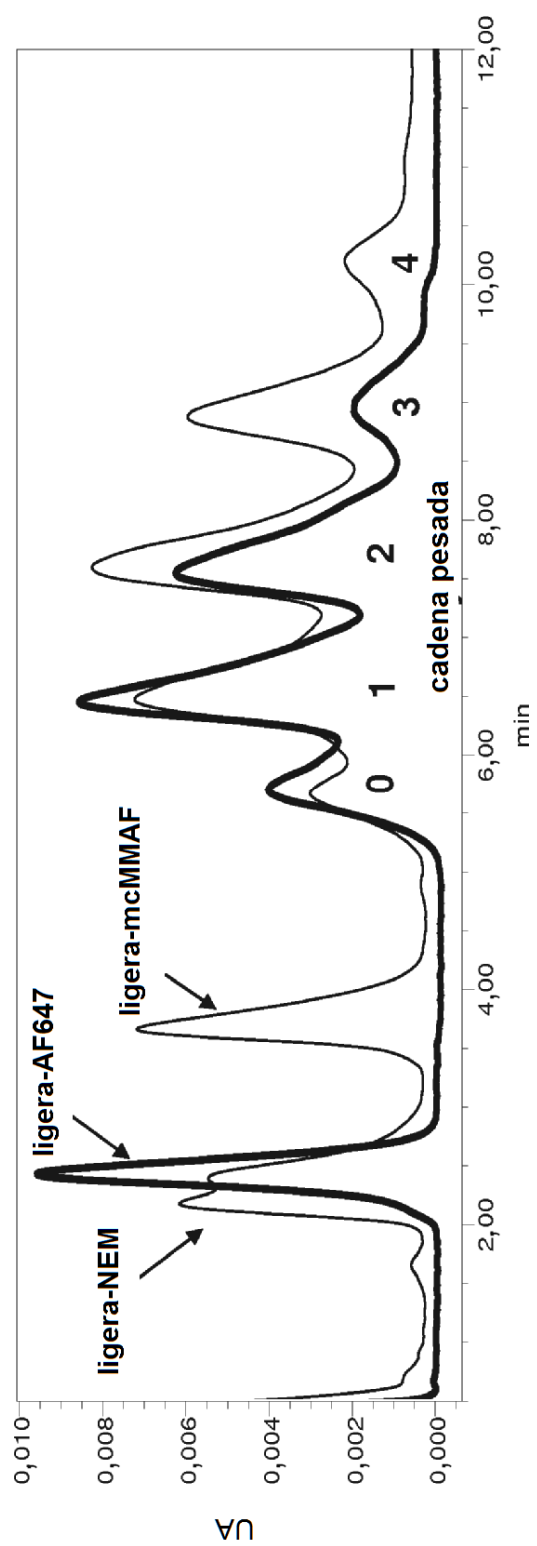


FIGURA 7

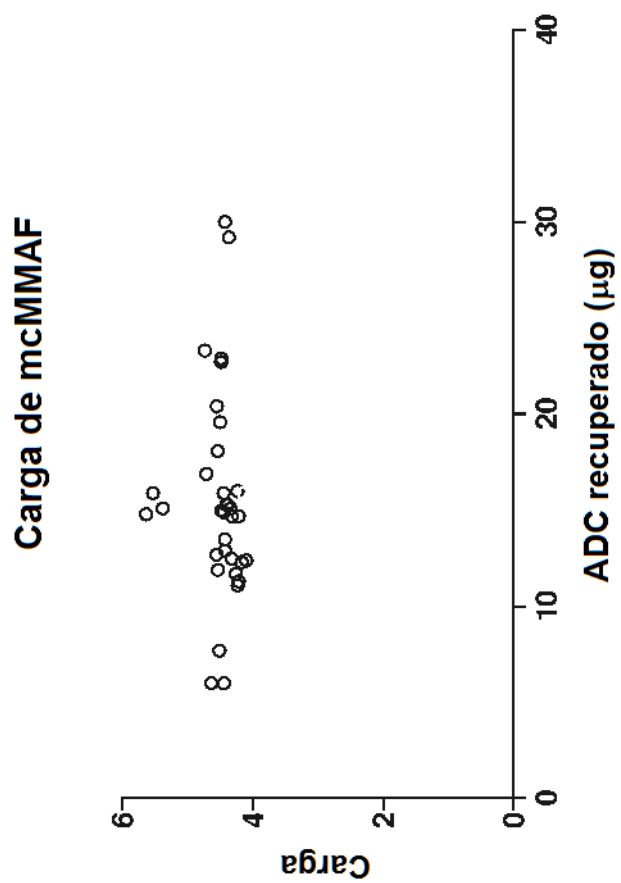


FIGURA 8

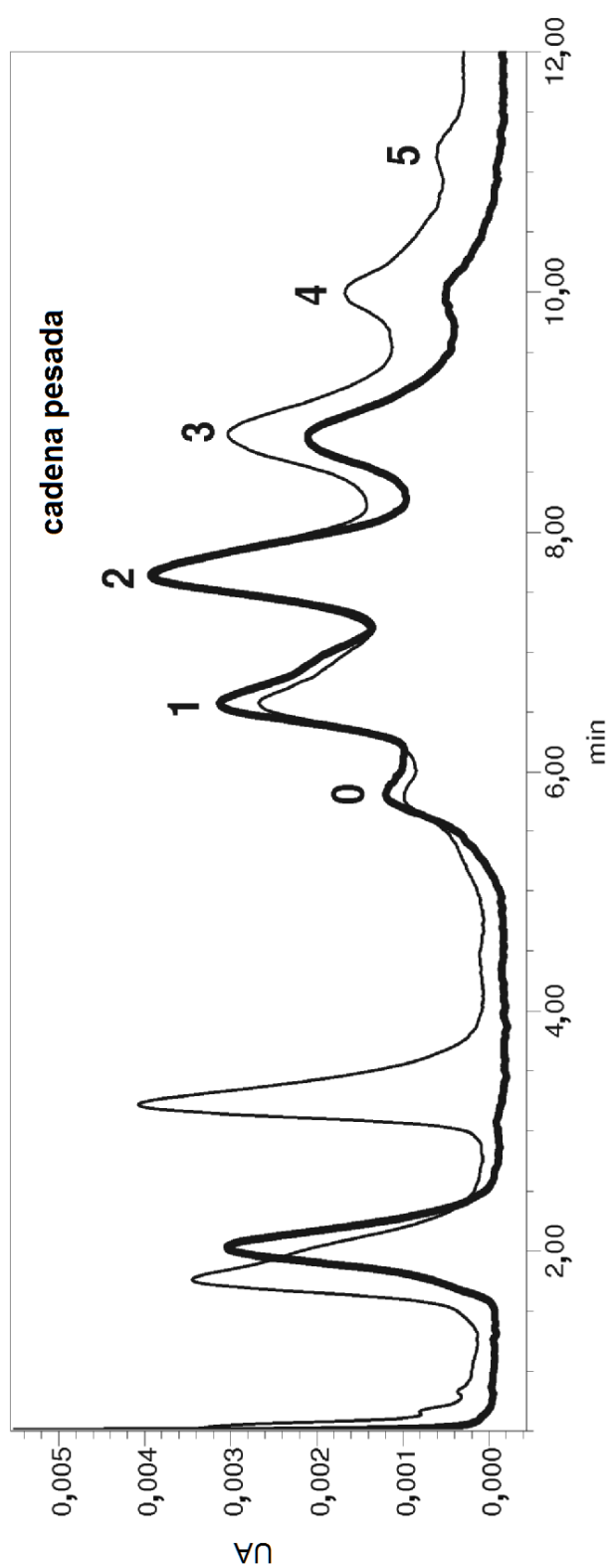


FIGURA 9

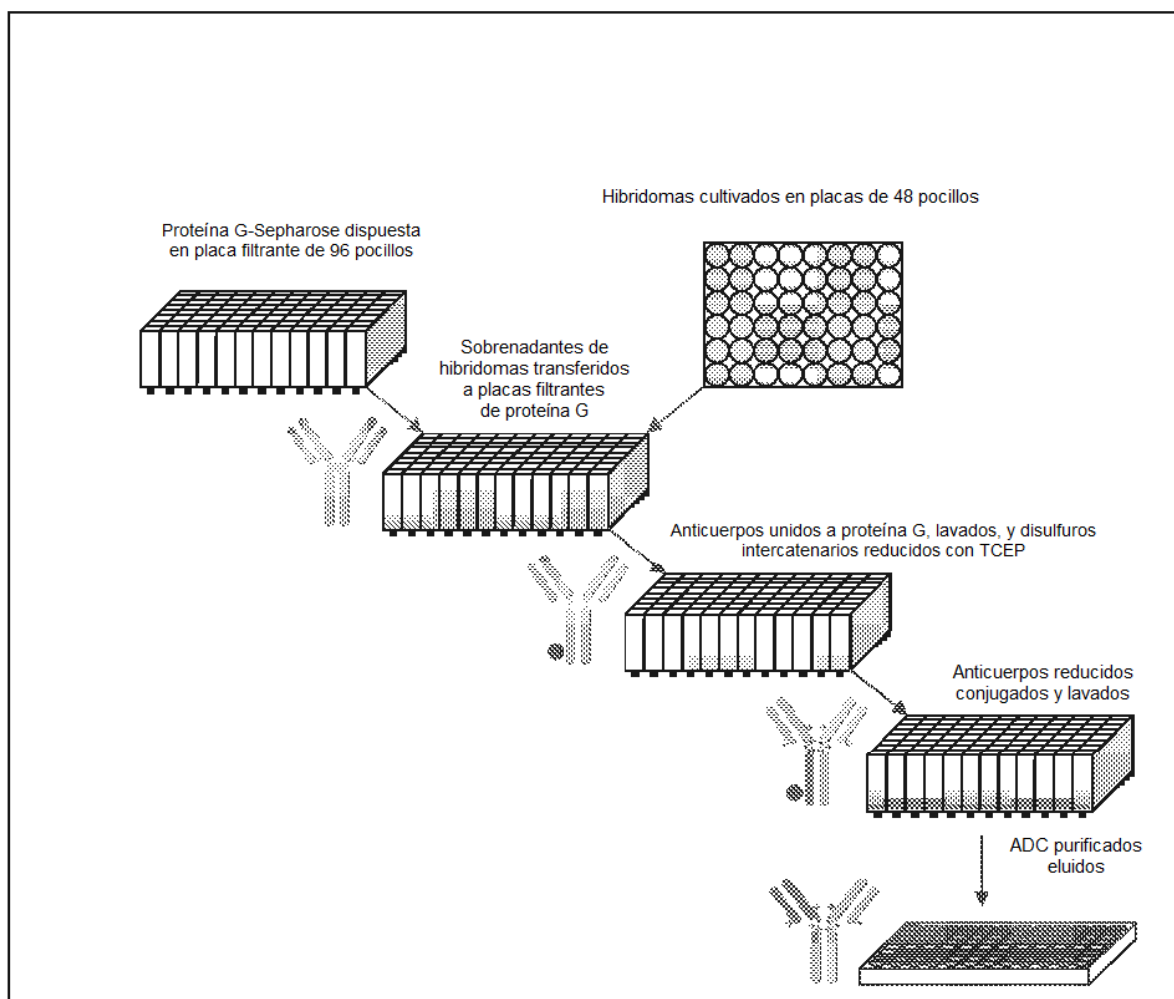


FIGURA 10

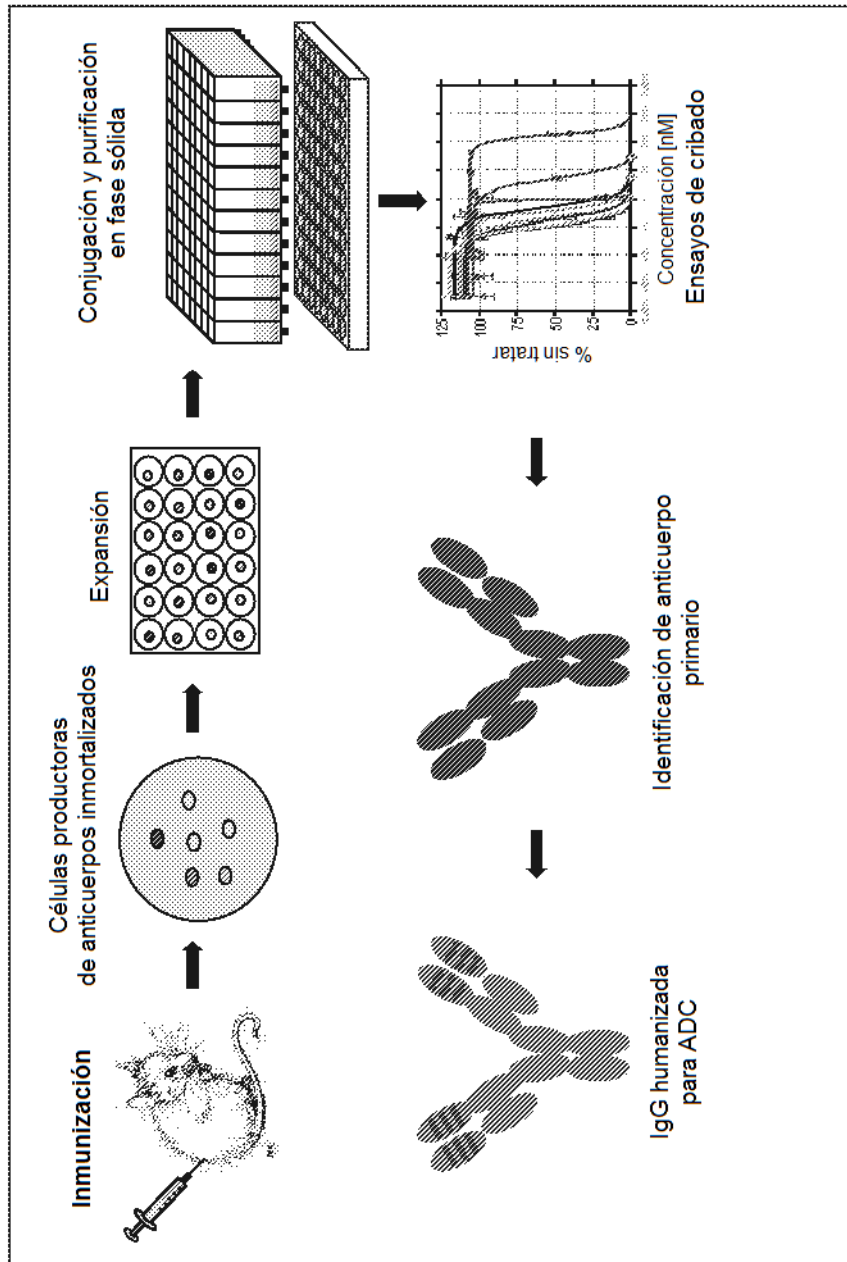


FIGURA 11