

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 304**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2003 PCT/US2003/13910**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2003 WO03092623**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2003 E 03724432 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 1507556**

54 Título: **Conjugados de transportador derivado de caliqueamicina**

30 Prioridad:

02.05.2002 US 377440 P

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

07.12.2016

73 Titular/es:

**WYETH HOLDINGS LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**KUNZ, ARTHUR;
MORAN, JUSTIN, KEITH;
RUBINO, JOSEPH, THOMAS;
JAIN, NEERA;
VIDUNAS, EUGENE, JOSEPH;
SIMPSON, JOHN, MCLEAN;
ROBBINS, PAUL, DAVID;
MERCHANT, NISHITH;
DIJOSEPH, JOHN, FRANCIS;
RUPPEN, MARK, EDWARD;
DAMLE, NITIN, KRISHNAJI y
POPPLEWELL, ANDREW, GEORGE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 593 304 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

Conjugados de transportador derivado de caliqueamicina

Campo de la invención

5 La presente invención divulgación se refiere a los procedimientos para la producción de conjugados de fármaco/transportador citotóxico monomérico (los "conjugados") con mayor carga de fármaco y fracción baja de conjugado sustancialmente reducida (LCF). En particular, la invención/divulgación se refiere a conjugados de caliqueamicina con anticuerpos monoméricos dirigidos contra CD22. Se refiere también a los conjugados de la invención, a los procedimientos de purificación de los conjugados, la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados, y a los usos de los conjugados.

Antecedentes de la invención

10 Los conjugados de fármacos desarrollados para farmacoterapia sistémica son agentes citotóxicos específicos de diana. El concepto implica el acoplamiento de un agente terapéutico a una molécula transportadora con especificidad para una población de células diana definida. Los anticuerpos con elevada afinidad para los antígenos son una elección natural como restos directores. Con la disponibilidad de anticuerpos monoclonales de elevada afinidad, las perspectivas de los agentes terapéuticos dirigidos contra anticuerpos se han vuelto prometedoras. Las sustancias tóxicas que se han conjugado con anticuerpos monoclonales incluyen toxinas, fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, modificadores de la respuesta biológica, y radionucleidos. Los conjugados de anticuerpo-toxina se denominan frecuentemente inmunotoxinas, mientras que los inmunoconjugados que consisten en anticuerpos y fármacos de bajo peso molecular tales como metotrexato y adrimicina se denominan quimioinmunoconjugados. Los inmunomoduladores contienen modificadores de la respuesta biológica conocidos por tener funciones reguladoras como linfoquinas, factores de crecimiento, y factor del veneno de la cobra activador del complemento (CVF). Los radioinmunoconjugados consisten en isótopos radioactivos que se pueden usar como agentes terapéuticos para destruir células por su radiación o utilizarse para la formación de imágenes. Se espera que la administración específica mediada por anticuerpos de fármacos citotóxicos a células tumorales no solo aumente su eficacia antitumoral, sino que evite también la captación no dirigida por tejidos normales, aumentando de esta manera sus índices terapéuticos.

15 La presente invención se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo como vehículo director y que tienen especificidad para determinantes antigénicos sobre la superficie de células malignas conjugadas a un fármaco citotóxico. La invención se refiere a conjugados de fármaco-anticuerpo citotóxicos, en el que el anticuerpo tiene especificidad para determinantes antigénicos en neoplasias de linfocitos B, trastornos linfoproliferativos y enfermedades inflamatorias crónicas. La presente invención también se refiere a procedimientos para producir inmunoconjugados y a su(s) uso(s) terapéutico(s).

20 Se han homologado numerosos agentes terapéuticos basados en anticuerpos para tratar una variedad de enfermedades que incluyen el cáncer y la artritis reumatoide para uso clínico o están en ensayos clínicos para una variedad de neoplasias incluyendo neoplasias de linfocitos B tales como linfoma no de Hodgkin. Uno de dichos agentes terapéuticos basados en anticuerpos es rituximab (Rituxan™), un anticuerpo $\gamma 1$ (región +my1V) humano quimérico no marcado, que es específico del antígeno superficial celular CD20, que se expresa en linfocitos B. Estos agentes terapéuticos basados en anticuerpos se basan tanto en la citotoxicidad mediada por el complemento (CDCC) como en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra los linfocitos B, o en el uso de radionucleidos, tales como ^{131}I o ^{90}Y , que se han asociado a problemas de preparación y uso por los especialistas clínicos y pacientes. En consecuencia, existe necesidad de generación de inmunoconjugados que pueda superar los inconvenientes de los agentes terapéuticos basados en anticuerpos actuales para tratar una variedad de neoplasias que incluyen neoplasias hematopoyéticas del tipo linfoma no de Hodgkin (NHL), que se pueden producir de manera fácil y eficaz, y que se pueden usar repetidamente sin inducir una respuesta inmune.

25 Los inmunoconjugados comprenden un miembro de la potente familia de agentes antibacterianos y antitumorales, conocidos conjuntamente como las caliqueamicinas o el complejo LL-E33288, (véase la patente de los Estados Unidos n.º 4.970.198 (1990)), que se desarrollaron para su uso en el tratamiento de mielomas. La más potente de las caliqueamicinas se designa $\gamma 1$, a la que se hace referencia sencillamente en el presente documento como gamma. Estos compuestos contienen un trisulfuro de metilo que se puede hacer reaccionar con los tioles adecuados para formar disulfuros, introduciendo en el mismo momento un grupo funcional tal como una hidrazida u otro grupo funcional que sea útil en la unión de un derivado de caliqueamicina a transportador (véase la patente de los Estados Unidos n.º 5.053.394). El uso de conjugados monoméricos de derivados/transportadores de caliqueamicina en el desarrollo de tratamientos para una amplia variedad de cánceres ha estado limitado por la disponibilidad de agentes de direccionamiento específicos (transportadores) así como por las metodologías de conjugación que dan como resultado la formación de agregados de proteínas cuando aumenta la cantidad del derivado de caliqueamicina que se conjuga al vehículo (es decir, la carga del fármaco). Debido a que mayores cargas del fármaco aumentan la potencia inherente del conjugado, es deseable tener mucho fármaco cargado en el transportador que sea consistente con la retención de la afinidad de la proteína transportadora. La presencia de la proteína agregada, que puede ser no específicamente tóxica e inmunógena, y por tanto debe eliminarse de las aplicaciones terapéuticas, hace más difícil escalar el procedimiento para la producción de estos conjugados y disminuye el rendimiento de los productos. La cantidad de

caliqueamicina cargada en la proteína transportadora (la carga de fármaco), la cantidad de agregado que se forma en la reacción de conjugación, y el rendimiento de conjugado monomérico purificado final que se puede obtener están relacionados entre sí. Debe llegarse por tanto a un compromiso entre la mayor carga del fármaco y el rendimiento final del monómero ajustando la cantidad del derivado reactivo de caliqueamicina que se añade a la reacción de conjugación. El documento US 5.712.374, Kuntsmann y col., divulgan un procedimiento para preparar conjugados de derivados/transportadores de caliqueamicina monomérica con mayor carga/rendimiento del fármaco y menores niveles de agregación. Los conjugados se preparan incubando un derivado de caliqueamicina y un transportador de proteínico en una solución que comprende una solución tamponada con fosfato y un codisolvente que comprende propilenglicol o terc-butanol. El documento US 183.744, Goldenberg, divulga el uso de anticuerpos e inmunoconjugados que se unen al antígeno CD22, sin embargo, proporcionan un medio eficaz para tratar neoplasias de linfocitos B tal como las formas indolentes y agresivas de linfomas de linfocitos B, y formas agudas y crónicas de leucemias linfáticas. El documento WO 91/09967, Athwal., divulga moléculas de anticuerpo injertadas con CDR, especialmente de anticuerpos dirigidos contra CD4, y los procedimientos para su producción usando tecnología de ADN recombinante y sus usos terapéuticos. Yelton, y col., The Journal of Immunology, 1995, Vol. 155, páginas 1994-2004, divulgan procedimientos para maduración por afinidad de anticuerpos, especialmente la maduración por afinidad del anticuerpo dirigido contra el carcinoma BR96. Siegel, y col., Anal. Chem. 1997, 69, 2716-2726, divulgan la preparación de anticuerpos monoclonales conjugados con derivados de caliqueamicina utilizando cromatografía de exclusión molecular para resolver los derivados conjugados de caliqueamicina de los derivados de caliqueamicina sin reaccionar. Los valores de carga promedio para los derivados de caliqueamicina, cuando están conjugados a los anticuerpos, se calcularon a partir de datos de UV-MALDI/MS, IR-MALDI/EM y IEN/EM. Hinman, y col., Cancer Res 1993; 53:3336-3342, divulgan la preparación y caracterización de conjugados de anticuerpos monoclonales de caliqueamicinas y la evaluación de su inmunoreactividad y citotoxicidad específica frente a células tumorales positivas para el antígeno in vitro e in vivo. Para finalizar las reacciones de conjugación, los conjugados se hicieron pasar por una columna de desalación. El documento EP0263526, Laird, y col., divulgan procedimientos para aislar y purificar conjugados de cadena A de ricina ("srRTA")/anticuerpo y conjugados de TNF/anticuerpos usando una variedad de procedimientos cromatográficos incluyendo HIC y SEC.

La tendencia de los conjugados de fármacos citotóxicos, especialmente de los conjugados de caliqueamicina a agregarse es especialmente problemática cuando se llevan a cabo las reacciones de conjugación con los engarces descritos en la patente de los Estados Unidos N.º 5.877.296 y en la patente de los Estados Unidos N.º 5.773.001. En este caso, un gran porcentaje de los conjugados producidos están en forma agregada, y es muy difícil purificar los conjugados realizados mediante estos procedimientos originales (procedimiento CMA-676) para su uso terapéutico. Para algunas proteínas transportadoras, los conjugados con incluso modestas cargas son virtualmente imposibles de preparar excepto a pequeña escala. En consecuencia, existe una necesidad crítica de mejorar los procedimientos para conjugar fármacos citotóxicos, tales como caliqueamicinas, para transportadores que minimicen la cantidad de agregación y permitan por tanto una carga tan alta como sea posible con un rendimiento razonable del producto.

Anteriormente, se han descrito procedimientos de conjugación para preparar derivados/transportadores de caliqueamicina monomérica con mayor carga/rendimiento del fármaco y agregación disminuida (véase la patente de los Estados Unidos N.º 5.714.586 y la patente de los Estados Unidos N.º 5.712.3749. Aunque estos procedimientos dan como resultado preparaciones de conjugados con un contenido de agregados sustancialmente reducido, se ha descubierto que estos conjugados producidos contienen altos niveles indeseables (45-65 %, HPLC Área %) de una fracción baja de conjugado (LCF), una fracción que consiste en su mayoría en anticuerpo no conjugado. La presencia de la LCF en el conjugado da como resultado un uso ineficaz del anticuerpo, ya que no contiene el fármaco citotóxico. Esto puede competir también con el conjugado del transportador de caliqueamicina a la diana y reducir potencialmente la direccionabilidad de este último dando como resultado una eficacia reducida del fármaco citotóxico. Por tanto, es deseable un procedimiento de conjugación mejorado que daría como resultado niveles significativamente bajos de LCF y que tenga niveles aceptables de agregación, sin alterar significativamente las propiedades físicas de la molécula.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para la producción de conjugados de derivado de fármaco citotóxico/transportador monomérico (los "conjugados") con mayor carga de fármaco y fracción baja de conjugado sustancialmente reducida (LCF). En particular, la divulgación se refiere a la producción un conjugado de derivado-transportador de caliqueamicina monomérica, a los conjugados producidos de acuerdo con el procedimiento de la invención, la invención se refiere a composiciones que comprenden los conjugados producidos de acuerdo con el procedimiento de la invención, a los procedimientos de purificación de los conjugados, y al uso de los conjugados de la invención. Más particularmente, la invención se refiere a procedimiento(s) para producir el anticuerpo dirigido contra CD22 del derivado monomérico de caliqueamicina (CMC-544).

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para preparar una composición que comprende conjugados de derivado monomérico de caliqueamicina/anticuerpo con una fracción conjugada baja (LCF) inferior al 10 por ciento que tiene la fórmula, Pr(-X-S-S-W)_m, en la que:

Pr es un anticuerpo,
X es un engarce hidrolizable que puede liberar el derivado de caliqueamicina procedente del conjugado tras la

unión y la entrada células diana,
W es una caliqueamicina;
m es la carga promedio de un producto de conjugación purificado, de tal manera que el fármaco citotóxico
constituye un 4-10 % del
conjugado en peso; y
(-X-S-S-W)_m es un derivado de caliqueamicina,

comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(1) añadir el caliqueamicina al anticuerpo en el que el derivado de caliqueamicina representa un 4,5-11 % en peso del anticuerpo;

(2) incubar el derivado de fármaco citotóxico y un transportador proteínico en una solución tamponada no nucleófila, compatible con proteínas, que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 8 a 9 para producir un conjugado de fármaco/transportador citotóxico monomérico, en el que la solución comprende además (a) etanol, y (b) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C₆-C₁₈ o su sal, seleccionada entre: decanoato, nanoato 100 mM, undecanoato 20 mM, dodecanoato 5 mM, y en el que la incubación se lleva a cabo a una temperatura que varía entre aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C durante un periodo de tiempo que varía entre aproximadamente 15 minutos a 24 horas; y

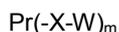
(3) someter la composición producida en la etapa (2) a un procedimiento de separación cromatográfica para separar el conjugado monomérico de derivado de caliqueamicina citotóxica / anticuerpo con una carga en el intervalo de 4 - -10 % en peso de fármaco citotóxico y con una fracción conjugada baja (LCF) por debajo del 10 por ciento de anticuerpo no conjugado, derivado de caliqueamicina, y los conjugados agregados.

La invención proporciona además una composición que comprende conjugados de derivado monomérico de caliqueamicina/anticuerpo anti-CD22 con una fracción conjugada baja (LCF) inferior al 10 por ciento y que tiene la fórmula, Pr(-X-S-S-W)_m, en la que:

Pr es un anticuerpo dirigido contra CD22;
X es un engarce hidrolizable que puede liberar la caliqueamicina procedente del conjugado tras la unión y la entrada células diana;
W es una caliqueamicina;
m es la carga promedio de un producto de conjugación purificado, de tal manera que la caliqueamicina constituye un 4 - 10 % del conjugado en peso; y
(-X-S-S-W)_m es un derivado de caliqueamicina.

La invención proporciona además un medicamento que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de la composición de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo:

En una realización, la presente invención divulga un procedimiento de conjugación mejorado para la producción de los conjugados de fármaco citotóxico monomérico/transportador ("los conjugados") que da como resultado niveles significativamente menores de la LCF (por debajo del 10 por ciento) sin ninguna alteración significativa de las propiedades físicas o químicas de la molécula. La divulgación también divulga una mejora adicional del procedimiento de conjugación que da como resultado no solo una reducción significativa en los niveles de la LCF, sino que también dé como resultado una reducción significativa en la agregación de los procedimientos anteriormente descritos, y produce una carga del fármaco sustancialmente mejorada. Los conjugados de derivado de fármaco monomérico/transportados (los "conjugados") de la presente invención tienen la fórmula:



en la que:

Pr es un transportador proteínico,
X es un engarce que comprende un producto de cualquier grupo reactivo que pueda reaccionar con un transportador proteínico,
W es un fármaco citotóxico;
m es la carga promedio de un producto de conjugación purificado, de tal manera que el fármaco citotóxico constituye un 7-9 % del conjugado en peso; y
(-X-W)_m es un derivado de fármaco citotóxico.

Los conjugados de derivado de fármaco monomérico/transportados (los "conjugados") de la presente invención, en una realización, se generan según el procedimiento de la invención que comprende las etapas de: (1) añadir el derivado de fármaco citotóxico al transportador proteínico en el que el derivado de fármaco citotóxico representa un 4,5 - 11 % en peso del transportador proteínico; (2) incubar el derivado de fármaco citotóxico y un transportador proteínico en una solución tamponada no nucleófila, compatible con proteínas, que tiene un pH en el intervalo de

- aproximadamente 7 a 9 para producir un conjugado de fármaco/transportador citotóxico monomérico, en el que la solución comprende además (a) un cosolvente orgánico adecuado, y (b) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C₆-C₁₈ o su sal, y en el que la incubación se lleva a cabo a una temperatura que varía entre aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C durante un periodo de tiempo que varía entre aproximadamente 15 minutos a 24 horas; y (3) someter el conjugado producido en la etapa (2) a un procedimiento de separación cromatográfica para separar los conjugados monoméricos de derivado de fármaco citotóxico / transportadores proteínicos con una carga en el intervalo de 4 - 10 % en peso de fármaco citotóxico y con una fracción conjugada baja (LCF) por debajo del 10 por ciento de un transportador proteínico no conjugado, derivado de fármaco citotóxico, y los conjugados agregados.
- 5
- 10 En un aspecto de la divulgación, el transportador proteínico del conjugado se selecciona a partir de un grupo que consiste en hormonas, factores de crecimiento, de acuerdo con los anticuerpos de la invención, fragmentos de anticuerpos, y como miméticos de los anticuerpos divulgados, y sus homólogos diseñados mediante ingeniería genética o enzimáticamente.
- 15 En una realización de la invención, el transportador proteínico es un anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo se selecciona entre un grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab y un fragmento F(ab)₂.
- En otra realización, el anticuerpo humanizado se dirige contra el antígeno superficial celular CD22.
- 20 En una realización preferida, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR, y comprende una región variable de la cadena ligera 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19), y una región variable de la cadena pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).
- En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 28.
- 25 En otra realización más preferida, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO:30.
- En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 30.
- 30 En otra realización, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que es una variante del anticuerpo obtenida mediante un protocolo de maduración por afinidad y tiene una especificidad aumentada para CD22 humano.
- En otro aspecto, el fármaco citotóxico usado para generar el conjugado monomérico de fármaco citotóxico / transportador de la presente divulgación es cualquiera de un inhibidor de polimerización de la tubulina, un agente alquilante que se une y perturba el ADN, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de las tirosina quinasas.
- 35 En una divulgación, el fármaco citotóxico se selecciona entre tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, esperamicinas, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifeno, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemisterlinas y maitansinoides.
- En una realización preferida de la invención, el fármaco citotóxico es caliqueamicina, y se selecciona entre gamma caliqueamicina o un derivado de N-acetil gamma caliqueamicina.
- 40 En otro aspecto más, el fármaco citotóxico está funcionalizado con 3 -mercapto-3-metil butanoil hidrazida y conjugado a un transportador proteínico mediante un engarce hidrolizable que puede liberar el fármaco citotóxico a partir del conjugado tras la unión y entrada a las células dianas.
- En una realización preferida de este aspecto, el engarce hidrolizable es ácido 4-(4-acetilfenoxi) butanoico (AcBut).
- 45 En otro aspecto más de la divulgación, se usa ácido octanoico o su sal, o ácido decanoico o su sal como aditivo durante el procedimiento de conjugación para disminuir la agregación y aumentar la carga del fármaco.
- En otro aspecto más de la divulgación, los conjugados de la invención se purifican mediante una etapa de procesamiento mediante separación cromatográfica.
- En una realización, el procedimiento de separación cromatográfica usado para separar el conjugado del derivado-transportador del fármaco monomérico es la cromatografía de exclusión molecular (SEC).
- 50 En otra realización, el procedimiento de separación cromatográfica usado para separar el conjugado del derivado-transportador del fármaco monomérico es la cromatografía de HPLC, FPLC o Sephacryl S-200.

- 5 En una realización preferida, el procedimiento de separación cromatográfica usado para separar el conjugado del derivado-transportador del fármaco monomérico es la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). En una realización especialmente preferida, se lleva a cabo la HIC usando medio cromatográfico Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, medio cromatográfico Butyl Sepharose 4 Fast Flow, medio cromatográfico Octyl Sepharose 4 Fast Flow, medio cromatográfico Toyopearl Ether-650M, medio Macro-Prep methyl HIC o medio Macro-Prep t-Butyl HIC.
- En una realización especialmente más preferida, se lleva a cabo la HIC usando medio cromatográfico Butyl Sepharose 4 Fast Flow.
- 10 En otro aspecto, la divulgación se dirige a un conjugado monomérico de derivado de fármaco citotóxico/transportador producido mediante el procedimiento de la divulgación. En una realización preferida de este aspecto, el fármaco citotóxico usado es caliqueamicina y el transportados utilizado es un anticuerpo.
- En otra realización preferida de la invención, el anticuerpo se selecciona entre un grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab y un fragmento F(ab)₂. En un aspecto más particularmente preferido, se utiliza un anticuerpo humanizado dirigido contra el antígeno superficial celular CD22.
- 15 En una realización, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR, y comprende una región variable de la cadena ligera 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19), y una región variable de la cadena pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).
- En otra realización, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 28.
- 20 En una realización preferida, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO:30.
- En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 30.
- 25 En otra realización adicional más, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que es una variante del anticuerpo obtenida mediante un protocolo de maduración por afinidad tiene una especificidad aumentada para CD22 humano.
- En una realización preferida, el derivado del fármaco citotóxico es una gamma caliqueamicina o una N-acetil gamma caliqueamicina.
- 30 En una realización, el derivado de caliqueamicina está funcionalizado con 3-mercapto-3-metil butanoil hidrazida.
- En otra realización, el engarce utilizado para conjugar el fármaco al transportador es un engarce hidrolizable que puede liberar el fármaco citotóxico del conjugado tras la unión y entrada en células diana. En una realización preferida, el engarce hidrolizable es ácido 4-(4-acetilfenoxi) butanoico (AcBut).
- 35 Otro aspecto de la invención se dirige a un conjugado de derivado monomérico de caliqueamicina / anticuerpo dirigido contra CD22 que tiene la fórmula, Pr(-X-S-S-W)_m en la que: Pr es un anticuerpo dirigido contra CD22; X es un engarce hidrolizable que comprende un producto de cualquier grupo reactivo que puede reaccionar con un anticuerpo; W es un radical de caliqueamicina; m es la carga promedio de un producto de conjugación purificado, de tal manera que la caliqueamicina constituye un 4 - 10 % del conjugado en peso; y (-X-S-S-W)_m es un derivado de caliqueamicina, y generado mediante el procedimiento de la invención.
- 40 En una realización de este aspecto, el anticuerpo se selecciona entre un grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab y un fragmento F(ab)₂.
- En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo dirigido contra CD22 que tiene especificidad para CD22 humano, y comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene al menos una de las secuencias proporcionadas como H1 en la Figura 1 (SEQ ID NO:1) para CDR-H1, como H2 en la Figura 1 (SEQ ID NO:2) o H2' (SEQ ID NO:13) o H2" (SEQ ID NO:15) o H2''' (SEQ ID NO:16) para CDR-H2, o como H3 en la Figura 1 (SEQ ID NO:3) para CDR-H3, y comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene al menos una de las secuencias proporcionadas como L1 en la Figura 1 (SEQ ID NO:4) para CDR-L1, como L2 en la Figura 1 (SEQ ID NO:5) para CDR-L2, o como L3 en la Figura 1 (SEQ ID NO:6) para CDR-L3.
- 45
- 50 En otra realización preferida, el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene al menos al menos una de las secuencias proporcionadas en la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16 para CDR-H2 o SEQ ID NO:3 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene al menos una de las secuencias proporcionadas en la SEQ ID NO:4 para CDR-L1, SEQ ID NO:5 para CDR-L2 o SEQ ID NO:6 para

CDR-L3.

En otra realización más preferida, el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la SEQ ID NO: 2 o la SEC ID NO:13 o la SEQ ID NO:15 o la SEQ ID NO:16 para CDR-H2, la SEQ ID NO:3 para CDR-H3, la SEQ ID NO:4 para CDR-L1, SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

- 5 En otra realización, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo dirigido contra CD22 injertado con CDR y comprende un dominio variable que comprende regiones marco aceptoras humanas y CDR donantes no humanas.

10 En otra realización, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 tiene un marco aceptor humano en el que las regiones del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se basan en una secuencia consenso del subgrupo I humano y comprenden restos donantes no humanos en las posiciones 1,28, 48, 71 y 93. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende además restos no humanos en las posiciones 67 y 69.

15 En una realización preferida, el anticuerpo humanizado injertado con la CDR comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una región marco aceptora humana basada en una secuencia consenso del subgrupo I humano y que comprende además restos donantes no humanos en las posiciones 2, 4, 37, 38, 45 y 60. En otra realización, el anticuerpo injertado con la CDR comprende además un resto donante no humano en la posición 3.

En otra realización adicional, el anticuerpo injertado con la CDR comprende una región variable de la cadena ligera 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) y una región variable de la cadena pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).

En otra realización, el anticuerpo injertado con la CDR comprende una cadena ligera que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO:30.

- 20 En otra realización adicional, el anticuerpo injertado con la CDR comprende una cadena ligera que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 30.

En una realización, el anticuerpo injertado dirigido contra CD22 es una variante del anticuerpo obtenida mediante un protocolo de maduración por afinidad y tiene una especificidad aumentada para CD22 humano.

- 25 En otra realización, el anticuerpo dirigido contra CD22 es un anticuerpo quimérico que comprende las secuencias de los dominios variables de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal que se muestra en la SEC ID N.º:7 y en la SEC ID N.º:8, respectivamente.

30 En otra realización adicional, el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende una CDR híbrida con una secuencia de una CDR donante truncada en la que la porción desaparecida de la CDR donante está sustituida por una secuencia diferente y forma una CDR funcional.

En una realización especialmente preferida, el derivado del fármaco citotóxico es tanto una gamma caliqueamicina como un derivado de N-acetil gamma caliqueamicina.

35 En otro aspecto, la divulgación se dirige a un procedimiento para la preparación de una composición liofilizada estable de un conjugado monomérico de derivado de fármaco citotóxico / transportador producido. En una realización preferida de este aspecto, la composición liofilizada estable del conjugado monomérico de derivado de fármaco citotóxico / transportador se prepara (a) disolviendo el conjugado monomérico de derivado de fármaco citotóxico / transportador a una concentración final de 0,5 a 2 mg/ml en una solución que comprende un crioprotector a una concentración de 1,5 %-5 % en peso, un agente de volumen polimérico a una concentración de 0,5-1,5 % en peso, electrolitos a una concentración de 0,01 M a 0,1 M, un agente facilitador de la solubilidad a una concentración de 40 0,005-0,05 % en peso, agente tamponante a una concentración de 5-50 mM de tal manera que el pH final de la solución es de 7,8-8,2, y agua; (b) dispensando la solución anterior en viales a una temperatura de +5 °C a +10 °C; (c) congelando la solución a una temperatura de congelación de -35 °C a -50 °C; (d) sometiendo la solución congelada a una etapa de criodesecación inicial a una presión de secado primaria de 20 a 80 micrómetros a una temperatura de almacenamiento de -10 °C a -40 °C durante 24 a 78 horas; y (e) sometiendo el producto criodesecado de la etapa (d) 45 a una etapa de secado secundaria a una presión de secado de 20 a 80 micrómetros a una temperatura de almacenamiento de +10 °C a + 35 °C durante 15 a 30 horas.

50 En una divulgación, el crioprotector usado en la liofilización del conjugado de fármaco citotóxico / transportador se selecciona entre alditol, manitol, sorbitol, inositol, polietilenglicol, ácido aldónico, ácido urónico, ácido aldárico, aldosas, cetosas, aminoazúcares, alditoles, inositoles, gliceraldehídos, arabinosa, lixosa, pentosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, hexosa, idosa, manosa, talosa, heptosa, glucosa, fructosa, ácido glucónico, sorbitol, lactosa, manitol, metil a-glucopiranosido, maltosa, ácido isoascórbico, ácido ascórbico, lactona, sorbosa, ácido glutámico, eritrosa, treosa, arabinosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, eritrolulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, tagatosa, ácido glucourónico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido galacturónico, ácido mannurónico, glucosamina, galactosamina, sacarosa, trehalosa, ácido neuramínico, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, 55 xilanos, levano, fucoidano, carragenato, galactocarolosa, pectinas, ácidos pécticos, amilosa, pululano, glucógeno,

amilopectina, celulosa, dextrano, pustulano, quitina, agarosas, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido alginico, goma xantana, almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, trehalosa, etilenglicol, polietilenglicol, propilenglicol, glicerol y pentaeritritol.

En una divulgación preferida, el crioprotector es sacarosa, que está presente a una concentración de 1,5 % en peso.

- 5 En una divulgación, el agente de volumen polimérico usado durante el procedimiento de liofilización se selecciona entre dextrano 40 o hidroxietil almidón 40, y está a una concentración de 0,9 % en peso.

En otra divulgación, el electrolito usado en la solución de liofilización es cloruro de sodio, que está presente a una concentración de 0,05 M.

- 10 En una divulgación preferida, se usa un agente facilitador de la solubilidad durante el procedimiento de liofilización. Normalmente, este agente facilitador de la solubilidad es un tensioactivo. En una realización especialmente preferida, el tensioactivo es polisorbato 80, que está presente a una concentración de 0,01 % en peso.

- 15 En una divulgación, el agente tamponante utilizado es trometamina, que está presente a una concentración de 0,02 M. Es deseable que el pH de la solución sea 8,0 al comienzo del procedimiento de liofilización. La solución que contiene el conjugado de fármaco/transportador citotóxico se dispensa en viales a una temperatura de +5 °C antes del comienzo del procedimiento.

- 20 En una divulgación preferida, la solución en los viales se congela a una temperatura de -45 °C; la solución congelada se somete a una etapa de criodesecación inicial a una presión de secado primaria de 60 micrómetros a una temperatura de almacenamiento de -30 °C durante 60 horas; el producto criodesecado se somete a una etapa de secado secundaria a una presión de secado de 60 micrómetros a una temperatura de almacenamiento de +25 °C durante 24 horas.

Otro aspecto de la invención se dirige a una composición que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de un conjugado de derivado/transportador citotóxico monomérico preparado con el procedimiento de la invención.

- 25 En una divulgación, el transportador en el conjugado monomérico de derivado de fármaco citotóxico / transportador es un transportador proteínico seleccionado entre hormonas, factores de crecimiento, y miméticos de anticuerpos, de acuerdo con la invención es un anticuerpo.

En una realización preferida, el transportador proteínico es un anticuerpo monoclonal humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.

En una realización preferida, el anticuerpo humanizado se dirige contra el antígeno superficial celular CD22.

- 30 En una realización especialmente preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo dirigido contra CD22 tiene especificidad para CD22 humano, y comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene al menos una de las secuencias proporcionadas como H1 en la Figura 1 (SEQ ID NO:1) para CDR-H1, como H2 en la Figura 1 (SEQ ID NO:2) o H2' (SEQ ID NO:13) o H2" (SEQ ID NO:15) o H2''' (SEQ ID NO:16) para CDR-H2, o como H3 en la Figura 1 (SEQ ID NO:3) para CDR-H3, y comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene al menos una de las secuencias proporcionadas como L1 en la Figura 1 (SEQ ID NO:4) para CDR-L1, como L2 en la Figura 1 (SEQ ID NO:5) para CDR-L2, o como L3 en la Figura 1 (SEQ ID NO:6) para CDR-L3.
- 35

- 40 En otra realización preferida, el anticuerpo dirigido contra CD22 tiene una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene al menos una de las secuencias proporcionadas en la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16 para CDR-H2 o SEQ ID NO:3 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene al menos una de las secuencias proporcionadas en la SEQ ID NO:4 para CDR-L1, SEQ ID NO:5 para CDR-L2 o SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

- 45 En otra realización más preferida, la molécula de anticuerpo comprende la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO:13 o la SEQ ID NO:15 o la SEQ ID NO:16 para CDR-H2, la SEQ ID NO:3 para CDR-H3, la SEQ ID NO:4 para CDR-L1, SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

En una realización especialmente preferida, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 injertado con CDR y comprende una región variable de la cadena ligera 5/44-gL1 (SEQ ID NO 19), y una región variable de la cadena pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).

- 50 En otra realización especialmente preferida, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que tiene especificidad para CD22 humano y comprende una cadena ligera que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 30.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que tiene especificidad para CD22 humano y comprende una cadena ligera que tiene una secuencia que se muestra en la

SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 30.

En una realización, el anticuerpo injertado con CDR es una variante de anticuerpo, que tiene especificidad aumentada para CD22 humano, y el anticuerpo se obtiene mediante un protocolo de maduración por afinidad.

5 En una realización, el fármaco citotóxico monomérico es caliqueamicina y se selecciona entre gamma caliqueamicina o N-acetil caliqueamicina.

En una realización, la composición puede contener opcionalmente agente bioactivo adicional. Dicho agente bioactivo puede ser un fármaco citotóxico, un factor de crecimiento o una hormona.

10 Otro aspecto más de la invención se dirige a un procedimiento para tratar un sujeto con un trastorno proliferativo administrando al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de la composición de la invención. La composición se puede administrar por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramedular, intratecal, transdérmica, transcutánea, intranasal, tópica, entérica, intravaginal, sublingual o rectal. En una realización preferida, la composición de la invención se administra por vía intravenosa.

15 En una realización, la composición se administra a un sujeto humano que padece un trastorno proliferativo tal como cáncer. En una realización preferida, el cáncer es una neoplasia de linfocitos B. La neoplasia de linfocitos B puede ser una leucemia o linfoma que expresa el antígeno superficial celular CD22.

En otra realización adicional, el cáncer es un carcinoma o un sarcoma.

20 Otro aspecto de la presente invención se dirige a un procedimiento para tratar una neoplasia de linfocitos B administrando a un paciente con dicha neoplasia una composición terapéuticamente eficaz que comprende un conjugado de un anticuerpo dirigido contra CD22 con un fármaco citotóxico de la invención. En una realización preferida, la neoplasia de linfocitos B es un linfoma, particularmente linfoma no de Hodgkin.

En una realización, el fármaco citotóxico utilizado para preparar los conjugados de la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en caliqueamicinas, de acuerdo con la divulgación; tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifeno, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemisterlinas, esperamicinas y maitansinoides.

25 En una realización preferida, el fármaco citotóxico es gamma caliqueamicina o N-acetil caliqueamicina.

En otra realización, el tratamiento comprende administrar el conjugado del fármaco citotóxico de la invención con uno o más agentes bioactivos seleccionados entre anticuerpos, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, antihormonas, xantinas, interleuquinas, interferones y fármacos citotóxicos.

30 En una realización preferida, el agente bioactivo es un anticuerpo, y se dirige contra un antígeno superficial celular expresado en neoplasias de linfocitos B. En una realización preferida, el anticuerpo dirigido contra los antígenos superficiales celulares expresados en neoplasias de linfocitos B se selecciona entre un grupo que consiste en anticuerpos dirigidos contra CD19, CD20 y CD33. Dichos anticuerpos incluyen el anticuerpo dirigido contra CD20, rituximab (Rituxan™).

35 En otra realización, los agentes bioactivos son citoquinas o factores de crecimiento e incluyen, pero sin limitación, interleuquina 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF.

En otra realización, los agentes bioactivos son hormonas e incluyen estrógenos (dietilestilbestrol, estradiol), andrógenos (testosterona, Halotestin), progestinas (Megace, Provera), y corticoesteroides (prednisona, dexametasona, hidrocortisona).

40 En otra realización adicional, el agente bioactivo es un fármaco citotóxico seleccionado entre doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carrubicina, nogalamicina, menogaril, pitarubicina, valrubicina, citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, azacitidina, doxifluridina, pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina, gougierotina, puromicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, metotrexato de procarbazina, fluorouracilo, etopósido, taxol, análogos de taxol y mitomicina.

45 En una realización preferida, la composición terapéuticamente eficaz del conjugado de fármaco citotóxico / anticuerpo dirigido contra CD22 se administra junto con una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento, en el que la combinación de agentes citotóxicos se selecciona entre: CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona y procarbazina); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona); COP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona); CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazina, bleomicina, vincristina y prednisona); m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorina); ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazina); ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, citarabina, bleomicina y vincristina); MACOP-B (metotrexato,

- doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazona); ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina); MOPP alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina); MOPP alternando con ABVD, ChIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazona, prednisona); IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, etopósido,); MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, etopósido,); DHAP (dexametasona, citabina en dosis alta y cisplatino); ESHAP (etopósido, metilprednisolona, HD citarabina, y cisplatino); CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona y bleomicina); CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona); CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina y prednisona); y DHAP (cisplatino, citabina en dosis alta y dexametasona).
- 5 En una realización preferida, la composición del conjugado de fármaco citotóxico / anticuerpo dirigido contra CD22 terapéuticamente eficaz se administra antes de la administración de las una o más combinaciones anteriores de fármacos citotóxicos. En otra realización preferida, la composición terapéuticamente eficaz del conjugado de fármaco citotóxico / anticuerpo dirigido contra CD22 se administra posteriormente a la administración de una o más de las anteriores combinaciones de fármacos citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.
- 10 Otro aspecto de la invención se dirige a un procedimiento para tratar linfomas agresivos que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una composición terapéuticamente eficaz de un conjugado monomérico de un derivado de caliqueamicina / anticuerpo dirigido contra CD22 con uno o más agentes bioactivos.
- 15 Otro aspecto más de la presente invención se dirige al uso de la composición de la invención en el tratamiento de un sujeto con un trastorno proliferativo tal como cáncer. En particular, el cáncer es una neoplasia de linfocitos B, que expresan el antígeno CD22 sobre la superficie celular. En particular, la neoplasia de linfocitos B es tanto una leucemia como un linfoma. En una realización, el cáncer es un carcinoma o una leucemia.
- 20 En una realización, una dosis terapéuticamente eficaz de la administración se administra por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramedular, intratecal, transdérmica, transcutánea, intranasal, tópica, entérica, intravaginal, sublingual o rectal.
- 25 En una realización preferida, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la invención se administra por vía intravenosa.
- Otro aspecto de la invención se dirige al uso de un conjugado monomérico de un derivado de caliqueamicina / anticuerpo dirigido contra CD22 de la presente invención para su uso en el tratamiento de un sujeto con una neoplasia de linfocitos B tal como linfoma no de Hodgkin. En una realización, el conjugado monomérico de derivado de caliqueamicina / anticuerpo dirigido contra CD22 de la presente invención se administra con uno o más agentes bioactivos.
- 30 En una realización, los agentes bioselectivos se seleccionan entre un grupo que consiste en anticuerpos, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, antihormonas, xantinas, interleuquinas, interferones y fármacos citotóxicos.
- En una realización preferida, el agente bioactivo es un anticuerpo dirigido contra un antígeno superficial celular expresado en neoplasias de linfocitos B, tales como anticuerpos dirigidos contra CD19, CD20 y CD33. En una realización preferida, el anticuerpo dirigido contra CD20 es rituximab (Rituxan™).
- 35 En otra realización, los agentes bioactivos incluyen citoquinas o factores de crecimiento tales como interleuquina 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF u hormonas, que incluyen estrógenos (diétilstilbestrol, estradiol), andrógenos (testosterona, Halotestin), progestinas (Megace, Provera), y corticoesteroides (prednisona, dexametasona, hidrocortisona).
- 40 En otra realización, el agente bioactivo es un fármaco citotóxico seleccionado entre doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carrubicina, nogalamina, menogaril, pitarubicina, valrubicina, citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, encitabina, azacitidina, doxifluridina, pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina, gougertina, puromicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, metotrexato de procarbazona, fluorouracilo, etopósido, taxol, análogos de taxol, y mitomicina.
- 45 En una realización preferida, la dosis terapéutica eficaz del conjugado monomérico de derivado de caliqueamicina / anticuerpo dirigido contra CD22 se administra junto con una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento, en el que la combinación de agentes citotóxicos se selecciona entre: CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona y procarbazona); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona); COP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona); CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazona, bleomicina, vincristina y prednisona); m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorina); ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazona); ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, citarabina, bleomicina y vincristina); MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazona); ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina); MOPP
- 50
- 55

- (mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazona) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazona) alternando con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina); ChIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazona, prednisona); IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, etopósido,); MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, etopósido,);
- 5 DHAP (dexametasona, citabina en dosis alta y cisplatino); ESHAP (etopósido, metilprednisolona, HD citarabina, y cisplatino); CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona y bleomicina); CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona); CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina y prednisona); y DHAP (cisplatino, citabina en dosis alta y dexametasona).
- 10 En una realización preferida, el conjugado monomérico de derivado de caliqueamicina / anticuerpo dirigido contra CD22 se administra antes de la administración de una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.
- En otra realización preferida, la dosis terapéutica eficaz del conjugado monomérico de derivado de caliqueamicina / anticuerpo dirigido contra CD22 se administra posteriormente a la administración de una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.
- 15 En otra realización más preferida, la dosis terapéutica eficaz del conjugado monomérico de derivado de caliqueamicina / anticuerpo dirigido contra CD22 se administra junto con un anticuerpo dirigido contra un antígeno superficial celular en neoplasias de linfocitos B, y que comprende opcionalmente una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.
- 20 En otro aspecto, la invención se dirige al uso de un conjugado monomérico de derivado de caliqueamicina / anticuerpo dirigido contra CD22 de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo. Se puede usar dicho medicamento para tratar trastornos proliferativos de linfocitos B solos o en combinación con otros agentes bioactivos.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de las CDR del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44 (SEQ ID NOS:1 a 6);
- La Figura 2 muestra la secuencia completa del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44;
- La Figura 3 muestra la secuencia completa del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44;
- 30 la Figura 4 muestra la estrategia para la eliminación del sitio de glicosilación y la lisina reactiva en CDR-H2;
- la Figura 5 muestra el diseño del injerto para la secuencia de la cadena ligera 5/44;
- la Figura 6 muestra el diseño del injerto para la secuencia de la cadena pesada 5/44;
- la Figura 7 muestra los vectores pMRR14 y pMRR10.1;
- la Figura 8 muestra los resultados del ensayo Biacore de los mutantes 5/44 quiméricos;
- 35 la Figura 9 muestra los oligonucleótidos para los ensamblajes de los genes 5/44 gH1 y gL1;
- la Figura 10 muestra los vectores intermedios pCR2.1(544gH1) y pCR2.1(544gL1);
- la Figura 11 muestra los casetes de oligonucleótidos utilizados para preparar injertos adicionales;
- la Figura 12 muestra el ensayo de competición entre el anticuerpo 5/44 de ratón marcado fluorescentemente y las variantes injertadas;
- 40 la Figura 13 muestra la secuencia completa de ADN y las proteínas de las cadenas pesada y ligera injertadas;
- la Figura 14 es una representación esquemática de un conjugado de anticuerpo dirigido contra NAC-gamma caliqueamicina DMH;
- 45 la Figura 15 muestra el efecto de CMC 544 sobre el crecimiento del linfoma de linfocitos B RAMOS. CMC-544 preparado mediante el procedimiento de conjugación CMC se evaluó en xenoinjertos de linfoma de linfocitos B en ratones lampiños. Los animales con xenoinjertos de tumor recibieron una inyección por vía intraperitoneal (ip) con dosis variables de CMC-544 o su correspondiente anticuerpo murino preparado mediante el procedimiento de conjugación CMC en los días 1, 5 y 9. En este estudio, mostrado en la Figura 5, CMC-544 y su homólogo de anticuerpo de murino mostraron ser eficaces en la inhibición, de una manera dependiente de la dosis, del crecimiento del linfoma de linfocitos B RAMOS;

la Figura 16 muestra el efecto de CMC-544 sobre linfomas de linfocitos B grandes en un modelo de xenoinjerto *in vivo* en ratones lampiños. Tal como se muestra en la Figura 3, la administración de CMC-544 (160 µg/kg) a ratones que soportan linfomas RAMOS grandes en los días 1, 5, y 9 produjo la regresión gradual de la masa de linfoma preexistente y en el día 20, 3 de 4 ratones que soportan tumores estaban exentos de tumores. La vigilancia de estos ratones exentos de tumores hasta el día 50 no indica ningún recrecimiento del linfoma RAMOS en regresión. Por el contrario, un control emparejado por isotipo, CMA-676, no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral. Cuatro de cinco ratones que soportaban tumores grandes tratados con CMA-676 se sacrificaron antes del día 15 debido a que su carga tumoral alcanzó casi el 15 % de su peso corporal;

la Figura 17 compara los efectos de CMC-544 realizados con los procedimientos de conjugación CMA y CMC sobre el crecimiento del linfoma RL. la Figura 4 muestra los resultados de un experimento representativo en el que los ratones que soportaban un linfoma estadiado recibieron dos dosis diferentes (80 y 320 µg/kg de caliqueamicina conjugada) de CMC-544 preparadas usando el procedimiento de conjugación (marcado como "OP") y el procedimiento de conjugación CMC (marcado como "NP") utilizando el calendario de dosificación normalizado. la Figura 17 muestra que la eficacia antitumoral observada fue dependiente de la dosis como se esperaba y no hubo diferencias en las eficacias de cualquiera de las dos preparaciones CMC-544. Por el contrario, la N Ac-gamma caliqueamicina DMH sin conjugar administrada por vía intraperitoneal a 160 µg/kg fue inactiva; y

la Figura 18 es una gráfica que muestra que el linfoma RL grande tratado con Rituxan™ es susceptible al tratamiento con CMC-544. Para determinar si los linfomas de linfocitos B que crecen después de la finalización del tratamiento con el Rituxan™ dirigido contra CD20 comercialmente disponible siguen siendo sensible al tratamiento con CMC-544, los linfomas RL se trataron con Rituxan™ durante tres semanas. Tras el cese del tratamiento con Rituxan™, los linfomas RL crecieron rápidamente hasta el tamaño de 1 masa de 1 g, en cuyo momento se trataron con CMC-544 a la dosis intraperitoneal de 160 µg/Kg en los días 1, 5, y 9. La Figura 8 muestra que estos linfomas RL siguieron siendo sensibles a CMC-544 con un 80 % de ratones que llegaron a estar exentos de tumores en el día 60.

Descripción detallada de la invención

Los conjugados de la presente invención comprenden un fármaco citotóxico derivatizado con un engarce que incluye cualquier grupo reactivo que reacciona con un transportador proteínico para formar un conjugado de derivado de fármaco citotóxico-transportador proteínico. Específicamente, los conjugados de la presente invención comprenden un fármaco citotóxico derivatizado con un engarce que incluye cualquier grupo reactivo que reacciona con un anticuerpo utilizado como un transportador proteínico para formar un conjugado de derivado de fármaco citotóxico / anticuerpo. Específicamente, el anticuerpo reacciona contra un antígeno superficial celular expresado en neoplasias de linfocitos B. Se describe a continuación un procedimiento mejorado para preparar y purificar dichos conjugados. El uso de cosolventes, aditivos, y condiciones de reacción específicas concretas junto con el procedimiento de separación da como resultado la formación de un conjugado monomérico de derivado de fármaco citotóxico / anticuerpo anti-CD22 con una reducción significativa en la LCF. La forma monomérica por oposición a la forma agregada tiene un significativo valor terapéutico, y minimizar la LCF y reducir sustancialmente la agregación da como resultado la utilización del material de partida del anticuerpo de una manera terapéuticamente significativa evitando que la LCF compita con una fracción mucho más conjugada (HCF).

I. TRANSPORTADORES

Los agentes transportadores/de direccionamiento de la presente invención son preferentemente agentes transportadores/agentes de direccionamiento proteínicos. Como agentes transportadores/agentes de direccionamiento se incluyen hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, miméticos de anticuerpos y sus homólogos diseñados mediante ingeniería genética o enzimáticamente, denominados a partir de ahora en el presente documento como un transportador individual o en forma agrupada como "transportadores". La propiedad esencial de un transportador se su capacidad para reconocer y unirse a un antígeno o receptor asociado con células indeseadas e internalizarse posteriormente. En la patente de Estados Unidos N.º 5.053.394 se describen los ejemplos de transportadores que son de utilidad uso en la presente invención. Los transportadores preferidos para uso en la presente invención son anticuerpos y, como se ha divulgado, miméticos de anticuerpos.

Se han utilizado numerosas estructuras de proteínas no inmunoglobulinas para generar miméticos de anticuerpos que se unen a epítopes antigénicos con la especificidad de un anticuerpo (publicación PCT N.º WO 00/34784). Por ejemplo, se ha diseñado una estructura de "minicuerpo", que está relacionada con el pliegue de inmunoglobulina, para eliminar tres cadenas beta de un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal (Tramontano y col., J. Mol. Recognit. 7:9, 1994). Esta proteína incluye 61 restos y se puede usar para presentar dos bucles hipervariables. Se han aleatorizado estos dos bucles y se han seleccionado los productos según su unión al antígeno, pero hasta el momento el marco parece tener cierta utilidad limitada debido a problemas de solubilidad. Otro marco utilizado para expresar bucles es tendamistat, una proteína que inhibe específicamente las alfa-amilasas de mamífero y tiene 74 restos, una lámina beta de seis cadenas en sándwich junto con dos enlaces disulfuro, (McConnell y Hoess, J. Mol. Biol. 250:460, 1995). Esta estructura incluye tres bucles pero, hasta la fecha, solo se han examinado dos de estos bucles para la aleatorización potencial.

Se han ensayado otras proteínas como marcos y se han utilizado para expresar restos aleatorizados sobre superficies de alfa hélice (Nord y col., Nat. Biotechnol. 15:772, 1997; Nord y col., Protein Eng. 8:601, 1995), en los bucles entre las hélices alfa y los haces de hélices alfa (Ku y Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6552, 1995), y bucles constreñidos por puentes disulfuro, tales como los de los inhibidores de las proteasas pequeñas (Markland y col., Biochemistry 35:8045, 1996; Markland y col., Biochemistry 35:8058, 1996; Rottgen y Collins, Gene 164:243, 1995; Wang y col., J. Biol. Chem. 270:12250, 1995).

Los ejemplos de transportadores de anticuerpos que se pueden usar en la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y sus fragmentos biológicamente activos. Preferentemente, dichos anticuerpos se dirigen contra antígenos superficiales celulares expresados en células y/o tejidos diana en trastornos proliferativos tales como cáncer. Los ejemplos de anticuerpos específicos dirigidos contra antígenos superficiales celulares en células diana incluyen sin limitación anticuerpos dirigidos contra el antígeno CD22 que se expresan en exceso en la mayoría de linfomas de linfocitos B; G5/44, una forma humanizada de un anticuerpo monoclonal de murino dirigido contra CD22; anticuerpos contra el antígeno superficial celular CD33, que es prevalente en determinados tumores mieloides humanos, especialmente, leucemia mieloide aguda; hP67.6, una forma humanizada del anticuerpo de murino dirigido contra CD33 (véase la patente de los Estados Unidos N.º 5.773.001); un anticuerpo contra el antígeno PEM que se encuentra en muchos tumores de origen epitelial designados mP67.6 (véase I.D. Bernstein y col., J. Clin. Invest. 79:1153 (1987) e I.D. Bernstein y col., J. Immunol. 128:867-881 (1992)); y un anticuerpo humanizado contra el antígeno del carbohidrato Y de Lewis expresado en exceso en muchos tumores sólidos designados hu3S193, (véase la patente de los Estados Unidos n.º 6.310.185 B1). Además, existen algunos anticuerpos comercialmente disponibles tales como rituximab (Rituxan™) y trastuzumab (Herceptin™), que se pueden utilizar también como agentes transportadores/de direccionamiento. Rituximab (Rituxan™) es un anticuerpo quimérico dirigido contra CD20 utilizado para tratar diversos linfomas de linfocitos B y trastuzumab (Herceptin™) es un anticuerpo humanizado dirigido contra Her2 utilizado para tratar el cáncer de mama.

Se ilustra en el presente documento el uso como transportador de la presente invención una molécula de anticuerpo humanizado injertada con CDR dirigida contra el antígeno superficial celular CD22, designada G5/44. Este anticuerpo es una forma humanizada de un anticuerpo monoclonal de murino dirigido contra CD22 que se dirige contra el antígeno superficial celular CD22, que es prevalente en determinados linfomas humanos. El término "una molécula de anticuerpo injertada con CDR" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (a partir de ahora en el presente documento, CDR) (que incluyen, si se desea, una CDR modificada) de un anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de murino) injertado en un marco de la región variable de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Preferentemente, tal anticuerpo injertado con CDR tiene un dominio variable que comprende regiones marcoceptoras humanas, así como una o más de las CDR citadas anteriormente.

Cuando se injertan las CDR, se puede usar cualquier secuencia marco de región variable aceptoras adecuada teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo donante a partir del cual se deriva la CDR, incluyendo regiones marco de ratón, primate y ser humano. Ejemplos de regiones marco humanas que se pueden usar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat y col. Seq. of Proteins of Immunol. Interest, 1:310-334 (1994)). Por ejemplo, se pueden usar KOL y NEWM para la cadena pesada, se puede usar REI para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden usar para la cadena pesada y la cadena ligera.

En un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, se prefiere usar como anticuerpo aceptor uno que tenga cadenas que sean homólogas a las cadenas del anticuerpo donante. Las cadenas pesada y ligera aceptoras no necesitan derivarse necesariamente del mismo anticuerpo y pueden, si se desea, comprender cadenas de materiales compuestos que tienen regiones marco derivadas de diferentes cadenas.

Asimismo, en un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, las regiones marco no necesitan tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, se pueden cambiar restos inusuales por restos más frecuentes de la clase o tipo de la cadena aceptoras. Como alternativa, los restos seleccionados en las regiones marco aceptoras se pueden cambiar de tal manera que correspondan al resto que se encuentra en la misma posición en el anticuerpo donante. Dichos cambios deben mantenerse en el mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. Se muestra un protocolo para seleccionar restos en las regiones marco aceptoras que se pueden necesitar cambiar en la Publicación PCT N.º WO 91/09967.

Los restos donantes son restos procedentes del anticuerpo donante, es decir, el anticuerpo a partir del cual se derivaron originalmente las CDR.

El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una cadena pesada en la que el dominio variable comprende como CDR-H2 (tal como se ha definido por Kabat y col., (más arriba)) un H2' en el que se ha eliminado una secuencia del sitio de glicosilación potencial a fin de aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

De manera alternativa o adicional, el anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una cadena pesada en la que el dominio variable comprende como CDR-H2 (como se ha definido por Kabat y col., (más arriba)) una H2" en la

que un resto de lisina está en la posición 60. Este resto de lisina, que se localiza en la posición expuesta en CDR-H2, y se considera que tiene el potencial de reaccionar con los agentes de conjugación resultantes en una reducción de la afinidad de la unión a antígeno, se sustituye con un aminoácido alternativo.

5 Además, el anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una cadena pesada en la que el dominio variable comprende como CDR-H2 (como se ha definido por Kabat y col., (más arriba)) una H2^m en la que la secuencia del sitio de glicosilación potencial y el resto de lisina en la posición 60, se sustituyen con aminoácidos alternativos.

10 La molécula de anticuerpo de la presente invención puede comprender: una molécula de anticuerpo completo, que tiene las cadenas pesada y ligera de longitud completa; uno de sus fragmentos biológicamente activos, tales como Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂ o un fragmento Fv; un monómero o un dímero de cadena ligera o de cadena pesada; un anticuerpo monocatenario, por ejemplo, un Fv monocatenario en el que los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera se unen mediante un péptido engarce. De manera similar, tal como se ha divulgado, las regiones variables de la cadena pesada y ligera pueden combinarse con otros dominios de anticuerpos según sea adecuado.

15 La molécula de anticuerpo de la presente divulgación puede incluir también un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora o indicadora al extremo terminal C de su cadena pesada. Preferentemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno a dos restos de cisteína a los cuales se puede unir el efector o la molécula indicadora.

20 Los dominios de la región constante de la molécula de anticuerpo de la presente divulgación, si están presentes, se pueden seleccionar con respecto a la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular para las funciones efectoras que puedan requerirse o no. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En particular, se pueden usar dominios de la región constante de la IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando se prevé que la molécula de anticuerpo tenga usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras del anticuerpo. Como alternativa, se pueden usar los isotipos IgG2 e IgG4 la molécula de anticuerpo está prevista para fines terapéuticos y no se requieren o se desean funciones efectoras del anticuerpo.

25 La molécula de anticuerpo de la presente divulgación tiene una afinidad de unión de al menos 5×10^{-8} M, preferentemente al menos 1×10^{-9} M, más preferentemente al menos $0,75 \times 10^{-10}$ M, y lo más preferentemente al menos $0,5 \times 10^{-10}$ M.

30 En una realización, la presente divulgación se refiere a conjugados de inmunotoxinas y a procedimientos para preparar estos conjugando usando variantes de anticuerpos o miméticos de anticuerpos. En una realización preferida, las variantes de la molécula de anticuerpo de la presente divulgación se dirigen contra CD22 y expresan una afinidad aumentada para CD22. Se pueden obtener dichas variantes mediante numerosos protocolos de maduración por afinidad incluyendo mutaciones en las CDR (Yang y col., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), búsqueda de cadenas (Marks y col., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low y col., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), Intercambio de ADN (Patten y col., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), expresión en fagos (Thompson y col., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Crameri y col., Nature, 391, 288-291, 1998).

35 Puede utilizarse cualquier sistema de célula/vector hospedador para la expresión de las secuencias ADN que codifican las moléculas del transportador, incluyendo los anticuerpos de la presente divulgación. Se pueden usar sistemas bacterianos, Por ejemplo, *E. coli*, y otros sistemas microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, y especialmente fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, Fv monocatenarios. Se pueden usar sistemas de expresión de células hospedadoras eucariotas, por ejemplo, de mamíferos para la producción de moléculas de anticuerpo más grandes, incluyendo moléculas de anticuerpos completas. Las células hospedadoras de mamíferos adecuadas incluyen células CHO, células de mieloma, células de levadura, células de insectos, células de hibridoma, células NSO, células VERO o células PER C6. Los sistemas de expresión adecuados incluyen también animales y plantas transgénicas.

45 II. AGENTES TERAPÉUTICOS

Los agentes terapéuticos adecuados para su uso en la presente invención son fármacos citotóxicos que inhiben o perturban la polimerización de la tubulina, Agentes alquilantes que se unen y perturban el ADN, y agentes que inhiben la síntesis de proteínas o de las proteínas celulares esenciales tales como las proteínas quinasas, enzimas y ciclinas. Los ejemplos de dichos fármacos citotóxicos incluyen, pero no se limitan a tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifeno, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemiasterlinas, esperamicinas y maitansinoides. Los fármacos citotóxicos preferidos son las caliqueamicinas, que son un ejemplo de los antibióticos antitumorales de trisulfuro de metilo. Se describen los ejemplos de caliqueamicinas adecuados para el uso en la presente invención, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 4.671.958; patente de los Estados Unidos N.º 4.970.198, patente de los Estados Unidos N.º 5.053.394, patente de los Estados Unidos N.º 5.037.651; y la patente de los Estados Unidos N.º 5.079.233. Las caliqueamicinas preferidas son los derivados de las gamma caliqueamicinas o los derivados de la N-acetil gamma-caliqueamicina.

III. CONJUGADOS DE DERIVADOS DE FÁRMACO CITOTÓXICO/TRANSPORTADOR

Los conjugados de la presente invención tienen la fórmula $Pr(-X-S-S-W)_m$ en la que:

Pr es un transportador proteínico,

X es un engarce que comprende un producto de cualquier grupo reactivo que pueda reaccionar con un transportador proteínico,

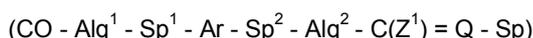
W es el fármaco citotóxico;

m es la carga promedio de un producto de conjugación purificado, de tal manera que la caliqueamicina constituye un 4 - 10 % del

conjugado en peso; y

$(-X-W)_m$ es un derivado de fármaco citotóxico.

Preferentemente, X tiene la fórmula



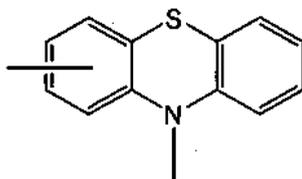
en la que

Alq^1 y Alq^2 son independientemente un enlace o una cadena de alquileo (C_1-C_{10}) ramificada o no ramificada;

Sp^1 es un enlace, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, -NR', -N(CH₂CH₂)₂N-, o -X-Ar'-Y-(CH₂)_n-Z en la que X, Y, y Z son independientemente un enlace, -NR', -S-, u -O-, con la condición de que cuando n = 0, entonces al menos uno de Y y Z debe ser un enlace y Ar' es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos, o tres grupos de alquilo (C_1-C_5), alcoxi (C_1-C_4), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR', o -S(CH₂)_nCONHR', con la condición de que cuando Alq^1 es un enlace, Sp^1 es un enlace; n es un número entero de 0 a 5;

R' es una cadena (C_1-C_5) ramificada o no ramificada opcionalmente sustituida con uno o dos grupos de -OH, alcoxi (C_1-C_4), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, dialquilamino (C_1-C_3), o trialquil (C_1-C_3) amonio -A⁺ en el que A⁺ es un anión farmacéuticamente aceptable que completa una sal;

Ar es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos, o tres grupos de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR', o -S(CH₂)_nCONHR' en el que n y R' son como se ha definido anteriormente en el presente documento o un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, o 2,7-naftilideno o



con cada naftilideno o fenotiazina opcionalmente sustituida con uno, dos, tres, o cuatro grupos de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', o -S(CH₂)_nCONHR' en el que n y R' son como se ha definido anteriormente, con la condición de que cuando Ar es fenotiazina, Sp^1 es un enlace vinculado solo a nitrógeno;

Sp^2 es un enlace, -S-, u -O-, con la condición de que cuando Alq^2 es un enlace, Sp^2 es un enlace;

Z^1 es H, alquilo (C_1-C_5), o fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos, o tres grupos de alquilo (C_1-C_5), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, -COOR', -ONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR', o -S(CH₂)_nCONHR' en el que n y R' son como se ha definido anteriormente;

Sp es un radical (C_1-C_{18}) divalente o trivalente de cadena lineal o ramificada, un radical arilo o heteroarilo divalente o trivalente, un radical cicloalquilo o heterocicloalquilo (C_3-C_{18}) divalente o trivalente, un radical arilo o heteroaril (C_1-C_{18}) arilo divalente o trivalente, un radical cicloalquilo o heterocicloalquil (C_1-C_{18}) alquilo divalente o trivalente o un radical alquilo (C_2-C_{18}) divalente o trivalente insaturado, en el que heteroarilo es preferentemente furilo, tienilo, N-metilpirrolilo, piridinilo, N-metilimidazolilo, oxazolilo, pirimidinilo, quinolilo, isoquinolilo, N-metilcarbazoilo, aminocourmarinilo, o fenazinilo y en el que si Sp es un radical trivalente, Sp puede sustituirse adicionalmente por grupos dialquil (C_1-C_5) lamino inferior, alcoxi (C_1-C_5) inferior, hidroxilo, o alquilio (C_1-C_5) inferior; y Q es =NHNCO-, =NHNCS-, =NHNCONH-, =NHNCSNH-, o =NHO-.

Preferentemente, Alq^1 es una cadena de alquileo (C_1-C_{10}) ramificado o no ramificado; Sp^1 es un enlace, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, o -NR' en el que R' es como se ha definido anteriormente en el presente documento, con la condición de que cuando Alq^1 es un enlace, Sp^1 es un enlace;

Ar es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos, o tres grupos de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR', o -S(CH₂)_nCONHR' en la que n y R' son como se ha definido anteriormente, o Ar es un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-,

1,8-, 2,3-, 2,6-, o 2,7-naftilideno sustituido cada uno opcionalmente con uno, dos, tres, o cuatro grupos de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$.

5 Z^1 es alquilo (C_1-C_5), o fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos, o tres grupos de alquilo (C_1-C_5), alcoxi (C_1-C_4), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$; Alq^2 y Sp^2 son conjuntamente un enlace; y Sp y Q son como se ha definido inmediatamente anteriormente.

10 La patente de los Estados Unidos N.º 5.773.001 describe engarces que se pueden usar con derivados nucleófilos, particularmente hidrazidas y nucleófilos relacionados, preparados a partir de caliqueamicinas. Estos engarces son especialmente útiles en aquellos casos en los que se obtiene una actividad mejor cuando el enlace formado entre el fármaco y el engarce es hidrolizable. Estos engarces contienen dos grupos funcionales. Un grupo es normalmente un ácido carboxílico que se utiliza para reaccionar con el transportador. El grupo funcional ácido, cuando se activa adecuadamente, puede formar un enlace amida con un grupo amina libre del transportador, tales como, por ejemplo, la amina en la cadena secundaria de una lisina de un anticuerpo u otro transportador proteínico. El otro grupo funcional es comúnmente un grupo carbonilo, es decir, un aldehído o una cetona, que reaccionará con el agente terapéutico modificado adecuadamente. Los grupos carbonilo pueden reaccionar con un grupo hidrazida en el fármaco para formar un enlace hidrazona. Este enlace es hidrolizable, permitiendo la liberación del agente terapéutico a partir del conjugado tras la unión a las células diana.

20 Un engarce bifuncional más preferido para su uso en la presente invención es ácido 4-(4-acetilfenoxi) butanoico (AcBut), que da como resultado un producto preferido en el que el conjugado consiste en p-caliqueamicina, γ-caliqueamicina o N-acetil γ-caliqueamicina funcionalizada por reacción con 3-mercapto-3-metil butanoil hidrazida, el engarce AcBut, y un transportador dirigido al anticuerpo IgG humano o humanizado.

IV. CONJUGACIÓN MONOMÉRICA

25 La naturaleza hidrófoba natural de muchos fármacos citotóxicos incluyendo las caliqueamicinas crea dificultades en la preparación de conjugados de fármacos monoméricos con buenas cargas de fármacos y rendimientos razonables que son necesarios para las aplicaciones terapéuticas. La hidrofobicidad aumentada del enlace proporcionado por los engarces, tal como el engarce AcBut, divulgado en la patente de los Estados Unidos N.º 5.773.001, así como la mayor distancia covalente que separa el agente terapéutico del transportador (anticuerpo), agrava este problema.

30 La agregación de conjugados de derivados de fármaco citotóxico / transportador con cargas mayores de fármacos se produce debido a la naturaleza hidrófoba de los fármacos. Ha de limitarse a menudo la carga del fármaco para obtener cantidades razonables de producto monomérico. En algunos casos, tales como con los conjugados de la patente de los Estados Unidos N.º 5.877.296, es a menudo difícil preparar conjugados en rendimientos útiles con cargas útiles para aplicaciones terapéuticas que utilizan las condiciones de reacción descritas en la patente de los Estados Unidos N.º 5.053.394 debido a la agregación excesiva. Estas condiciones de reacción utilizaron DMF como el cosolvente en la reacción de conjugación. Se necesitan por tanto procedimientos que permiten mayores cargas/rendimientos de fármacos sin agregación y la pérdida inherente de material.

35 Se describen mejoras para reducir la agregación en las patentes de los Estados Unidos N.ºs 5.712.374 y 5.714.586. Se describen en las patentes transportadores proteínicos que incluyen, pero no se limitan a, proteínas tales como anticuerpos humanos o humanizados que se usan para dirigir los agentes citotóxicos terapéuticos del presente documento, tales como, por ejemplo, hP67.6 y el resto de anticuerpos humanizados divulgados en el presente documento, se ha descubierto que el uso de una solución tamponada no nucleófila, compatible con proteínas, que contiene (i) propilenglicol como cosolvente y (ii) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C_6-C_{18} produce generalmente conjugados de derivados monoméricos de fármaco citotóxico / transportador con mayor carga/rendimiento del fármaco y agregación disminuida que tienen una excelente actividad. Los ácidos preferidos descritos en el anterior son ácidos C_7 a C_{12} , y el ácido más preferido es el ácido octanoico (tal como ácido caprílico) o sus sales. Las soluciones tamponadas preferidas para los conjugados preparados a partir de ésteres de N-hidroxisuccinimida (OSu) u otros ésteres activados comparables son solución salina tamponada con fosfato (PBS) o ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etanosulfónico (tampón HEPES). La solución tamponada utilizada en tales reacciones de conjugación no puede contener aminas o nucleófilos libres. Los que sean expertos en la materia pueden determinar fácilmente los tampones aceptables para otros tipos de conjugados. Como alternativa, el uso de una solución tamponada no nucleófila, compatible con proteínas, se ha encontrado también que la solución tamponada que contiene t-butanol sin el aditivo adicional produce conjugados de derivados/transportadores de caliqueamicina monomérica con mayor carga/rendimiento del fármaco y agregación disminuida.

55 La cantidad de cosolvente necesaria para formar un conjugado monomérico varía algo de proteína a proteína y se puede determinar por las personas normalmente expertas en la técnica sin experimentación innecesaria. La cantidad de aditivo necesaria para formar eficazmente un conjugado monomérico varía también de anticuerpo a anticuerpo. Una persona normalmente experta en la materia puede determinar también esta cantidad sin experimentación innecesaria. Se añaden adiciones de propilenglicol en cantidades que variaban de 10 % a 60 %, preferentemente de 10 % a 40 %, y más preferentemente aproximadamente 30 % en volumen de la solución total, y un aditivo que

comprende al menos un ácido carboxílico C₆-C₁₈ o su sal, preferentemente ácido caprílico o su sal, en cantidades que varían de 20 mM a 100 mM, preferentemente de 40 mM a 90 mM, y más preferentemente de aproximadamente 60 mM a 90 mM a reacciones de conjugación para producir conjugados de derivados monoméricos de fármaco citotóxico / transportador con mayor carga/rendimiento del fármaco y agregación disminuida. Pueden utilizarse también otros cosolventes orgánicos compatibles con proteínas diferentes de propilenglicol, tales como etilenglicol, etanol, DMF, DMSO; etc. Se utilizan algunos o todos los cosolventes orgánicos para transferir el fármaco a la mezcla de conjugación.

Como alternativa, se puede aumentarse la concentración del ácido carboxílico C₆-C₁₈ o su sal a 150-300 mM y el cosolvente distribuirse en forma de gotas al 1-10 %. En una realización, el ácido carboxílico es ácido octanoico o su sal. En una realización preferida, el ácido carboxílico es ácido decanoico o su sal. En una realización preferida, el ácido carboxílico es ácido caprílico o su sal, que está presente a una concentración de 200 mM de ácido caprílico junto con propilenglicol al 5 % o etanol.

En otra realización alternativa, se puede añadir t-butanol a concentraciones que varían de 10 % a 25 %, preferentemente 15 %, en volumen de la solución total a la reacción de conjugación para producir conjugado de derivado de fármaco citotóxico / transportador con mayor carga/rendimiento del fármaco y agregación disminuida.

Estas condiciones de conjugación establecidas se aplicaron a la formación de CMA-676 (Gemtuzumab Ozogamicin), que se vende ahora comercialmente como Mylotarg™. Debido a la introducción de este tratamiento para la leucemia mieloide aguda

(LMA), se ha aprendido a través del uso de la cromatografía de intercambio iónico que la caliqueamicina no está distribuida sobre el anticuerpo de una manera uniforme. La mayor parte de la caliqueamicina está en aproximadamente la mitad del anticuerpo, mientras que la otra mitad existe en una LCF que contiene solo pequeñas cantidades de caliqueamicina. En consecuencia, existe una necesidad crítica de mejorar los procedimientos para conjugar fármacos citotóxicos tales como las caliqueamicinas con transportadores, que minimicen la cantidad de agregación y permitan una mayor carga uniforme del fármaco con un rendimiento significativamente mejorado del producto conjugado.

Un ejemplo específico es el del conjugado G5/44-NAc-gamma-caliqueamicina DMH AcBut, que se denomina CMC-544 y se muestra genéricamente en la Figura 14. Se deseaba la reducción de la cantidad de la LCF a <10 % del anticuerpo total para el desarrollo de CMC-544, y se consideraron varias opciones para la reducción de los niveles de baja fracción conjugada. Otros atributos del inmunconjugado, tales como la unión al antígeno y la citotoxicidad, no deben verse afectados por la solución en última instancia. Las opciones consideradas incluyeron la modificación genética o física de la molécula de anticuerpo, técnicas de separación cromatográficas, o modificación de las condiciones de reacción.

La reacción del anticuerpo G5/44 con las NAc-gamma-caliqueamicina DMH AcBut OSu utilizando condiciones de reacción antiguas (Condiciones del Procedimiento CMA-676) dieron como resultado un producto con similares propiedades físicas (carga del fármaco, fracción baja de conjugado (LCF), y agregación) como CMA-676. Sin embargo, el nivel elevado (50-60 %) de LCF presente tras la conjugación se consideró indeseable. Se determinaron las condiciones de reacción óptimas a través de la metodología estadística de diseño experimental en la que se evaluaron variables de reacción claves tales como la temperatura, pH, entrada del derivado de caliqueamicina, y concentración de aditivos. El análisis de estos experimentos demostró que la entrada de caliqueamicina y la concentración de aditivo tenían los efectos más significativos sobre el nivel de la fracción conjugada baja LCF y la formación de agregados, mientras que la temperatura y el pH ejercieron influencias similares. En experimentos adicionales, se ha mostrado también que las concentraciones de proteínas transportadoras (anticuerpos) y cosolventes (etanol) fueron análogamente de menor importancia (en comparación con la entrada de caliqueamicina y la concentración de aditivo) en el control de la LCF y los niveles de agregados. A fin de reducir la LCF a <10 %, se aumentó la entrada del derivado de caliqueamicina de 3 % a 8,5 % (en p/p) con respecto a la cantidad de anticuerpo en la reacción. Se cambió el aditivo de ácido octanoico o su sal a una concentración de 200 mM (procedimiento CMA) a ácido decanoico o su sal a una concentración de 37,5 mM. La reacción de conjugación procedió mejor a una temperatura (30-35 °C) y un pH (8,2-8,7) ligeramente elevados. Las condiciones de reacción que incorporaban estos cambios redujeron la fracción conjugada baja (LCF) por debajo del 10 por ciento aumentando a la vez la carga de caliqueamicina, y se denominan a partir de ahora en el presente documento Condición de Procedimiento CMC-544 o "nuevas" condiciones de procedimiento. En la Tabla 1 se muestra una comparación de los resultados obtenidos con las Condiciones de Procedimiento CMA-676 y CMC-544.

TABLA 1: COMPARACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PROCEDIMIENTO CMA-676 (GEMTUZUMAB OZOGAMICINA) Y CMC-544

CONDICIONES/RESULTADOS	CONDICIONES DEL PROCEDIMIENTO CMA-676	CONDICIONES DEL PROCEDIMIENTO CMC-544
Entrada de caliqueamicina	3,0 % (en p/p sobre la base del peso de polvo)	8,5 % (p/p)
Identidad del aditivo y concentración	Ácido octanoico/Sodio octanoico; 200 mM	Ácido decanoico/Decanoato de sodio; 37,5 mM
Temperatura	26 °C	31-35 °C
pH	7,8	8,2-8,7
Carga de caliqueamicina (porcentaje en peso; mediante el ensayo de UV)	2,4-3,5	7,0-9,0
Fración conjugada baja (LCF) (LCF) (antes de la purificación) Agregación (antes de la purificación)	45-65 % del área de HPLC ~ 5 %	<10 % <5 %
Agregación (después de la purificación)	≤ 2 %	<2 %

5 El aumento en la entrada de caliqueamicina aumentó la carga del fármaco de 2,5-3,0 en porcentaje en peso a 7,0-9,0 (más normalmente 7,5-8,5) en porcentaje en peso, y dio como resultado un nulo aumento en la agregación de proteínas en la reacción. Debido a la reducción del agregado y la LCF, las condiciones del procedimiento CMC-544 dieron como resultado un producto más homogéneo. CMC-544 se preparó de manera reproducible mediante este nuevo procedimiento de conjugación a escala multigramo de anticuerpo.

10 En las anteriores reacciones, la concentración del anticuerpo puede variar de 1 a 15 mg/ml, y la concentración del derivado de caliqueamicina, por ejemplo, el éster de N-acetil gamma-caliqueamicina DMH AcBut OSu (usado para preparar los conjugados que se muestran en la Figura 14), varía entre aproximadamente 4,5-11 % en peso del anticuerpo. El cosolvente era etanol, para el cual se han demostrado buenos resultados a concentraciones que variaban entre 6 y 11,4 % (en base volumétrica). Las reacciones se realizaron en PBS, HEPES, ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(4-etanosulfónico) (HEPES), u otro tampón compatible a un pH de 8 a 9, a una temperatura que varía de 30 °C a aproximadamente 35 °C, y para tiempos que varían de 15 minutos a 24 horas. Los que sean expertos en la materia pueden determinar fácilmente intervalos de pH aceptables para otros tipos de conjugados. Se ha descubierto que para diversos anticuerpos, el uso de ligeras variaciones en las combinaciones de los aditivos anteriormente mencionados mejora la carga del fármaco y el rendimiento del conjugado monomérico, y debe entenderse que cualquier transportador de proteínas concreto puede requerir algunas alteraciones menores en las condiciones exactas de selección de los aditivos para conseguir los resultados óptimos.

V. PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DEL CONJUGADO

25 Tras la conjugación, los conjugados monoméricos se pueden separar de los reactivos sin conjugar (tales como las moléculas proteínicas de transportador/anticuerpo y el fármaco citotóxico/caliqueamicina libre) y/o la forma agregada de los conjugados mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, la cromatografía de exclusión molecular (SEC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), o cromatocentrado (CF). Los conjugados purificados son monoméricos, y contienen usualmente de un 4 a un 10 % en peso de fármaco citotóxico/caliqueamicina. En una realización preferida, los conjugados se purifican usando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). En los procedimientos anteriormente utilizados para la producción a escala de fabricación de los conjugados de fármacos citotóxicos/caliqueamicina de anticuerpos (procedimiento CMA-676), la única etapa de separación posterior a la conjugación empleada fue la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Aunque esta etapa es muy eficaz en la eliminación de conjugados de agregados y para realizar el intercambio de tampones para la formulación, es ineficaz en la reducción del contenido de LCF. En consecuencia, el procedimiento basado en SEC se basa completamente en la química de la reacción de conjugación para controlar el contenido de LCF del producto final. Otra desventaja de SEC es la limitación del volumen de la mezcla de reacción conjugada aplicada a la columna (que no excede normalmente del 5 por ciento del volumen del lecho de la columna de procedimiento). Esto limita gravemente el tamaño del lote (y por tanto la capacidad de producción) que se puede soportar en un espacio de producción dado. Finalmente, el procedimiento de purificación SEC da como resultado también una dilución significativa de la solución conjugada, que supone restricciones a la concentración de proteínas que se puede conseguir de manera dependiente en la formulación.

40 Cuando un fármaco citotóxico tiene una naturaleza muy hidrófoba, tal como un derivado de caliqueamicina, y se usa en un conjugado, la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) es un candidato preferido para proporcionar una separación eficaz del anticuerpo conjugado y no conjugado. HIC presenta tres ventajas clave sobre SEC: (1) tiene la capacidad de reducir eficazmente el contenido de LCF, así como el agregado; (2) la capacidad de carga de la columna para HIC es mucho mayor; y (3) HIC evita la excesiva dilución del producto.

45

Numerosos medios de HIC de alta capacidad adecuados para el uso a escala de producción, tales como Butyl, Phenyl y Octyl Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) pueden separar eficazmente los no conjugados y los agregados del conjugado de los componentes conjugados monoméricos tras el procedimiento de la conjugación.

5 VI. COMPOSICIONES Y FORMULACIONES

La presente invención proporciona también un procedimiento para la preparación de una composición/formulación de un conjugado monomérico de un derivado de fármaco citotóxico/transportador de la presente invención junto con un excipiente, diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable.

10 El conjugado monomérico de derivado de fármaco citotóxico / transportador puede ser un único principio activo en la composición/formulación terapéutica o diagnóstica o puede ir acompañado de mediante otros principios activos que incluyen ingredientes de anticuerpos diferentes, por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra CD19, dirigidos contra CD20, dirigidos contra CD33, dirigidos contra linfocitos T, dirigidos contra IFN γ o dirigidos contra LPS, o ingredientes no de anticuerpos tales como citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, antihormonas, fármacos citotóxicos y xantinas.

15 Las citoquinas y factores de crecimiento que se pueden usar para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer y que se pueden usar junto con los conjugados de derivados de fármaco citotóxico / transportador de la presente invención incluyen interferones, interleuquinas tales como interleuquina 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF.

20 Las hormonas comúnmente usadas para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer y que se pueden usar junto con el conjugado de derivado de fármaco citotóxico / transportador de la presente invención incluyen estrógenos (dietilestilbestrol, estradiol), andrógenos (testosterona, Halotestin), progestinas (Megace, Provera), y corticoesteroides (prednisona, dexametasona, hidrocortisona).

Se usan comúnmente antihormonas tales como antiestrógenos (tamoxifeno), antiandrógenos (flutamida) y agentes antiadrenales para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer, y se pueden usar junto con el conjugado del derivado / transportador del fármaco citotóxico de la presente invención.

25 Los agentes quimioterapéuticos/antineoplásicos usados habitualmente para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer, y que se pueden usar junto con el conjugado de derivado de fármaco citotóxico / transportador de la presente invención incluyen, pero no se limitan a adriamicina, cisplatino, carboplatino, vinblastina, vincristina, bleomicina, metotrexato, doxorubicina, fluorouracilos, etopósido, taxol y sus diversos análogos, y mitomicina.

30 Las formulaciones o composiciones farmacéuticas deben comprender preferentemente una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de la invención. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o dolencia diana, o para presentar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier conjugado, se puede estimar la dosis terapéuticamente eficaz inicialmente tanto en ensayos de cultivos celulares como en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también puede usarse para determinar el intervalo de concentración adecuado y la pauta de administración. Dicha información puede usarse seguidamente para determinar dosis útiles y rutas para la administración en seres humanos.

35 La cantidad eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad de la patología, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, combinaciones de fármacos), las sensibilidades a la reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento. Esta cantidad se puede determinar mediante experimentación rutinaria y está comprendida en el criterio del especialista clínico. En general, una dosis eficaz estará entre 0,01 mg/m² y 50 mg/m², preferentemente 0,1 mg/m² a 20 mg/m², más preferiblemente de aproximadamente 15 mg/m², cuya dosis se calcula sobre la base del transportador proteínico.

40 Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o se pueden administrar en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas. La dosis a la que se administra el conjugado de derivado / anticuerpo de fármaco citotóxico monomérico depende de la naturaleza de la dolencia que se va a tratar, el grado del linfoma o de la leucemia maligna y si el conjugado se está usando profilácticamente o para tratar una dolencia existente.

45 La frecuencia de a dosis dependerá de la vida media del conjugado y de la duración de su efecto. Si el conjugado tiene una vida corta media (por ejemplo, 2 a 10 horas) puede ser necesario proporcionar una o más dosis por día. Como alternativa, si la molécula del conjugado tiene una vida media larga (por ejemplo, 2 a 15 días) puede ser necesario solo proporcionar una dosificación una vez por día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

50 Una composición puede contener también un transportador farmacéuticamente aceptable para la administración del conjugado del anticuerpo. El transportador no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los transportadores adecuados pueden ser grandes macromoléculas metabolizadas lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

55

Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o las sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

5 Los transportadores farmacéuticamente aceptables de estas composiciones/formulaciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, suero salino, glicerol, y etanol. Además, pueden estar presentes en dichas composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH. Dichos transportadores permiten que las composiciones se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas y suspensiones, para la ingestión por el paciente.

10 Las formas preferidas para la administración incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o la infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes formuladores, tales como agentes suspensores, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes.

15 Aunque la estabilidad de las soluciones conjugadas tamponadas es adecuada para la estabilidad a corto plazo, la estabilidad a largo plazo es mala. Para potenciar la estabilidad del conjugado y para aumentar su vida media, el conjugado de anticuerpo-fármaco puede liofilizarse hasta una forma seca, para la reconstitución antes del uso con un líquido estéril adecuado. Los problemas asociados con la liofilización de una solución de proteínas están bien documentados. Se puede producir la pérdida de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria durante los procedimientos de congelación y secado. En consecuencia, pueden incluirse criopreservantes para actuar como estabilizantes amorfos del conjugado y para mantener la integridad estructural de la proteína durante el procedimiento de liofilización. En una realización, el criopreservante útil en la presente divulgación es un alcohol azucarado, tal como
20 alditol, manitol, sorbitol, inositol, polietilenglicol y combinaciones de los mismos. En otra realización, el criopreservante es un ácido azucarado, incluyendo un ácido aldónico, un ácido urónico, un ácido aldárico, y sus combinaciones.

25 El criopreservante de esta divulgación puede ser también un hidrato de carbono. Los hidratos de carbono adecuados son compuestos de aldehídos o cetonas que contienen dos o más grupos hidroxilo. Los hidratos de carbono pueden ser cíclicos o lineales e incluyen, por ejemplo, aldosas, cetosas, aminoazúcares, alditoles, inositoles, ácidos aldónicos, ácidos urónicos, o ácidos aldáricos, o sus combinaciones. El hidrato de carbono puede ser también un mono, un di, o policarbohidrato, tal como por ejemplo, un disacárido o polisacárido. Los hidratos de carbono adecuados incluyen por ejemplo, gliceraldehídos, arabinosa, lixosa, pentosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, hexosa, idosa, manosa, talosa, heptosa, glucosa, fructosa, ácido glucónico, sorbitol, lactosa, manitol, metil α -glucopiranosido, maltosa, ácido
30 isoascórbico, ácido ascórbico, lactona, sorbosa, ácido glutámico, eritrosa, treosa, arabinosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, eritrolosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, tagatosa, ácido glucourónico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido galacturónico, ácido mannurónico, glucosamina, galactosamina, sacarosa, trehalosa o ácido neuramínico, o derivados del mismo. Los polihidratos de carbono adecuados incluyen por ejemplo arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos (tales como, por ejemplo, inulina), levano, fucoidano, carragenato, galactocarolosa, pectinas, ácidos pécticos, amilosa, pululano, glucógeno, amilopectina, celulosa, dextrano, pustulano, quitina, agarosas, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma xantana, o almidón. Entre los hidratos de carbono útiles están la sacarosa, glucosa, lactosa, trehalosa, y sus combinaciones. La sacarosa es un criopreservante particularmente útil.

40 Preferentemente, el criopreservante de la presente divulgación es un hidrato de carbono o alcohol "azucarado", que puede ser un alcohol polihídrico. Los compuestos polihídricos son compuestos que contienen más de un grupo hidroxilo. Preferentemente, los

compuestos polihídricos son lineales. Los compuestos polihídricos adecuados incluyen, por ejemplo, glicoles tales como etilenglicol, polietilenglicol, y polipropilenglicol, glicerol, o pentaeritritol; o sus combinaciones.

45 En algunas realizaciones preferidas, el agente criopreservante es sacarosa, trehalosa, manitol, o sorbitol.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser animales. Sin embargo, se prefiere que las composiciones se adapten para la administración a sujetos humanos.

50 Las composiciones de la presente invención pueden administrarse mediante cualquiera de numerosas rutas incluyendo, pero no se limitan a, rutas oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (véase Publicación PCT N.º WO 98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. Se pueden usar también hipopulverizadores para administrar las composiciones de la invención. Normalmente, las composiciones pueden prepararse como inyectables, tanto como soluciones o suspensiones líquidas. Se pueden preparar también formas sólidas adecuadas para
55 disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección.

La administración directa de las composiciones se llevará a cabo generalmente mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o administrarse en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones se pueden administrar también en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un calendario de

dosis única o un calendario de dosis múltiple.

Se apreciará que el principio activo de la composición será un conjugado de fármaco citotóxico/transportador proteínico. De este modo, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por tanto, si la composición se va a administrar mediante una ruta que utiliza el tracto gastrointestinal, la composición deberá incluir agentes que protejan el transportador proteínico de la degradación, pero que liberen el conjugado una vez haya quedado absorbido en el tracto gastrointestinal.

Está disponible una discusión completa de los transportadores farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

La presente invención proporciona en particular un derivado de caliqueamicina monomérico / anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 (G5/44), CMC-544, para su uso en el tratamiento de trastornos proliferativos caracterizados por células que expresan el antígeno CD22 sobre su superficie.

La presente invención proporciona además el uso de CMC-544 en la fabricación de una composición o un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo caracterizado por células que expresan CD22.

Se puede utilizar también CMC-544 en cualquier tratamiento en el que se desee reducir el nivel de células que expresan CD22 que están presentes en el sujeto que se está tratando con la composición o un medicamento descrito en el presente documento. Específicamente, la composición o el medicamento se utiliza para tratar seres humanos o animales con trastornos proliferativos, concretamente linfomas y leucemias, que expresan el antígeno CD22 sobre la superficie celular. Estas células que expresan CD22 pueden estar circulando en el cuerpo o estar presentes en un número indeseablemente grande en un sitio concreto en el cuerpo.

CMC-544 puede usarse también preferentemente para el tratamiento de neoplasias de linajes de linfocitos B que incluyen linfomas y leucemias, de forma más preferente linfoma no de Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), mieloma múltiple, leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC). CMC-544 se puede usar solo o en combinación con otros agentes bioactivos para tratar sujetos que padecen neoplasias de linfocitos B.

Los agentes bioactivos comúnmente utilizados incluyen factores de crecimiento, citoquinas, y fármacos citotóxicos. Los fármacos citotóxicos comúnmente utilizados para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer, y que se pueden usar juntos con CMC-544 incluyen antraciclina tal como doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carrubicina, nogalamicina, menogaril, pitarubicina, y valrubicina durante hasta tres días; un nucleósido de pirimidina o purina tal como citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, encitabina, azacitidina, doxifluridina, pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina, gougertina, puomicina, tegafur, tiazofurina. Otros agentes quimioterapéuticos/antineoplásicos que se pueden administrar en combinación con CMC-544 incluyen adriamicina, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, metotrexato de procarbazina, fluorouracilos, etopósido, taxol y sus diversos análogos, y mitomicina. CMC-544 se puede administrar simultáneamente con uno o más de estos agentes terapéuticos. Como alternativa, CMC-544 se puede administrar secuencialmente con uno o más de estos agentes terapéuticos.

CMC-544 se puede administrar también solo, en paralelo con, o secuencialmente con una combinación de otros agentes bioactivos tales como factores de crecimiento, citoquinas, esteroides, anticuerpos tales como anticuerpo dirigido contra CD20, rituximab (Rituxan™), y agentes quimioterapéuticos como parte de un régimen de tratamiento. Los regímenes de tratamiento establecidos para el tratamiento de trastornos linfoproliferativos malignos incluyen CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona y procarbazina), CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona), COP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona), CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazina, bleomicina, vincristina y prednisona), m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorina, ProM-ACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazina), ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, citarabina, bleomicina y vincristina), MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dosis fija de prednisona, bleomicina y leucovorina), MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazina), ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina), MOPP alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina), y MOPP alternando con ABVD y ChIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazina, prednisona). El tratamiento puede comprender una fase de tratamiento de inducción, una fase de tratamiento de consolidación y una fase de tratamiento de mantenimiento. CMC-544 se puede administrar también solo, en paralelo con, o secuencialmente con cualquiera de los regímenes de tratamiento anteriormente identificados como parte de la fase de tratamiento de inducción, una fase de tratamiento de consolidación y una fase de tratamiento de mantenimiento.

Los conjugados de la presente invención pueden administrarse también junto con otros agentes bioactivos y quimioterapéuticos como parte de un régimen de quimioterapia combinado para el tratamiento de los linfomas agresivos que han recidivado. Dicho régimen de tratamiento incluye IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, etopósido), MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, etopósido), DHAP (dexametasona, citabina en dosis alta y cisplatino), ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina a dosis elevada, y cisplatino), CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido,

procarbazona, prednisona y bleomicina), CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona), CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), y DHAP (cisplatino, citarabina y dexametasona). Los regímenes de tratamiento adicionales para linfomas agresivos pueden incluir una primera línea de tratamiento en fase 1 con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona)-rituximab (Rituxan™)-CMC-544, seguido por CHOP-rituximab en fase 2 y fase 3 (Rituxan™), CHOP-CMC CHOP-CMC-544 o CHOP-rituximab (Rituxan™)-CMC-544. Como alternativa, la fase 1 puede tener una primera línea de tratamiento con COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona)-rituximab (Rituxan™)-CMC-544, seguido por COP-rituximab (Rituxan™) en fase 2 y fase 3, COP-CMC-544 o COP-rituximab (Rituxan™)-CMC-544. En una realización adicional, el tratamiento de linfomas agresivos puede incluir una primera o segunda línea de tratamiento con el conjugado de fármaco-anticuerpo CMC-544 en fase 1, seguido por CMC-544 y CHOP en fase 2 y 3 (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona), CMC-544 y COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona), CMC-544 con rituximab (Rituxan™) o rituximab (Rituxan™) solo. En otra realización adicional, el tratamiento de linfomas agresivos puede incluir una primera línea de tratamiento con el conjugado de fármaco-anticuerpo CMC-544 seguido en fase 2 y 3 con CMC-544 solo o en combinación con diferentes regímenes de tratamiento que incluyen, pero no se limitan a, ESHOP (etopósido, metilprednisolona, citarabina a dosis elevada (AD), vincristina y cisplatino), EPOCH, IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, etopósido), ASHAP, MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, etopósido) e ICE (ifosfamida, ciclofosfamida, y etopósido).

La presente invención proporciona también un procedimiento para tratar sujetos humanos o animales que padecen o están en riesgo de un trastorno proliferativo caracterizado por células que expresan CD22, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de CMC-544 de la presente invención.

La presente invención se describirá adicionalmente a continuación en ejemplos de trabajo específicos, que están previstos para describir más detalladamente la invención sin limitar su alcance.

Ejemplo 1

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS CANDIDATOS

Se seleccionó un panel de anticuerpos contra CD22 a partir de hibridomas que utilizaban los siguientes criterios de selección: unión a células Daudi, internalización en células Daudi, unión a células mononucleares de sangre periférica (PBMC), internalización en PBMC, afinidad (mayor de 10^{-9} M), ratón γ 1 y tasa de producción. 5/44 se seleccionó como el anticuerpo preferido.

I. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN GÉNICA DE MOLÉCULAS DE ANTICUERPOS QUIMÉRICOS 5/44

a) Preparación de células de hibridoma 5/44 y preparación de ARN a partir de las anteriores

Se generaron células de hibridoma 5/44 mediante tecnología de hibridoma convencional tras inmunización de ratones con proteína CD22 humana. Se preparó el ARN de células de hibridoma 5/44 utilizando un kit RNEasy (Qiagen, Crawley, Reino Unido; n.º de catálogo 74106). El ARN obtenido se transcribió de manera inversa con ADNc, tal como se describe a continuación.

b) Distribución de CD22 en tumores NHL

Se emprendió un estudio de inmunohistoquímica para examinar la incidencia y distribución de la tinción usando anticuerpos monoclonales 5/44 dirigidos contra CD22. Se incluyeron en el estudio anticuerpos dirigidos contra CD20 y CD79 de control para confirmar las áreas de linfocitos B de los tumores.

Se estudiaron un total de 50 tumores y estos se clasificaron como sigue utilizando la formulación de trabajo y los sistemas de clasificación REAL:

- 7 B Leucemia/linfoma linfoblástico (Alto/I)
- 4 B Linfoma linfocítico de células pequeñas/LLC (Bajo/A)
- 3 linfoplasmacitoide/Inmunocitoma (Bajo/A)
- 1 Células del manto (Int/F)
- 14 Linfoma del centro del folículo (Bajo a Int/D)
- 13 Linfoma de células grandes difuso (Int a Alto/G,H)
- 6 Inclasificable (K)
- 2 linfomas de linfocitos T

Cuarenta linfomas de linfocitos B fueron positivos para el antígeno CD22 con el anticuerpo 5/44 a 0,1 μ g/ml y seis más se volvieron positivos cuando se aumentó la concentración a 0,5 μ g/ml. Para los restantes dos tumores de linfocitos B

que fueron negativos a 0,1 µg/ml, el tejido remanente fue insuficiente para ensayar a concentraciones mayores. Sin embargo, el ensayo en paralelo con otro anticuerpo dirigido contra CD22 designado 6/13, que proporcionó una tinción más fuerte que 5/44, dio como resultado una tinción positiva para CD22 en los 48 linfomas de linfocitos B.

5 Por tanto, es posible concluir que el antígeno CD22 está ampliamente expresado en linfomas de linfocitos B y proporciona así una diana adecuada para la inmunoterapia en NHL.

c) Clonación mediante la PCR de 5/44 V_H y V_L

10 Se sintetizaron las secuencias de ADNc para los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de 5/44 utilizando la transcriptasa inversa para producir copias de ADNc monocatenario del ARMm presente en el ARN total. Este se usó a continuación como el molde en la amplificación de las secuencias de la región V de murino utilizando cebadores de oligonucleótidos específicos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

i) Síntesis del ADNc

15 Se sintetizó el ADNc en un volumen de reacción de 20 µl que contenía los reactivos siguientes: Tris 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, ditiotretitol 10 mM, MgCl₂ 3 mM, 0,5 mM de cada trifosfato de desoxirribonucleósido, 20 unidades de ARNsin, 75 ng de cebador de hexanucleótidos aleatorio, 2 µg de ARN 5/44 y 200 unidades de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney. Tras la incubación a 42 °C durante 60 minutos, se terminó la reacción calentando a 95 °C durante 5 minutos.

ii) PCR

20 Se sometieron alícuotas del ADNc a la PCR usando combinaciones de cebadores específicas de las cadenas pesada y ligera. Se usaron combinados de cebadores degenerados designados para hibridarse con las secuencias conservadas del péptido señal como cebadores directos. Estas secuencias contienen, en orden, un sitio de restricción (V_L SfuI; V_H HindIII) que comienza 7 nucleótidos desde sus extremos 5', la secuencia GCCGCCACC (SEQ ID NO:50), para permitir la traducción óptima de los ARNm resultantes, un codón de inicio y 20-30 nucleótidos basados en las secuencias peptídicas líderes de anticuerpos de ratón conocidos (Kabat y col., Sequences of protein of immunological interest, 5ª Edición, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

25 Los cebadores 3' se designan para ampliar la unión J-C del marco 4 del anticuerpo y contienen un sitio de restricción para la enzima BsiWI para facilitar la clonación del fragmento V_L de la PCR. Los cebadores 3' de la cadena pesada son una mezcla diseñada para ampliar la unión J-C del anticuerpo. El cebador 3' incluye un sitio de restricción Apal para facilitar la clonación. La región 3' de los cebadores contiene una secuencia mixta basada en los encontrados en anticuerpos de ratón conocidos (Kabat y col., 1991, *más arriba*).

30 Las combinaciones de los cebadores descritos anteriormente permiten que los productos de la PCR para V_H y V_L se clonen directamente en un vector de expresión adecuado (véase a continuación) para producir cadenas pesadas y ligeras quiméricas (ratón-ser humano) de estos genes que se van a expresar en células de mamíferos para producir anticuerpos quiméricos del isotipo deseado.

35 Las incubaciones (100 µl) para la PCR se desarrollaron como sigue. Cada reacción contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, 0,01 % n p/v de gelatina, 0,25 mM de cada trifosfato de desoxirribonucleósido, 10 pmoles de la mezcla del cebador 5', 10 pmoles del cebador 3', 1 µl de ADNc y 1 unidad de polimerasa Taq. Las reacciones se incubaron a 95 °C durante 5 minutos y a continuación se ciclaron a 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, se analizaron las alícuotas de cada reacción mediante electroforesis en un gel de agarosa.

40 Para la región V de la cadena pesada, se obtuvo un solo producto de ADN amplificado cuando un combinado de cebadores que se hibridó con el inicio del marco I sustituyó la señal del combinado del cebador peptídico. Los fragmentos se clonaron en vectores de secuenciación del ADN. Se determinó la secuencia de ADN y se tradujo para dar una secuencia de aminoácidos deducida. Esta secuencia deducida se verificó por referencia a la secuencia de la proteína del extremo N determinada experimentalmente. Las Figuras 2 y 3 muestran la secuencia de ADN/proteína de las regiones V de la cadena ligera y pesada madura del anticuerpo 5/44 monoclonal de ratón, respectivamente.

iii) Clonación molecular de los fragmentos de la PCR

45 A continuación se clonaron las secuencias de la región V de murino en los vectores de expresión pMRR10.1 y pMRR14 (Figuras 7A y 7B). Se trata de vectores para la expresión de la cadena ligera y la cadena pesada que contienen respectivamente, el ADN que codifica las regiones constantes de la cadena ligera kappa humana y ligera y pesada gamma 4 humana. La región V_L se subclonó en el vector de expresión mediante digestión por restricción y ligadura a partir del vector de secuenciación, utilizando los sitios de restricción SfuI y BsiWI, creando el plásmido pMRR10(544cL) (Figura 7B). El ADN de la cadena pesada se amplificó mediante la PCR utilizando un cebador 5' para introducir un péptido señal, como este no se obtuvo en la estrategia de clonación, se empleó un anticuerpo líder de la cadena pesada de ratón procedente de un hibridoma propio diferente (denominado 162). El cebador 5' tenía la

55

siguiente secuencia:

5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTTCGGATTCTCTCTCGTGTTCCT
GGCACTCATTCTCAAGGGAGTGCAGTGTGAGGTGCAGCTCGTTCGAGTCTGG³
(SEQ ID NO:51).

El cebador inverso era idéntico al utilizado en la clonación del gen V_H original. El producto resultante de la PCR se digirió con las enzimas HindIII y Apal, se subclonó, y su secuencia de ADN se confirmó, creando el plásmido pMRR14(544cH) (Figura 7A). La transfección simultánea transitoria en ambos vectores de expresión en células CHO generó el anticuerpo c5/44 quimérico. Esto se consiguió usando el reactivo Lipofectamine de acuerdo con los protocolos del fabricante (Invitrogen:Life Technology, Groningen, Países Bajos, n.º de catálogo 11668-027).

II. ELIMINACIÓN DEL SITIO DE GLICOSILACIÓN Y DE LA LISINA REACTIVA

Se observó un sitio de glicosilación potencial unido a N en CDR-H2, que tenía la secuencia de aminoácidos N-Y-T (Figura 3). SDS-PAGE, el análisis de la transferencia Western y de la tinción de hidratos de carbono de geles de 5/44 y sus fragmentos (incluyendo Fab) indicaron que este sitio estaba indudablemente vez glicosilado (no se muestra). Además, se observó un resto de lisina en una posición expuesta en CDR-H2, que tenía el potencial de reducir la afinidad de unión del anticuerpo proporcionando un sitio adicional para la conjugación con un agente con el que se puede conjugar el anticuerpo.

Se usó una estrategia de la PCR para introducir sustituciones de aminoácidos en la secuencia de CDR-H2 en un intento de eliminar el sitio de glicosilación y/o la lisina reactiva, como se muestra en la Figura 4. Se usaron cebadores directos que codificaban las mutaciones N55Q, T57A o T57V para eliminar el sitio de glicosilación (Figura 4) y se generó un cuarto cebador directo que contenía la sustitución K60R para eliminar el resto de lisina reactiva (Figura 4). Se usó un cebador inverso del marco 4 en cada una de estas amplificaciones de la PCR. Los productos de la PCR se digirieron con las enzimas XbaI y Apal y se insertaron en pMRR14(544cH) (escindido también con XbaI y Apal) para generar los plásmidos de expresión que codifican estos mutantes. Las mutaciones N55Q, T57A y T57V eliminan el sitio de glicosilación cambiando la secuencia de aminoácidos con respecto al consenso N-X-T/S mientras que la mutación K60R sustituye la lisina potencialmente reactiva por el resto arginina cargado positivamente de manera similar. Los plásmidos variantes cH resultantes se transfectaron simultáneamente con el plásmido cL para generar las variantes de anticuerpos quiméricos expresadas.

III. EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LOS GENES QUIMÉRICOS

Se evaluaron las actividades de los genes quiméricos tras la transfección transitoria en células CHO y la determinación de las constantes de afinidad mediante un análisis BiaCore.

Las afinidades de 5/44 quimérico o sus variantes, de los que se había eliminado su sitio de glicosilación o su lisina reactiva, se investigaron utilizando tecnología BIA para la unión a las construcciones CD22-mFc. Los resultados se muestran en la Figura 8. Se llevaron a cabo todas las medidas de la unión en el instrumento BIAcore™ 2000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). Se llevó a cabo el ensayo mediante la captura de CD22mFc con Fc inmovilizado dirigido contra IgG de ratón. El anticuerpo estaba en la fase soluble. Las muestras, los patrones, y los controles (50 µl) se inyectaron en Fc inmovilizado dirigido contra IgG de ratón seguido por el anticuerpo en la fase soluble. Después de cada ciclo, se regeneró la superficie con 50 µl de HCl 40 mM a 30 µl/min. Se llevó a cabo el análisis cinético utilizando el programa informático BIAevaluation 3.1 (Pharmacia).

La eliminación del sitio de glicosilación en la construcción T57A dio como resultado una velocidad de la reacción directa ligeramente más rápida y una velocidad de la reacción inversa significativamente más lenta en comparación con 5/44 quimérico, proporcionando un aumento de la afinidad de aproximadamente 5 veces. La mutación N55Q no tuvo efecto sobre la afinidad. Este resultado fue inesperado ya que sugiere que la eliminación de los hidratos de carbono por sí mismos no tiene efecto aparentemente sobre la unión (como con el cambio de N55Q). Se observó solo la afinidad aumentada con el cambio T57A. Una posible explicación es que, con respecto a la presencia del hidrato de carbono, la treonina en la posición 57 ejerce un efecto negativo sobre la unión que se elimina en la conversión de treonina a alanina. La hipótesis de que el tamaño pequeño de la alanina es importante, y de que el efecto negativo de la treonina está relacionado con su tamaño, se basa en el resultado obtenido usando la mutación T57V: esta sustitución con valina en la posición 57 no es beneficiosa (no se muestran los resultados).

La eliminación de la lisina por la mutación K60R tiene un efecto neutro sobre la afinidad, es decir, la introducción de arginina elimina un sitio reactivo potencial sin comprometer la afinidad.

Las mutaciones para la eliminación del sitio de glicosilación y la eliminación de la lisina reactiva se incluyeron por tanto en el diseño de humanización.

Ejemplo 2

INJERTO EN CDR de 5/44

5 Se ha descrito anteriormente la clonación molecular de genes para las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 5/44 y su uso para producir anticuerpos 5/44 quiméricos (ratón/ser humano). Se muestran los nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de los dominios 5/44 V_L y V_H de ratón en las Figuras 2 y 3 (SEQ ID NOS:7 y 8), respectivamente. Este ejemplo describe el injerto en CDR del anticuerpo 5/44 en marcos humanos para reducir la inmunogenicidad potencial en seres humanos, de acuerdo con el procedimiento de Adair y col., (publicación PCT N.º WO 91/09967).

I. INJERTO EN CDR DE CADENA 5/44 LIGERA

10 La alineación de la secuencia de proteína con secuencias consenso procedentes de la región V de la cadena ligera Kappa del subgrupo I humano indicó una identidad de secuencias del 64 %. En consecuencia, para construir la cadena ligera injertada con CDR, las regiones marcoceptoras seleccionadas correspondieron a las de la secuencia DPK9 de la línea germinal O12 del subgrupo I de VK humano. La secuencia aceptora del marco 4 se derivó de la secuencia JK1 de la línea germinal de la región J humana.

15 Se proporciona una comparación de las secuencias de aminoácidos de las regiones marco 5/44 de murino y la secuencia aceptora en la Figura 5 y muestra que existen 27 diferencias entre las cadenas donantes yceptoras. En cada posición, se preparó un análisis del potencial del resto de murino para contribuir a la unión con el antígeno, de forma tanto directa como indirecta, a través de los efectos sobre el empaquetado o en la interfase V_H/V_L. Si se consideró importante un resto de murino y suficientemente diferente del resto humano en términos de tamaño, polaridad o carga, entonces el resto de murino se retuvo. Basándose en este análisis, se construyeron dos versiones de la cadena ligera injertada con CDR, que tenían las secuencias proporcionadas en la SEQ ID NO:19 y la SEQ ID NO:20 (Figura 5).

II. INJERTO EN CDR DE LA CADENA 5/44 PESADA

25 Se llevó a cabo el injerto en CDR de la cadena 5/44 pesada utilizando la misma estrategia que se ha descrito para la cadena ligera. Se ha encontrado que el dominio V de la cadena 5/44 pesada es homólogo a las cadenas pesadas humanas que pertenecen al subgrupo I (70 % de identidad de la secuencia) y por tanto se ha usado el marco VH1-3 DP7 de la línea germinal del subgrupo I humano como un marco aceptor. Las secuenciasceptoras del marco 4 se derivaron de la secuencia JH4 de la línea germinal de la región J humana.

30 En la Figura 6 se muestra una comparación de la cadena 5/44 pesada con las regiones marco en la que se puede observar que la cadena 5/44 pesada difiere de la secuencia aceptoras en las posiciones 22. El análisis de la contribución que cualquiera de estas puede hacer a la unión con el antígeno condujo a 5 versiones de las cadenas pesadas injertadas con CDR que se estaban construyendo, que tenían las secuencias proporcionadas en la SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:27 (Figura 6).

III. CONSTRUCCIÓN DE GENES DE SECUENCIAS INJERTADAS

35 Se diseñaron los genes para codificar las secuencias injertadas gH1 y gL1, y se diseñaron y construyeron una serie de oligonucleótidos solapantes (Figura 9). Se empleó una técnica de ensamblaje de la PCR para construir los genes. Se configuraron volúmenes de reacción de 100 µl que contenían Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,001 %, 0,25 mM de cada trifosfato de desoxirribonucleósido, 1 pmol de cada uno de los cebadores 'internos' (T1, T2, T3, B1, B2, B3), 10 pmoles de cada uno de los cebadores 'externos' (F1, R1), y 1 unidad de la polimerasa Taq (AmpliTaq, Applied Biosystems, n.º de catálogo N808-0171). Los parámetros de ciclación de la PCR fueron 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto, durante 30 ciclos. A continuación se desarrollaron los productos de reacción en un gel de agarosa al 1,5 %, se escindieron y recuperaron utilizando columnas de centrifugación QIAGEN (kit de extracción en gel QIAquick, n.º de cat 28706). El ADN se eluyó en un volumen de 30 µl. A continuación se clonaron alícuotas (1 µl) del ADN de gH1 y gL1 en el vector de clonación pCR2.1 TOPO de InVitrogen TOPO TA (n.º de catálogo K4500-01) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este vector no de expresión sirvió como intermedio de clonación para facilitar la secuenciación de un gran número de clones. Se usó la secuenciación del ADN utilizando cebadores específicos de vector para identificar clones correctos que contenían gH1 y gL1, creando los plásmidos pCR2.1 (544gH1) y pCR2.1 (544gL1) (Figuras 10 A y B).

50 Se utilizó un procedimiento de sustitución del casete de oligonucleótidos para crear los injertos humanizados gH4, 5, 6 y 7, y gL2. La Figura 11 muestra el diseño de los casetes de oligonucleótidos. Para construir cada variante, se cortó el vector pCR2.1(544gH1) o pCR2.1(544gL1) con las enzimas de restricción que se muestran (XmaI/SacII para la cadena pesada, XmaI/BstEII para la cadena ligera). El fragmento de vector grande se purificó en gel de agarosa y se utilizó en la ligadura con el casete de oligonucleótidos. Estos casetes están compuestos por 2 oligonucleótidos complementarios (que se muestran en la Figura 11), mezclados a una concentración de 0,5 pmoles/µl en un volumen de 200 µl de Tris-HCl 12,5-mM pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM, NaCl 25 mM, ditioeritrol 0,25 mM. Se consiguió la hibridación calentando a 95 °C durante 3 minutos en un baño de agua (volumen 500 ml) permitiendo a la reacción enfriarse lentamente a temperatura ambiente. El casete de oligonucleótidos hibridado se diluyó a continuación diez veces en

agua antes de la ligadura en el vector cortándolo adecuadamente. Se usó la secuenciación del ADN para confirmar la secuencia correcta, creando los plásmidos pCR2.1 (5/44-gH4-7) y pCR2.1 (5/44-gL2). Las secuencias injertadas verificadas se subclonaron a continuación en los vectores de expresión pMRR14 (cadena pesada) y pMR10.1 (cadena ligera).

5 IV. ACTIVIDAD DE UNIÓN A CD22 DE LAS SECUENCIAS INJERTADAS CON CDR

Los vectores que codificaban las variantes injertadas se transfectaron simultáneamente en células CHO en una variedad de combinaciones, junto con las cadenas de anticuerpos quiméricos originales. Se comparó la actividad de unión en un ensayo de competición, compitiendo la unión del anticuerpo 5/44 original de ratón para la unión a células Ramos (obtenidas de la ATCC, una línea de células linfoblásticas humanas de linfoma de Burkitt que expresaban CD22 superficial). Se consideró que este ensayo era el mejor modo de comparar los injertos por su capacidad de unirse a CD22 superficial celular. Los resultados se muestran en la Figura 8. Como se puede observar, existe muy poca diferencia entre cualquiera de los injertos, todos se comportaron más eficazmente que el quimérico en la competición frente al progenitor de murino. La introducción de 3 restos humanos adicionales en el extremo de CDR-H3 (gH5 y gH7) no parece haber afectado la unión.

15 Se seleccionó la combinación del injerto con el menor número de restos gL1gH7 de murino. El injerto gL1 de la cadena ligera tiene 6 restos donantes. Los restos V2, V4, L37 y Q45 son restos de empaquetado potencialmente importantes. El resto H38 está en la interfase V_H/V_L . El resto D60 es un resto superficial cercano a CDR-L2 y puede contribuir directamente a la unión con el antígeno. De estos restos, V2, L37, Q45 y D60 se encuentran en las secuencias de la línea germinal de los genes kappa humanos procedentes de otros subgrupos. El injerto gH7 de la cadena pesada tiene 4 restos marco donantes (se considera que el resto R28 es parte de CDR-H1 en la definición estructural utilizada en el injerto con CDR (véase Adair y col., (1991), solicitud PCT N.º WO 91/09967). Los restos E1 y A71 son restos superficiales próximos a las CDR. El resto 148 es un potencial resto empaquetado. El resto T93 está presente en la interfase V_H/V_L . De estos restos, E1 y A71 se encuentran en otros genes de la línea germinal del subgrupo I humano. El resto 148 se encuentra en el subgrupo 4 de la línea germinal humana, y T73 se encuentra en el subgrupo 3 de la línea germinal humana.

El ADN completo y la secuencia de proteínas de la cadena ligera y la cadena pesada, incluyendo la posición aproximada de los intrones en los genes de la región constante proporcionados por los vectores, se muestran en la Figura 13 y se proporcionan en la SEQ ID NO:29 y la SEQ ID NO:28, respectivamente, para la cadena ligera y en la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO:30 respectivamente para la cadena pesada.

30 El ADN que codificaba estos genes de la cadena ligera y la cadena pesada se escindió de estos vectores. El ADN de la cadena pesada se digirió en el sitio 5' HindIII, se trató a continuación con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* para crear un extremo 5' enromado. La escisión en el sitio 3' EcoRI dio como resultado el fragmento de la cadena pesada, que se purificó en geles de agarosa. De la misma manera, se produjo un fragmento de cadena ligera enromado en el sitio 5' SfuI y con un sitio 3' EcoRI. Ambos fragmentos se clonaron en vectores de expresión basados en DHFR y se usaron para generar líneas celulares estables en células CHO.

Ejemplo 3

CONJUGACIÓN DE NAc-GAMMA CALIQUEAMICINA DMH ACBUT CON ANTICUERPO HUMANIZADO DIRIGIDO CONTRA CD22 (G5/44)

40 En una reacción de conjugación típica, el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 (G5/44) se conjugó con NAc-gamma caliqueamicina DMH AcBut OSu (derivado de caliqueamicina), en la que la concentración de la proteína diana era de 7,5 mg/ml y la carga del derivado de caliqueamicina diana era del 8,5 por ciento en peso de la carga de proteína. El pH de la reacción diana era de $8,5 \pm 0,2$, y las concentraciones diana de los diferentes componentes de la reacción fueron como sigue: ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(4-butanosulfónico) (HEPBS) 50 mM, decanoato de sodio 37,5 mM, y etanol total en v/v al 9 %. La reacción se llevó a cabo a $33^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ durante una hora. Los resultados del análisis de esta reacción típica antes de la purificación fueron como sigue: Proteína: 7,34 mg/ml; Carga de caliqueamicina: 82,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$; Agregado: 93,25 %; y proteína sin conjugar (LCF): 1,07 (UV área en % mediante HPLC).

50 Se ensayó el efecto de diversos aditivos tensioactivos y sus concentraciones sobre el rendimiento y la pureza del producto para determinar su efecto sobre la producción de monómero conjugado (véase la Tabla 2). Las reacciones se desarrollaron cuando todo se mantuvo constante excepto el aditivo y su concentración. Los conjugados producidos a partir de estas reacciones se analizaron para determinar la concentración de proteínas, la carga de caliqueamicina, el contenido de agregados, y la LCF. Aunque todos los ácidos n-carboxílicos en el intervalo de C_6 (hexanoato) a C_{12} (dodecanoato) proporcionaron resultados aceptables, los mejores resultados globales (LCF baja, agregados bajos, y una elevada recuperación de conjugados monoméricos) se obtuvieron con decanoato en un intervalo de concentración de 30 mM a 50 mM.

55

TABLA 2: EFECTO DE LA IDENTIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADITIVOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA CONJUGACIÓN

Aditivos/concentración	Recuperación de proteínas (% de recuperación)	Porcentaje de agregados	Porcentaje de LCF
Hexanoato-500 mM	51,3	3,36	38,3
Heptanoato-400 mM	49,9	4,7	20,6
Octanoato-200 mM	57,3	3,27	10,6
Nanonoato-100 mM	54,7	1,41	0,3
Decanoato-50 mM	56,7	1,35	0,2
Undecanoato-20 mM	46,9	2,95	0,6
Dodecanoato-5 mM	65,6	0,78	7,0

Ejemplo 4

5 PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA

I. PROCEDIMIENTOS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Aunque Butyl Sepharose 4 Fast Flow se ha identificado como el mejor medio HIC para esta aplicación, se pueden obtener resultados aceptables con ligeras alteraciones en las condiciones cromatográficas utilizando otras resinas tales como Octyl Sepharose Fast Flow, PPG-600C (Tosoh Biosep), Fractogel EMD Propyl (EM Processing) y Source 15ISO (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

El material de partida para la purificación era una mezcla de reacción de conjugación que contenía 7,2 mg/ml de proteína y una carga de derivado de caliqueamicina de 83 µg/mg, con un contenido de agregados de 10,1 % (porcentaje de área mediante HPLC, y un contenido de LCF de 5,6 % (porcentaje de área mediante HPLC).

Tras completarse la reacción de conjugación, la mezcla de reacción se diluyó cuatro veces mediante la adición de una solución de fosfato de potasio a una concentración final de fosfato de 0,7 M (pH 8,2). Tras el mezclado, esta solución se filtró a través de filtros de 0,45 micras. La solución diluida se cargó en una columna Butyl Sepharose 4 Fast Flow. La cantidad total de proteína cargada en la columna fue de 29 mg por ml de volumen de lecho. Tras un lavado con fosfato de potasio 0,7 M, La columna se eluyó utilizando un gradiente en etapa de fosfato de potasio 0,7 M a 4 mM, pH 8,2. Las fracciones eluidas durante el gradiente en etapas se combinaron para el procesamiento adicional, consistiendo el combinado en un conjugado monomérico con menos de un 1 por ciento de área de cada uno de los agregados y LCF. Este combinado se cargó en una columna de desalación Sephadex G-25 (Amersham Biosciences) para el intercambio de un tampón adecuado para la formulación, consistente en Tris-Cl 20 mM y cloruro de sodio 100 mM a pH 8,0. La preparación de CMC-544 purificada, intercambiada con el tampón tenía las siguientes propiedades: Carga de caliqueamicina: 81 pg/mg; Agregado: 0,4 % (porcentaje de área mediante HPLC) LCF: 0,8 % (porcentaje de área mediante HPLC).

Ejemplo 5

ANÁLISIS DE UNIÓN DE LA NAC-GAMMA CALIQUEAMICINA DMH ACBUT CON EL INMUNOCONJUGADO G5/44 (CMC-544)

El inmunconjugado del anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 (G5/44) con caliqueamicina (CMC-544) generada mediante el procedimiento de conjugación anterior se analizó en un estudio de unión para determinar si el conjugado generado utilizando el procedimiento mejorado tenía algún efecto adverso sobre la unión al antígeno. La Tabla 3 muestra que el procedimiento de conjugación no tiene ningún impacto sobre la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo. El inmunconjugado CMC-544 preparado mediante el procedimiento de conjugación antiguo o nuevo se unió al antígeno diana con afinidades similares, que no difieren de las del anticuerpo G5/44 sin conjugar.

35

TABLA 3: AFINIDADES DE UNIÓN DE CMC-544 REALIZADAS UTILIZANDO LOS PROCEDIMIENTOS DE CONJUGACIÓN CMA Y CMC

Anticuerpo dirigido contra CD22	K_D (M)	K_A (1/M)	k_d (1/s)	k_a (1/Ms)	Porcentaje de LCF
G5/44 humanizado	$1,30 \times 10^{-10}$	$7,90 \times 10^9$	$2,80 \times 10^{-5}$	$2,20 \times 10^5$	100
CMC-544 (21 μ g/mg) (procedimiento CMA)	$1,20 \times 10^{-10}$	$8,10 \times 10^9$	$6,10 \times 10^{-5}$	$4,90 \times 10^5$	25
CMC-544 (87 μ g/mg) (procedimiento CMA)	$1,50 \times 10^{-10}$	$6,60 \times 10^9$	$6,90 \times 10^{-5}$	$4,60 \times 10^5$	3,3

Se llevaron a cabo análisis con biosensores utilizando BIAcore 2000 (BIAcore AB, Uppsala, Suecia). CD22mFc se inmovilizó covalentemente sobre el chip biosensor revestido con carboximetil dextrano activado con N-hidroxisuccinimida (CM5) utilizando química normalizada de acoplamiento de aminas a una densidad de proteínas de aproximadamente 2000 unidades de resonancia. Las muestras de CMC-544 o G5/44 se diluyeron en tampón HBS (HEPES 10 mM, pH 7,4 que contenía NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y polisorbato 20 al 0,005 % (en v/v)) y se inyectó en un intervalo de concentración de 1 a 100 nN sobre la superficie del chip biosensor revestida de CD22mFc a un caudal de 30 μ l/min durante 3 min para permitir la unión. Tras la fase de unión, se vigiló la disociación del anticuerpo de unión lavando el chip con el tampón HBS durante un periodo de 15 minutos. Se regeneró la superficie antigénica lavando el chip biosensor con 15 μ l del tampón de regeneración (NaOH 10 mM y NaCl 200 mM) durante 30 segundos, seguido por un tiempo de estabilización de 2 min antes del siguiente ciclo. Se calcularon las constantes cinéticas mediante análisis no lineal de regresión por mínimos cuadrados utilizando un modelo 1:1 ajustado a la curva de unión de Langmuir y un programa BIAevaluation (versión 3.0, BIAcore). Se evaluó la unión de CMC-544 al antígeno mediante análisis de resonancia de plasmón superficial utilizando CD22mFc inmovilizado covalentemente sobre un chip biosensor. Los resultados del análisis cinético de la unión de CMC-544 y G5/44 a CD22mFc muestran que, Tras ajustar los datos globalmente a un modelo de Langmuir 1:1 con compensación para la transferencia de masas, Tanto CMC-544 como CD22 unido a G544 sin conjugar tuvieron una afinidad similar (CMC-544:CD22 K_D = 200 pM; G5/44:CD22 K_D = 235 pM). La conjugación a la caliqueamicina no afecta a la capacidad de G5/44 de unirse eficazmente a CD22mFc.

Se examinó también la unión de CMC-544 y G5/44 a CD22 expresada sobre la superficie de células de linfoma de linfocitos B mediante citometría de flujo. Se usaron el mAb gemtuzumab dirigido contra CD33 (hP67.6) y su conjugado de caliqueamicina CMA-676 (gemtuzumab ozogamicina) como controles emparejados por isotipo en esta evaluación. Rituximab (Rituxan™), una IgG1 quimérica humana dirigida contra mAb CD20 humano, se usó como control positivo. IgG1 e IgG4 policlonales humanos purificados se usaron también como controles negativos. La unión de CMC-544 y G5/44 a CD22 a Ramos o RL BCL fue similar y distinguible de la de IgG4 humana. RL BCL mostró una expresión superficial de CD22 menor que en Ramos BCL. Por el contrario, la unión de CMA-676 o de gemtuzumab a cualquiera de BCL fue similar a la de la IgG4 humana consistente con su ausencia de expresión de CD33 (no se muestran los datos). Las mismas células demostraron una fuerte unión de rituximab dirigido contra CD20. A diferencia de gemtuzumab y CMA-676, ni CMC-544 ni G5/44 demostraron ninguna unión a células CD22⁺ CD33⁺ HL-60 de leucemia (no se muestran los datos). Estos resultados sugieren que la conjugación de G5/44 con caliqueamicina no afecta su especificidad antigénica. CMC-544 reconoce específicamente CD22 en linfocitos B humanos, pero no en murino, rata, can, porcino o primate (macaco y mono rhesus) (no se muestran los datos).

35 Ejemplo 6

ANÁLISIS DE LOS EFECTOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CMC-544

1. CITOTOXICIDAD *IN VITRO*

Se comparó el efecto de CMC-544 utilizando los procedimientos CMA-676 y CMC-544 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares de linfoma de linfocitos B CD22⁺, RL, Daudi, Raji y Ramos. Se usó un conjugado de caliqueamicina emparejado por isotipo dirigido a CD33 humano (CMA-676) para reflejarlos efectos no específicos de antígeno del conjugado. El uso de N-Ac gamma caliqueamicina DMH sin conjugar (el fármaco liberado a partir del conjugado tras la hidrólisis ácida) en esta evaluación indicó que cada una de estas líneas celulares utilizadas fue sensible a los efectos letales de la caliqueamicina. La Tabla 4 muestra los resultados de estas evaluaciones basados en la equivalencia de la caliqueamicina y la Tabla 5 muestra estos resultados expresados como las concentraciones de las proteínas de los anticuerpos conjugados. La administración mediada por CD22 de caliqueamicina a las células CD22⁺ fue al menos 10 veces más eficaz en la destrucción de las células diana que el propio fármaco no conjugado. El conjugado del control emparejado por isotipo (CMA-676) mostró citotoxicidad que fue tanto menor como similar con el derivado de caliqueamicina sin conjugar. Resulta evidente de la Tabla 4 que el conjugado preparado mediante el procedimiento de conjugación CMC-544 puede generar un efecto citotóxico equivalente a concentraciones menores de anticuerpos que el conjugado preparado mediante el procedimiento de conjugación CMA-676.

TABLA 4: INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR LA CALIQUEAMICINA CONJUGADA (IC₅₀ Pm de la caliqueamicina)

LÍNEAS DE LINFOMA DE LINFOCITOS B	CARGA DE CMC-544 EN EL PROCEDIMIENTO CMC-544: 65 µG/MG	CARGA DE CMC-544 EN EL PROCEDIMIENTO CMA-676: 35 µG/MG	CONTROL NEGATIVO CMA-676 CARGA: 35 µG/MG	N-ACETIL GAMMA CALIQUEAMICINA DMH
RL n.º 1	6	30	600	226
n.º 2	12	40	400	270
Daudi n.º 1	21	80	1886	260
Raji n.º 1	500	ND*	2800	460
n.º 2	560	520	4100	490
Ramos n.º 1	200	130	ND	700
n.º 2	260	ND	ND	1000

*ND, sin determinar

TABLA 5. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR EL ANTICUERPO CONJUGADO (IC₅₀ µg/ML DE ANTICUERPO)

LÍNEAS DE LINFOMA DE LINFOCITOS B	CARGA DE CMC-544 EN EL PROCEDIMIENTO CMC-544: 65 µG/MG	CARGA DE CMC-544 EN EL PROCEDIMIENTO CMA-676: 35 µG/MG	CONTROL NEGATIVO CMA-676 CARGA: 35 µG/MG	ANTICUERPO CONTROL G5/44
RL n.º 1	0,09	0,86	17,14	> 100
n.º 2	0,18	1,14	11,43	> 100
Daudi n.º 1	0,32	2,29	53,89	> 100
Raji n.º 1	7,69	ND*	80,00	> 100
n.º 2	8,62	14,86	117,14	> 100
Ramos n.º 1	3,08	3,71	ND	> 100
n.º 2	4,00	ND	ND	> 100

*ND, sin determinar

- 5 Citotoxicidad *in vivo*. CMC-544 preparado mediante el procedimiento CMC-544 se evaluó adicionalmente en xenoinjertos de linfoma de linfocitos B. En estos estudios, se utilizaron dos tumores de linfomas de linfocitos B. Linfoma RL es una línea de células derivada de NHL no de Burkitt, mientras que RAMOS se derivó originalmente de linfoma de Burkitt. En un experimento representativo que se muestra en la Figura 15, CMC-544 y su homólogo de anticuerpo de murino mostraron ser eficaces en la inhibición, de una manera dependiente de la dosis, del crecimiento de linfocitos B RAMOS.

Se ha mostrado que el conjugado del anticuerpo humanizado es más potente que su homólogo murino. En este estudio, la dosis más baja del conjugado de caliqueamicina que puede producir una inhibición del crecimiento de linfoma significativa era de 10 mg/kg de conjugado de NAC-gamma caliqueamicina DMH. Por el contrario, el anticuerpo sin conjugar, G5/44, a 10 mg/kg administrado por vía intraperitoneal en un calendario similar como conjugado no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral.

Se llevaron a cabo estudios similares utilizando el modelo del linfoma RL. La Tabla 6 muestra los análisis combinados de tres experimentos independientes en los que se evaluaron los efectos antitumorales de CMC-544 en tumores RL NHL estadiados a 300-400 mg de tamaño en ratones lampiños. CMC-544 produjo tumores dependientes de la dosis hasta la regresión en un marco de tiempo de 3 semanas. La dosis mínimamente eficaz de CMC-544 en el modelo de linfoma RL se estableció a partir de análisis estadísticos de estos estudios para ser 20 mg/kg basándose en el contenido en caliqueamicina. No existen muertes en ninguno de estos tres estudios. Dosis mayores (60-320 mg/kg) de CMC-544 produjeron una regresión casi completa del linfoma RL. En su conjunto, los resultados obtenidos con los dos modelos de linfomas de linfocitos B demuestran claramente la capacidad de CMC-544 de producir una regresión tumoral.

25 TABLA 6: EFECTO ANTITUMORAL DE CMC-544 CONTRA XENOINJERTOS RL NHL EN RATONES LAMPIÑOS

DOSIS DE CALIQUEAMICINA EN µG/KG	PROMEDIO RELATIVO DE CRECIMIENTO TUMORAL ¹	% DE T/C ²	VALOR P FRENTE A VEHÍCULO ³
Vehículo	6,74	-	-
20	2,87	43	0,011
40	1,34	20	<0,001
60	0,58	9	<0,001
80	0,54	8	<0,001
160	0,21	3	<0,001
320	0,10	1	<0,001

(continuación)

DOSIS DE CALIQUEAMICINA EN $\mu\text{G}/\text{KG}$	PROMEDIO RELATIVO DE CRECIMIENTO TUMORAL ¹	% DE T/C ²	VALOR P FRENTE A VEHÍCULO ³
¹ Crecimiento tumoral relativo (RTG) calculado como (masa tumoral en la Semana 3/ masa tumoral en el Día 1) para cada animal. ² $100^*(\text{RTG promedio para la dosis de CMC-544} / \text{RTG promedio para el grupo del vehículo})$ ³ Valor p procedente de un test de la t monolateral comparativo de CMC-544 frente al vehículo, usando el RTG transformado por rangos como la variable respuesta. ⁴ Término error para todos los test de la t basados en la varianza combinada, s^2 , a través de todos los grupos de tratamiento ($s = 154,54$).			

Se ha investigado también la capacidad de CMC-544 realizada mediante el nuevo procedimiento de inhibir el crecimiento de xenoinjertos grandes de linfomas de linfocitos B establecidos usando los modelos de linfoma RAMOS y RL. Se dejaron crecer los tumores y se estadificaron a 1,5 o 2 g de masa tumoral tras lo cual se administraron CMC-544 o un conjugado del control negativo emparejado por isotipo (CMA-676) por vía intraperitoneal a la dosis de 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de caliqueamicina conjugada manteniendo el calendario original de dosificación en los días 1, 5 y 9. Se ha mostrado anteriormente que el mismo calendario de dosificación producía una regresión duradera de tumores pequeños estadificados (véase la Tabla 6). Tal como se muestra en la Figura 16, la administración de CMC-544 a ratones que soportan linfomas RAMOS grandes produjo la regresión gradual de la masa de linfoma preexistente y en el día 20, 3 de 4 ratones que soportan tumores estaban exentos de tumores. La vigilancia de estos ratones exentos de tumores hasta el día 50 no indica ningún recrecimiento del linfoma RAMOS en regresión. Por el contrario, un control emparejado por isotipo, CMA-676, no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral. Cuatro de cinco ratones que soportaban tumores grandes tratados con CMA-676 se sacrificaron antes del día 15 debido a que su carga tumoral alcanzó casi el 15 % de su peso corporal.

Se llevó a cabo un experimento similar utilizando CMC-544 en el modelo de linfoma RL. La administración intraperitoneal de CMC-544 a una dosis 160 mg/kg en un calendario similar al que se ha descrito antes produjo >90 % de regresión de la masa preexistente de linfoma RL en 30 días. Sin embargo, en el día 45, 2 ratones de este grupo con linfomas reducidos mostraron un recrecimiento de los tumores. Estos resultados indican que CMC-544 puede producir la regresión de linfomas establecidos tanto pequeños como grandes. En un pequeño número de estudios que no se muestran aquí, los linfomas RL que recrecieron esporádicamente tras la regresión inicial inducida por CMC-544 se volvieron a tratar con CMC-544 de nuevo, y siguieron siendo sensibles al segundo ciclo del tratamiento con CMC-544 y volvieron a experimentar de nuevo regresión. Por tanto, el tratamiento con CMC-544 puede ser eficaz frente a masas pequeñas y grandes de linfomas de linfocitos B con potencial para repetir el tratamiento.

II. COMPARACIÓN *IN VIVO* DE CONJUGADOS PREPARADOS CON PROCEDIMIENTOS DE CONJUGACIÓN CMA y CMC.

La Figura 17 muestra los resultados de un experimento representativo en el que los ratones que soportaban un linfoma estadificado recibieron dos dosis diferentes (80 y 320 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de caliqueamicina conjugada) de CMC-544 preparadas usando el procedimiento de conjugación CMA-676 y el procedimiento de conjugación CMC-544 utilizando el calendario de dosificación normalizado. La eficacia antitumoral observada fue dependiente de la dosis como se esperaba y no hubo diferencias en las eficacias de cualquiera de las dos preparaciones CMC-544. Por el contrario, la N Ac-gamma caliqueamicina DMH sin conjugar administrada por vía intraperitoneal a 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fue inactiva. Sin embargo, debe enfatizarse que para cada dosis de la caliqueamicina conjugada, la cantidad de proteína de anticuerpo administrada en la forma de un conjugado fue cuatro veces mayor para CMC-544 preparada mediante el procedimiento CMA-676 frente a la preparada mediante el procedimiento CMA-676. Como el contenido de caliqueamicina del conjugado diana es principalmente responsable de producir el efecto antitumoral, es posible administrar la cantidad requerida de caliqueamicina mediante el conjugado preparado mediante el nuevo procedimiento utilizando cantidades mucho más pequeñas del anticuerpo director. La carga aumentada del conjugado preparado mediante el procedimiento CMC-544 es, en efecto, debida a la ausencia de cantidades significativas de fracción conjugada baja (LCF).

III. TUMORES RESISTENTES AL TRATAMIENTO CON RITUXIMAB (RITUXAN™)

La siguiente cuestión a explorar si cualquiera de los linfomas de linfocitos B que crece después de la finalización del tratamiento con el rituximab (Rituxan™) dirigido contra CD20 comercialmente disponible sigue siendo sensible al tratamiento con CMC-544. Con este fin, linfomas RL en desarrollo (no estadificados) se trataron con rituximab (Rituxan™) durante tres semanas. Siempre que se continuó el tratamiento con rituximab (Rituxan™), se inhibió el crecimiento del linfoma RL. Tras el cese del tratamiento con rituximab (Rituxan™), los linfomas RL crecieron rápidamente hasta el tamaño de ~1 g de masa, en cuyo momento se trataron con CMC-544 a la dosis intraperitoneal de 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Tal como se muestra en la Figura 18, estos linfomas RL siguieron siendo sensibles a CMC-544 con un 80 % de ratones que llegaron a estar exentos de tumores en el día 60. Por tanto, CMC-544 puede producir la regresión de linfomas de linfocitos B con tres dosis que podrían solo inhibirse mediante la dosificación continua de rituximab (Rituxan™).

Ejemplo 8**EFFECTO *IN VITRO* E *IN VITRO* DE CMC-544 I. ESTUDIOS DE UNIÓN Y TOXICIDAD**

Se evaluó CMC-544 para su unión con CD22 y también para su actividad en modelos *in vitro* e *in vivo*. Se comparó también CMC-544 con CMA-676, un conjugado del control emparejado por isotipo de hP67.6 (IgG4) con AcBut unido a caliqueamicina, y a Rituximab, una IgG1 quimérica dirigida contra el mAb CD20, (Rituxan™, IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA), que está comercialmente disponible y se ha adquirido de Medworld Pharmacy (Chestnut Ridge, NY). Se utilizaron los siguientes anticuerpos en los estudios del dominio de unión G5/44: BU12 (Celltech, Slough, Reino Unido); BLCAM, HD239 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA); RFB-4 (Ansell Corp, Bayport, MN); SHCL-1, Leu 14 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ); 4KB128 y To 15 (Dako Corp, Carpinteria, CA); M6/13 y M5/44 (Celltech, Slough, Reino Unido). Los anticuerpos adicionales utilizados en los estudios de bloqueo fueron SJ10 (Immunotech, Fullerton, CA) y M17.1.1, M19.1.1, M38.1.1 (Celltech, Slough, Reino Unido). Las líneas celulares para los estudios que incluían la línea Ramos de células de linfoma de Burkitt (CRL-1923) y la línea celular RL de linfoma no de Hodgkin (CRL-2261) (NHL) se obtuvieron de la American Type Culture Collection. Se determinó que las líneas celulares estaban exentas de micoplasmas con un ensayo de detección de micoplasmas mediante reacción en cadena de la polimerasa (ATCC, Manassas, VA). Las líneas celulares se mantuvieron como cultivos en suspensión en medio RPMI más FBS al 10 %, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, glucosa al 0,2 %, 100 U/ml de penicilina G sodio, y 100 µg/ml de sulfato de estreptomina.

Se evaluó si G5/44 puede inhibir o no la unión de los mAb de murino de especificidad conocida para CD22 mediante el análisis BIAcore utilizando Fc-CD22 inmovilizado con el chip BIAcore CM5. Se compararon las unidades de resonancia mediante plasmón superficial (RU) obtenidas con y sin saturación previa de Fc-CD22 inmovilizado con G5/44. Se llevó a cabo el análisis de interacción biomolecular utilizando BIACORE 2000. Los anticuerpos se pasaron sobre una superficie del control blanca (celda de flujo 1, sirve como control, no se acopló la proteína) y la superficie del ensayo de Fc-CD22 (celda de flujo 2) se inmovilizó sobre un chip sensor CM5 mediante química de acoplamiento de aminos a un nivel de 9,042 RU. El sensograma resultante era la respuesta (RU) sobre la celda de flujo 2 menos la respuesta (RU) sobre la celda de flujo 1. Se obtuvo un segundo sensograma saturando en primer lugar las celdas de flujo G5/44 (100 µg/ml) antes de la introducción de los mAb de murino contra CD22 que se habían caracterizado anteriormente para su unión. Inmediatamente tras medir la respuesta a G5/44, los mAb de murino dirigidos contra CD22 se perfundieron individualmente sin eliminar G544. Se registró también la segunda respuesta combinada generada debido a la unión del mAb de murino dirigido contra CD22 con el CD22 revestido con G5/44. Si el anticuerpo de murino se unió a CD22 en los sitios no relacionados con los ocupados por G5/44, entonces las respuestas combinadas serían aditivas. Si la unión de G5/44 con CD22 interfería o evitaba la unión del segundo anticuerpo, entonces las respuestas combinadas no serían aditivas. Cada una de las segundas medidas combinadas se corrigió para la "velocidad de la reacción inversa" de la interacción G5/44 CD22.

G5/44 bloqueó la unión solo de aquellos anticuerpos que se unían al epítipo A / dominio 1 de tipo Ig de CD22 (SHCL1 Leu 14 y HD239), indicando que G5/44 se une también en este dominio de CD22 (Figuras 1X y 1Y). Los anticuerpos que se unen al epítipo B / dominio 3 de tipo Ig de CD22 (RFB-4), epítipo C / dominio 4 de tipo Ig de CD22 (To 15) y dominio 2 de tipo Ig de CD22 (4KB128), no se bloquearon por G5/44. Estos resultados indican que el sitio de unión a G5/44 en CD22 se localiza en el primer dominio de tipo Ig ya que evita la unión de aquellos mAb dirigidos contra CD22 que reconocen el primer dominio de tipo Ig de CD22 (epítipo A). Otro anticuerpo dirigido contra CD22, M6/13, de subespecificidad desconocida se bloqueó también con G5/44 (Cell-tech, Slough, Reino Unido), cartografiando de esta manera el sitio de unión de M6/13 al epítipo A / dominio 1 de tipo Ig de CD22. El anticuerpo M5/44, el precursor murino de G5/44 que tiene la misma especificidad que G5/44 inhibe la unión de G5/44, y sirve como control positivo. El anticuerpo BU12 dirigido contra CD19 sirve como control negativo en estas evaluaciones. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Usando los mAb de murino de especificidades de unión conocidas para los dominios individuales de CD22, se investigó la capacidad de G5/44 para bloquear la unión de estos anticuerpos a los linfocitos B. Además, se investigó también la capacidad de los mAb para bloquear la unión de G5/44 a los linfocitos B. En estos estudios, 1×10^5 células Ramos se expusieron en primer lugar al anticuerpo dirigido contra CD22 de murino (10 µg/ml de G5/44 humanizado o anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra CD22) durante 1 hora a 40 °C antes de la exposición de las células a G5/44 (10 µg/ml). Las células se incubaron durante 1 hora más a 4 °C. Después de los tratamientos con anticuerpos, los linfocitos B se agruparon y lavaron con PBS-BSA al 1 % y se añadió el anticuerpo secundario adecuado (tanto anticuerpo de cabra-FITC dirigido contra IgG humana (cadena pesada y ligera) o anticuerpo de cabra-FITC dirigido contra IgG de ratón (cadena pesada y ligera)) a 100 µl de una dilución 1:100 en PBS-BSA al 1 % durante 30 minutos a 4° C. Las células se agruparon de nuevo, se lavaron, y se volvieron a suspender en PBS-BSA al 1 % y se añadieron a un tubo que contenía 250 µl de PBS- formaldehído al 1 %. Se midió la intensidad de la fluorescencia asociada con las células mediante citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo BD FACSort.

Los resultados mostraron que la exposición previa de G5/44 a linfocitos B CD22+ dio como resultado una significativa inhibición de la unión posterior de los mAb M5/44 y M6/13 dirigidos contra CD22. Por el contrario, la unión de los mAb RFB4 dirigidos contra CD22, To15, HD239, y 4KB a los linfocitos B no fue inhibida por G5/44. La ausencia de inhibición significativa de la unión de HD239 a los linfocitos B mediante G5/44 como se detectó mediante citometría de flujo fue inesperada, debido especialmente a que el análisis BIAcore indicó que G5/44 puede bloquear la unión de HD239 a

CD22. La ausencia de una inhibición fuerte de HD239 por G5/44 puede explicarse basándose en las diferencias en sus afinidades relativas para CD22. Cuando se examinaron los anteriores mAb dirigidos contra CD22 de murino para establecer su capacidad de inhibir la unión de G5/44 a linfocitos B CD22+, SHCL1 y M6/13, pero no de los otros mAb dirigidos contra CD22, inhibió la unión de G5/44. Se han cartografiado los epítomos de unión de HD239 y SHCL1 al primer dominio de tipo Ig de CD22. Sin embargo, no se han cartografiado los epítomos reconocidos por M6/13 o M5/44. Los estudios de bloqueo detallados anteriormente indican que los anticuerpos anteriores reconocen los epítomos localizados en el primer dominio de tipo Ig de CD22, conocidos en su conjunto como epítomo A.

Se incubaron veinte mil células Ramos con diversas dosis de CMC-544 con y sin rituximab durante 96 horas. Después de 96 horas, se midió la viabilidad celular medida mediante exclusión con yoduro de propidio y se analizó mediante citometría de flujo. Se calculó la viabilidad promedio de 3 a 6 pocillos y se calculó la inhibición de respuesta a la dosis para los diversos tratamientos. Se calculó la inhibición de respuesta al fondo de la viabilidad celular de una concentración cero de CMC-544. Se usó la regresión logística para ensayar si CMC-544 produjo una inhibición dependiente de la dosis estadísticamente significativa del crecimiento de células Ramos sobre el intervalo de dosis de 0,01 a 3 ng de caliqueamicina DMH/ml. Se usó también la regresión logística para determinar si la interacción de CMC-544 con rituximab fue estadísticamente significativa. Se calcularon también las concentraciones (CI_{50}) y se registró solo la eficacia de cada tratamiento con respecto al tratamiento con CMC-544. El análisis se llevó a cabo utilizando el procedimiento PROBIT en SAS versión 8.2.

Los resultados del estudio mostraron que CMC-544 produjo una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de células Ramos sobre el intervalo de dosis de 0,01 a 3 ng de caliqueamicina DMH/ml. La concentración inhibidora promedio (CI_{50}) de CMC-544 solo fue de 0,029 ng/ml (Figura 20). Se añadieron concentraciones de 2, 20, y 200 μ g/ml de rituximab a células tratadas con CMC-544 para determinar si la interacción de rituximab con la actividad de citotoxicidad de CMC-544 es estadísticamente significativa. Rituximab, añadido a 20 y 200 μ g/ml sin CMC-544, no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento celular por sí mismo (111,7 % y 94,0 % de crecimiento del vehículo, respectivamente). En combinación con CMC-544, las tres concentraciones de rituximab produjeron cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$) hacia la izquierda en la pendiente e interceptan la curva de dosis-respuesta de CMC-544 (Figura 20). La combinación con 2 y 200 μ g/ml de rituximab produjo los cambios más grandes en las curvas de dosis-respuesta. Estas 2 curvas no fueron estadísticamente diferentes entre sí, pero fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) de la dosis combinada de 20 μ g/ml. Un segundo estudio (no se notifican los resultados) confirmó los resultados observados en el primer estudio. Las concentraciones inhibitorias promedio para las combinaciones de 2, 20, y 200 μ g/ml de rituximab más CMC-544 son 0,0072, 0,0081, y 0,0072 ng/ml, respectivamente. Las concentraciones inhibitorias promedio CMC-544 más rituximab son aproximadamente cuatro veces más potentes que la CI_{50} de CMC-544 solo.

II. XENOINJERTOS SUBCUTÁNEOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VIVO* Y LINFOMAS DE LINFOCITOS B DISEMINADOS SISTÉMICAMENTE EN RATONES SCID

Se administró a ratones lampiños atómicos hembras de 18-22 g una irradiación corporal total (400 rads). La irradiación suprimió además el sistema inmune de los ratones para potenciar la captación del tumor. Tres días después de la irradiación, se inyectaron a los ratones por vía subcutánea células 107 RL en Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Belford, MA, diluidas 1:1 en medio RPMI) en el flanco derecho dorsal. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño adecuado, ($\approx 0,3$ g, normalmente 21 días después), se administró CMC-544, rituximab o tratamiento CHOP (véase a continuación) en solución salina estéril, 0,2 ml/ratón ip. El día inicial de la administración del fármaco se consideró el día 1. Se administraron dos dosis adicionales en los días 5 y 9 (tratamiento = q4Dx3). El tratamiento CHOP consistió en ciclofosfamida (C), (Cytosan™, Bristol-Meyers Squibb Co., Princeton, NJ) 40 mg/kg ip; HCl de doxorubicina (H), (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO) 3,3 mg/kg ip; vincristina (O), (GensiaSicor Pharmaceuticals, Irvine, CA) 0,5 mg/kg ip; y prednisona (P), (Roxane Labs., Columbia, OH) 0,2 mg/kg por vía oral. CHO se administró de acuerdo con el mismo calendario de dosificación que CMC-544 y rituximab (q4Dx3) mientras que prednisona se administró por vía oral cada día diferente para 5 dosis (q2Dx5). Los tumores se midieron al menos una vez a la semana y se calcularon como masa tumoral (g) = 0,5 (anchura del tumor/2)(longitud del tumor). Se calcularon las \square SEM promedio de grupo y se compararon con el grupo tratado con el vehículo para la significancia estadística utilizando test de la T múltiples. Se registraron los promedios de grupo hasta 50 días o hasta que murió cualquier ratón (que perturbó el promedio del grupo) o el tumor creció demasiado grande ($> 3,5$ g) y hubo que someter a eutanasia al ratón. Transcurrido este tiempo, se registró la masa tumoral solo para cada ratón individual en todos los grupos de tratamiento. Se registró también el número de ratones exentos al final de cada grupo de tratamiento del estudio.

Para determinar el efecto de CMC-544 solo o en combinación con otros agentes bioactivos en linfomas diseminados, se usó el modelo de ratón SCID. Ratones SCID machos, (CB17 SCID), de 20-25 g, recibieron una inyección con 10^6 células Ramos a través de la vena de la cola (0,2 ml). 3 o 9 días después de la inyección de células, se administró a los ratones vehículo, conjugados (CMC-544 o CMC-676), o rituximab, ip, para un total de 3 dosis. El día 3 del calendario de tratamiento, los ratones recibieron una dosis en los días 3, 7, y 11. El día 9 del calendario de tratamiento, los ratones recibieron una dosis en los días 9, 13 y 17. El día 9 del calendario de tratamiento, se administraron también combinaciones de CMC-544 y rituximab como se describe a continuación. Se vigiló a los ratones diariamente para la presencia de parálisis en las extremidades inferiores en cuyo momento se sacrificaron. Se usaron de siete a 10 ratones por grupo de tratamiento. Se calcularon los tiempos de supervivencia promedio del grupo (\pm SD), los tiempos medios, mínimos, y máximos. Se determinó la diferencia en la distribución de supervivencia entre grupos utilizando el test de

rango logarítmico no paramétrico con una significancia notificada al nivel de 0,05. Se construyeron las curvas de supervivencia utilizando el procedimiento de Kaplan-Meier.

El estudio inicial examinó el efecto de dos diferentes calendarios de dosificación sobre los tiempos de supervivencia de ratones SCID con el linfoma diseminado. El primer estudio buscó iniciar la dosificación del fármaco 3 días después que se inyectaran las células tumorales por vía intravenosa (modelo de desarrollo) Mientras que el segundo estudio retrasó la dosificación del fármaco hasta 9 días después de la inyección de células (modelo establecido). En cada estudio se administraron tres dosis de CMC-544 (160 mg/kg), CMA-676 (160 mg/kg), o rituximab (20 mg/kg) ip, con 4 días de separación (Q4Dx3). En el modelo de desarrollo, los ratones tratados con el vehículo tuvieron un tiempo de supervivencia promedio de 27 días (Figura 20, Tabla 8). CMA-676, el control emparejado por isotipo para CMC-544, no aumenta el tiempo de supervivencia significativamente ($p>0,05$). CMC-544 aumentó significativamente el tiempo de supervivencia a 41 días mientras que rituximab tuvo un profundo efecto, aumentando el tiempo de supervivencia a > 125 días (significativamente mayor que CMC-544, $p<0,05$). La dosificación retardada hasta que las células tumorales tuvieron oportunidad de circular (buscar) y depositarse en los tejidos diana (modelo establecido) cambió los resultados para CMC-544 y rituximab (Rituxan™). De nuevo, CMA-676 no tuvo efecto significativo sobre los tiempos de supervivencia (Figura 21, Tabla 8). Rituximab aumentó el tiempo de supervivencia promedio a 62,6 días mientras que CMC-544 aumentó el tiempo de supervivencia promedio a 83,5 días. No hubo diferencia significativa entre los efectos de CMC-544 y rituximab en el modelo establecido.

Se llevó a cabo un estudio preliminar para determinar si rituximab (Rituxan™) tenía algún efecto, tanto positivo como negativo, sobre la respuesta de supervivencia de CMC-544. Se administró CMC-544 (160 mg/kg) con y sin rituximab (Rituxan™) (20 mg/kg, se marcó la dosis alta de fármaco combinada (HD)). Además, se administraron simultáneamente dosis menores de CMC-544 (80 mg/kg) con dosis menores de rituximab (Rituxan™) (10 mg/kg). Los compuestos no se administran por separado a dosis respectivas de 80 mg/kg o 10 mg/kg debido al número limitado de ratones del estudio. Esta combinación, CMC-544 (80 mg/kg) con rituximab (Rituxan™) (10 mg/kg) marcó la dosis media combinada (MD) y se desarrolló para determinar la factibilidad de las dosis combinadas menores de fármacos sobre la supervivencia del ratón SCID. CMC-544 (160 mg/kg) y rituximab (Rituxan™) (20 mg/kg), administrados en solitario, Se comportaron como se había encontrado en el modelo anterior establecido. Cada tiempo de supervivencia promedio se prolongó a 58,5 y 50,5 días, respectivamente (Figura 22, Tabla 9). En combinación, el tiempo de supervivencia promedio aumentó ligeramente (aunque no fue estadísticamente significativo, $p>0,05$) aumentó a 64,4 días para una AD combinada. La dosis media combinada de 80 mg/kg de CMC-544 y 10 mg/kg de rituximab aumentó significativamente ($p<0,05$ frente al vehículo tratado) el tiempo de supervivencia hasta un promedio de 92,4 días. Estos resultados sugirieron que se garantizaron las dosis combinadas menores de CMC-544 y rituximab.

Se llevó un estudio combinado adicional con CMC-544 y rituximab. Se analizaron los siguientes grupos de tratamiento: CMC-544 a 40, 80 y 160 mg/kg; rituximab (Rituxan™) a 5, 10, y 20 mg/kg; y CMC-544 a 40 mg/kg más rituximab (Rituxan™) 5 mg/kg, CMC-544 a 80 mg/kg más rituximab (Rituxan™) 10 mg/kg, y CMC-544 a 160 mg/kg más rituximab (Rituxan™) 20 mg/kg. Todas las dosis de rituximab (Rituxan™) aumentaron ligeramente el tiempo de supervivencia promedio al intervalo de 33 - 40 días, (todas las dosis tenían $p<0,05$ en comparación con el tiempo de supervivencia promedio tratado con el vehículo de 25,8, Figura 23, Tabla 10). La dosis alta de CMC-544, 160 mg/kg, Aumentó el tiempo de supervivencia promedio a 85 días, consistente con los resultados notificados en los dos estudios iniciales. La combinación de CMC-544 con rituximab (Rituxan™) no mejora significativamente los tiempos de supervivencia (Figura 24, Tabla 10). Las dos dosis menores de CMC-544 (80 y 40 mg/kg) aumentaron cada una significativamente ($p<0,05$) los tiempos de supervivencia promedio por encima de la dosis alta de CMC-544. Para las dosis de 40 y 80 mg/kg de CMC-544, 90 % y 80 %, respectivamente, de los ratones sobrevivían aún a los 125 días. Ambos grupos combinados de fármacos hicieron que el 100 % de los ratones sobrevivieran hasta el día 125. Dosis menores de CMC-544 son más eficaces que la dosis alta de 160 mg/kg.

Rituximab (Rituxan™); en combinación con CMC-544, no tuvieron un efecto evidente sobre la actividad de CMC-544 en el modelo de linfocitos B diseminados en ratones SCID a las dosis ensayadas (véase anteriormente). Cualquiera de CMC-544, administrado simultáneamente con rituximab (Rituxan™), dio como resultado un aumento o inhibición de la actividad de actividad antitumoral se evaluó también usando el xenoinjerto de linfoma RL B subcutáneo en ratones lampiños Balb/c. En el modelo de linfoma B subcutáneo, los tumores se estadificaron hasta una masa tumoral promedio de 300 mg, después de los cual los dos agentes terapéuticos bajo estudio se administraron IP. CMC-544 se usó a 20 u 80 mg/kg Q4Dx3 con o sin rituximab (Rituxan™) (20 mg/kg Q4Dx3). La administración simultánea de rituximab (Rituxan™) ni aumentó ni inhibió significativamente ($p>0,05$) la eficacia terapéutica de CMC- 544 (Figura 25). Rituximab (Rituxan™); administrados en solitario, inhibieron el crecimiento del linfoma RL B (inhibición del 57 % del crecimiento tumoral en el día 20, $p<0,05$ frente al vehículo tratado) en este estudio, similar al observado con la dosificación menor de CMC-544.

El régimen quimioterapéutico combinado CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona) es la modalidad de tratamiento más comúnmente utilizada para pacientes con linfoma no de Hodgkin. Se comparó el efecto antitumoral de CHOP con el de CMC-544 en xenoinjertos RL B establecidos. Los componentes individuales del régimen CHOP se utilizaron a sus dosis respectivas máximas toleradas evaluadas en ratones lampiños (no se notifican los datos) y fueron como sigue: Ciclofosfamida (C) 40 mg/kg IP, doxorubicina (H) 3,3 mg/kg IP, vincristina (O) 0,5 mg/kg IP, y prednisona (P) 0,2 mg/kg PO. CHO se administró Q4Dx3 y P se administraron por vía oral, Q2Dx5. CMC-544 se administró IP, Q4Dx3 a una dosificación de 160 mg/kg de equivalentes de caliqueamicina. El tratamiento

CHOP produjo inicialmente una inhibición significativa del crecimiento del linfoma RL B (Figura 26). Sin embargo, 3 semanas después, los tumores volvieron a crecer con velocidades de crecimiento similares a las del grupo tratado con vehículo. Por el contrario, el efecto antitumoral de CMC-544 fue completo y prolongado a lo largo del periodo experimental. Estos resultados sugieren que CMC-544, a una dosis significativamente menor que la dosis no letal máxima en ratones lampiños, fue más eficaz que el tratamiento combinado CHOP.

Estos estudios mostraron que rituximab (Rituxan™) añadido a CMC-544 produjo un significativo aumento en la actividad citotóxica de CMC-544 observada con las células Ramos de linfoma B. También se ha notificado recientemente una interacción sinérgica en células Ramos para rituximab (Rituxan™) y los glucocorticoides. Además, se ha observado una inhibición sinérgica del crecimiento en 4 de 8 líneas de células adicionales con rituximab (Rituxan™) cuando se administró en combinación con dexametasona 10 µM.

Rituximab (Rituxan™) por sí mismo, 0,4 a 10 mg/ml, se notificó que producía una inhibición del crecimiento de células Ramos significativa, aunque pequeña (máximo del 18 %). Además, fue activo en 6 de 8 líneas celulares de linfoma no de Hodgkin de linfocitos B cuando se incubó a 10 µg/ml (48 h de incubación). Ghetie y col., mostraron que rituximab (Rituxan™), 10 µg/ml, produjo un aumento del 6.2 % en la apoptosis (frente al 3,5 % en las células tratadas con vehículo) tras 24 horas de incubación con células Ramos. En los estudios actuales, rituximab (Rituxan™), a las dosis de 20 y 200 µg/ml no tuvo efecto sobre el crecimiento de las células Ramos cuando se administró solo. En ratones, no hubo evidencia de ninguna interacción entre CMC 544 y rituximab (Rituxan™) tanto en el modelo diseminado como en el modelo de xenoinjerto subcutáneo. Los fármacos combinados ensayados no interfieren con los efectos del resto ni los potencian. Si se reducen las dosis de cada fármaco en el modelo diseminado cambiara esta observación necesaria a determinar.

El modelo de linfoma de linfocitos B diseminados con células Ramos se ha descrito por Flavell y col. Se notificó que los tiempos de supervivencia promedio para los ratones tratados con vehículo eran de 34-36 días. Los ratones desarrollaron parálisis de las extremidades posteriores y progresaron hasta llegar a estar moribundo, muriendo pronto después. El análisis histológico de los órganos rebeló que los órganos implicados más comúnmente eran la glándula adrenal, el bazo y el espacio subaracnoide. El espacio subaracnoide infiltrado se extiende frecuentemente en el cerebro. Rituximab (Rituxan™) se comportó correctamente cuando se administró en la fase inicial del procedimiento de la enfermedad para los ratones SCID diseminados (Figura 20) pero lo hizo peor cuando se administró en el día 9 en la fase establecida del modelo (Figura 21). Rituximab (Rituxan™); siendo del isotipo IgG1, trabaja más probablemente a través de los mecanismos efectores del ratón hospedador. Estos mecanismos incluyen la citotoxicidad mediada por complemento y/o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediante el reclutamiento de linfocitos citotóxicos naturales que están presentes en los ratones SCID. Las células tumorales Ramos inyectadas son probablemente más susceptibles inicialmente hacia los mecanismos inmunes del hospedador que se activan mediante rituximab (Rituxan™), antes de que las células tengan una oportunidad de infiltrarse en los órganos afectados. El anticuerpo G5/44 sin conjugar (la molécula directora en CMC-544) no se ha ensayado todavía en el modelo del tumor diseminado en ratones SCID, pero no tiene efecto cuando se administra en xenoinjertos subcutáneos. G5/44, siendo del isotipo IgG4, no se espera que active los mecanismos efectores del hospedador y, por lo tanto, no produciría actividad antitumoral.

La caliqueamicina conjugada con G5/44 (CMC-544) se comportó de manera opuesta a rituximab (Rituxan™), produciendo mejores resultados cuando se administró en la fase establecida de la enfermedad. El motivo para que CMC-544 se comporte mejor en la fase establecida no está claro pero la fase establecida representa más claramente la situación clínica. CMA-676, el isotipo emparejado, el conjugado no unido del control no tiene ningún efecto significativo sobre los tiempos de supervivencia promedio. Los resultados en el modelo SCID diseminado sugieren claramente que las dosis de CMC-544 deben reducirse para determinar la dosis eficaz máxima (MED). La dosis de 160 µg/kg fue menos activa que las dosis menores de 80 y 40 µg/kg. No es evidente el motivo, pero la dosis de 160 µg/kg puede ser aproximadamente la MED. Se planificaron estudios adicionales para centrarse en este problema.

Mohammad y col., usó el tratamiento CHOP (Ciclofosfamida (C) 40 mg/kg IV, doxorubicina (H) 3,3 mg/kg IV, vincristina (O) 0,5 mg/kg IV, y prednisona (P) 0,2 mg/kg PO) en un modelo de xenoinjertos subcutáneos con una línea celular de linfoma difuso de células grandes, DLCL. Las dosis utilizadas para el tratamiento CHOP para ser su dosis tolerada máxima. El tratamiento con CHO, administrado una vez IV y P, administrado diariamente durante 5 días, se clasificó 'activo', produciendo una T/C de 25,8 %. No se registraron curas de tumores. Los resultados en el modelo descrito por Mohammad y col., parecen similares a los observados con el tratamiento CHOP (administrado IP, Q4Dx3) en el modelo RL descrito en el presente documento. En ningún estudio CHOP produjo curas a largo plazo, A diferencia de CMC-544.

		Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5	Columna 6
Anticuerpo	Epítipo Dominio Ig de CD22	Respuesta 1 con G544	Respuesta 2 después del 2° mAb Dirigido contra CD22	Respuesta 3 (respuesta 2 – 1)	Respuesta 3 ajustada para la velocidad de la "reacción inversa" de G544	Unión del 2° mAb sin G544 ajustada para el fondo	Inhibición mediante G544 (%)
SHCL-1 Leu 14 dirigido contra CD22	A 1,2	654,3	579,8	-74,5	9	29,3	69
HD239 dirigido contra CD22	A 1	710,5	628,7	-81,8	1,7	19,3	91
M 6/13 dirigido contra CD22	? ?	710,0	652,7	-57,3	26,2	152,4	83
RFB-4 dirigido contra CD22	B 3	703,5	1108,5	405	488,5	534	9
4KB128 dirigido contra CD22	? 2	691,0	1343,5	652,5	736,0	738,8	0
To15 dirigido contra CD22	C 4	676,9	1163,6	486,7	570,2	614,6	7
M 5/44 dirigido contra CD22	Control positivo	725,1	679,3	-45,8	37,7	613,9	94
BU12 dirigido contra CD19	Control negativo	686,2	602,7	-83,5	0	0	0

Estudio	Compuesto	Promedio del tiempo de supervivencia	Mediana del tiempo de supervivencia	Desviación estándar	Tiempo de supervivencia a mínimo	Tiempo de supervivencia máximo	Número de animales
Modelo de desarrollo	CMA-676	32,9	34,0	3,9	28,0	36,0	7
	CMC-544	41,0	38,0	10,1	32,0	60,0	7
	Rituximab	128,4	> 130,0	4,7	119,0	> 130,0	7
	Vehículo	27,1	28,0	1.A	25,0	28,0	8
Modelo establecido	CMA-676	33,7	31,0	4,6	30,0	42,0	7
	CMC-544	83,5	76,5	41,6	34,0	> 130,0	8
	Rituximab	62,6	37,0	46,2	31,0	> 130,0	7
	Vehículo	30,5	29,0	3,6	27,0	36,0	8

Compuesto	Tiempo de supervivencia promedio	Mediana del tiempo de supervivencia	Desviación estándar	Tiempo de supervivencia mínimo	Tiempo de supervivencia máximo	Número de animales
CMC MD+Ritux MD	92,4	> 100,0	16,0	62,0	> 100,0	10
CMC MD+Ritux HD	64,4	58,5	26,7	29,0	> 100,0	10
CMC-544	58,5	34,5	35,8	27,0	> 100,0	10
Rituximab	50,5	41,0	26,4	30,0	> 100,0	10
Vehículo	31,0	27,0	9,7	27,0	56,0	9

(continuación)

Compuesto	Tiempo de supervivencia promedio	Mediana del tiempo de supervivencia	Desviación estándar	Tiempo de supervivencia mínimo	Tiempo de supervivencia máximo	Número de animales
CMC MD = dosis media de CMC-544, 80 µg/kg CMC HD = CMC-544 dosis alta de 160 µg/kg Ritux MD = Dosis media de rituximab 10 µg/kg Ritux HD = Dosis alta de rituximab 20 µg/kg						

Tabla 10: Medidas descriptivas del tiempo de supervivencia para estudios combinados

Tratamiento	Tiempo de supervivencia promedio	Mediana del tiempo de supervivencia	Desviación estándar	Tiempo de supervivencia mínimo	Tiempo de supervivencia máximo	Número de animales
CMC-544 40 µg/kg	118,90	125,00	19,29	64,00	125,00	10
CMC LD + Ritux LD	125,00	125,00	0,00	125,00	125,00	10
CMC-544 80 µg/kg	118,22	125,00	17,86	71,00	125,00	9
CMC MD + Ritux MD	125,00	125,00	0,00	125,00	125,00	10
CMC-544 160 µg/kg	85,22	82,00	40,37	35,00	125,00	9
CMC HD + Ritux HD	91,30	100,00	36,31	44,00	125,00	10
Rituxiamb 5 µg/kg	40,70	36,50	9,57	34,00	64,00	10
Rituximab 10 mg/kg	33,80	34,00	3,26	29,00	41,00	10
Rituximab 20 mg/kg	40,50	34,00	15,45	31,00	82,00	10
Vehículo	25,80	25,00	3,12	22,00	34,00	10
CMC LD = CMC-544 baja dosis, Ritux HD 40 mg/kg = dosis alta de rituximab, 5 mg/kg CMC MD = dosis media de CMC-544, 80 mg/kg de Ritux MD = dosis media de Rituximab, 10 mg/kg CMC HD = dosis alta de CMC-544, 160 mg/kg de Ritux HD = dosis alta de Rituximab, 20 mg/kg						

Ejemplo 9

5 FORMULACIONES ESTABLES DE CMC-544

Se prepararon formulaciones estables de CMC-544 para la administración *in vivo* añadiendo diluyentes, excipientes, vehículos y estabilizantes. Tras la cromatografía HIC, se evaluaron fracciones cromatográficas mediante SEC-HPLC y análisis UV multilongitud de onda. Se seleccionan las fracciones adecuadas para la combinación sobre la base de los análisis anteriores, que proporcionan información sobre el contenido de agregados, la concentración de proteínas, y la carga de caliqueamicina. Se añaden excipientes, estabilizantes, agentes de volumen y agentes tamponantes para estabilizar la solución. Como CMC-544 puede experimentar degradación mediante numerosas rutas de degradación, necesitan tenerse en cuenta las inestabilidades físicas en el desarrollo de las formulaciones. Una de las principales consideraciones en el desarrollo de las formulaciones es que debe de minimizarse la velocidad de hidrólisis de la caliqueamicina procedente del anticuerpo mientras que debe mantenerse la integridad física y química del anticuerpo dirigido contra CD-22. Además, debe minimizarse la precipitación del conjugado de caliqueamicina-anticuerpo, que se puede producir en determinadas condiciones de pH y concentración.

En el desarrollo de una formulación de un conjugado de anticuerpo-caliqueamicina, el pH de la formulación es crítico, ya que minimiza la degradación y la inestabilidad física. Se seleccionó un pH de 8,0 para minimizar la hidrólisis de la caliqueamicina y mantener la solubilidad adecuada del conjugado. Datos adicionales obtenidos utilizando SDS-PAGE y el ELISA de unión a antígeno indicaron que la integridad y especificidad estructural del anticuerpo se mantienen a un pH de 8,0. En consecuencia, se seleccionó trometamina como agente tamponante para mantener un pH de 8,0. Un tampón alternativo podría incluir sodio dibásico o fosfato de potasio. El intervalo de concentración tampón puede ser de 5 a 50 mM. Se ha sugerido un intervalo de pH preferido de 7,5 a 8,5 para una estabilidad/solubilidad óptima. La especificación de pH actual para el producto acabado es de 7,0-9,0.

25 Aunque la estabilidad de las soluciones conjugadas tamponadas es adecuada para la estabilidad a corto plazo, la estabilidad a largo plazo es mala. Se usa la liofilización para aumentar la vida media de los conjugados. Los problemas asociados con la liofilización de una solución de proteínas están bien documentados, y se puede producir la pérdida de

la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria durante los procedimientos de congelación y secado. La sacarosa se incluye en la formulación por actuar como un estabilizante amorfo del conjugado y para mantener la integridad estructural de la proteína durante la congelación y el secado. Se han usado concentraciones de 1,5-5,0 % en p/v de sacarosa. Además, se puede incorporar un agente de volumen polimérico tal como dextrano 40 o hidroxietil almidón para potenciar la apariencia y la rigidez física de las tortas liofilizadas a una concentración de 0,5-1,5 % en peso. Estos materiales forman tortas liofilizadas a concentraciones relativamente bajas y se pueden usar para minimizar el contenido de sólidos de la fórmula liofilizada, permitiendo de esta manera una criodesecación más rápida. Los estudios de formulación han utilizado una concentración de dextrano 40 de 0,9 % en peso.

Se incluye polisorbato 80 en la formulación para aumentar la solubilidad del conjugado. Se utiliza una concentración preferida del 0,01 % con un intervalo potencial de 0,005-0,05 %. Se ha añadido también Tween a la formulación a una concentración de 0,01-0,05 % en volumen.

Puede estar también presente en la fórmula un electrolito y se puede usar para mejorar la eficacia del procedimiento de purificación final. Se usa normalmente cloruro de sodio a una concentración de 0,01 M a 0,1 M. Se pueden usar también electrolitos adicionales tales como sulfato de sodio como un sustituto del cloruro de sodio ya que el último electrolito puede liofilizarse más fácilmente. Óptimamente, la solución final de CMC-544 comprende sacarosa al 1,5 % (en peso), Dextrano 40 al 0,9 % (en peso), Tween 80 al 0,01 %, cloruro de sodio 50 mM, polisorbato 80 al 0,01 % (en peso) y trometamina 20 mM.

Se presenta a continuación una fórmula representativa para la solución antes de la liofilización: CMC-544 0.5 mg/ml, sacarosa al 1,5 % en peso, dextrano 40 al 0,9 % en peso, cloruro de sodio 0,05 M, tween 0,01-0,05 % en volumen, polisorbato 80 al 0,01 % en peso, trometamina 0,02 M, pH 8,0, y agua. La solución se dispensa en viales de color ámbar a una temperatura de +5 °C to 10 °C, (óptimamente a +5 °C); la solución se congela a una temperatura de congelación de -35 °C a -50 °C, (óptimamente a -45 °C); la solución congelada se somete a una etapa de criodesecación inicial a una presión de secado primaria de 20 a 80 micrómetros, (óptimamente a 60 micrómetros); los productos criodesecados se mantienen a una temperatura de almacenamiento de -10 °C a -40 °C, (óptimamente a -30 °C), durante 24 a 72 horas, (óptimamente durante 60 horas); y finalmente, el producto criodesecado se somete a una etapa de secado secundario de 20-80 micrómetros, (óptimamente a 60 micrómetros) a una temperatura de almacenamiento de +10 °C a +35 °C, (óptimamente +25 °C), durante 15 a 30 horas (óptimamente durante 24 horas). Se usó un ensayo de aumento de presión para determinar la finalización del secado primario. A la conclusión del ciclo de liofilización, los viales se volvieron a llenar con nitrógeno y se cerraron.

La Tabla 12 muestra las diferencias en la formulación utilizada para CMC-544 y la formulación utilizada para "Mylotarg". Las diferencias significativas entre la formulación "Mylotarg" y la formulación utilizada para CMC-544 incluyen una concentración reducida de proteínas en la nueva formulación (0,5 mg/ml), el uso de trometamina como tampón y la presencia de tween 80 al 0,01 %. Estos resultados en el CMC-544 reconstituido en la nueva formulación resultan evidentes al contrario que la turbidez que se observa en la formulación de "Mylotarg" reconstituida (véanse las Tablas 13 y 14).

TABLA 11: COMPARACIÓN DE LA FORMULACIÓN "MYLOTARG" y DE LA FORMULACIÓN CMC-544 PARA CMC-544

	Formulación "Mylotarg"	Formulación de CMC-544
Concentración de proteína	1,0 mg/ml	0,5 mg/ml
Formulación	sacarosa al 1,5 %, dextrano 40 al 0,9 %, cloruro de sodio 100 mM, tampón fosfato 5 mM	sacarosa al 1,5 %, dextrano 40 al 0,9 %, Tween 80 al 0,01 %, polisorbato 80 al 0,01 %, cloruro de sodio 50 mM, trometamina 20 mM

TABLA 12: OBSERVACIONES DE ESTABILIDAD Y FÍSICOQUÍMICAS DE LAS FORMULACIONES DE "MYLOTARG" Y CMC-544 PARA CMC-544 a 5 °C.

Tiempo	Formulación "Mylotarg"		Formulación de CMC-544	
	Inicial	2 semanas	Inicial	2 semanas
Observación física	Turbidez ligera	Turbidez ligera	Transparente	Transparente
pH	7,5	7,5	7,8	7,8
Proteína total (mg/ml)	1,07	1,07	0,52	0,52
Caliqueamicina total (µg/mg de proteínas)	67	67	57	57
Caliqueamicina sin conjugar (µg/mg de proteínas)	1,21	2,82	0,97	1,13
% de agregados	3,03	2,81	1,59	1,70

TABLA 13: OBSERVACIONES DE ESTABILIDAD Y FISICOQUÍMICAS DE LA FORMULACIÓN DE MYLOTARG Y CMC LIOFILIZADA Y ALMACENADA A 25 °C.

Tiempo	FORMULACIÓN "MYLOTARG"		CMC Formulación	
	Inicial	4 semanas	Inicial	4 semanas
Observación física de conjugados reconstituidos	Turbidez ligera	Turbidez ligera	Transparente	Transparente
pH	7,5	7,5	7,8	7,8
Proteína total (mg/ml)	1,03	1,03	0,51	0,51
Caliqueamicina total (µg/mg de proteínas)	67	67	57	57
Caliqueamicina sin conjugar (µg/mg de proteínas)	1,13	1,03	1,03	0,94
% de agregados	2,63	2,96	1,49	2,09

5 Se han incluido numerosas modificaciones y variaciones de las presentes invenciones en la memoria descriptiva anteriormente identificada y se espera que sean evidentes para el experto en la técnica. Dichas modificaciones y alteraciones en el procedimiento de conjugación, los conjugados preparados mediante el procedimiento, y las correspondientes composiciones/formulaciones que comprenden los conjugados se consideran comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> WYETH HOLDING CORPORATION.; KUNZ, ARTHUR Y COL.
- <120> CONJUGADOS DE TRANSPORTADOR DERIVADO DE CALIQUEAMICINA
- <160> 51
- <170> SeqWin99, versión 1.02
- <210> 1
- 20 <211> 5
- <212> PRT
- <213> ratón
- <220>
- 25 <223> CDR-H1 5/44g
- <220>
- <221>
- 30 <400> 1

Asn Tyr Trp Ile His
1 5

- 35 <210> 2
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> ratón
- <220>
- 40 <223> CDR-H2gL1 T3 5/44 monoclonal de ratón
- <220>
- <221>
- 45 <400> 2

Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys
1 5 10 15
Gly

ES 2 593 304 T3

5 <210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> ratón

<220>
<223> CDR-H3 5/44 monoclonal de ratón
10 <220>
<221>

<400> 3

15 Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

20 <210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> ratón

<220>
<223> CDR-L1 5/44 monoclonal de ratón

25 <220>
<221>

<400> 4

30 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser
 1 5 10 15

35 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> ratón

<220>
<223> CDR-L2 5/44 monoclonal de ratón

40 <220>
<221>

<400> 5

45 Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

50 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> ratón

<220>
<223> CDR-L3 5/44 monoclonal de ratón

55 <220>
<221>

<400> 6

 Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr
 1 5

ES 2 593 304 T3

5 <210> 7
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> ratón

<220>
 <223> dominio VL 5/44 monoclonal de ratón

10 <220>
 <221>

<400> 7

```

Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Phe Gly
1          5          10
Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser
20          25
Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50          55          60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85          90          95

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100          105          110

```

15 Arg

<210> 8
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> dominio VH 5/44 monoclonal de ratón

<220>
 <223> dominio VH 5/44 monoclonal de ratón

25 <220>
 <221>

<400> 8

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CH
 <220>
 <221>

15 <400> 9

Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

20 <210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> N55Q
 <220>
 <221>

<400> 10

Gly Asn Gln Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

30 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> T57A

40 <220>

ES 2 593 304 T3

<221>

<400> 11

Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
1 5 10

5

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> T57V

15

<220>

<221>

<400> 12

Gly Asn Asn Tyr Val Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
1 5 10

20

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-H2 (T57)A H'

30

<220>

<221>

<400> 13

Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys
1 5 10 15

35

Gly

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> K60R

45

<220>

<221>

<400> 14

Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys Gly
1 5 10

50

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

ES 2 593 304 T3

<220>
 <223> CDR-H2 (K60R)R H"
 5
 <220>
 <221>
 <400> 15
 Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys
 1 5 10 15
 Gly
 10
 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> CDR-H2 (T57A K60R) H"
 20
 <220>
 <221>
 <400> 16
 Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys
 1 5 10 15
 Gly
 25
 <210> 17
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <220>
 <223> DPK9
 35
 <220>
 <221>
 <400> 17
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 20 25 30
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 50 55 60
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 65 70
 40
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <220>

<223>JK1

<220>

<221>

5

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

10

<210> 19

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> gL1

<220>

<221>

20

<400> 19

Asp Val Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser
 20 25 30
 Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

25

<210> 20

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> gL2

<220>

<221>

35

<400> 20

ES 2 593 304 T3

Asp Val Val Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser
20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 21
<211> 80
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> DP7

<220>
<221>

<400>21

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Phe Gln Gly
35 40 45

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
50 55 60

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
65 70 75 80

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> JH4

<220>
<221>

<400> 22

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

5
 <210> 23
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> gH1

<220>
 <221>

15
 <400> 23

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1		5		10		15									
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Arg	Phe	Thr	Asn	Tyr
		20						25					30		
Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Gly	Asn	Gln	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Asn	Leu
		50				55					60				
Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Arg	Glu	Gly	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Gly	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

20
 <210> 24
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> gH4

<220>
 <221>

30
 <400> 24

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Asn Leu
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 25
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> gH5
 <220>
 <221>

15 <400> 25

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Asn Leu
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20 <210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> gH6

<220>

<221>

5

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 27

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> gH7

<220>

<221>

20

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 593 304 T3

<210> 28
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia completa de cadena ligera injertada

10

<220>
 <221>
 <400> 28

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Leu Leu Phe Trp Ile Pro
 1 5 10
 Ala Ser Arg Gly Asp Val Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys
 50 55 60
 Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

15

<210> 29
 <211> 781
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia completa de cadena ligera injertada

ES 2 593 304 T3

<220>
<221>

<400> 29

5

```

ttcgaagccg ccaccatgaa gttgcctggt aggctggtgg tgcttctggt gttctggatt 60
cctgcttccc ggggtgacgt tcaagtgacc cagagcccat ccagcctgag cgcctctgta 120
ggagaccggg tcaccatcac ttgtagatcc agtcagagtc ttgcaaacag ttatgggaac 180
acctttttgt cttggtatct gcacaaaacca ggtaaagccc cacaaattgct catctacgga 240
atctctaaca gatttagtgg tgtaccagac aggttcagcg gttccggaag tggtagctgat 300
ttcaccctca cgatctcgtc tctccagcca gaagatttcg ccacttatta ctgtttacaa 360
ggtaacatc agccgtacac attcggtcag ggtactaaag tagaaatcaa acgtacggta 420
gcgccccat ctgtcttcat cttcccgcc tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc 480
tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg 540
gataacgcc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac 600
agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa 660
gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac 720
aggggagagt gttagagggg gaagtgcacc cacctgctcc tcagttccag cctgggaatt 781
c
    
```

<210> 30
<211> 467
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Secuencia completa de cadena pesada injertada

15

<220>
<221>

<400> 30

20

```

Met Asp Phe Gly Phe Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1           5           10           15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20           25           30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe
          35           40           45
    
```

ES 2 593 304 T3

Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg
 65 70 75 80
 Arg Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 225 230 235 240
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

ES 2 593 304 T3

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Gly Lys
 465

5 <210> 31
 <211> 2160
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN completa de cadena pesada injertada

<220>
 <221>

15 <400> 31

```

aagcttgccg ccaccatgga ctccggattc tctctcgtgt tcctggcact cattctcaag 60
ggagtgcagt gtgaggtgca attggtccag tcaggagcag aggttaagaa gcctgggtgt 120
tccgtcaaag tttcgtgtaa ggctagcggc tacaggttca caaattatg gattcattgg 180
gtcaggcagg ctccgggaca aggcctggaa tggatcggtg gcattaatcc cggaataac 240
tacgctacat ataggagaaa attccagggc agagtacga tgaccgcgga caccctcaca 300
agcactgtct acatggagct gtcactctctg agatccgagg acaccgcagt gtactattgt 360
actagagaag gctacggtaa ttacggagcc tggttcgcct actggggcca gggtagccta 420
gtcacagtct cctcagcttc tacaaagggc ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc 480
aggagcacct ccgagagcac agccgcccctg ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctacggcgc ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggct 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggaggac 720
aagagagttg gtgagaggcc agcacagggg gggaggggtgt ctgctggaag ccaggctcag 780
ccctcctgcc tggacgcacc ccggctgtgc agccccagcc cagggcagca aggcattgcc 840
catctgtctc ctaccccgga ggctctgac caccaccctc atgcccaggg agagggtctt 900
ctggattttt ccaccaggct ccgggcagcc acaggctgga tgcccctacc ccaggccttg 960
cgcatacagg ggcagggtgt gcgctcagac ctgccaagag ccataatccg gaggaccctg 1020
cccctgacct aagcccaccc caaaggccaa actctccact ccctcagctc agacaccttc 1080
tctctcccca gatctgagta actcccaate ttctctctgc agagtccaaa tatggteccc 1140
catgcccacc atgcccagggt aagcccaacc aggcctcggc ctccagctca aggcgggaca 1200
ggtgcccctag agtagcctgc atccagggaac aggccccagc cgggtgctga cgcateccacc 1260
tccatctctt cctcagcacc tgagttcctg gggggacct cagtcttctt gttcccccca 1320
aaacccaagg acactctcat gatctcccgg acccttgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 1380
gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggagggtcat 1440
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1500
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1560
aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtg gacccacggg 1620
gtgcgagggc cacatggaca gaggtcagct cggcccaccc tctgcccctg gagtgaccgc 1680
tgtgccaaac tctgtcccta cagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgecccc 1740
atcccaggag gagatgacca agaaccagggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta 1800
cccagcgac atcgcctgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac 1860
cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaggc taaccgtgga 1920
caagagcagg tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgtctc gtgatgcatg aggcctctgca 1980
caaccactac acacagaaga gcctctccct gtctctgggt aaatgagtgc cagggccggc 2040
aagccccccg tccccgggct ctccgggtcg cgcgaggatg cttggcacgt accccgtcta 2100
catacttccc aggcaccag catggaaata aagcacccac cactgccttg gctcgaattc 2160
    
```

20 <210> 32
 <211> 94
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> 544gH1 T1

ES 2 593 304 T3

<220>
 <221>
 <400> 32
 5
 agtgtgaggt gcaattggtc cagtcaggag cagagggttaa gaagcctggt gcttccgtca 60
 aagtttcgtg taaggctagc ggctacaggt tcac 94
 <210> 33
 <211> 96
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 544gH1 T2
 15
 <220>
 <221>
 <400> 33
 20
 gtggcattaa tcccgggaat cagtacacta catataaaag aaatctaaag ggcagagcaa 60
 cgctgaccgc ggacacctcc acaagcactg tctaca 96
 <210> 34
 <211> 95
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 544gH1 T3
 30
 <220>
 <221>
 <400> 34
 35
 agagaaggct acggttaatta cggagcctgg ttgcctact ggggccaggg taccctagtc 60
 acagtctcct cagcttctac aaagggccca agaaa 95
 <210> 35
 <211> 94
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 544 gH1 B1
 45
 <220>
 <221>
 <400> 35
 50
 ggaccaattg cacctcacac tgcactccct tgagaatgag tgccaggaac acgagagaga 60
 atccgaagtc catggtggcg gcaagctttt attc 94
 <210> 36
 <211> 97
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 544gH1 B2

ES 2 593 304 T3

<220>
 <221>
 5 <400> 36
 gattcccggg attaatgcca ccgatccatt ccaggccttg tcccggagcc tgcctgaccc 60
 aatgaatcca ataattigtg aacctgtagc cgctagc 97
 <210> 37
 <211> 93
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> 544gH1 B3
 <220>
 <221>
 20 <400> 37
 cgtaattacc gtagccttct ctagtacaat agtacactgc ggtgtcctcg gatctcagag 60
 atgacagctc catgtagaca gtgcttgtgg agg 93
 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> 544gH1 F1
 <220>
 <221>
 35 <400> 38
 gaataaaagc ttgccccac c 21
 <210> 39
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> 544gH1 R1
 <220>
 <221>
 45 <400> 39
 ttcttgggc cctttaga ag 22
 <210> 40
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> 544gL1 T1
 60 <220>
 <221>
 <400> 40

ES 2 593 304 T3

```

gcttccccggg gtgacgttca agtgaccag ageccatcca gectgagcgc atctgtagga 60
gaccgggtca ccatcacttg tagatcc 87

<210> 41
<211> 90
5 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> 544gL1 T2
10
<220>
<221>

<400> 41
15
   tatctgcaca aaccaggtaa agccccacaa ttgctcatct acggaatctc taacagattt 60
   agtggtgtac cagacaggtt cagcgggtcc 90

<210> 42
<211> 91
20 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> 544gL1 T3
25
<220>
<221>

<400> 42
30
   agatttcgcc acttattact gtttacaagg tacacatcag ccgtacacat tcggtcagga 60
   tactaaagta gaaatcaaac gtacggcgtg c 91

<210> 43
<211> 88
35 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> 544gL1 B1
40
<220>
<221>

<400> 43
45
   gaacgtcacc cggggaagca ggaatccaga acaacagaag caccaacagc ctaacaggca 60
   acttcatggt ggcggcttcg aatcatcc 88

<210> 44
<211> 88
50 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> 544gL1 B2
55
<220>
<221>

<400> 44
60

```

ES 2 593 304 T3

```

      ctttacctgg ttgtgcaga taccaagaca aaaaggtgtt cccataactg ttgcaagac 60
      tctgactgga tctacaagtg atggtgac                               88

5  <210> 45
   <211> 90
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
    <223> 544gL1 B3

   <220>
   <221>

15 <400> 45

      aacagtaata agtggcgaaa tcttctggct ggagagacga gatcgtgagg gtgaaatcag 60
      taccacttcc ggaaccgctg aacctgtctg                               90

20 <210> 46
   <211> 20
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

25 <220>
    <223> 544gL1 F1

   <220>
   <221>

30 <400> 46
    ggatgattcg aagccgccac      20

   <210> 47
   <211> 21
   <212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

   <220>
   <223> 544gL1 R1

40 <220>
   <221>

   <400> 47
45 gcacgccgta cgtttgattt c      21

   <210> 48
   <211> 339
   <212> ADN
50 <213> ratón

   <220>
   <223> secuencia de ADN de VL 5/44 monoclonal de ratón

55 <220>
   <221>

   <400> 48

```

ES 2 593 304 T3

```

gatgttgtgg  tgactcaaac  tccactctcc  ctgcctgtca  gctttggaga  tcaagtttct  60
atctcttgca  ggtctagtca  gagtcttgca  aacagttatg  ggaacacctt  tttgtcttgg  120
tacctgcaca  agcctggcca  gtctccacag  ctctcatct  atgggatctc  caacagattt  180
tctggggtgc  cagacagggt  cactggcagt  ggttcaggga  cagattcac  actcaagatc  240
agcacaataa  agcctgagga  cttgggaatg  tattactgct  tacaaggtag  acatcagccg  300
tacacgttcg  gaggggggac  caagctggaa  ataaaacgt  339

```

5
 <210> 49
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> ratón

10
 <220>
 <223> secuencia de ADN de VH 5/44 monoclonal de ratón
 <220>
 <221>

15
 <400> 49

```

gaggccaac  tgcagcagtc  tgggactgta  ctggcaaggc  ctggggcttc  cgtgaagatg  60
tcctgcaagg  cttctggcta  caggtttacc  aactactgga  ttcactgggt  aaaacagagg  120
cctgggcagg  gtctagaatg  gattgggtgg  attaatcttg  gaaataatta  tactacgtat  180
aagaggaact  tgaagggcaa  ggccacactg  actgcagtca  catccgccag  cactgcctac  240
atggacctca  gcagcctgac  aagtgaggac  tctgcggtct  attactgtac  aagagagggc  300
tatggtaact  acggggcctg  gtttgcttac  tggggccagg  ggactctggt  caccgtctcc  363
tca

```

20
 <210> 50
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> secuencia en el cebador oligonucleotídico
 <400> 50
 gccgccacc 9

30
 <210> 51
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico 5'
 <400> 51

```

gcgcgcaagc  ttgccgccac  catggacttc  ggattctctc  tcgtgttcct  ggcaactcatt  60
ctcaagggag  tgcagtgtga  ggtgcagctc  gtcgagctcg  g

```

40

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una composición que comprende conjugados de derivado monomérico de caliqueamicina/anticuerpo con una fracción conjugada baja (LCF) inferior al 10 por ciento que tiene la fórmula, $Pr(-X-S-S-W)_m$, en la que:

- 5 Pr es un anticuerpo,
 X es un engarce hidrolizable que puede liberar el derivado de caliqueamicina procedente del conjugado tras la unión y la entrada dentro de las células diana,
 W es una caliqueamicina;
 m es la carga promedio de un producto de conjugación purificado, de tal manera que el fármaco citotóxico
 10 constituye un 4 - 10 % del conjugado en peso; y
 $(-X-S-S-W)_m$ es un derivado de caliqueamicina,

comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (1) añadir el caliqueamicina al anticuerpo en el que el derivado de caliqueamicina representa un 4,5-11 % en peso del anticuerpo;
 15 (2) incubar el derivado de fármaco citotóxico y un transportador proteínico en una solución tamponada no nucleófila, compatible con proteínas, que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 8 a 9 para producir un conjugado de fármaco/transportador citotóxico monomérico, en el que la solución comprende además (a) etanol, y (b) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C_6-C_{18} o su sal, seleccionada entre: decanoato, nanoato 100 mM, undecanoato 20 mM, dodecanoato 5 mM, y en el que la incubación se lleva a cabo a una temperatura que varía entre aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C durante un periodo de tiempo que varía entre aproximadamente 15 minutos a 24 horas; y
 20 (3) someter la composición producida en la etapa (2) a un procedimiento de separación cromatográfica para separar el conjugado monomérico de derivado de caliqueamicina citotóxica / anticuerpo con una carga en el intervalo de 4 - 10 % en peso de fármaco citotóxico y con una fracción conjugada baja (LCF) por debajo del 10 por ciento de anticuerpo no conjugado, derivado de caliqueamicina, y los conjugados agregados.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se selecciona entre un grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, y un fragmento de anticuerpo biológicamente activo en el que el fragmento biológicamente activo es un Fab, Fab modificado, Fab', $F(ab')_2$ o un fragmento Fv, o un monómero o un dímero de cadena pesada.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo humanizado se dirige contra el antígeno superficial celular CD22.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 19, y una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:27.
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 30.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO:15 o la SEQ ID NO: 16 o los restos 50-66 de la SEQ ID NO:23 o los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 27 para CDR-H2, la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3, la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.
- 40 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo comprende los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 27 para CDR-H2.
8. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que es una variante del anticuerpo obtenida mediante un protocolo de maduración por afinidad y tiene una afinidad aumentada para CD22 humano.
- 45 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la caliqueamicina es gamma caliqueamicina o una N-acetil gamma caliqueamicina.
10. El procedimiento de reivindicación 1 o 9, en el que la caliqueamicina está funcionalizado con 3-mercapto-3-metil butanoil hidrazida.
- 50 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el engarce hidrolizable es el ácido 4-(4-acetilfenoxi) butanoico (AcBut).
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el aditivo de la etapa (2)(b) es decanoato provisto a una concentración de entre 30 a 50 mM.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento de separación cromatográfica de la etapa (3) es

la cromatografía de exclusión estérica (SEC).

14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento de separación cromatográfica de la etapa (3) es la HPLC, FPLC o Sephacryl S-200.

5 15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento de separación cromatográfica de la etapa (3) es la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se lleva a cabo usando medio cromatográfico Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, medio cromatográfico Butyl Sepharose 4 Fast Flow, medio cromatográfico Octyl Sepharose 4 Fast Flow, medio cromatográfico Toyopearl Ether-650M, medio Macro-Prep methyl HIC o medio Macro-Prep t-Butyl HIC.

10 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se lleva a cabo usando medio cromatográfico Butyl Sepharose 4 Fast Flow.

18. Una composición que comprende conjugados de derivado monomérico de caliqueamicina/anticuerpo anti-CD22 con una fracción conjugada baja (LCF) inferior al 10 por ciento y que tiene la fórmula, $Pr(-X-S-S-W)_m$, en la que:

Pr es un anticuerpo dirigido contra CD22,

15 X es un engarce hidrolizable que puede liberar la caliqueamicina procedente del conjugado tras la unión y la entrada dentro de las células diana;

W es una caliqueamicina;

m es la carga promedio de un producto de conjugación purificado, de tal manera que la caliqueamicina constituye un 4 - 10 % del conjugado en peso; y

20 $(-X-S-S-W)_m$ es un derivado de caliqueamicina.

19. La composición de la reivindicación 18, en la que el anticuerpo dirigido contra CD22 se selecciona entre un grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, y un fragmento de anticuerpo biológicamente activo, en el que el fragmento biológicamente activo es un Fab, Fab modificado, Fab', $F(ab')_2$ o un fragmento Fv, o un monómero o un dímero de cadena pesada.

25 20. La composición de la reivindicación 18, en la que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 19 y una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 27.

30 21. La composición de la reivindicación 18, en la que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 30.

35 22. La composición de la reivindicación 18, en la que el anticuerpo comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO:16 o los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 23 o los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 27 para CDR-H2, y la SEQ ID NO: 3 para CDR- H3, y comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la SEQ ID NO:4 para CDR-L1, la SEQ ID NO:5 para CDR-L2, y la SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

23. La composición de la reivindicación 18, en la que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 16 o los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 23 o los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 27 para CDR-H2, la SEQ ID NO:3 para CDR-H3, la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

40 24. La composición de la reivindicación 23, en la que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 27 para CDR-H2.

25. La composición de la reivindicación 19, en la que el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo dirigido contra CD22 injertado con CDR.

45 26. La composición de la reivindicación 19, en la que el anticuerpo humanizado dirigido contra CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que es una variante del anticuerpo obtenida mediante un protocolo de maduración por afinidad y tiene una afinidad aumentada para CD22 humano.

27. La composición de la reivindicación 18, en la que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende un dominio variable que comprende regiones marco aceptoras humanas y donantes CDR no humanos.

50 28. La composición de la reivindicación 27, en la que las regiones marco aceptoras humanas del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se basan en las SEQ ID NOS: 21 y 22 y comprenden restos donantes en las posiciones 1,28, 48, 72 y 97 de la SEQ ID NO: 8.

29. La composición de la reivindicación 28, en la que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende además restos

donantes en las posiciones 68 y 70 en la SEQ ID NO: 8.

30. La composición de la reivindicación 27, en la que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una región marco aceptora humano basada en las SEQ ID NOS: 17 y 18 y que comprende restos donantes en las posiciones 2, 4, 42, 43, 50 y 65 de la SEQ ID NO: 7.

5 31. La composición de la reivindicación 30, en la que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende además un resto donante en la posición 3 de la SEQ ID NO: 7.

32. La composición de la reivindicación 18, en la que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 7 y una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 8.

10 33. La composición de la reivindicación 19, en la que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende una CDR híbrida que comprende una secuencia de una CDR donante truncada, en la que la porción desaparecida de la CDR donante está sustituida por una secuencia diferente y forma una CDR funcional.

34. La composición de la reivindicación 18, en la que la caliqueamicina es gamma caliqueamicina o una N-acetil gamma caliqueamicina.

15 35. La composición de la reivindicación 18 o 34, en la que la caliqueamicina está funcionalizado con 3-mercapto-3-metil butanoil hidrazida.

36. La composición de la reivindicación 18 o 35, en la que el engarce hidrolizable comprende el ácido 4-(4-acetilfenoxi) butanoico (AcBut).

20 37. Un medicamento que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de la composición de acuerdo con la reivindicación 18 para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo que expresa CD22.

38. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 37, en el que una dosis terapéuticamente eficaz de la composición se administra por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramedular, intratecal, transdérmica, transcutánea, intranasal, tópica, entérica, intravaginal, sublingual o rectal.

25 39. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 37, en el que una dosis terapéuticamente eficaz de la composición se administra por vía intravenosa.

40. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 37, en el que el trastorno proliferativo es cáncer.

41. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 40, en el que el cáncer es una neoplasia de linfocitos B.

42. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 41, en el que la neoplasia de linfocitos B es leucemia.

30 43. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 42, en el que la leucemia expresa el antígeno superficial celular CD22.

44. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 41, en el que la neoplasia de linfocitos B es linfoma.

45. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 44, en el que el linfoma expresa el antígeno superficial celular CD22.

35 46. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 41, en el que la neoplasia de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste de un linfoma no de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda, y leucemia linfocítica crónica.

47. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 40, en el que el cáncer es un carcinoma.

48. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 40, en el que el cáncer es un sarcoma.

40 49. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 40, en el que la caliqueamicina del derivado de caliqueamicina es una gamma caliqueamicina o una N-acetil caliqueamicina.

50. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 40, en el que la composición se administra con uno o más agentes bioactivos.

45 51. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 50, en el que el uno o más agentes bioactivos se seleccionan entre un grupo que consiste en anticuerpos, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, antihormonas, xantinas, interleuquinas, interferones, y fármacos citotóxicos.

52. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 51, en el que el agente bioactivo es un anticuerpo.

53. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 52, en el que el anticuerpo se dirige contra un antígeno superficial celular expresado en neoplasias de linfocitos B.
54. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 53, en el que el anticuerpo dirigido contra los antígenos superficiales celulares expresados en neoplasias de linfocitos B se selecciona entre un grupo que consiste en anticuerpos dirigidos contra CD19, CD20 y CD33.
55. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 54, en el que el anticuerpo dirigido contra CD20 es rituximab.
56. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 51, en el que las citoquinas o los factores de crecimiento se seleccionan entre un grupo que consiste de interleuquina 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF, y G-CSF.
57. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 51, en el que la hormona es una hormona esteroide y se selecciona de estrógenos, andrógenos, progestinas, y corticoesteroides.
58. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 51, en el que dicho fármaco citotóxico se selecciona entre el grupo que consiste en una doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carrubicina, nogalamicina, menogaril, pitarubicina, valrubicina, citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, azacitidina, doxifluridina, pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina, gougertina, puomicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, procarbazona, metotrexato, fluorouracilos, etopósido, taxol, análogos de taxol, y mitomicina.
59. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 51, en el que la composición se puede administrar junto con una o más combinaciones de fármacos citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento, en el que la combinación de fármacos citotóxicos se selecciona entre:
- A. CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
 - B. CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona);
 - C. COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona);
 - D. CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazona, bleomicina, vincristina, y prednisona);
 - E. m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorina);
 - F. ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, mecloretamina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
 - G. ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, citarabina, bleomicina, y vincristina);
 - H. MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina, y leucovorina);
 - I. MOPP (mecloretamina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
 - J. ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina);
 - K. MOPP (mecloretamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, y vinblastina);
 - L. MOPP (mecloretamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina);
 - M. ChIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazona, y prednisona);
 - N. IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, y etopósido);
 - O. MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, y etopósido);
 - P. DHAP (dexametasona, citarabina a dosis elevada, y cisplatino);
 - Q. ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina a dosis elevada, y cisplatino);
 - R. CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona, y bleomicina);
 - S. CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina, y prednisona);
 - T. CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona);
 - U. ESHOP (etopósido, metilprednisolona, citarabina a dosis elevada, vincristina y cisplatino);
 - V. EPOCH (etopósido, vincristina, y doxorubicina durante 96 horas con dosis de bolos de ciclofosfamida y prednisona oral);
 - W. ICE (ifosfamida, ciclofosfamida, y etopósido);
 - X. CHOP-B (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y bleomicina); y
 - Y. P/DOCE (epirubicina o doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida, y prednisona).
60. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 51, en el que la composición se puede administrar antes de la administración con una o más combinaciones de fármacos citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento, en el que la combinación de fármacos citotóxicos se selecciona entre:
- A. CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
 - B. CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona);

- C. COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona);
- D. CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazona, bleomicina, vincristina, y prednisona);
- E. m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorina);
- 5 F. ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
- G. ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, citarabina, bleomicina, y vincristina);
- 10 H. MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina, y leucovorina);
- I. MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
- J. ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina);
- K. MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, y vinblastina);
- 15 L. MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina);
- M. ChIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazona, y prednisona);
- N. IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, y etopósido);
- 20 O. MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, y etopósido);
- P. DHAP (dexametasona, citarabina a dosis elevada, y cisplatino);
- Q. ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina a dosis elevada, y cisplatino);
- R. CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona, y bleomicina);
- S. CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina, y prednisona);
- T. CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona);
- 25 U. ESHOP (etopósido, metilprednisolona, citarabina a dosis elevada, vincristina y cisplatino);
- V. EPOCH (etopósido, vincristina, y doxorubicina durante 96 horas con dosis de bolos de ciclofosfamida y prednisona oral);
- W. ICE (ifosfamida, ciclofosfamida, y etopósido);
- X. CHOP-B (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y bleomicina); y
- 30 Y. P/DOCE (epirubicina o doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida, y prednisona).

61. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 51, en el que la composición se puede administrar después de la administración de con una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento, en el que la combinación de agentes bioactivos se selecciona entre:

- 35 A. CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
- B. CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona);
- C. COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona);
- D. CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazona, bleomicina, vincristina, y prednisona);
- E. m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorina);
- 40 F. ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
- G. ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, citarabina, bleomicina, y vincristina);
- H. MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina, y leucovorina);
- 45 I. MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
- J. ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina);
- K. MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, y vinblastina);
- 50 L. MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina);
- M. ChIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazona, y prednisona);
- N. IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, y etopósido);
- O. MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, y etopósido);
- 55 P. DHAP (dexametasona, citarabina a dosis elevada, y cisplatino);
- Q. ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina a dosis elevada, y cisplatino);
- R. CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona, y bleomicina);
- S. CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina, y prednisona);
- T. CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona);
- 60 U. ESHOP (etopósido, metilprednisolona, citarabina a dosis elevada, vincristina y cisplatino);
- V. EPOCH (etopósido, vincristina, y doxorubicina durante 96 horas con dosis de bolos de ciclofosfamida y prednisona oral);
- W. ICE (ifosfamida, ciclofosfamida, y etopósido);
- X. CHOP-B (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y bleomicina); y

Y. P/DOCE (epirubicina o doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida, y prednisona).

62. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 51, en el que la composición se administra junto con un anticuerpo dirigido contra un antígeno superficial celular expresado en neoplasias malignas de linfocitos B, y que comprende opcionalmente una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento, en el que la combinación de agentes citotóxicos se selecciona entre:

- A. CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
- B. CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona);
- C. COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona);
- D. CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazona, bleomicina, vincristina, y prednisona);
- E. m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorina);
- F. ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
- G. ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, citarabina, bleomicina, y vincristina);
- H. MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina, y leucovorina);
- I. MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona);
- J. ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina);
- K. MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, y vinblastina);
- L. MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina);
- M. ChIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazona, y prednisona);
- N. IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, y etopósido);
- O. MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, y etopósido);
- P. DHAP (dexametasona, citarabina a dosis elevada, y cisplatino);
- Q. ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina a dosis elevada, y cisplatino);
- R. CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona, y bleomicina);
- S. CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina, y prednisona);
- T. CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona);
- U. ESHOP (etopósido, metilprednisolona, citarabina a dosis elevada, vincristina y cisplatino);
- V. EPOCH (etopósido, vincristina, y doxorubicina durante 96 horas con dosis de bolos de ciclofosfamida y prednisona oral);
- W. ICE (ifosfamida, ciclofosfamida, y etopósido);
- X. CHOP-B (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y bleomicina); y
- Y. P/DOCE (epirubicina o doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida, y prednisona).

63. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 62, en el que el anticuerpo dirigido contra los antígenos superficiales celulares expresados en neoplasias de linfocitos B se selecciona entre un grupo que consiste en anticuerpos dirigidos contra CD19, CD20 y CD33.

64. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 63, en el que el anticuerpo dirigido contra CD20 es rituximab.

65. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 37, en el que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 19 y una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 27.

66. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 37, en el que el anticuerpo dirigido contra CD22 es un anticuerpo humanizado y comprende una cadena ligera que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 28.

67. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 37, en el que anticuerpo dirigido contra CD22 es un anticuerpo humanizado y comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 30.

68. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 37, en el que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 30.

69. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 37, en el que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene al menos una de las secuencias proporcionadas en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 16 o los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 23 o los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 27 para CDR-H2, o la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3, y comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene al menos una de las secuencias proporcionadas en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la SEQ ID NO: 5 para

CDR-L2, o la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

- 5 70. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 37, en el que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende la SEQ ID NO: 1 par CDR- H1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 16 o los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 23 o los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 27 para CDR-H2, la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3, la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2, y la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.
71. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 70, en el que el anticuerpo dirigido contra CD22 comprende los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 27.
72. El medicamento de la reivindicación 18 con uno o más agentes bioactivos para su uso en el tratamiento de linfomas agresivos.
- 10 73. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 72, en el que el conjugado monomérico de derivado de caliqueamicina / anticuerpo dirigido contra CD22 es CMC-544.
74. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H2 que comprende un resto de aminoácido en la posición de Kabat 55 diferente a asparagina.
75. El procedimiento de la reivindicación 74, en el que aminoácido en la posición de Kabat 55 es glutamina.
- 15 76. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de CDR-H2 que comprende un resto de aminoácido en la posición de Kabat 57 diferente a treonina.
77. El procedimiento de la reivindicación 76, en el que aminoácido en la posición de Kabat 57 es alanina o valina.
78. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de CDR-H2 que comprende un resto de aminoácido en la posición de Kabat 60 diferente a lisina.
- 20 79. El procedimiento de la reivindicación 78, en el que el resto de aminoácido es arginina.
80. La composición de la reivindicación 18, en el que el anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H2 que comprende un resto de aminoácido en la posición de Kabat 55 diferente a asparagina.
81. La composición de la reivindicación 80, en el que aminoácido en la posición de Kabat 55 es glutamina.
- 25 82. La composición de la reivindicación 18, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de CDR-H2 que comprende un resto de aminoácido en la posición de Kabat 57 diferente a treonina.
83. La composición de la reivindicación 82, en el que aminoácido en la posición de Kabat 57 es alanina o valina.
84. La composición de la reivindicación 18, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de CDR-H2 que comprende un resto de aminoácido en la posición de Kabat 60 diferente a lisina.
85. La composición de la reivindicación 84, en el que el resto de aminoácido es arginina.

30

FIGURA 1: SECUENCIA DE CDRS DE ANTICUERPO MONOCLONAL 5/44

H1	NYWIH	(SEQ ID NO:1)
H2	GINPGNNYTTYKRNLKG	(SEQ ID NO:2)
H3	EGYGNYGAWFAY	(SEQ ID NO:3)
L1	RSSQSLANSYGNTFLS	(SEQ ID NO:4)
L2	GISNRFS	(SEQ ID NO:5)
L3	LQGTHQPYT	(SEQ ID NO:6)

FIGURA 2: SECUENCIA DE ADN/PROTEÍNA DE 5/44 V_L

```

      10          20          30          40          50
GAT GTT GTG GTG ACT CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGC TTT GGA GAT CAA GTT
CTA CAA CAC CAC TGA GTT TGA GGT GAG AGG GAC GGA CAG TCG AAA CCT CTA GTT CAA
D V V V T Q T P L S L P V S F G D Q V>

      60          70          80          90          100          110
TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT GGG AAC ACC TTT TTG
AGA TAG AGA ACG TCC AGA TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA CCC TTG TGG AAA AAC
S I S C R S S Q S L A N S Y G N T F L>

      120          130          140          150          160          170
TCT TGG TAC CTG CAC AAG CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC
AGA ACC ATG GAC GTG TTC GGA CCG GTC AGA GGT GTC GAG GAG TAG ATA CCC TAA AGG
S W Y L H K P G Q S P Q L L I Y G I S>

      180          190          200          210          220
AAC AGA TTT TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC
TTG TCT AAA AGA CCC CAC GGT CTG TCC AAG TGA CCG TCA CCA AGT CCC TGT CTA AAG
N R F S G V P D R F T G S G S G T D F>

      230          240          250          260          270          280
ACA CTC AAG ATC AGC ACA ATA AAG CCT GAG GAC TTG GGA ATG TAT TAC TGC TTA CAA
TGT GAG TTC TAG TCG TGT TAT TTC GGA CTC CTG AAC CCT TAC ATA ATG ACG AAT GTT
T L K I S T I K P E D L G M Y Y C L Q>

      290          300          310          320          330
GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGT
CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGC AAG CCT CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCA
G T H Q P Y T F G G G T K L E I K R>

```

FIGURA 3: SECUENCIA DE ADN/PROTEÍNA DE 5/44 V_H

```

          10          20          30          40          50
GAG GTC CAA CTG CAG CAG TCT GGG ACT GTA CTG GCA AGG CCT GGG GCT TCC GTG AAG
CTC CAG GTT GAC GTC GTC AGA CCC TGA CAT GAC CGT TCC GGA CCC CGA AGG CAC TTC
E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K>

    60          70          80          90          100          110
ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC AGG TTT ACC AAC TAC TGG ATT CAC TGG GTA AAA
TAC AGG ACG TTC CGA AGA CCG ATG TCC AAA TGG TTG ATG ACC TAA GTG ACC CAT TTT
M S C K A S G Y R F T N Y W I H W V K>

    120          130          140          150          160          170
CAG AGG CCT GGG CAG GGT CTA GAA TGG ATT GGT GGT ATT AAT CCT GGA AAT AAT TAT
GTC TCC GGA CCC GTC CCA GAT CTT ACC TAA CCA CCA TAA TTA GGA CCT TTA TTA ATA
Q R P G Q G L E W I G G I N P G N N Y>

    180          190          200          210          220
ACT ACG TAT AAG AGG AAC TTG AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GTC ACA TCC GCC
TGA TGC ATA TTC TCC TTG AAC TTC CCG TTC CGG TGT GAC TGA CGT CAG TGT AGG CGG
T T Y K R N L K G K A T L T A V T S A>

230          240          250          260          270          280
AGC ACT GCC TAC ATG GAC CTC AGC AGC CTG ACA AGT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC
TCG TGA CCG ATG TAC CTG GAG TCG TCG GAC TGT TCA CTC CTG AGA CGC CAG ATA ATG
S T A Y M D L S S L T S E D S A V Y Y>

    290          300          310          320          330          340
TGT ACA AGA GAG GGC TAT GGT AAC TAC GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGG
ACA TGT TCT CTC CCG ATA CCA TTG ATG CCC CGG ACC AAA CGA ATG ACC CCG GTC CCC
C T R E G Y G N Y G A W F A Y W G Q G>

    350          360
ACT CTG GTC ACC GTC TCC TCA
TGA GAC CAG TGG CAG AGG AGT
T L V T V S S>

```

FIGURA 4: ELIMINACIÓN DEL SITIO DE GLICOSILACIÓN Y LISINA REACTIVA. ESTRATEGIA PCR PARA MUTAR CDR-H2 EN EL VECTOR CH

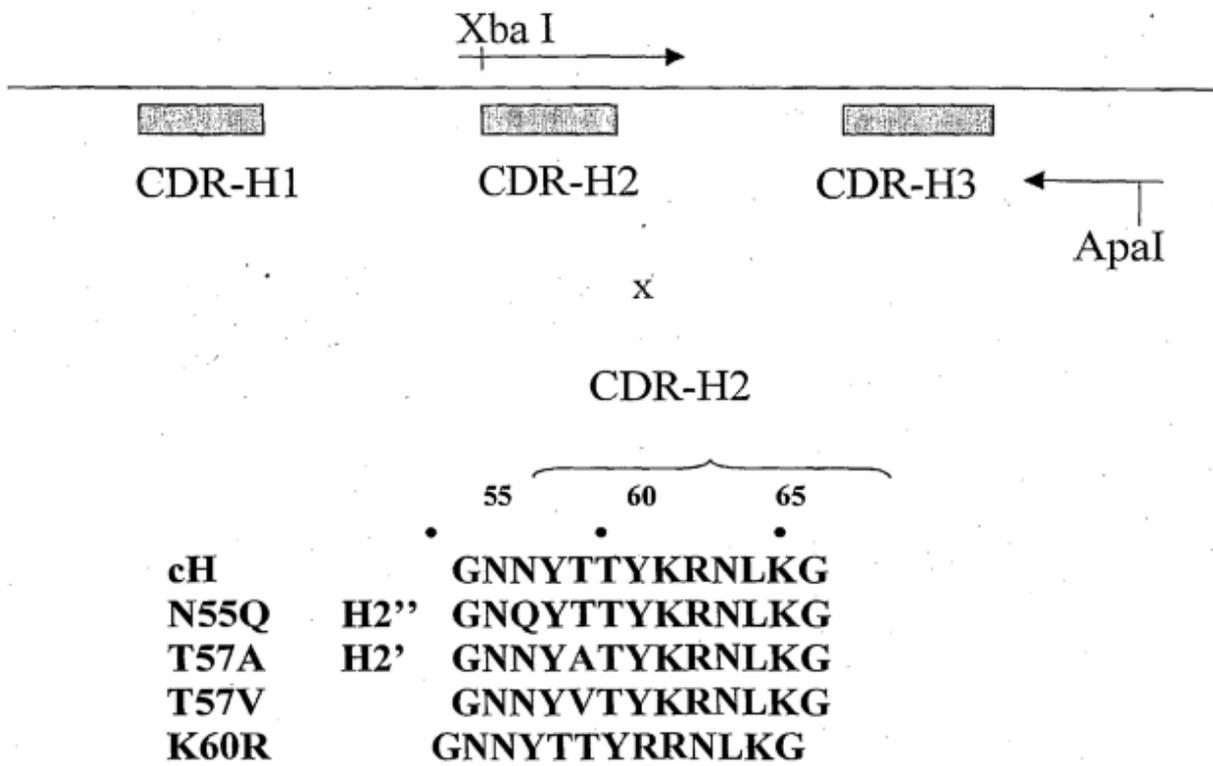


FIGURA 5: DISEÑO DEL INJERTO EN LA SECUENCIA 5/44 DE LA CADENA LIGERA

	10	20		40	
V _L	DVVVTQTPLSLPVSFGDQVSISC	RSSQSLANSYGNTFLS		WYLHKPGQSPQLLIY	
DPK9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC			WYQOKPGKAPKLLIY	
gL1	DVQVTQSPSSLSASVGDRVTITC	RSSQSLANSYGNTFLS		WYLHKPGKAPQLLIY	
gL2	DVVVTQSPSSLSASVGDRVTITC	RSSQSLANSYGNTFLS		WYLHKPGKAPQLLIY	
		60	70	80	90
V _L	GISNRFS	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYC		LQGTHQPYT	
DPK9		GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC			
gL1	GISNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC		LQGTHQPYT	
gL2	GISNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC		LQGTHQPYT	
	100				
V _L	FGGGTKLEIKR				
JK1	FGQGTKVEIKR				
gL1	FGQGTKVEIKR				
gL2	FGQGTKVEIKR				

FIGURA 6: DISEÑO DEL INJERTO EN LA SECUENCIA 5/44 DE LA CADENA PESADA

	10	20	30	40	50
V _H	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYRFT	NYW¹IH	WVKQRPQGLEWIG	GINP	
DP7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT		WVRQAPGQGLEWIMG		
gH1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYRFT	NYW¹IH	WVRQAPGQGLEWIG	GINP	
gH4,5,6,7	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYRFT	NYW¹IH	WVRQAPGQGLEWIG	GINP	
	60	70	80	90	100
V _H	GNNYTTYKRNLKG	KATLTAVTSASTAYMDLSSLTSEDSAVYYCTR	EGYGNYG		
DP7	KFQG	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR			
gH1	GNQYTTYKRNLKG	RATLTADTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG		
gH4	GNNYATYRRNLKG	RATLTADTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG		
gH5	GNNYATYRRNLKG	RVTMTADTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG		
gH6	GNNYATYRRKFQG	RATLTADTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG		
gH7	GNNYATYRRKFQG	RVTMTADTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG		
	110				
JH4	WGQGLVTVSS				
V _H	AWFAY	WGQGLVTVSS			
gH1	AWFAY	WGQGLVTVSS			
gH4,5,6,7	AWFAY	WGQGLVTVSS			

FIGURA 7: MAPA DEL VECTOR PMRR14

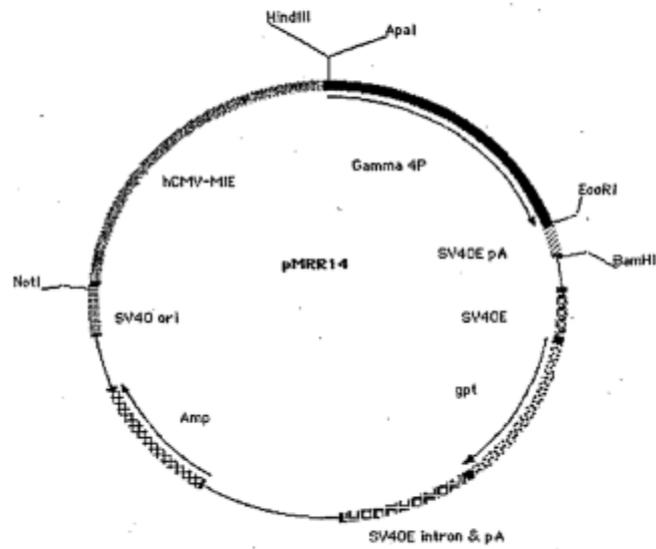


FIGURA 8: MAPA DEL VECTOR PMRR10.1

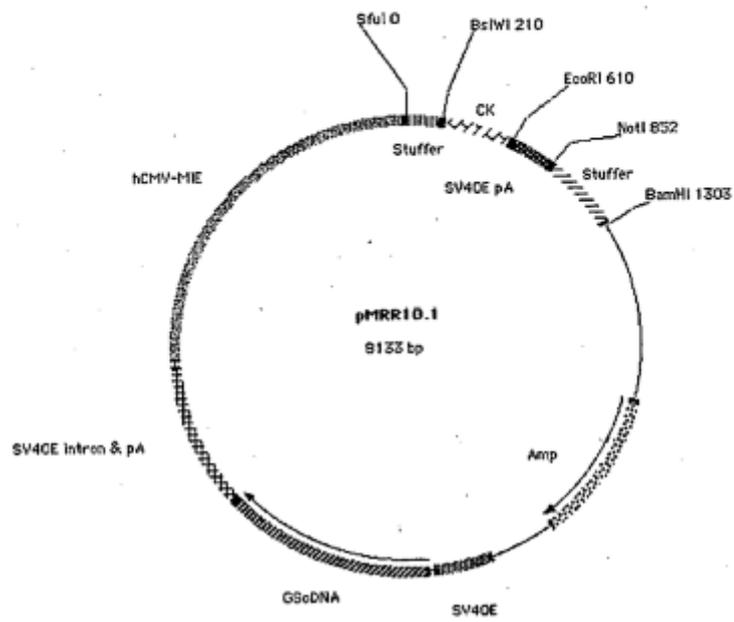


FIGURA 9: ENSAYO BIACORE DE 5/44 QUIMÉRICA Y MUTANTES

5/44	$K_a e^5$	$K_d e^{-4}$	$KD e^{-10}$	$\sim KD \text{ nM}$
<u>cLcH</u>	2,9	1,14	3,93	0,4
N55Q	5,81	1,9	3,27	0,3
T57A	7,8	0,51	0,66	0,07
K60R	4,95	1,01	2,04	0,2

FIGURA 10: OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LOS CONJUNTOS DE GENES GH1 Y GL1 DE 5/44

Cadena pesada

544gH1 T1

AGTGTGAGGTGCAATTGGTCCAGTCAGGAGCAGAGGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTC
AAAGTTTCGTGTAAGGCTAGCGGCTACAGGTTAC

544gH1 T2

GTGGCATTAAATCCCGGGAATCAGTACACTACATATAAAAAGAAATCTAAAGGGCAGAGCA
ACGCTGACCGCGGACACCTCCACAAGCACTGTCTACA

544gH1 T3

AGAGAAGGCTACGGTAATTACGGAGCCTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGTACCCTAGT
CACAGTCTCCTCAGCTTCTACAAAGGGCCCAAGAAA

544 gH1 B1

GGACCAATTGCACCTCACACTGCACTCCCTTGAGAATGAGTGCCAGGAACACGAGAGAG
AATCCGAAGTCCATGGTGGCGGCAAGCTTTTATTC

544 gH1 B2

GATTCCTGGGATTAATGCCACCGATCCATTCAGGCCTTGTCCTGGAGCCTGCCTGACCC
AATGAATCCAATAATTTGTGAACCTGTAGCCGCTAGC

544gH1 B3

CGTAATTACCGTAGCCTTCTCTAGTACAATAGTACACTGCGGTGTCCTCGGATCTCAGAG
ATGACAGCTCCATGTAGACAGTGCTTGTGGAGG

544gH1 F1

GAATAAAAAGCTTGCCGCCACC

544gH1 R1

TTTCTTGGGCCCTTTGTAGAAG

FIGURA 10 CONT.

Cadena ligera

544 gL1 T1

GCTTCCCGGGGTGACGTTCAAGTGACCCAGAGCCCATCCAGCCTGAGCGCATCTGTAGG
AGACCGGGTCACCATCACTTGTAGATCC

544 gL1 T2

TATCTGCACAAACCAGGTAAAGCCCCACAATTGCTCATCTACGGAATCTCTAACAGATTT
AGTGGTGTACCAGACAGGTTTCAGCGGTTCC

544gL1 T3

AGATTTGCCACTTATTACTGTTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACATTCGGTCAGGG
TACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGCGTGC

544gL1 B1

GAACGTCACCCCGGGAAGCAGGAATCCAGAACAACAGAAGCACCAACAGCCTAACAGG
CAACTTCATGGTGGCGGCTTCGAATCATCC

544gL1 B2

CTTTACCTGGTTTGTGCAGATACCAAGACAAAAAGGTGTTCCATAACTGTTTGCAAGAC
TCTGACTGGATCTACAAGTGATGGTGAC

544gL1 B3

AACAGTAATAAGTGCGCAAATCTTCTGGCTGGAGAGACGAGATCGTGAGGGTGAAATCA
GTACCACTCCGGAACCGCTGAACCTGTCTG

544gL1 F1

GGATGATTCGAAGCCGCCAC

544gL1 R1

GCACGCCGTACGTTTGATTC

FIGURA 11: MAPAS DE PLÁSMIDOS DE LOS VECTORES INTERMEDIOS PCR2.1 (544GH1)

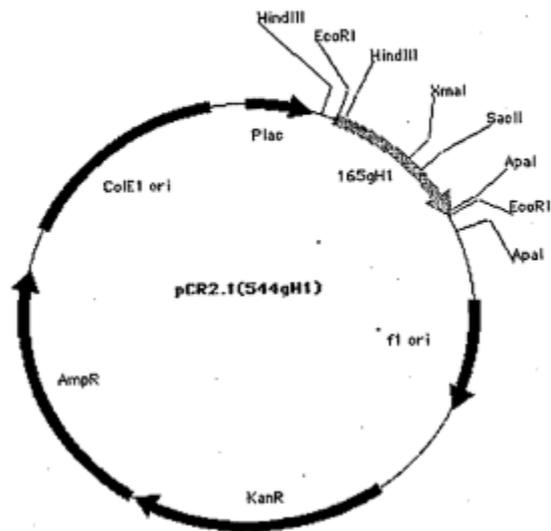


FIGURA 12: MAPAS DE PLÁSMIDOS DE LOS VECTORES INTERMEDIOS PCR2.1 (544GL1)

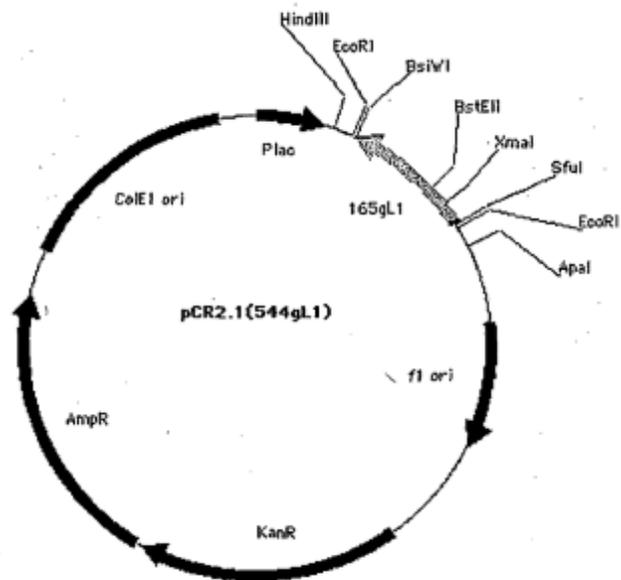


FIGURA 13: CASETES DE OLIGONUCLEÓTIDOS USADAS PARA PREPARAR OTROS INJERTOS

gH4

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG						
P G N N Y A T Y R R N L K G R A T L T A						

gH5

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG						
P G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A						

gH6

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG						
P G N N Y A T Y R R K F Q G R A T L T A						

gH7

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG						
P G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A						

gI2

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	60
<u>BstEII</u>						
C CGG GGT GAC GTT GTC GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG						
CCA CTG CAA CAG CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC CAG TG						
S R G D V V V T Q S P S S L S A S V G D R V T						

FIGURA 14: ENSAYO DE COMPETICIÓN, UNIÓN CON COMPETICIÓN DEL ANTICUERPO 5/44 DE RATÓN MARCADO FLUORESCENTE CON LAS VARIANTES INJERTADAS

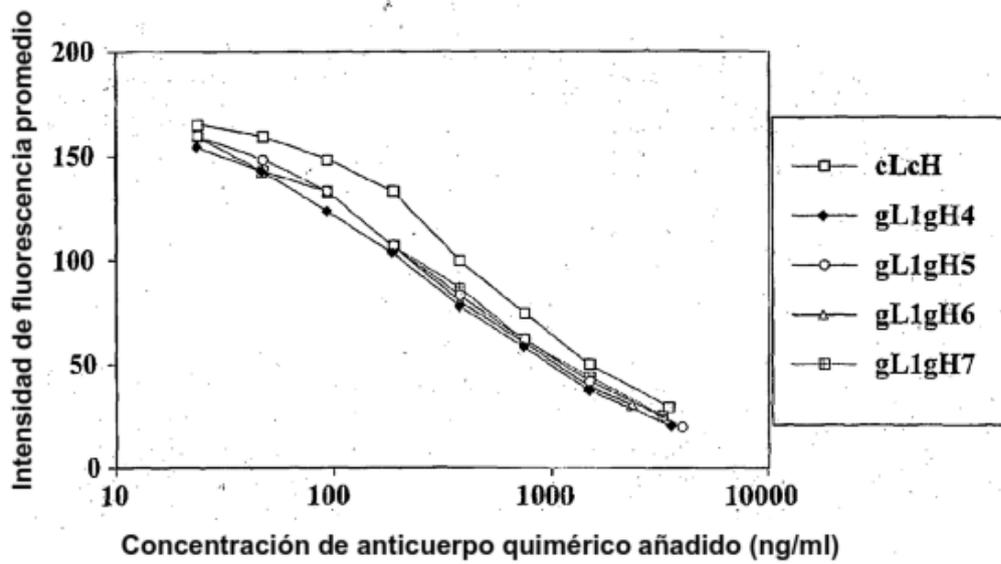


FIGURA 15: ENSAYO DE COMPETICIÓN, UNIÓN CON COMPETICIÓN DEL ANTICUERPO 5/44 DE RATÓN MARCADO FLUORESCENTE CON LAS VARIANTES INJERTADAS

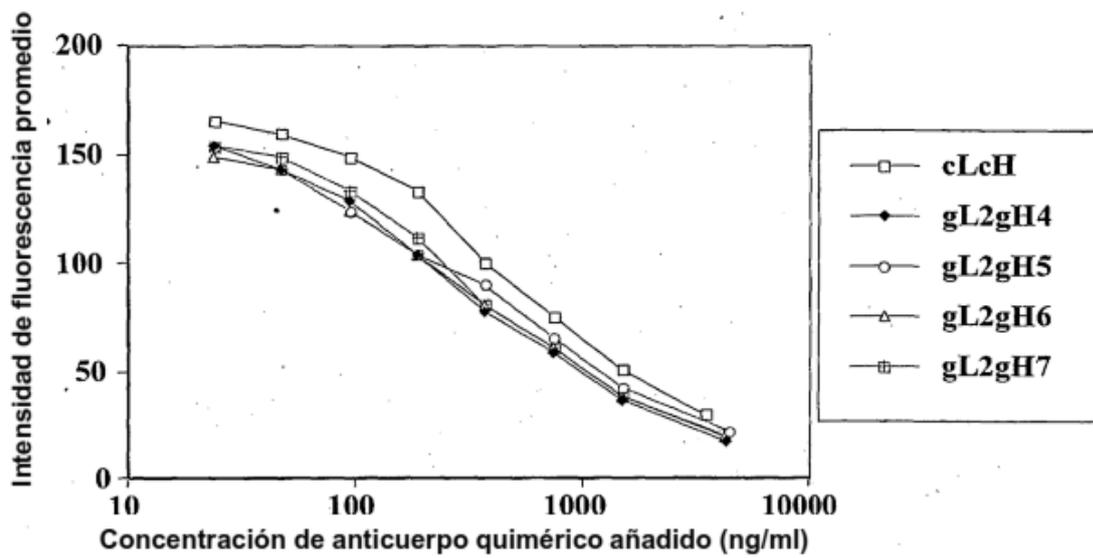


FIGURA 16: SECUENCIA DE ADN COMPLETA DE LAS CADENAS LIGERA Y PESADA INJERTADAS

a) Cadena pesada

```

10      20      30      40      50      60
AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TTC GGA TTC TCT CTC GTG TTC CTG GCA CTC ATT CTC AAG
TTCGAACGGC GGTGG TAC CTG AAG CCT AAG AGA GAG CAC AAG GAC CGT GAG TAA GAG TTC
      M . D F G F S L V F L A L I L K>

70      80      90      100     110
GGA GTG CAG TGT GAG GTG CAA TTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT
CCT CAC GTC ACA CTC CAC GTT AAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA
G V Q C E V Q L V Q S G A E V K K P G>

120     130     140     150     160     170
GCT TCC GTC AAA GTT TCG TGT AAG GCT AGC GGC TAC AGG TTC ACA AAT TAT TGG ATT
CGA AGG CAG TTT CAA AGC ACA TTC CGA TCG CCG ATG TCC AAG TGT TTA ATA ACC TAA
A S V K V S C K A S G Y R F T N Y W I>

180     190     200     210     220     230
CAT TGG GTC AGG CAG GCT CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGT GGC ATT AAT CCC
GTA ACC CAG TCC GTC CGA GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAG CCA CCG TAA TTA GGG
H W V R Q A P G Q G L E W I G G I N P>

240     250     260     270     280
GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GCG
CCC TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG CGC
G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A>

290     300     310     320     330     340
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GTC TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC ACC
CTG TGG AGG TGT TCG TGA CAG ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG TGG
D T S T S T V Y M E L S S L R S E D T>

350     360     370     380     390     400
GCA GTG TAC TAT TGT ACT AGA GAA GGC TAC GGT AAT TAC GGA GCC TGG TTC GCC TAC
CGT CAC ATG ATA ACA TGA TCT CTT CCG ATG CCA TTA ATG CCT CGG ACC AAG CGG ATG
A V Y Y C T R E G Y G N Y G A W F A Y>

410     420     430     440     450
TGG GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC
ACC CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG
W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V>

460     470     480     490     500     510
TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
AAG GGG GAC CGC GGG ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CCG CGG GAC CCG ACG
F P L A P C S R S T S E S T A A L G C>

520     530     540     550     560     570
CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG
GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CGG GAC
L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L>

580     590     600     610     620     630
ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC
TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG
T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L>

```

FIGURA 16: CONT,

```

        640          650          660          670          680
AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC
TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG AGG TCG TCG AAC CCG TGC TTC TGG ATG TGG ACG TTG
S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N>

690          700          710          720          730          740
GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT G GTGAGAGGCC
CAT CTA GTG TTC GGG TCG TTG TGG TTC CAC CTG TTC TCT CAA C CACTCTCCGG
V D H K P S N T K V D K R V>

        750          760          770          780          790          800          810
AGCACAGGGA GGGAGGGTGT CTGCTGGAAG CCAGGCTCAG CCCTCCTGCC TGGACGCACC CCGGCTGTGC
TCGTGTCCCT CCCTCCACCA GACGACCTTC GGTCCGAGTC GGGAGGACGG ACCTGCGTGG GGCCGACACG

        820          830          840          850          860          870          880
AGCCCCAGCC CAGGGCAGCA AGGCATGCC CATCTGTCTC CTCACCCGGA GGCCTCTGAC CACCCCACTC
TCGGGGTCCG GTCCCGTCGT TCCGTACGGG GTAGACAGAG GAGTGGGCCT CCGGAGACTG GTGGGGTGAG

        890          900          910          920          930          940          950
ATGCCCAGGG AGAGGGTCTT CTGGATTTT CCACCAGGCT CCGGGCAGCC ACAGGCTGGA TGCCCCTACC
TACGGGTCCC TCTCCAGAA GACCTAAAAA GGTGGTCCGA GGCCCGTCGG TGTCCGACCT ACGGGGATGG

        960          970          980          990          1000          1010          1020
CCAGGCCCTG CGCATACAGG GGCAGGTGCT GCGCTCAGAC CTGCCAAGAG CCATATCCGG GAGGACCCTG
GGTCCGGGAC GCGTATGTCC CCGTCCACGA CGCGAGTCTG GACGGTITCTC GGTATAGGCC CTCCTGGGAC

        1030          1040          1050          1060          1070          1080          1090
CCCCTGACCT AAGCCCAACC CAAAGGCCAA ACTCTCCACT CCCTCAGCTC AGACACCTTC TCTCCTCCCA
GGGACTGGA TTCGGGTGGG GTTCCGGTT TGAGAGGTGA GGGAGTCGAG TCTGTGGAAG AGAGGAGGGT

        1100          1110          1120          1130          1140          1150
GATCTGAGTA ACTCCCAATC TTCTCTCTGC A GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA CCA
CTAGACTCAT TGAGGGTTAG AAGAGAGACG T CTC AGG TTT ATA CCA GGG GGT ACG GGT GGT
E S K Y G P P C P P>

1160          1170          1180          1190          1200          1210          1220
TGC CCA GGT AAGCCAACCC AGGCTCGCC CTCCAGCTCA AGGCGGGACA GGTGCCCTAG AGTAGCCTGC
ACG GGT CCA TTCGGTTGGG TCCGGAGCGG GAGGTCGAGT TCCGCCCTGT CCACGGGATC TCATCGGACC
C P>

        1230          1240          1250          1260          1270          1280
ATCCAGGGAC AGGCCCCAGC CGGGTGCTGA CGCATCCACC TCCATCTCTT CCTCA GCA CCT GAG TTC
TAGGTCCCTG TCCGGGGTCG GCCCAGGACT GCGTAGGTGG AGGTAGAGAA GGAGT CGT GGA CTC AAG
A P E F>

1290          1300          1310          1320          1330          1340
CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC
GAC CCC CCT GGT AGT CAG AAG GAC AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG
L G G P S V F L F P P K P K D T L M I>

        1350          1360          1370          1380          1390          1400
TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG
AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGC ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTC CTT CTG GGG CTC
S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E>

```

FIGURA 16: CONT,

```

1410      1420      1430      1440      1450
GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC
V  Q  F  N  W  Y  V  D  G  V  E  V  H  N  A  K  T  K  P>

1460      1470      1480      1490      1500      1510
CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
GCC CTC CTC GTC AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
R  E  E  Q  F  N  S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T  V  L  H>

1520      1530      1540      1550      1560      1570
CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG
GTC CTG ACC GAC TTG CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGC
Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S  N  K  G  L  P>

1580      1590      1600      1610      1620      1630
TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGG GACCCACGGG GTGCGAGGGC
AGG AGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCACC CTGGGTGCC CACGCTCCCG
S  S  I  E  K  T  I  S  K  A  K>

1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
CACATGGACA GAGGTCAGCT CGGCCACCC TCTGCCCTGG GAGTGACCGC TGTGCCAAC TCTGTCCCTA
GTGTACCTGT CTCAGTTCGA GCCGGGTGGG AGACGGGACC CTCACTGCCG ACACGGTTGG AGACAGGGAT

1710      1720      1730      1740      1750
CA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG
GT CCC GTC GGG GCT CTC GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GTC CTC CTC TAC
G  Q  P  R  E  P  Q  V  Y  T  L  P  P  S  Q  E  E  M>

1760      1770      1780      1790      1800      1810
ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC
TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATG GGG TCG CTG TAG
T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L  V  K  G  F  Y  P  S  D  I>

1820      1830      1840      1850      1860      1870
GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC
CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG
A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P  E  N  N  Y  K  T  T  P  P>

1880      1890      1900      1910      1920
GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC
CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TCC GAT TGG CAC CTG TTC TCG
V  L  D  S  D  G  S  F  F  L  Y  S  R  L  T  V  D  K  S>

1930      1940      1950      1960      1970      1980
AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC
TCC ACC GTC CTC CCC TTA CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG
R  W  Q  E  G  N  V  F  S  C  S  V  M  H  E  A  L  H  N>

1990      2000      2010      2020      2030      2040
CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA GTGC CAGGGCCGGC
GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GAC CCA TTT ACT CACG GTCCCCGGCC
H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  L  G  K  *>

2050      2060      2070      2080      2090      2100      2110
AAGCCCCCGC TCCCCGGGCT CTCGGGGTCG CGCGAGGATG CTTGGCACGT ACCCCGTCTA CATACTCC
TTCGGGGGCG AGGGGCCCGA GAGCCCCAGC GCGCTCTAC GAACCGTCA TGGGGCAGAT GTATGAAGG

```

FIGURA 16: CONT,

2120	2130	2140	2150	2160
AGGCACCCAG	CATGGAAATA	AAGCACCCAC	CACTGCCCTG	GCTCGAATTC
TCCGTGGGTC	GTACCTTTAT	TTCGTGGGTG	GTGACGGGAC	CGAGCTTAAG

FIGURA 16: CONT,

a) Cadena ligera

```

      10          20          30          40          50          60
TTCGAAGCCG CCACC ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT
AAGCTTCGGC GGTGG TAC TTC AAC GGA CAA TCC GAC AAC CAC GAA GAC AAC AAG ACC TAA
      M      K      L      P      V      R      L      L      V      L      L      L      F      W      I>

      70          80          90          100         110
CCT GCT TCC CGG GGT GAC GTT CAA GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT
GGA CGA AGG GCC CCA CTG CAA GTT CAC TGG STC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA
P   A   S   R   G   D   V   Q   V   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S>

120          130          140          150          160          170
GTA GGA GAC CGG GTC ACC ATC ACT TGT AGA TCC AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT
CAT CCT CTG GCC CAG TGG TAG TGA ACA TCT AGG TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA
V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   S   S   Q   S   L   A   N   S   Y>

      180          190          200          210          220          230
GGG AAC ACC TTT TTG TCT TGG TAT CTG CAC AAA CCA GGT AAA GCC CCA CAA TTG CTC
CCC TTG TGG AAA AAC AGA ACC ATA GAC GTG TTT GGT CCA TTT CGG GGT GTT AAC GAG
G   N   T   F   L   S   W   Y   L   H   K   P   G   K   A   P   Q   L   L>

      240          250          260          270          280
ATC TAC GGA ATC TCT AAC AGA TTT AGT GGT GTA CCA GAC AGG TTC AGC GGT TCC GGA
TAG ATG CCT TAG AGA TTG TCT AAA TCA CCA CAT GGT CTG TCC AAG TCG CCA AGG CCT
I   Y   G   I   S   N   R   F   S   G   V   P   D   R   F   S   G   S   G>

290          300          310          320          330          340
AGT GGT ACT GAT TTC ACC CTC ACG ATC TCG TCT CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT
TCA CCA TGA CTA AAG TGG GAG TGC TAG AGC AGA GAG GTC GGT CTT CTA AAG CGG TGA
S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T>

      350          360          370          380          390          400
TAT TAC TGT TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA
ATA ATG ACA AAT GTT CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT
Y   Y   C   L   Q   G   T   H   Q   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   V>

      410          420          430          440          450
GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG
CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC
E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V   F   I   F   P   P   S   D   E>

460          470          480          490          500          510
CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA
GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT
Q   L   K   S   G   T   A   S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y   P   R>

      520          530          540          550          560          570
GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG
CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC
E   A   K   V   Q   W   K   V   D   N   A   L   Q   S   G   N   S   Q   E>

      580          590          600          610          620          630
AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG
TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC
S   V   T   E   Q   D   S   K   D   S   T   Y   S   L   S   S   T   L   T>

      640          650          660          670          680

```

FIGURA 16: CONT,

```

CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG
GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG GTA GTC
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q>

690          700          710          720          730          740
GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG AGGGA
CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC CCT CTC ACA ATC TCCCT
G L S S P V T K S F N R G E C *>

750          760          770          780
GAAGTGCCCC CACCTGCTCC TCAGTTCAG CCTGGGAATT C
CTTCACGGGG GTGGACGAGG AGTCAAGGTC GGACCCTTAA G

```

FIGURA 17: ESTRUCTURA DE UN ANTICUERPO NAC-GAMMA CALICAMICINA DMH CONJUGADO

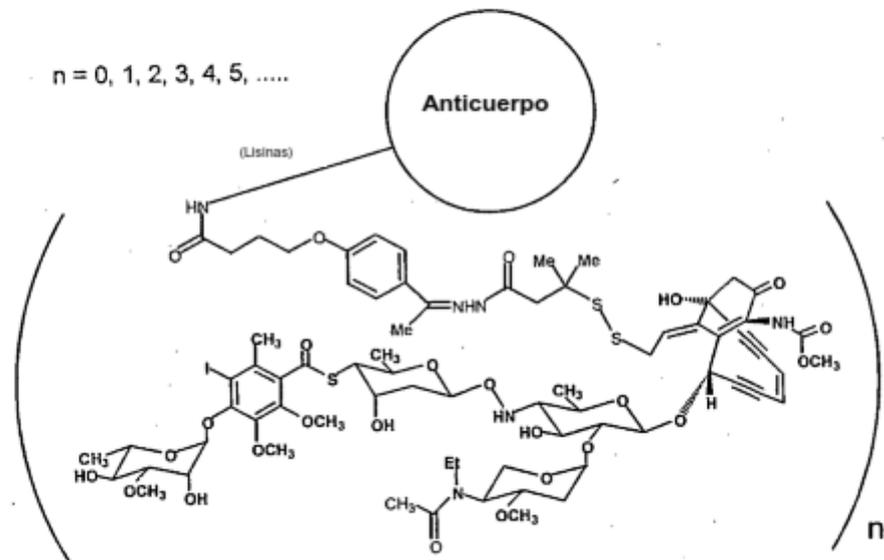


FIGURA 18: EFECTO DE CMC-544 SOBRE EL CREDIMIENTO DEL LINFOMA DE LINFOCITOS B RAMOS

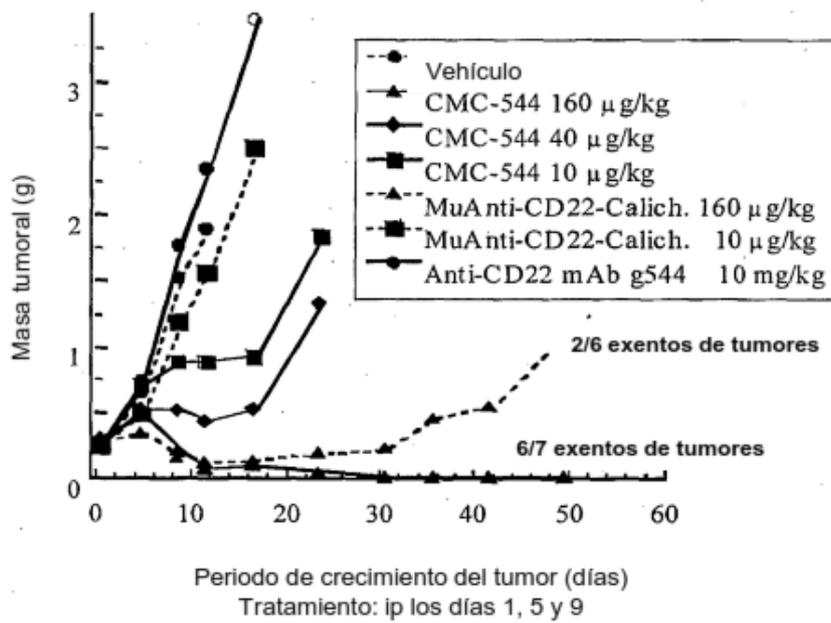


FIGURA 19: EFECTO DE CMC-544 SOBRE LINFOMAS DE LINFOCITOS B GRANDES

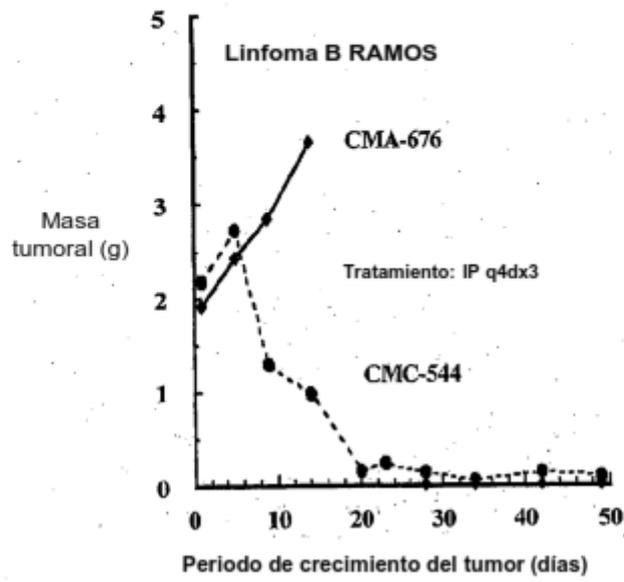


FIGURA 20: EFECTO DE CMC-544 PREPARADO CON LOS PROCEDIMIENTOS DE CONJUGACIÓN CMA Y CMC SOBRE EL CREDIMIENTO DEL LINFOMA RL

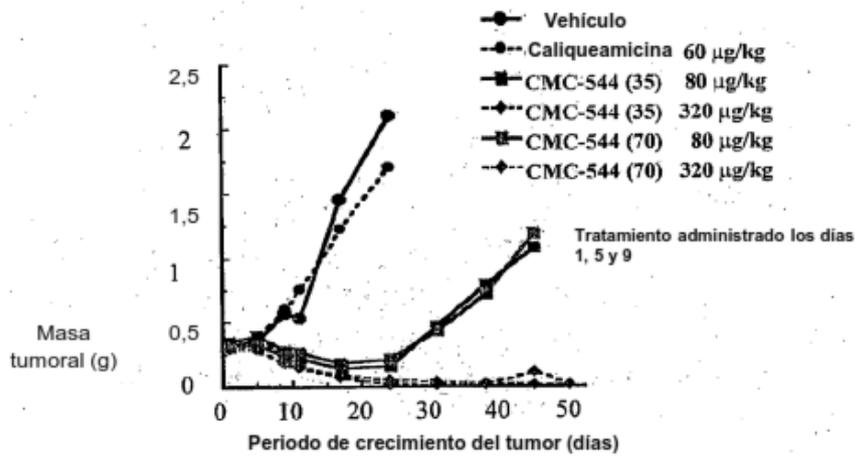


FIGURA 21: EL LINFOMA RL DE CÉLULAS GRANDES TRATADO CON RITUXIMAB (RITUXAN™) ES SUSCEPTIBLE A CMC-544

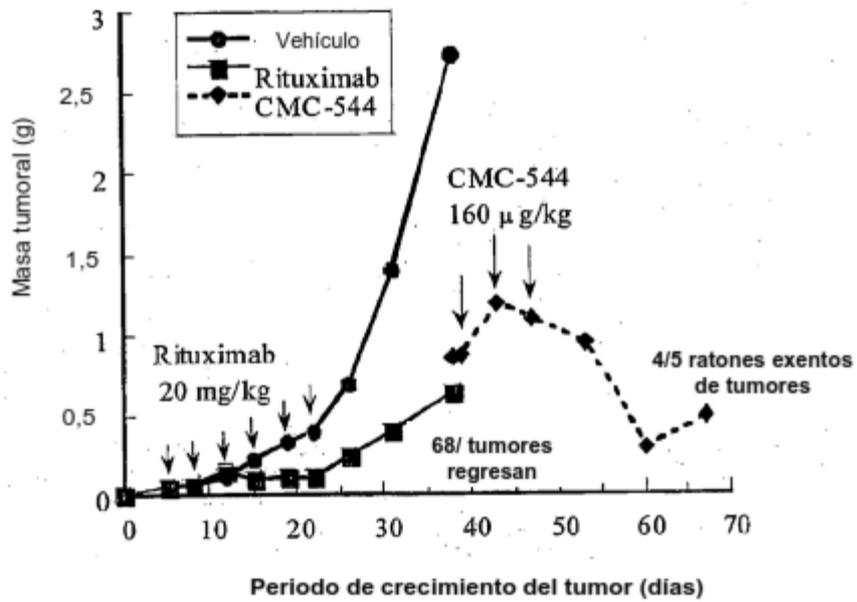


FIGURA 22: EFECTO DE RITUXIMAB (RITUXAN™) SOBRE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CMC-544

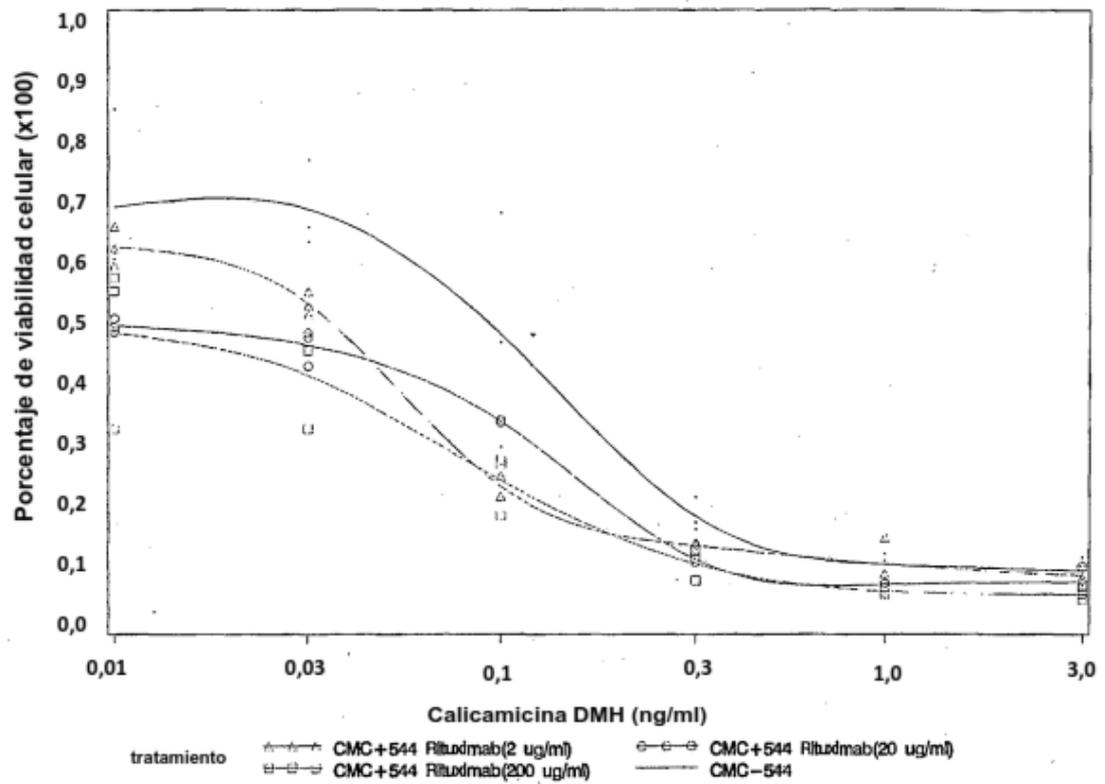


FIGURA 23: EFECTO DE CMC-544, RITUXIMAB (RITUXAN™), Y CMA-676 SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE RATONES SCID CON LINFOMA RAMOS B TEMPRANO DISEMINADO

Linfoma de linfocitos b Ramos
IV en ratones SCID el día 0

Tratamiento IP los días 3, 7, 11
Q4Dx3

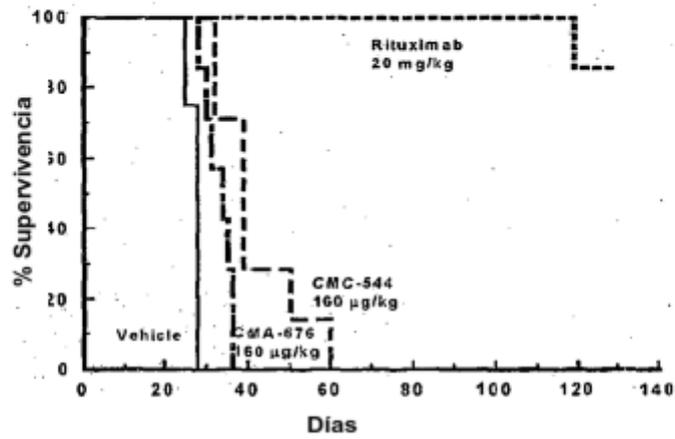


FIGURA 24: EFECTO DE CMC-544, RITUXIMAB (RITUXAN™), Y CMA-676 SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE RATONES SCID CON LINFOMA RAMOS B TARDÍO DISEMINADO

Linfoma de linfocitos b Ramos
IV en ratones SCID el día 0

Tratamiento IP los días 9, 13, 17
Q4Dx3

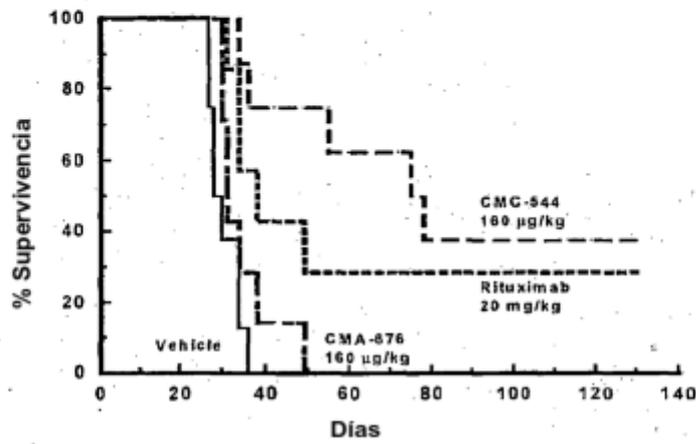


FIGURA 25: EFECTO DE CMC-544, RITUXIMAB (RITUXAN™), Y CMA-676 SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE RATONES SCID CON LINFOMA RAMOS B TARDÍO DISEMINADO

Linfoma de linfocitos B Ramos
IV en ratones SCID el día 0

Tratamiento IP los días 9, 13, 17
Q4Dx3

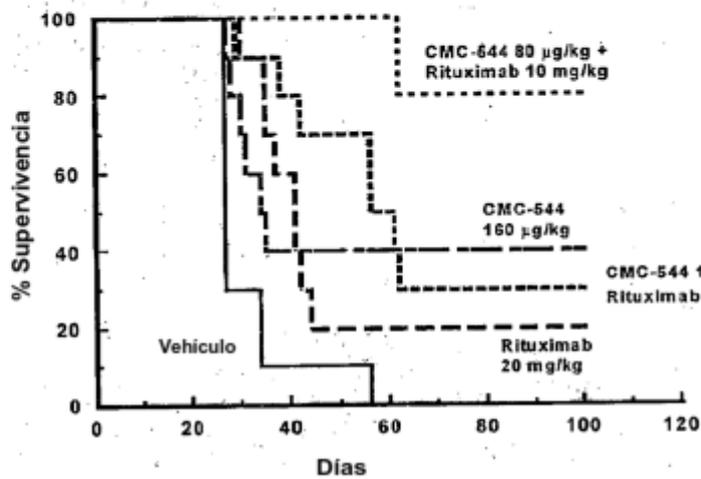


FIGURA 26: EFECTO DE CMC-544, RITUXIMAB (RITUXAN™), Y CMA-676 SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE RATONES SCID CON LINFOMA RAMOS B TARDÍO DISEMINADO

Linfoma de linfocitos B Ramos
IV en ratones SCID el día 0

Tratamiento IP los días 9, 13, 17
Q4Dx3

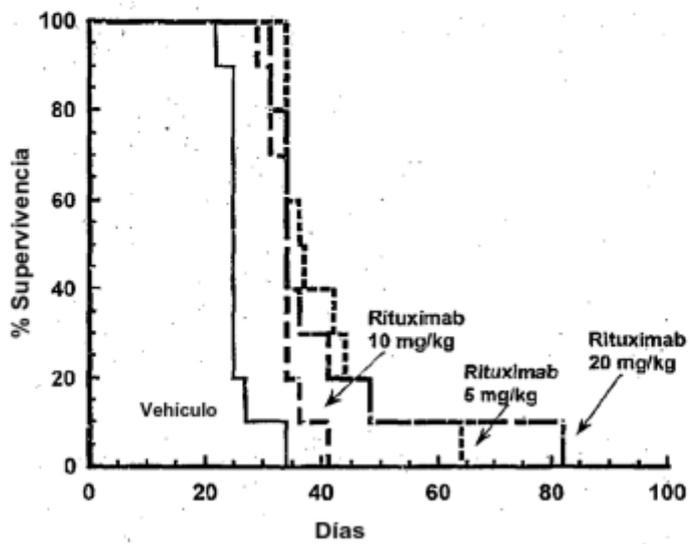


FIGURA 27: EFECTO DE CMC-544, RITUXIMAB (RITUXAN™), Y CMA-676 SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE RATONES SCID CON LINFOMA RAMOS B TARDÍO DISEMINADO

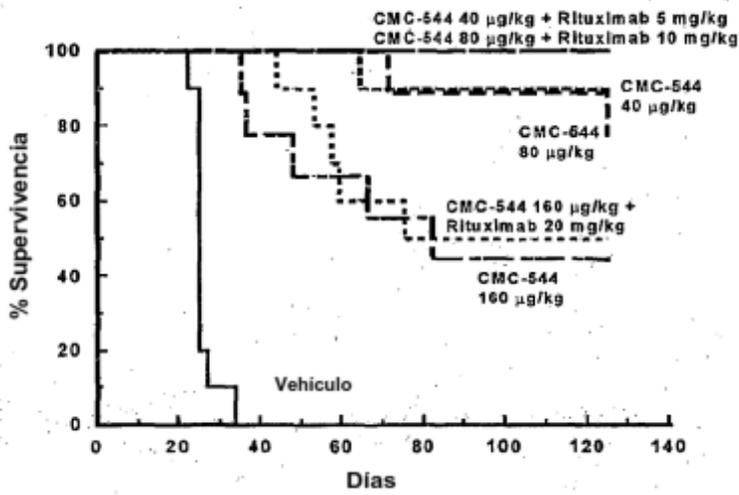


FIGURA 28: ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CMC-544 CON Y SIN RITUXIMAB (RITUXAN™) SOBRE LINFOMA NO DE HODGKINS RL

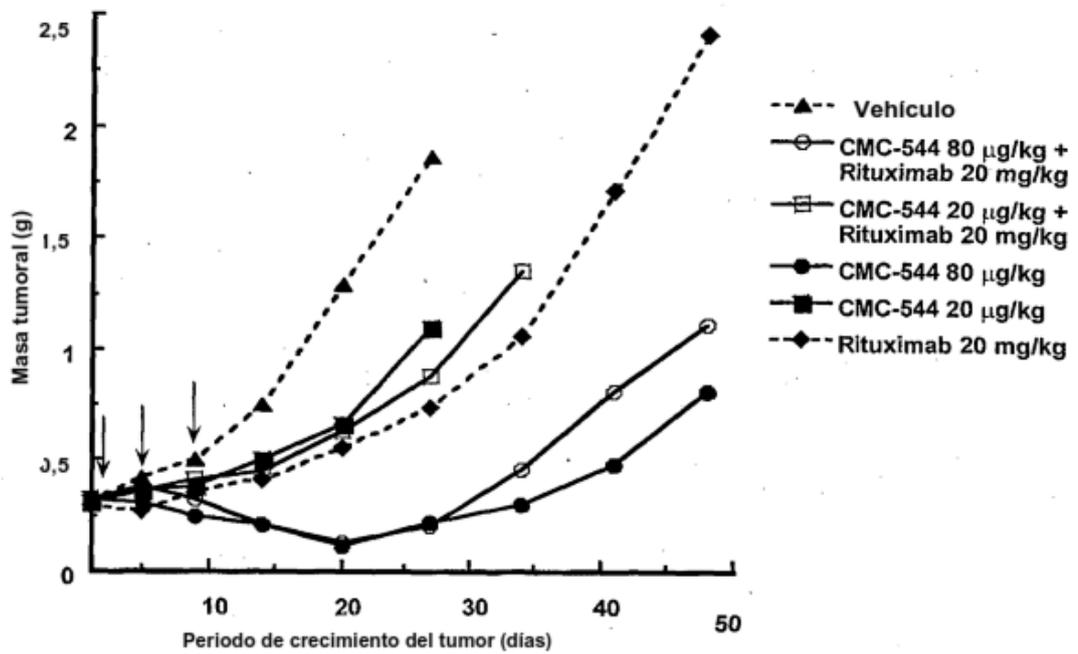


FIGURA 29: ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CMC-544 Y CHOP SOBRE LINFOMA NO DE HODGKINS RL

