(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 716 812**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2010 PCT/IB2010/054422**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO11039724**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2010 E 10765689 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2483312**

(54) Título: **Anticuerpos que se unen específicamente al receptor EphA2**

(30) Prioridad:

02.10.2009 EP 09305938

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2019

(73) Titular/es:

SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR

(72) Inventor/es:

BOUCHARD, HERVÉ;
COMMERCON, ALAIN;
FROMOND, CLAUDIA;
MIKOL, VINCENT;
PARKER, FABIENNE;
SASSOON, INGRID y
TAVARES, DANIEL

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que se unen específicamente al receptor EphA2.

La presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este que se une específicamente a un receptor EphA2.

Se refiere, además, a un conjugado que comprende un agente citotóxico que se une covalentemente al anticuerpo y un método para preparar dicho conjugado.

Antecedentes de la invención

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación descontrolada, que resulta de una transducción de señal aberrante. Las formas más peligrosas de cáncer son células malignas que tienen la capacidad de propagarse, ya sea por crecimiento directo en tejido adyacente a través de la invasión, o por implantación en sitios distantes mediante metástasis. Las células metastásicas han adquirido la capacidad de desprenderse del tumor primario, trasladarse a sitios distantes a través del torrente circulatorio o sistema linfático, y colonizar microentornos distantes y extraños.

Ahora está claro que las moléculas Eph participan en estados de enfermedad como el cáncer. Los receptores Eph son una familia única de tirosina cinasas receptoras (RTK, por sus siglas en inglés), la más grande en el genoma, que consiste en catorce receptores, divididos en dos grupos A y B, que interactúan con ocho ligandos Ephrin unidos a la membrana (Pasquale, E. B. et al., 2005, Nature Reviews Mol. Cell Biol., 6: 462-475). La unión de los receptores Eph a sus ligandos induce la aglomeración del receptor, la activación de la actividad de cinasa y la posterior transfosforilación de los dominios citoplasmáticos en residuos tirosina, que crean sitios de acoplamiento para varias proteínas de señalización (Kullander, K. and Klein, R., 2002, Nature Reviews Mol. Cell Biol., 3: 475-486; Noren, N. K. and Pasquale, E. B., 2004, Cell signal., 16: 655-666).

Se ha informado sobre la sobreexpresión del receptor EphA2 en cánceres de ovario, mama, próstata, pulmón, colon, esófago, célula renal, cuello uterino y melanoma. Se ha sugerido que EphA2 es un regulador positivo del crecimiento celular y la supervivencia en células malignas (Landen, C. N. et al., 2005, Expert. Opin. Ther. Targets, 9 (6): 1179-1187). También se ha descrito un papel para EphA2 en el cáncer, dado que la sobreexpresión de EphA2 sola es suficiente para transformar las células epiteliales mamarias en un fenotipo maligno (Zelinski et al., 2001, Cancer Res., 61: 2301-2306) y aumenta la metástasis espontánea hacia sitios distantes (Landen, C. N. et al., 2005, Expert. Opin. Ther. Targets, 9 (6): 1179-1187). Además, hay cada vez más pruebas que sugieren que EphA2 participa en la angiogénesis tumoral (Ogawa et al., 2000, Oncogene, 19: 6043-6052; Cheng et al. 2002, Mol. Cancer Res., 1: 2-11; Cheng et al., 2003, Neoplasia, 5 (5): 445-456; Dobrzanski et al., 2004, Cancer Res., 64: 910-919).

Se ha demostrado que la fosforilación de EphA2 está vinculada con su abundancia. El EphA2 fosforilado en tirosina se internaliza rápidamente y queda destinado a la degradación, mientras que el EphA2 no fosforilado demuestra recambio reducido y, por lo tanto, se acumula en la superficie celular. Actualmente se cree que este tipo de modelo podría contribuir a una mayor frecuencia de sobreexpresión de EphA2 en el cáncer (Landen, C. N. et al., 2005, Expert. Opin. Ther. Targets, 9 (6): 1179-1187). Sin embargo, la realidad puede ser más compleja, dado que datos recientes parecen indicar un papel para las funciones dependientes e independientes de EphA2 en la progresión tumoral (Fang W. B., 2005, Oncogene, 24: 7859-7868).

Se han desarrollado anticuerpos agonistas que promueven la fosforilación en tirosina e internalización de EphA2, que resulta, en última instancia, en la inhibición del crecimiento de las células tumorales (Dodge-Zantek et al., 1999, Cell Growth & Differ., 10: 629-638; WO 01/12172, WO 03/094859, WO 2004/014292, WO 2004/101764, WO 2006/023403, WO 2006/047637, WO 2007/030642).

La solicitud WO 2006/084226 describe anticuerpos que no aumentan ni disminuyen la actividad de EphA2 cinasa, pero que son capaces de impedir la proliferación de las células tumorales. Sin embargo, no hay indicación en ella de que estos anticuerpos previenen la unión de EphrinA1 al receptor e inhiben la fosforilación de EphA2 inducida por EphrinA1. Se ha propuesto el uso de anticuerpos antagonistas en WO 2004/092343, pero no se ha descrito ningún anticuerpo propiamente dicho en ella. Se han descrito anticuerpos que reconocen EphA2 que son verdaderos antagonistas en WO 2008/010101, así como variantes humanizadas y conjugados de estos. Estos anticuerpos y derivados de estos inhiben el crecimiento de células tumorales dependiente de EphA2 cinasa.

Sin embargo, todavía existe la necesidad de medicamentos nuevos y eficaces que se puedan usar en el tratamiento del cáncer.

Compendio de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar nuevos agentes que se unen específicamente a miembros de la familia del receptor Eph de clase A, tales como EphA2, e inhiben la actividad celular del receptor al antagonizar al receptor. Por lo tanto, la presente memoria descriptiva incluye anticuerpos o fragmentos de estos que reconocen el receptor

EphA2, preferiblemente humano y funcionan como antagonistas de dicho receptor. Estos anticuerpos carecen de toda actividad agonista. La invención es como se define en las reivindicaciones.

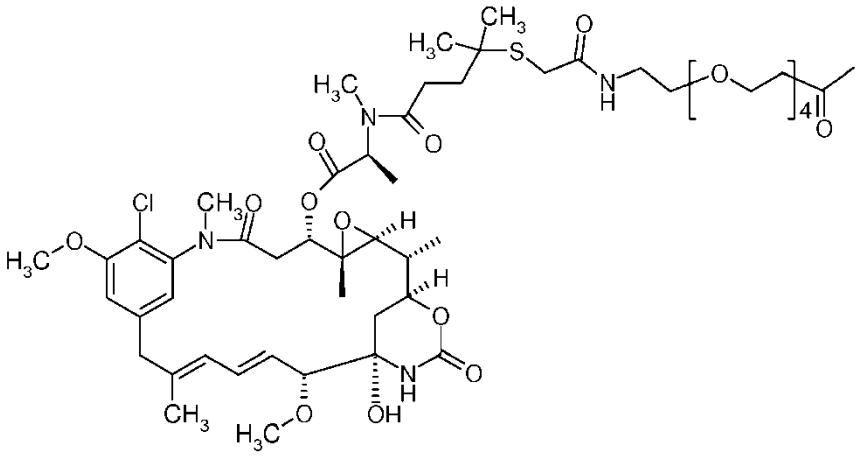
El anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo de este de la presente memoria descriptiva comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, dicha cadena pesada comprende tres regiones de determinación de la complementariedad secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, y dicha cadena ligera comprende tres regiones de determinación de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 4, 5 y 6. En una realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este está humanizado o acondicionado.

La invención se refiere, en particular, a un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo de este que se une específicamente a un receptor EphA2 y comprende al menos una cadena pesada y al menos una ligera, en donde dicha cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 12, y en donde dicha cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 14.

En una realización adicional, la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, y la cadena ligera de dicho anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.

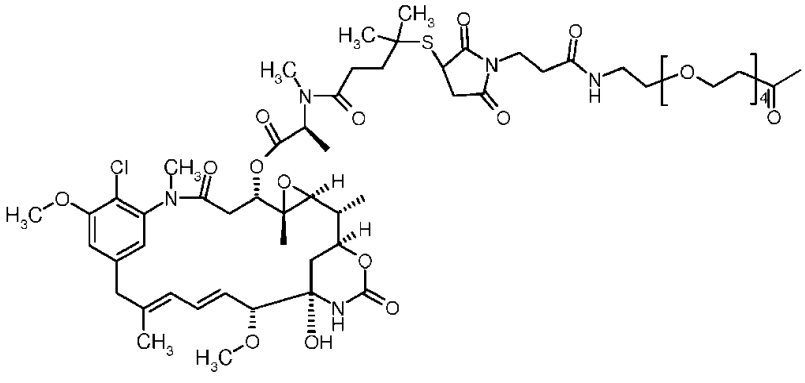
Según se describe en la presente memoria, el dicho anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este se conjuga con un agente citotóxico. Por lo tanto, un aspecto de la presente memoria descriptiva es describir un conjugado de un anticuerpo de la presente invención o un fragmento de unión a epítopo de este, en donde dicho conjugado comprende un agente citotóxico unido que se elige entre:

el compuesto de fórmula (XIII):



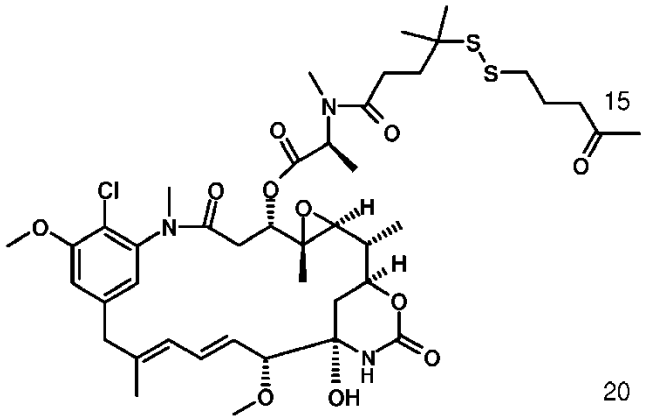
(XIII)

el compuesto de fórmula (XIV):



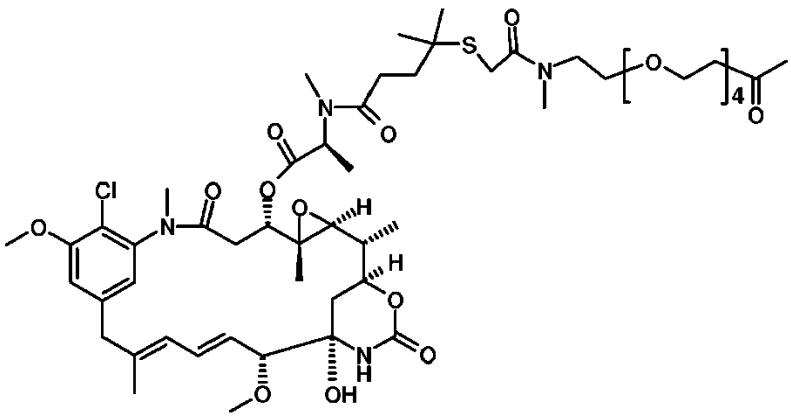
(XIV)

el compuesto de fórmula (XXIV):



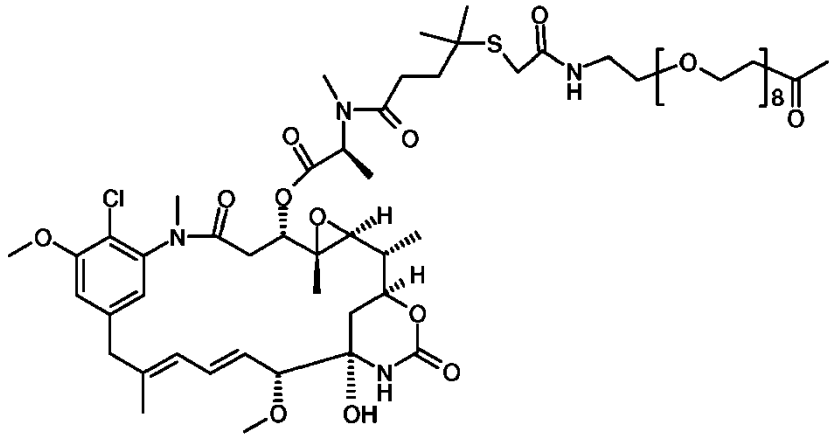
(XXIV)

el compuesto de fórmula (XXV):



(XXV)

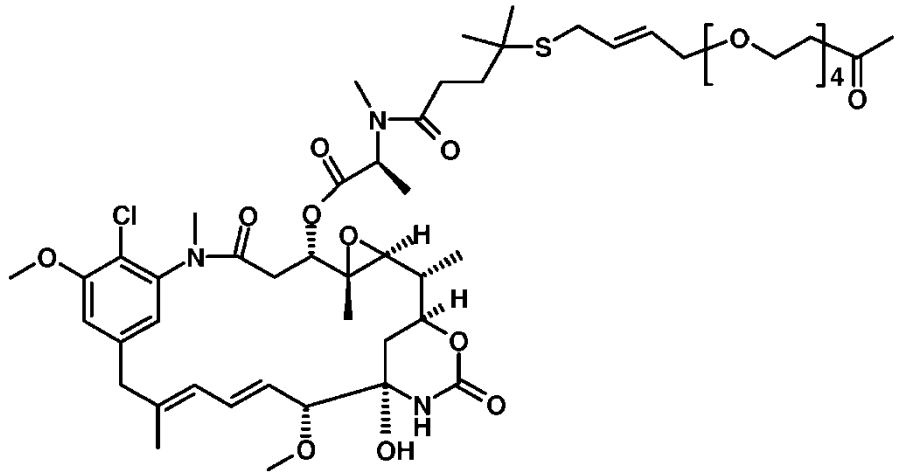
el compuesto de fórmula (XXVI):



(XXVI)

y

el compuesto de fórmula (XXVII):



(XXVII)

En un aspecto preferido, el conjugado comprende el compuesto de fórmula (XIII) como el agente citotóxico. En una realización, la cantidad de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo (DAR) en dicho conjugado comprende entre 4 y 7 moléculas de maitansinoide/molécula de anticuerpo, dicha DAR se determina al medir por vía espectrofotométrica la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm.

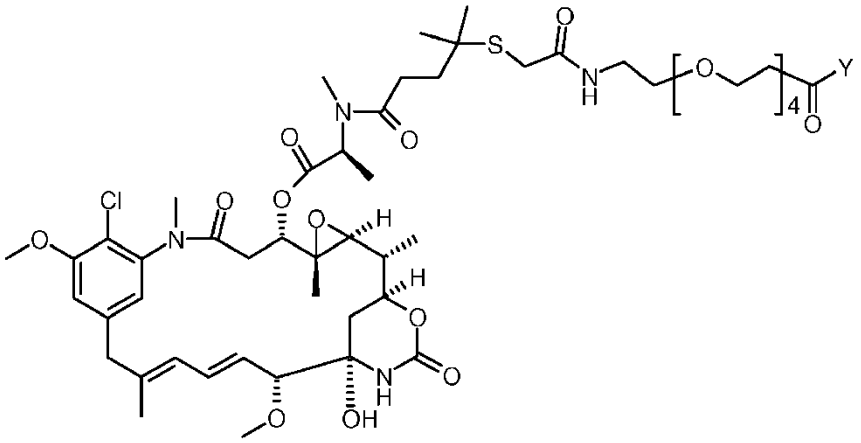
En otro aspecto, se proporciona un método para preparar un conjugado que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto una disolución acuosa, opcionalmente tamponada, de un agente de unión a célula con una disolución de un compuesto citotóxico;

(ii) después, separar opcionalmente el conjugado que se formó en (i) de los reactivos que no hicieron reacción y cualquier aglomerado que pueda estar presente en la disolución;

en donde el agente de unión a célula es un anticuerpo según las reivindicaciones 1-3, y un agente citotóxico elegido entre:

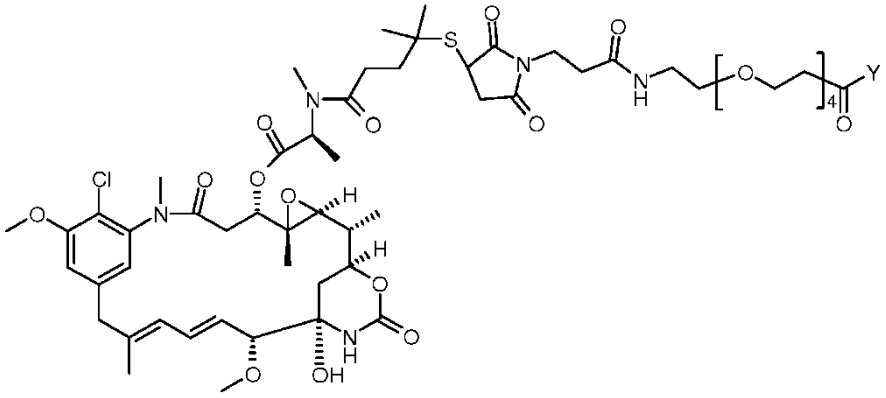
el compuesto de fórmula (XVII):



(XVII)

en donde Y es N-succinimidiloxi, N-sulfosuccinimidiloxi, N-ftalimidiloxi, N-sulfoftalimidiloxi, 2-nitrofeniloxi, 4-nitrofeniloxi, 2,4-dinitrofeniloxi, 3-sulfonil-4-nitrofeniloxi, 3-carboxi-4-nitrofeniloxi, imidazolilo o átomo de halógeno; y

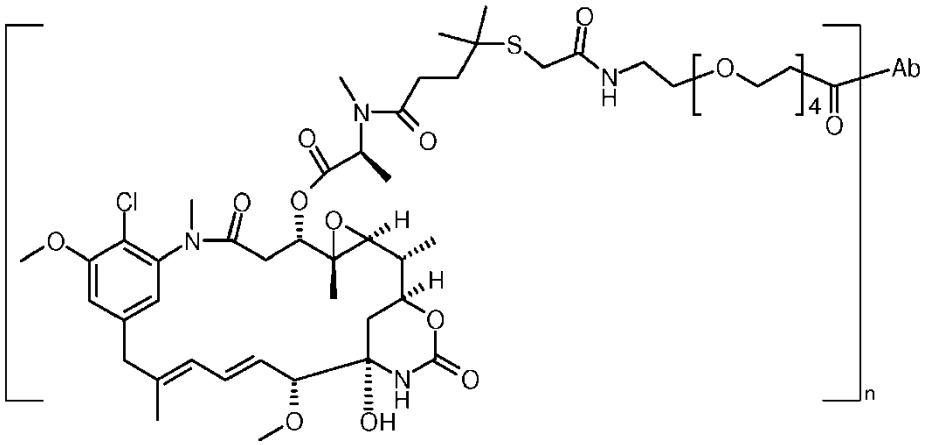
el compuesto de fórmula (XVIII):



(XVIII)

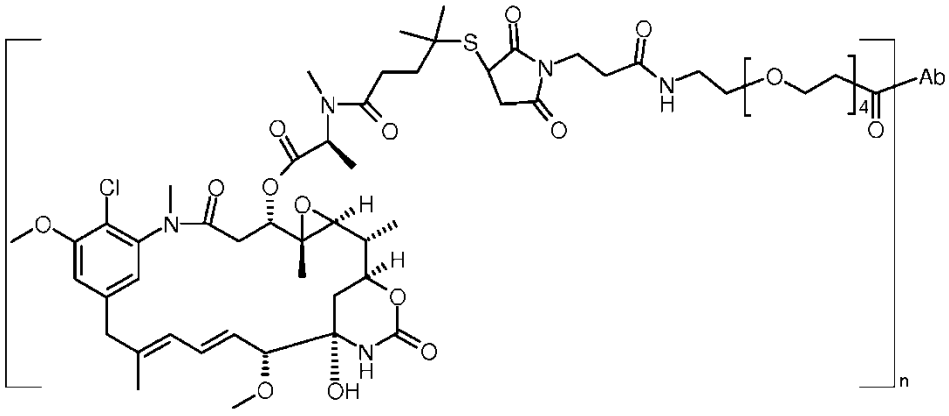
en donde Y es N-succinimidiloxi, N-sulfosuccinimidiloxi, N-ftalimidiloxi, N-sulfoftalimidiloxi, 2-nitrofeniloxi, 4-nitrofeniloxi, 2,4-dinitrofeniloxi, 3-sulfonil-4-nitrofeniloxi, 3-carboxi-4-nitrofeniloxi, imidazolilo o átomo de halógeno.

Los conjugados que se pueden obtener mediante dicho método están comprendidos dentro del alcance de la presente memoria descriptiva. En particular, dicho conjugado tiene una estructura elegida entre las estructuras de la fórmula (XV):



(XV)

y de la fórmula (XVI):



(XVI)

en donde Ab es un anticuerpo según la presente invención y n es un número entero comprendido entre 1 y 15. En una realización preferida, n está comprendido entre 4 y 7. En otra realización preferida, el conjugado de la invención tiene la estructura de la fórmula (XV).

La afinidad del anticuerpo de la invención o fragmento de unión a epítopo de este por el antígeno no se ve afectada por el proceso de conjugación; por otro lado, la conjugación de un agente citotóxico con los anticuerpos de la técnica anterior resulta en una afinidad menor por EphA2. El dicho anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este de la presente invención, cuando se conjuga con un agente citotóxico, muestra más potencia y es más selectivo al destruir células tumorales que expresan EphA2 que los conjugados de la técnica anterior. Además, los conjugados de la presente invención exhiben propiedades farmacocinéticas ventajosas con respecto a los conjugados de la técnica anterior, tal como un aclaramiento más lento, una mejor exposición y una estabilidad aumentada del conjugado *in vivo.* Duchas propiedades serían particularmente útiles, junto con la elevada eficacia citotóxica y selectividad, para desarrollar un medicamento que es a la vez seguro y eficaz.

Por lo tanto, la invención abarca una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de la invención o fragmento de unión a epítopo de este, o un conjugado de este, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos de la invención o fragmentos de unión a epítopo de estos, o conjugados de estos, se pueden usar como un medicamento. En particular, se pueden usar para producir un medicamento para tratar el cáncer. En una realización preferida, el dicho cáncer se elige entre carcinoma, incluidos los de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; incluido el carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluida, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluidas leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; otros tumores, incluidos melanoma,

seminoma, teratocarcinoma, cáncer folicular tiroideo, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluidos astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas.

Leyendas de figuras

Figura 1: Secuencias de la CDR, la V_H y la V_L de mu2H11R35R74, y de la V_H y la V_L de hu2H11 R35R74.

Figura 2: Espectro de HRMS de hu2H11 R35R74-PEG4-NHAc-DM4 usando el método C (ejemplo 1a.1.)

Figura 3: Espectro de HRMS de hu2H11 R35R74-PEG4-Mal-DM4 usando el método C (ejemplo 1b.1.)

Figura 4: Análisis de la cinética de la fosforilación de EphA2 en células MDA-MB-231. WT: células no tratadas naturales; MW: marcador de peso molecular; P-EphA2: Epha2 fosforilado

Figuras 5A y 5B: Inhibición de la fosforilación de EphA2 después de la inducción mediante EphrinA1/Fc, respectivamente, en células NCI-H1299 (5A) y células MDA-MB-231 (5B); WT: células no tratadas naturales; MW: marcador de peso molecular; P-EphA2: EphA2 fosforilado.

Figura 6: Actividad citotóxica de hu2H11 R35R74-PEG4-Mal-DM4 (círculos rellenos pequeños: DAR = 6,7; círculos rellenos grandes: DAR = 7,0) en comparación con hu2H11-PEG4-Mal-DM4.

Figura 7: Representación de gráfico de tiempo (escala semilogarítmica) de las concentraciones en plasma medias (n=2) de hu2H11-SPDB-DM4 después de una dosis simple por administración intravenosa de 20 mg/kg de inmunoconjugado en HGS a ratones CD-1 macho. Se muestran la concentración total de IgG humana (diamantes rellenos) y la fracción de conjugado (cuadrados abiertos).

Figura 8: Representación de gráfico de tiempo (escala semilogarítmica) de las concentraciones en plasma medias (n=2) de hu2H11 R35R74-PEG4-NHAc-DM4 después de una dosis simple por administración intravenosa de 20 mg/kg de inmunoconjugado en HGS a ratones CD-1 macho. Se muestran la concentración total de IgG humana (diamantes rellenos) y la fracción de conjugado (cuadrados abiertos).

Figuras 9A y 9B: Parámetros PK para hu2H11 R35R74-PEG4-NHAc-DM4 a diversos DAR, representación de gráfico de barras de la exposición a (AUC(0-inf); figura 9A) y aclaramiento (CI; figura 9B) de diversos ADC como una función de la DAR después de una dosis simple por administración intravenosa de 20 mg/kg de inmunoconjugado en HGS a ratones CD-1 macho (n=4).

Figura 10: ilustra el mapeo del epítopo de EphA2 para Fab2H11.

Figura 11: es la secuencia de EphA2 en donde los residuos en gris oscuro son parte del epítopo; los residuos en gris claro no son visibles en las estructuras de cristal.

Figura 12 A: representa la estructura general del complejo y la figura 12B es una ampliación de la parte con las dos mutaciones de Fab.

Figura 13: es una representación de la estructura del parátopo.

Figura 14: Espectro de HRMS de hu2H11R35R74-PEG4-NMeAc-DM4.

Figura 15: Espectro de HRMS de hu2H11 R35R74-PEG8-NHAc-DM4.

Figura 16: Espectro de HRMS de hu2H11 R35R74-PEG4-Allyl-DM4.

Figura 17: Espectro de HRMS de hu2H11-PEG4-NHAc-DM4.

Descripción detallada de la invención

A menos que se definan de cualquier otra manera, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera, los términos en singular incluirán plurales y los términos en plural incluirán el singular. En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en la presente memoria son las conocidas y usadas comúnmente en la técnica. La puesta en práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura, tal como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook et al, 1989); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et ah, eds., 1987 y

actualizaciones periódicas); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al, ed., 1994); A Practical Guide to Molecular Cloning (Perbal Bernard V., 1988); Phage Display: A Laboratory Manual (Barbas et al., 2001). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se llevan a cabo según las especificaciones del fabricante, como se realizan comúnmente en la técnica o como se describen en la presente memoria. Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en la presente memoria son las conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Se usan técnicas estándares para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y suministro farmacéuticos, y el tratamiento de pacientes.

Se describen en la presente memoria nuevos anticuerpos y fragmentos de estos, capaces de unirse específicamente al receptor EphA2 y antagonizar a dicho receptor. En particular, los nuevos anticuerpos o fragmentos de la memoria descriptiva se unen específicamente a receptores Eph en la superficie celular, pero preferiblemente desprovistos de toda actividad agonista. Por otro lado, son capaces de inhibir las funciones celulares del receptor incluso en presencia de sus ligandos.

Según se usa en la presente memoria, el término “receptor EphA2” se refiere a una tirosina cinasa que pertenece a la familia de receptores Eph (revisado en Pasquale, E. B. et al., 2005, Nature Reviews Mol. Cell Biol., 6, 462-475), y que comprende, por ejemplo, una secuencia amínica como en los núms. de acceso a Genbank NM_004431 (EphA2 humano), NM_010139 (EphA2 murino) o NXM_345596 (EphA2 de rata). El EphA2 humano es un receptor EphA2 preferido. El término “ligando de EphA2”, según se usa en la presente memoria, se refiere a una proteína que se une a, y opcionalmente activa (p. ej., estimula la autofosforilación de) un receptor EphA2. Un ligando de EphA2 preferido en la presente memoria es “EphrinA1”, que se une al receptor EphA2 y comprende, por ejemplo, una secuencia amínica como en el acceso a Genbank NM_004428 (EphrinA1 humana).

El término “antagonista”, según se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula que es capaz de inhibir una o más de las actividades biológicas de una molécula diana, tal como un receptor EphA2. Los antagonistas pueden actuar al interferir en la unión de un receptor a un ligando y vice versa, al disminuir la fosforilación de EphA2 que podría inducirse mediante un ligando y/o al inhibir las vías intracelulares que se inducen mediante la unión de dicho ligando, y/o al inhibir la homo/hetero-oligomerización de receptores EphA. El antagonista puede bloquear completamente las interacciones receptor-ligando o puede reducir sustancialmente dichas interacciones. Todos estos puntos de intervención mediante un antagonista se considerarán equivalentes a los fines de la presente invención. Por lo tanto, se incluyen dentro del alcance de la memoria descriptiva los antagonistas (p. ej., anticuerpos neutralizantes) que se unen al receptor EphA2, al ligando de EphA2 o a un complejo de un receptor EphA2 y un ligando de EphA2; variantes o derivados de secuencia de aminoácidos de un receptor EphA2 o ligando de EphA2 que antagonizan la interacción entre un receptor EphA2 y un ligando de EphA2; receptor EphA2 soluble o ligando de EphA2 soluble, opcionalmente fusionado con una molécula heteróloga tal como una región de inmunoglobulina (p. ej., una inmunoadhesina); un complejo que comprende un receptor EphA2 en asociación con un ligando de EphA2; péptidos de secuencia sintéticos o naturales que se unen a un receptor EphA2 o un ligando de EphA2. En un aspecto preferido, el antagonista es un anticuerpo.

El término “agonista”, según se usa en la presente memoria, se refiere cualquier compuesto, incluida una proteína, un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula grande, una molécula pequeña, capaz de activar una o más de las actividades biológicas de la molécula diana. Los agonistas de EphA2 actúan al estimular la fosforilación de la proteína, desencadenado, de esta manera, la degradación de dicha proteína.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente memoria descriptiva describe, entre otras características, anticuerpos monoclonales anti-EphA2, anticuerpos humanizados anti-EphA2 y fragmentos de los anticuerpos anti-EphA2. Cada uno de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente invención se diseña para reconocer y unirse específicamente al receptor EphA2, y actúa como un antagonista del receptor EphA2, inhibiendo la fosforilación inducida por los ligandos de EphA2.

El receptor EphA2 pertenece a la familia de receptores cuya fosforilación de la cola citoplasmática aumenta después de la unión al ligando para interactuar con una variedad de proteínas adaptadoras y de señalización, lo que conduce a la activación de diferentes vías de señalización celulares posteriores (Kullander, K. and Klein, R., 2002, Nature Reviews Mol. Cell Biol., 3: 475-486; Noren, N. K. and Pasquale, E. B., 2004, Cell signal., 16: 655-666). Según se usa en la presente memoria, el término “señalización mediada por EphA2” se refiere a todos los eventos celulares que se producen en respuesta a la unión al ligando de EphA2. Aunque los anticuerpos descritos en técnica anterior agonizan el receptor EphA2, y, en particular, aumentan la fosforilación en tirosina de la proteína EphA2, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención carecen preferiblemente de todas dichas propiedades agonistas. En particular, son incapaces de estimular la fosforilación de EphA2 por sí mismos. Al igual que los anticuerpos descritos en WO 2008/010101, los anticuerpos antagonistas y fragmentos de anticuerpos de la invención están desprovistos de toda actividad agonista. En una realización específica, se puede usar para promover la fosforilación en tirosina de EphA2, a diferencia de otros anticuerpos descritos en la técnica anterior (Dodge-Zantek et al., 1999, Cell Growth & Differ., 10: 629-638; WO 01/12172, WO 03/094859, WO 2004/014292, WO 2004/101764, WO 2006/023403, WO 2006/047637, WO 2007/030642).

La presente memoria descriptiva describe anticuerpos anti-EphA2 antagonistas propiamente dichos. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención tienen la capacidad de inhibir las funciones celulares del receptor EphA2, incluso en presencia de los ligandos de dicho receptor EphA2, p. ej., EphrinA1. En una realización, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención pueden inhibir la unión de un ligando a un receptor EphA2. En un aspecto preferido, la unión de EphrinA1 a EphA2 se evita mediante los anticuerpos y fragmentos de estos según se describen en la presente memoria. Notablemente, en otra realización, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención tienen la capacidad de inhibir la fosforilación en tirosina del receptor EphA2, incluso en presencia de EphrinA1.

Anticuerpos

El término “anticuerpo” se usa en la presente memoria en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa) de cualquier isotipo tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos y fragmentos de anticuerpo. Se puede generar un anticuerpo reactivo con un antígeno específico mediante métodos recombinantes tales como selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, o al inmunizar un animal con el antígeno o un ácido nucleico que codifica el antígeno.

Un anticuerpo típico comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que se enlazan mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable. Según se usa en la presente memoria, “V_H” o “VH” se refiere a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, que incluye la cadena pesada de un fragmento Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' o F(ab')2. Cuando se hace referencia a “V_L” o “VL” se refiere a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina de un anticuerpo, que incluye la cadena ligera de un fragmento Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' o F(ab')2. Cada región variable contiene tres segmentos denominados “regiones de determinación de la complementariedad” (“CDR”, por sus siglas en inglés) o “regiones hipervariables”, que son principalmente responsables de unirse a un epítopo de un antígeno. Normalmente se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas de manera secuencial desde el extremo N. Las porciones más altamente conservadas de las regiones variables se denominan “regiones marco” (“FR”, por sus siglas en inglés). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, y adoptan en su mayoría una configuración de lámina beta, conectada mediante las tres CDR, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena se mantienen unidas muy estrechamente entre sí mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, National Institute of Health, Bethesda, MD, 1991).

Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés), la fagocitosis a través de la unión al receptor Fcγ, velocidad de aclaramiento de semivida a través del receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, por sus siglas en inglés) a través del complemento C1q de la cascada de complemento.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distinguibles, llamados kappa (K) y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variables y constantes se unen mediante una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada que también incluye una región “D” de aproximadamente 10 aminoácidos más (véase, p. ej., Fundamental Immunology Ch. 7, Paul, W., ed., 2a edición, Raven Press, N. Y., 1989). Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen y describen en general en, por ejemplo, Abbas et al. (Cellular y Mol. Immunology, 4a edición, W. B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos distintos.

Un “anticuerpo policlonal” es un anticuerpo que se produjo entre o en presencia de uno o más anticuerpos distintos no idénticos. En general, los anticuerpos policlonales se producen a partir de linfocitos B en presencia de diversos otros linfocitos B que producen anticuerpos no idénticos. Normalmente, los anticuerpos policlonales se obtienen directamente de un animal inmunizado.

Un “anticuerpo monoclonal”, según se usa en la presente memoria, es un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos que forman esta población son

esencialmente idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que podrían estar presentes en cantidades menores. Estos anticuerpos se dirigen contra un epítopo simple y, por lo tanto, son altamente específicos.

Un “anticuerpo no conjugado”, a los efectos de la presente, es un anticuerpo que no está conjugado con un resto citotóxico ni radioetiqueta.

Un “epítopo” es el sitio en el antígeno al que se une un anticuerpo. Puede estar formado por residuos contiguos o por residuos no contiguos que se acercan estrechamente mediante el plegado de una proteína antigénica. Los epítopos formados por aminoácidos contiguos típicamente se conservan tras la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por aminoácidos no contiguos típicamente se pierdan con dicha exposición.

Según se usa en la presente memoria, el término “K_D” se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo/antígeno específica. “Afinidad de unión” generalmente se refiere a la intensidad de la suma total de interacciones no covalente entre un sitio de unión simple de una molécula {p. ej., un anticuerpo) y su pareja de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, según se usa en la presente memoria, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1 : 1 entre miembros de un par de unión (p. ej., anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y generalmente se puede representar mediante la K_D. La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en la presente memoria. Los anticuerpos con afinidad baja generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos con afinidad alta generalmente se unen al antígeno de manera más rápida y tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica se conoce una variedad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de estos puede usarse a los efectos de la presente invención.

La presente invención procede a partir de un anticuerpo anti-EphA2 murino, en la presente memoria mu2H11 R35R74, que está completamente caracterizado con respecto a las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada, la identificación de las CDR, la identificación de los aminoácidos superficiales y los medios para su expresión en forma recombinante.

El anticuerpo murino de la invención se puede obtener, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio del anticuerpo 53.2H11. El anticuerpo 53.2H11 se produce mediante un hibridoma depositado en virtud del Tratado de Budapest, el 16 de junio, en la American Type Culture Collection (Colección estadounidense de cultivos tipo), con el número de acceso PTA-7662, y que se describe en la solicitud PCT WO 2008/010101. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de 53.2H11, la identificación de las CDR, la identificación de los aminoácidos superficiales, así como las secuencias polinucleotídicas que codifican dichas cadenas ligera y pesada se describen todas en WO 2008/010101.

Las secuencias de aminoácidos y ADN primarias de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo mu2H11R35R74 y de versiones humanizadas de estas se describen en la presente memoria. En un aspecto, la presente memoria descriptiva describe anticuerpos o fragmento de unión a epítopo de estos que comprenden una o más CDR que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6.

En un aspecto, los anticuerpos de la memoria descriptiva comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 4, 5, 6.

En una realización preferida, el parátopo de dichos anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a epítopo de estos comprende en la cadena ligera: Arg35 del bucle L1, Tyr54, Arg58 y Asp60 de L2.

En una realización preferida, el parátopo de dichos anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a epítopo de estos comprende la cadena pesada: Thr30, Ala31, Tyr32 y Tyr33 del bucle H1, Asn52, Tyr54, Asn55 y Phe57 de H2 y Glu99, Phe100, Tyr101, Gly102, Tyr103 y Tyr105 de H3.

Dichos anticuerpos o fragmentos de unión a epítopo de estos pueden comprender mutaciones:

en la posición: Thr H28,

en una de pocas de las siguientes posiciones en la cadena ligera: 35, 26 a 31, 34 a 37, 55, 56, 57, 59 y 94 a 102, y/o

en una de pocas de las siguientes posiciones en la cadena pesada: 28, 54 y 57.

En otra realización, los anticuerpos de la invención se unen específicamente a un epítopo del receptor EphA2 humano que comprende los residuos Gly49, Lys50, Gly51, Asp53, Cys70, Asn71, Val72, Met73, Ser74, Gly75, Gln77, Phe108, Pro109, Gly110, Gly111, Ser113 y Ser114 del LBD del dominio extracelular del receptor EphA2 o una forma conservadoramente sustituida de estos. En un aspecto adicional, los anticuerpos de la memoria

descriptiva comprenden una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO 8. En otra realización preferida, los anticuerpos de la invención comprenden una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO 10.

Anticuerpo 2H11R35R74 humanizado o acondicionado

Según se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que contiene una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Un “anticuerpo quimérico”, según se usa en la presente memoria, es un anticuerpo en el que la región constante, o una porción de esta, se altera, reemplaza o intercambia, de manera que la región variable se enlace a una región constante de una especie diferente, o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo. “Anticuerpo quimérico” también se refiere a un anticuerpo en el que la región variable, o una porción de esta, se altera, reemplaza o intercambia, de manera que la región constante se enlace a una región variable de una especie diferente, o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo.

El objetivo de la humanización es la reducción de la inmunogenicidad de un anticuerpo xenógeno, tal como un anticuerpo murino, para su introducción en un humano, mientras se mantienen la afinidad de unión a antígeno y la especificidad completas del anticuerpo. Los anticuerpos humanizados o anticuerpos adaptados para no ser rechazados por otros mamíferos se pueden producir utilizando diversas tecnologías tales como rebarnizado e injerto de CDR. Según se usa en la presente memoria, la tecnología de rebarnizado utiliza una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies distintas de CDR de las regiones variables del anticuerpo para que se parezcan a las superficies de anticuerpos conocidos del hospedante diana.

Las estrategias y métodos para rebarnizar los anticuerpos y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos dentro de un hospedante diferente se describen en la patente estadounidense núm. 5.639.641. De manera resumida, en un método preferido, (1) se generan alineaciones de posición de una concentración de regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo para proporcionar un conjunto de posiciones expuestas en la superficie del marco de región variable de cadena pesada y ligera en donde las alineaciones de posición para todas las regiones variables son al menos aproximadamente 98 % idénticas; (2) se define un conjunto de residuos aminoacídicos expuestos en la superficie de marco de región variable de cadena pesada y ligera para un anticuerpo de roedor (o fragmento de este); (3) se identifica un conjunto de residuos aminoacídicos expuestos en la superficie de marco de región variable de cadena pesada y ligera que es más estrechamente idéntico al conjunto de residuos aminoacídicos expuestos en la superficie del roedor; (4) el conjunto de residuos aminoacídicos expuestos en la superficie de marco de región variable de cadena pesada y ligera definido en la etapa (2) se sustituye con el conjunto de residuos aminoacídicos expuestos en la superficie de marco de región variable de cadena pesada y ligera identificado en la etapa (3), excepto aquellos residuos aminoacídicos que están a 5 Å de cualquier átomo de cualquier residuo de las regiones de determinación de la complementariedad del anticuerpo de roedor; y (5) se produce el anticuerpo de roedor humanizado que tiene especificidad de unión.

Otro método preferido de humanización de anticuerpos, basado en la identificación de residuos flexibles, se ha descrito en la solicitud PCT WO 2009/032661. Dicho método comprende las siguientes etapas: (1) construir un modelo de homología del mAb genitor y ejecutar una simulación de dinámica molecular; (2) analizar los residuos flexibles e identificar los residuos más flexibles de una molécula de anticuerpo no humano, así como identificar residuos o motivos que probablemente serán una fuente de heterogeneidad o de reacción de degradación; (3) identificar un anticuerpo humano que exhibe el conjunto más similar de áreas de reconocimiento al anticuerpo genitor; (4) determinar los residuos flexibles que se van mutar, los residuos o motivos que probablemente serán fuente de heterogeneidad y degradación también se mutan; y (5) verificar la presencia de epítopos de linfocitos T o linfocitos B conocidos. Los residuos flexibles se pueden encontrar usando un cálculo de dinámica molecular que usa un modelo disolvente implícito, que explica la interacción del disolvente de agua con los átomos de proteína durante el período de tiempo de la simulación.

Los anticuerpos se pueden humanizar mediante el uso de una variedad de técnicas distintas que incluyen injerto de CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; patentes estadounidenses Núms. 5.530.101; y 5.585.089), rechapado o rebarnizado (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814; Roguska M.A. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:969-973) y transposición de cadena (patente estadounidense N.° 5.565.332).

En ciertas realizaciones, las cadenas variables y constantes de los anticuerpos, o los fragmentos, variantes o derivados de unión a antígeno de estos son completamente humanos. Los anticuerpos completamente humanos se pueden producir usando técnicas que se conocen en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos completamente humanos contra un antígeno específico se pueden preparar al administrar el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a una exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han inhabilitado. Las técnicas de ejemplo que se pueden usar para producir dichos anticuerpos se describen en las patentes estadounidenses: 6.150.584; 6.458.592; 6.420.140. Se conocen otras técnicas en la técnica. Asimismo, los anticuerpos completamente humanos se pueden producir mediante diversas tecnologías de

visualización, p. ej., visualización en fagos u otros sistemas de visualización víricos. Véanse también las patentes estadounidenses núms. 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806 y 5.814.318; y las publicaciones de solicitud de patente internacionales con número WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

La presente memoria descriptiva describe anticuerpos humanizados o fragmentos de estos, que reconocen el receptor EphA2 y actúan como antagonistas. En una realización preferida, los anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a epítopo de estos tienen la capacidad adicional de inhibir el crecimiento de una célula cancerosa que expresa el receptor EphA2. En una realización adicional, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a epítopo de este tienen la capacidad adicional de inhibir la migración de una célula cancerosa metastásica que expresa el receptor EphA2.

Según se describe en la presente memoria, dicho anticuerpo humanizado es un anticuerpo 2H11R35R74 humanizado o un fragmento de unión a epítopo de este.

En una realización, los anticuerpos humanizados de la invención se obtienen mediante mutagénesis dirigida al sitio de las secuencias polinucleotídicas que codifican hu53.2H11 (WO 2008/010101) denominadas en la presente memoria hu2H11.

En realizaciones más preferidas, se proporcionan versiones acondicionadas o humanizadas del anticuerpo 2H11R35R74 en donde los residuos expuestos en la superficie del anticuerpo o sus fragmentos se reemplazan en ambas cadenas ligera y pesada para parecerse más estrechamente a las superficies de anticuerpo humano conocidas. El anticuerpo 2H11R35R74 humanizado o fragmentos de unión a epítopo de este de la presente invención tienen propiedades mejoradas. Por ejemplo, los anticuerpos 2H11R35R74 humanizados o fragmentos de unión a epítopo de estos reconocen específicamente el receptor EphA2. Más preferiblemente, el anticuerpo 2H11R35R74 humanizado o fragmentos de unión a epítopo de este tienen la capacidad adicional de inhibir el crecimiento de una célula que expresa el receptor EphA2.

Las versiones humanizadas del anticuerpo 2H11R35R74 también se caracterizan en su totalidad en la presente memoria con respecto a sus respectivas secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ambas cadenas ligera y pesada, las secuencias de ADN de los genes para las regiones variables de cadena ligera y pesada, la identificación de las CDR, la identificación de sus aminoácidos superficiales y la descripción de medios para su expresión en forma recombinante. Sin embargo, el alcance de la presente memoria descriptiva no se limita a anticuerpos y fragmentos que comprenden estas secuencias. En cambio, todos los anticuerpos y fragmentos que se unen específicamente al receptor EphA2 se describen en la presente memoria. Preferiblemente, los anticuerpos y fragmentos que se unen específicamente al receptor EphA2 antagonizan la actividad biológica del receptor. Más preferiblemente, dichos anticuerpos, además, carecen sustancialmente de actividad agonista. Por lo tanto, los anticuerpos y fragmentos de unión a epítopo de la presente memoria descriptiva pueden diferir del anticuerpo 2H11R35R74 o los derivados humanizados de este, en las secuencias de aminoácidos de sus estructuras, CDR y/o cadena ligera y cadena pesada, y todavía estar dentro del alcance de la presente memoria descriptiva.

Las CDR del anticuerpo 2H11R35R74 se han determinado al resolver la estructura de cristal del fragmento Fab de 2H11R35R74 formando complejo con el dominio extracelular del receptor EphA2. Se han identificado los residuos de 2H11R35R74 que interactúan con el dominio extracelular de EphA2. Por consiguiente, se describen anticuerpos y fragmentos que tienen propiedades mejoradas producidos mediante, por ejemplo, maduración de afinidad de un anticuerpo de la presente memoria descriptiva.

Se identificaron los genes de la línea germinal de IgVκ y Jκ de cadena ligera y los genes de la línea germinal de IgVh y Jh de cadena pesada de ratón de donde probablemente se derivó 53.2H11, y se describieron en WO 2008/010101. Los números de acceso de dichas secuencias de línea germinal son, respectivamente, MMU231196 y AF303833. Dichas secuencias de gen de línea germinal son útiles para identificar mutaciones somáticas en los anticuerpos, incluso en las CDR.

Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo 2H11R35R74 y las secuencias de sus CDR no se conocían anteriormente y se describen en la presente solicitud. Dicha información se puede usar para producir versiones humanizadas del anticuerpo 2H11R35R74. También se pueden obtener anticuerpos 2H11R35R74 humanizados de la invención mediante mutagénesis dirigida al sitio de hu2H11. Estos anticuerpos anti-EphA2 humanizados o sus derivados también se pueden usar como el agente de unión a célula de los conjugados de la presente memoria descriptiva.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente memoria descriptiva describe anticuerpos humanizados o fragmento de unión a epítopo de estos que comprenden una o más CDR que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6. En un aspecto adicional, los anticuerpos humanizados de la memoria descriptiva comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en donde dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por las

SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, y en donde dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 4, 5 y 6.

En un aspecto, la presente memoria descriptiva describe un anticuerpo 2H11R35R74 humanizado o fragmentos de este que comprenden una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO. 12. En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un anticuerpo 2H11R35R74 humanizado o fragmentos de este que comprenden una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO 14.

En un aspecto preferido, se describe un anticuerpo 2H11R35R74 humanizado, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en donde dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, en donde dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, en donde dicha cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO. 12, y en donde dicha cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO. 14.

Polinucleótidos, vectores y células hospedantes.

Se describen ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-EphA2 de la invención. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada y/o ligera de una inmunoglobulina anti-EphA2. En un aspecto preferido, un ácido nucleico simple codifica una cadena pesada de una inmunoglobulina anti-EphA2 y otra molécula de ácido nucleico codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina anti-EphA2.

En otro aspecto de la presente memoria descriptiva, se describen polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18. En un aspecto, el polinucleótido de la memoria descriptiva se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 7, 9, 11, 13, 15 y 17. La memoria descriptiva no se limita a dichos polinucleótidos de por sí, sino que también incluye todos los polinucleótidos que exhiben al menos 80 % de identidad con dichos polinucleótidos.

El término “polinucleótido”, al que se hace referencia en la presente memoria, significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN.

El término “polinucleótido aislado”, según se usa en la presente memoria, significará un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o algunas combinación de estos, que en virtud de su origen el “polinucleótido aislado” (1) no se asocia con todo ni una porción de un polinucleótido en el que el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza, (2) está funcionalmente enlazado a un polinucleótido con el que no está enlazado en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más extensa.

La memoria descriptiva describe vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención. En un aspecto, el vector contiene un polinucleótido que codifica una cadena pesada de una inmunoglobulina anti-EphA2. En otro aspecto, dicho polinucleótido codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina anti-EphA2. La memoria descriptiva también describe vectores que comprenden moléculas polinucleotídicas que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpo y sondas de estos.

Para expresar la cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos anti-EphA2 de la invención, los polinucleótidos que codifican dichas cadenas pesada y/o ligera se insertan en vectores de expresión de manera que los genes estén funcionalmente enlazados con secuencias de transcripción y traducción.

Las secuencias “enlazadas funcionalmente” incluyen secuencias de control de expresión que son contiguas al gen de interés y secuencias de control de expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. El término “secuencia de control de expresión”, según se usa en la presente memoria, se refiere a secuencias polinucleotídicas que son necesarias para provocar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias de iniciación de transcripción, terminación, promotoras y potenciadoras adecuadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficacia de traducción (es decir, secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y, cuando se desea, secuencias que potencian la secreción de la proteína. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedante; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen secuencias promotoras, de sitio de unión ribosómico y de terminación de transcripción; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen secuencias promotoras y de terminación de la transcripción. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líderes y secuencias de pareja de fusión.

Se pretende que el término “vector”, según se usa en la presente memoria, haga referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el cual se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedante en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (p. ej., vectores no episómicos de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedante tras la introducción en la célula hospedante y, de esta manera, se replican junto con el genoma hospedante.

Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están funcionalmente enlazados. Dichos vectores se denominan en la presente memoria “vectores de expresión recombinante” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” se pueden usar de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, se pretende que la memoria descriptiva incluya dichas formas de vectores de expresión, tales como plásmidos bacterianos, YAC, cósmidos, retrovirus, episomas derivados de VEB y todos los otros vectores que el experto sabe que son convenientes para garantizar la expresión de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos descritos en la presente memoria. El experto apreciará que los polinucleótidos que codifican las cadenas pesada y ligera se pueden clonar en diferentes vectores o en el mismo vector. En un aspecto preferido, dichos polinucleótidos se clonan en el mismo vector.

Los polinucleótidos de la memoria descriptiva y vectores que comprenden estas moléculas se pueden usar para la transformación de una célula hospedante de mamífero adecuada, o cualquier otro tipo de célula hospedante conocida por el experto. Se pretende que el término “célula hospedante recombinante” (o simplemente “célula hospedante”), según se usa en la presente memoria, haga referencia a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se entenderá que se pretende que dichos términos hagan referencia no solo a la célula objeto específico, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en generaciones posteriores por influencias de mutación o ambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula genitora, pero aun así se incluye dentro del alcance del término “célula hospedante”, según se usa en la presente memoria. La transformación puede hacerse mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedante. Dichos métodos son conocidos para el experto en la técnica e incluyen transformación mediada por dextrano, precipitación de fosfato cálcico, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplasto, electroporación, encapsulación del polinucleótido en liposomas, inyección biolística y microinyección directa de ADN en núcleos.

Fragmentos de anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención incluyen los anticuerpos de longitud completa descritos anteriormente, así como fragmentos de unión a epítopo. Según se usa en la presente memoria, “fragmentos de anticuerpo” incluye cualquier porción de un anticuerpo que conserva la capacidad de unirse al epítopo reconocido por el anticuerpo de longitud completa, generalmente denominados “fragmentos de unión a epítopo”. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab' y $F(ab')_2$, Fd, Fvs de cadena simple (scFv), anticuerpos de cadena simple, Fvs enlazados por disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprende una región V_L o V_H. Los fragmentos de unión a epítopo, incluidos anticuerpos de cadena simple, pueden comprender la región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios C_H1, C_H2 y C_H3.

Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento $F(ab')_2$. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo contienen las seis CDR del anticuerpo entero, aunque los fragmentos que contienen menos de todas dichas regiones, tal como tres, cuatro o cinco CDR, son también funcionales. Además, los fragmentos pueden ser o pueden combinar miembros de una cualquiera de las siguientes clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, y las subclases de estas.

Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ se pueden producir mediante escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (fragmentos Fab) o pepsinas (fragmentos $F(ab')_2$).

Los fragmentos “FV de cadena simple” (“scFv”) son fragmentos de unión a epítopo que contienen al menos un fragmento de una región variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) enlazada a al menos un fragmento de una región variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L). El enlazador puede ser un péptido corto, flexible seleccionado para garantizar que se produzca el pliegue tridimensional adecuado de las regiones (V_L) y (V_H) una vez que están enlazadas para mantener la especificidad de unión a la molécula diana del anticuerpo entero del cual se deriva el fragmento de anticuerpo de cadena simple. El extremo carboxílico de la secuencia (V_L) o (V_H) se puede enlazar covalentemente mediante un enlazador al extremo de aminoácido de una secuencia de (V_L) o (V_H) complementaria.

Los fragmentos de anticuerpo de cadena simple de la presente invención contienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos una de las regiones variables o de determinación de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos enteros descritos en la presente memoria descriptiva, pero carecen de algunos o todos los dominios constantes de dichos anticuerpos. Estos dominios constantes no son necesarios para la unión al antígeno, pero

constituyen una porción importante de la estructura de los anticuerpos enteros. Los fragmentos de anticuerpo de cadena simple, por lo tanto, pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos que contienen una parte o un dominio constante entero. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo de cadena simple tienden a no tener interacciones indeseadas entre moléculas biológicas y la región constante de cadena pesada, u otra actividad biológica indeseada. Además, los fragmentos de anticuerpo de cadena simple son considerablemente más pequeños que los anticuerpos enteros y, por lo tanto, pueden tener mayor permeabilidad capilar que los anticuerpos enteros, lo que permite que los fragmentos de anticuerpos de cadena simple localicen y se unan a sitios de unión a antígeno diana de manera más eficaz. Además, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir a una escala relativamente grande en células procariotas, lo que facilita su producción. Además, debido al tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpo de cadena simple es menos probable que provoquen una respuesta inmunitaria en un receptor que los anticuerpos enteros.

Los fragmentos de anticuerpo de cadena simple se pueden generar mediante clonación molecular, biblioteca de visualización en fagos de anticuerpo o técnicas similares conocidas para el experto. Estas proteínas se pueden producir, por ejemplo, en células eucariotas o células procariotas, incluidas bacterias. Los fragmentos de unión a epítopo de la presente invención también se pueden generar usando diversos métodos de visualización en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de visualización en fagos, los dominios de anticuerpo funcionales se visualizan en la superficie de partículas de fago que llevan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En particular, dicho fago se puede utilizar para visualizar los dominios de unión a epítopo expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatoria (p. ej., humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión a epítopo que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con el antígeno, p. ej., usando antígeno etiquetado unido o capturado en una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen los dominios de unión fd y M13 expresados a partir de los fagos con Fab, Fv o dominios de anticuerpo Fv estabilizados por disulfuro fusionados recombinantemente con la proteína de gen III o gen VIII de fago.

Los ejemplos de métodos de visualización en fagos que se pueden usar para producir fragmentos de unión a epítopo de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods, 182: 41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods, 184: 177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol., 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene 187: 9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology, 57: 191-280; la solicitud PCT n.° PCT/GB91/01134; las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes estadounidenses núms. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Después de la selección en fagos, se pueden aislar las regiones del fago que codifican los fragmentos y usarse para generar los fragmentos de unión a epítopo a través de la expresión en un hospedante elegido, incluidas células de mamíferos, células de insectos, células de plantas, levaduras y bacterias, usando tecnología de ADN recombinante, p. ej., según se describe en detalle más adelante. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y $F(ab')_2$ usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques, 12(6): 864-869; Sawai et al., 1995, AJRI, 34: 26-34; y Better et al., 1988, Science, 240: 1041-1043. Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv de cadena simple y anticuerpos incluyen los descritos en las patentes estadounidenses núms. 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., 1991, Methods in Enzymology 203: 46-88; Shu et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90: 7995-7999; Skerra et al., 1988, Science, 240: 1038-1040.

Equivalentes funcionales

También se incluyen dentro del alcance de la memoria descriptiva los equivalentes funcionales del anticuerpo anti-EphA y el anticuerpo anti-receptor EphA2 humanizado. El término “equivalentes funcionales” incluyen anticuerpos con secuencias homólogas, anticuerpos quiméricos, anticuerpos artificiales y anticuerpos modificados, por ejemplo, en donde cada equivalente funcional se define por su capacidad de unirse al receptor EphA2. El experto entenderá que hay una superposición entre el grupo de moléculas denominadas “fragmentos de anticuerpo” y el grupo denominado “equivalentes funcionales”. Los métodos para producir equivalentes funcionales son conocidos para el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en la solicitud PCT WO 93/21319, la patente europea n.° EP 0239400; la solicitud PCT WO 89/09622; la patente europea n.° EP 0338745; y la solicitud de patente europea EP 0332424.

Los anticuerpos con secuencias homólogas son los anticuerpos con secuencias de aminoácidos que tienen homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-EphA y un anticuerpo anti-EphA humanizado de la presente invención. Preferiblemente, la homología es con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo anti-EphA y el anticuerpo anti-EphA humanizado de la presente invención. “Homología de secuencia”, según se aplica a una secuencia de aminoácidos en la presente memoria se define como una secuencia con al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 % o 94 % de homología de secuencia y, más preferiblemente, al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología de secuencia con

respecto a otra secuencia de aminoácidos, según se determina, por ejemplo, mediante el método de búsqueda FASTA según Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 2444-2448.

Un anticuerpo quimérico es uno en el que las diferentes porciones de un anticuerpo se derivan de diferentes especies de animales. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino apareada con una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, p. ej., Morrison, 1985, Science, 229: 1202; Oi et al., 1986, BioTechniques, 4: 214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods, 125: 191-202; las patentes estadounidenses Núms. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

Las formas humanizadas de anticuerpos quiméricos se producir al sustituir las regiones de determinación de la complementariedad de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, por un dominio de marco humano, p. ej., véase la Pub. PCT N.° WO 92/22653. Los anticuerpos quiméricos humanizados preferiblemente tienen regiones constantes y regiones variables distintas de las regiones de determinación de la complementariedad (CDR) derivadas sustancialmente o exclusivamente de las regiones del anticuerpo humano correspondiente y CDR derivadas sustancialmente o exclusivamente de un mamífero distinto de un humano.

Los anticuerpos artificiales incluyen fragmentos scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y mru (véanse las revisiones de Winter, G. and Milstein, C., 1991, Nature, 349: 293-299; Hudson, P.J., 1999, Current Opinion in Immunology, 11: 548-557), cada uno de los cuales tiene capacidad de unión a antígeno. En el fragmento Fv de cadena simple (scFv), los dominios V_H y V_L de un anticuerpo se enlazan mediante un péptido flexible. Típicamente, este péptido enlazador tiene una longitud de aproximadamente 15 residuos aminoacídicos. Si el enlazador es mucho más pequeño, por ejemplo, de 5 aminoácidos, se forman diacuerpos, que son dímeros de scFv bivalentes. Si el enlazador se reduce a menos de tres residuos aminoacídicos, se forman estructuras triméricas y tetraméricas que se denominan triacuerpos y tetracuerpos. La unidad de unión más pequeña de un anticuerpo es una CDR, típicamente la CDR2 de la cadena pesada que tiene suficiente reconocimiento y unión específicos que se puede usar por separado. Dicho fragmento se denomina unidad de reconocimiento molecular o mru (por sus siglas en inglés). Diversas de dichas mru se pueden enlazar con péptidos enlazadores cortos y formar, de esta manera, una proteína de unión artificial con mayor avidez que una mru simple.

Los equivalentes funcionales de la presente solicitud también incluyen anticuerpos modificados, p. ej., anticuerpos modificados mediante el acoplamiento covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que se han modificado, p. ej., mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, ligadura a un ligando celular u otra proteína, etc. El acoplamiento covalente no evita que el anticuerpo genere una respuesta antiidiotípica. Estas modificaciones se pueden llevar a cabo mediante técnicas conocidas que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los equivalentes funcionales se pueden producir al intercambiar diferentes CDR en cadenas diferentes dentro de marcos diferentes. Por lo tanto, por ejemplo, a partir de un conjunto dado de CDR pueden surgir diferentes clases de anticuerpo mediante la sustitución de diferentes cadenas pesadas, por medio de la cual se pueden producir, por ejemplo, tipos e isotipos de anticuerpo IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, IgE. De manera similar, se pueden producir anticuerpos artificiales dentro del alcance de la memoria descriptiva al embeber un conjunto dado de CDR dentro de un marco completamente sintético.

Los equivalentes funcionales se pueden producir sin inconvenientes mediante mutación, eliminación e/o inserción dentro de las secuencias de región variable y/o constante que flanquean un conjunto específico de CDR, usando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica.

Los fragmentos de anticuerpo y equivalentes funcionales de la presente memoria descriptiva abarcas las moléculas con un grado detectable de unión a EphA2, cuando se comparan con el anticuerpo 2H11R35R74. Un grado detectable de unión incluye todos los valores en el intervalo de al menos 10-100 %, preferiblemente, al menos 50 %, 60 % o 70 %, más preferiblemente, al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de la capacidad de unión del anticuerpo 2H11R35R74 murino a EphA2.

Anticuerpos mejorados

Las CDR son de fundamental importancia para el reconocimiento del epítopo y la unión del anticuerpo. Sin embargo, se pueden hacer cambios a los residuos que comprenden las CDR sin interferir en la capacidad del anticuerpo para reconocer y unirse a su epítopo cognado. Por ejemplo, se pueden hacer cambios que no afectan el reconocimiento del epítopo, pero aumentan la afinidad de unión del anticuerpo por el epítopo.

Por lo tanto, también se incluyen en el alcance de la presente memoria descriptiva versiones mejoradas de los anticuerpos murinos y humanizados, que también reconocen y se unen específicamente a EphA2, preferiblemente con afinidad aumentada.

Diversos estudios han analizado los efectos de introducir uno o más cambios aminoacídicos en diversas posiciones de la secuencia de un anticuerpo, en función del conocimiento de la secuencia del anticuerpo primario, sus propiedades tales como unión y nivel de expresión (Yang, W. P. et al., 1995, J. Mol. Biol., 254: 392-403; Rader, C. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16: 535-539).

En estos estudios, se han generado equivalentes del anticuerpo primario al cambiar las secuencias de los genes de la cadena pesada y ligera en la CDR1, CDR2, CDR3, o regiones marco, usando métodos tales como mutagénesis dirigida al sitio mediada por oligonucleótido, mutagénesis en casete, PCR propensa a errores, redistribución de ADN o cepas mutadas de E. coli (Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16: 535-539; Adey, N. B. et al., 1996, Capítulo 16, págs. 277-291, en "Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press). Estos métodos de cambiar la secuencia del anticuerpo primario han resultado en afinidades mejoradas de los anticuerpos secundarios (Gram, H. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89: 3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97: 10701-10705; Davies, J. and Riechmann, L., 1996, Immunotechnolgy, 2: 169-179; Thompson, J. et al., 1996, J. Mol. Biol., 256: 77-88; Short, M. K. et al., 2002, J. Biol. Chem., 277: 16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, J. Biol. Chem., 276: 27622-27628).

Mediante una estrategia dirigida similar de cambiar uno o más residuos aminoacídicos del anticuerpo, las secuencias de anticuerpo descritas en la presente memoria descriptiva se pueden usar para desarrollar anticuerpos anti-EphA2 con funciones mejoradas, incluida afinidad mejorada por EphA2.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distintas de la secuencia peptídica de origen natural. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (preferiblemente, sustituciones de aminoácidos conservadoras) se pueden hacer en la secuencia de origen natural (preferiblemente, en la porción del polipéptido fuera del(de los) dominio(s) que forman contactos intermoleculares). Una sustitución de aminoácidos conservadora no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia genitora (p. ej., un aminoácido para reemplazo no debe tender a descomponer una hélice que se produce en la secuencia genitora, ni alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia genitora). Los ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica se describen en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N. Y. (1991)); y Thornton et al., 1991, Nature, 354: 105.

Los anticuerpos mejorados incluyen también los anticuerpos que tienen características mejoradas que se preparan mediante las técnicas estándares de inmunización animal, formación de hibridoma y selección de anticuerpos con características específicas.

Se cree que la interacción entre la región constante de un anticuerpo y diversos receptores Fc (FcγR) media las funciones efectoras del anticuerpo que incluyen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fijación de complemento, fagocitosis y semivida/aclaramiento del anticuerpo. Se pueden llevar a cabo diversas modificaciones en la región constante de anticuerpos de la memoria descriptiva dependiendo de la propiedad deseada. Por ejemplo, se detallan mutaciones específicas en la región constante para convertir un anticuerpo lítico en no lítico en EP 0629 240B1 y EP 0307 434B2 o se puede incorporar un epítopo de unión a receptor de recuperación en el anticuerpo para aumentar la semivida en suero (véase US 5.739.277). Existen cinco receptores Fcγ humanos reconocidos actualmente, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields et al. (J. Biol.Chem., 27: 6591-6604, 2001) demostraron que un conjunto común de residuos de IgGI participa en la unión a todos los FcγR, mientras que FcγRII y FcγRIII usan sitios distintos fuera de este conjunto común. Un grupo de residuos de IgGI redujo la unión a todos FcγR cuando se alteró a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de IgG y aglomerados cerca de la bisagra que une CH1 y CH2. Mientras FcγRI usa solo el conjunto común de residuos de IgGI para la unión, FcγRII y FcγRIII interactúan con residuos distintos además de con el conjunto común.

La alteración de algunos residuos redujo la unión solo a FcγRII (p. ej., Arg-292) o FcγRIII (p. ej., Glu-293). Algunas variantes exhibieron unión mejorada a FcγRII o FcγRIII, pero no afectaron la unión al otro receptor (p. ej., Ser-267Ala mejoró la unión a FcγRII, pero la unión a FcγRIII no fue afectada). Otras variantes exhibieron unión mejorada a FcγRII o FcγRIII con reducción de la unión al otro receptor (p. ej., Ser-298Ala mejoró la unión a FcγRII y redujo la unión a FcγRIII). Para FcγRIIIa, las mejores variantes de unión de IgGI tenían sustituciones de alanina combinadas en Ser-298, Glu-333 y Lys-334. Se cree que el receptor FcRn neonatal participa en el aclaramiento del anticuerpo y la transcitosis a través de los tejidos (véase Junghans R.P, 1997, Immunol. Res., 16: 29-57 y Ghetie et al., 2000, Annu. Rev. Immunol. 18: 739-766). Los residuos de IgGI humana que se determinó que interactúan directamente con el FcRn humano incluyen Ne253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435. Los cambios en cualquiera de estas posiciones descritas en esta sección pueden posibilitar una semivida en suero aumentada y/o propiedades efectoras alteradas de los anticuerpos de la memoria descriptiva.

Otras modificaciones incluyen variantes de glucosilación de los anticuerpos de la invención. Se sabe que la glucosilación de anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes tiene un profundo efecto en la función del anticuerpo, particularmente en funciones efectoras como las descritas anteriormente, véase, por ejemplo, Boyd et al (Mol. Immunol,. 32: 1311-1318, 1996). Se contemplan variantes de glucosilación de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos de la presente invención en donde uno o más restos carbohidrato se agregan, sustituyen, eliminan o modifican. La introducción de un motivo asparagina-X- serina o asparagina-X-treonina crea un posible sitio para el acoplamiento enzimático de restos carbohidrato y, por lo tanto, puede usarse para manipular el glicosilato de un anticuerpo. En Raju et al. (Biochemistry 40: 8868-8876, 2001) la sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG se aumentó a través de un proceso de regalactosilación y/o resialilación usando β-1,4-galactosiltransferasa y/o alfa, 2,3 sialiltransferasa. Se cree que aumentar la sialilación terminal aumenta la semivida de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, en común con la mayoría de las glicoproteínas, se producen típicamente como una mezcla de glicoformas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, particularmente, de mamíferos. Se ha desarrollado una variedad de métodos para producir glicoformas definidas (véase Zhang et al. 2004, Science 303: 371; Sears et al, 2001, Science 291: 2344; Wacker et al., 2002, Science 298: 1790; Davis et al. 2002, Chem.Rev. 102: 579; Hang et al., 2001, Acc.Chem. Res. 34: 727). Por lo tanto, la invención contempla una pluralidad de anticuerpos (monoclonales) (que pueden ser del isotipo de IgG, p. ej., IgG1) según se describen en la presente memoria que comprenden una cantidad definida (p. ej., 7 o menos, por ejemplo, 5 o menos, tal como dos o una única) glicoforma(s) de dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos.

Por lo tanto, los anticuerpos mejorados según la invención incluyen en particular anticuerpos con propiedades funcionales potenciadas. Generan especial interés los anticuerpos con capacidad potenciada para mediar las funciones efectoras citotóxicas celulares tales como la ADCC. Dichos anticuerpos se pueden obtener al producir sustituciones simples o múltiples en el marco constante del anticuerpo y alterar, por lo tanto, su interacción con los receptores Fc. Los métodos para diseñar dichos mutantes se pueden encontrar, por ejemplo, en Lazar et al. (2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103(11): 4005-4010) y Okazaki et al. (2004, J. Mol. Biol. 336(5): 1239-49). Véanse también WO 03/074679, WO 2004/029207, WO 2004/099249, WO2006/047350, WO 2006/019447, WO 2006/105338, WO 2007/041635. También es posible usar líneas celulares genomanipuladas específicamente para la producción de anticuerpos mejorados. En particular, estas líneas tienen regulación alterada de la vía de glucosilación, por ejemplo, que resulta en anticuerpos que están escasamente fucosilados o incluso totalmente desfucosilados. Tales líneas celulares y métodos para genomanipularlas se describen en, p. ej., Shinkawa et al. (2003, J. Biol. Chem. 278(5): 3466-3473), Ferrara et al. (2006, J. Biol. Chem. 281(8): 5032-5036; 2006, Biotechnol. Bioeng. 93(5): 851-61), EP 1 272 527 B1, EP 1 331 266, EP 1 498 490, EP 1 498 491, EP 1 676 910, EP 1 792 987 y WO 99/54342.

Realizaciones adicionales de la invención incluyen anticuerpos de la invención o fragmentos de unión a antígeno de estos acoplados a un polímero no proteináceo tal como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquileno. La conjugación de proteínas a PEG es una técnica establecida para aumentar la semivida de las proteínas, así como reducir la antigenicidad e inmunogenicidad de las proteínas. El uso de PEGilación con diferentes pesos moleculares y estilos (lineal o ramificado) se ha investigado con anticuerpos intactos, así como con fragmentos Fab' (Koumenis I. L. et al., 2000, Int. J. Pharmaceut. 198: 83-95).

La presente invención también incluye conjugados citotóxicos o conjugados de anticuerpo-fármaco o conjugados como se definen en las reivindicaciones. Según se usan en la presente memoria, todos estos términos tienen el mismo significado y son intercambiables.

Estos conjugados citotóxicos comprenden dos componentes primarios, un agente de unión a célula y un agente citotóxico.

Según se usa en la presente memoria, el término “agente de unión a célula” se refiere a un agente que reconoce y se une específicamente al receptor EphA2 en la superficie celular. En un aspecto, el agente de unión a célula reconoce específicamente el receptor EphA2 de manera que posibilita que el conjugado actúe de manera dirigida con escasos efectos secundarios que resultan de la unión no específica.

En otro aspecto, el agente de unión a célula, según se describe en la presente memoria, reconoce específicamente el receptor EphA2 de manera que el conjugado estará en contacto con la célula diana durante un período de tiempo suficiente para posibilitar que la porción de fármaco citotóxico del conjugado actúe en la célula, y/o para posibilitar que la célula internalice el conjugado.

En un aspecto preferido, los conjugados citotóxicos comprenden un anticuerpo anti-EphA2 como el agente de unión a célula, más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal 2H11R35R74 murino. En una realización más preferida, el conjugado citotóxico comprende un anticuerpo 2H11R35R74 humanizado o un fragmento de unión a epítopo de este. El anticuerpo 2H11R35R74 es capaz de reconocer específicamente un receptor EphA, tal como EphA2, y dirige el agente citotóxico a una célula o un tejido anormal, tal como células cancerosas, de manera dirigida.

El segundo componente de los conjugados citotóxicos de la presente invención es un agente citotóxico, según se define en las reivindicaciones. El término “agente citotóxico”, según se usa en la presente memoria, se refiere a una sustancia que reduce o bloquea la función o el crecimiento de células y/o provoca la destrucción de células.

Según se describe en la presente memoria, el agente citotóxico es un taxoide, un maitansinoide tal como DM1 o DM4, un fármaco pequeño, un derivado de tomaimicina, un profármaco, CC-1065 o un análogo de CC-1065. En aspectos preferidos, los agentes de unión a célula de la presente invención se acoplan covalentemente, directamente o a través de un enlazador escindible o no escindible al agente citotóxico. “Enlazador”, según se usa en la presente memoria, significa un resto químico que comprende una unión covalente o una cadena de átomos que acopla covalentemente un anticuerpo a un resto de fármaco.

Por lo tanto, la presente memoria descriptiva contempla el uso de conjugados entre (1) un agente de unión a célula que reconoce y se une al receptor EphA2, y (2) un agente citotóxico. En los conjugados citotóxicos, el agente de unión a célula tiene una afinidad alta por el receptor EphA2 y el agente citotóxico tiene un alto grado de citotoxicidad para células que expresan el receptor EphA2, de manera que los conjugados citotóxicos de la presente invención forman agentes destructores eficaces.

Los conjugados de anticuerpos para EphA2 antagonistas se han descrito anteriormente. Por ejemplo, WO 2008/010101 describe los anticuerpos 37.3D7 humanizado y 53.2H11 humanizado conjugados a L-DM4, N2'desacetil-N2'(4-metilo-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, usando el enlazador SPDB (N-hidroxisuccinimida éster de ácido 4-[2-piridilditio]butanoico) (véase el Ejemplo 10 de WO 2008/010101; hu37.3D7-SPDB-DM4 y hu2H11 - SPDB-DM4).

Cuando se conjuga a un agente citotóxico, los anticuerpos de la invención muestran varias propiedades ventajosas con respecto a los anticuerpos de la técnica anterior. En particular, la conjugación no afecta la afinidad de los anticuerpos de la invención por el receptor EphA2, mientras que la unión de 53.2H11 a EphA2 se ve negativamente afectada por el acoplamiento de un agente citotóxico a dicho anticuerpo 53.2H11.

Los agentes de unión a célula, agentes citotóxicos y enlazadores se describen en más detalle más adelante.

Agentes de unión a célula

La eficacia de los compuestos de la presente invención como agentes terapéuticos depende de la cuidadosa selección de un agente de unión a célula adecuado. Los agentes de unión a célula según se describen en la presente memoria pueden ser de cualquier tipo conocido actualmente, o que se vuelva conocido e incluyen péptidos y no péptidos. El agente de unión a célula puede ser cualquier compuesto que se puede unir a una célula, ya sea de manera específico o no específica. Generalmente, estos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de unión a célula.

Los ejemplos más específicos de agentes de unión a célula que se pueden usar incluyen:

anticuerpos policlonales;

anticuerpos monoclonales;

fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab' y $F(ab')_2$, Fv (Parham, 1983, J. Immunol., 131:2895-2902; Spring et al., 1974, J. Immunol., 113: 470-478; Nisonoff et al., 1960, Arch. Biochem. Biophys., 89: 230-244).

Preferiblemente, se usa un anticuerpo anti-EphA2 humanizado como el agente de unión a célula de la presente memoria descriptiva. Más preferiblemente, el anticuerpo anti-EphA2 humanizado es un anticuerpo 2H11R35R74 humanizado.

Agentes citotóxicos

En otro aspecto, el anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a epítopo de este, según se describe en la presente memoria, se puede conjugar con un fármaco, tal como un maitansinoide, un derivado de tomaimicina o un derivado de duocarmicina para formar un profármaco que tiene citotoxicidad específica hacia células que expresan antígeno al dirigir el fármaco al receptor EphA2. Los conjugados citotóxicos que comprenden dichos anticuerpos y un fármaco pequeño, altamente tóxico (p. ej., maitansinoides, derivados de tomaimicina, y CC-1065 y análogos de CC-1065) se pueden usar como un producto terapéutico para el tratamiento de tumores, tales como, por ejemplo, tumores de mama y ovario.

El agente citotóxico usado en el conjugado citotóxico de la presente memoria descriptiva puede ser cualquier compuesto que resulta en la destrucción de una célula o induce la muerte celular o, de alguna manera, disminuye la viabilidad celular. Los agentes citotóxicos preferidos incluyen, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoide, derivados de tomaimicina, y CC-1065 y análogos de CC-1065, definidos más adelante. Estos agentes

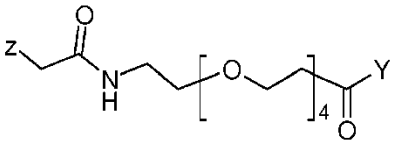
citotóxicos se conjugan con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus análogos, según se describen en la presente memoria.

Los conjugados citotóxicos se pueden preparar mediante métodos *in vitro*. Para enlazar un fármaco o profármaco al anticuerpo, se usa un grupo de enlace. Los grupos de enlace adecuados se conocen en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos sensibles a ácido, grupos fotolábiles, grupos sensibles a peptidasa y grupos sensibles a esterasa.

Los grupos de enlace de ejemplos son grupos disulfuro y grupos tioéter. Por ejemplo, se pueden construir conjugados usando una reacción de intercambio de disulfuro o al formar una unión tioéter entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco. Los ejemplos de enlazadores que llevan dichos grupos de enlace incluyen N-succinimidil piridilditiopropionato (SPDP) y N-succinimidil piridilditiobutirato (SPDB), cuyo grupo reactivo ditiopiridilo (véase Bourdon M.A. et al., Biochem. J., 173: 723-737, 1978; US 5208020) hace reacción con un grupo reactivo químico citotóxico tal como -SH para formar una nueva unión -S-S-. A continuación, el grupo N-succinimidiloxi preferiblemente hace reacción con los grupos amino presentes en el anticuerpo para formar uniones amida.

En otro aspecto preferido, el agente citotóxico se enlaza al agente de unión a célula usando grupos de enlace de polietilenglicol (PEG), como se expone en US 6.716.821. Los grupos de enlace de PEG de ejemplo incluyen enlazadores de PEG heterobifuncionales que se unen a los agentes citotóxicos y a los agentes de unión a célula a través de un grupo sulfhidrilo o disulfuro funcional en un extremo, un éster activo en el otro extremo (US 6.716.821). También se pueden usar enlazadores de PEG que no se unen a los agentes citotóxicos a través de un grupo sulfhidrilo o disulfuro funcional.

Se contempla específicamente un agente citotóxico que lleva un grupo de enlace de polietilenglicol (PEG) que tiene éster activo terminal de fórmula (I):

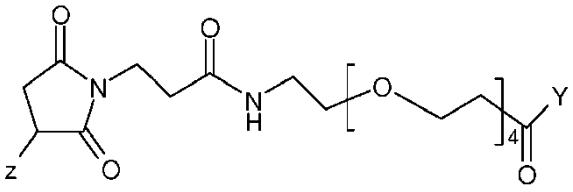


(I)

en donde Z es dicho agente citotóxico, dicho agente citotóxico se selecciona del grupo de maitansinoides y análogos de maitansinoide, derivados de tomaimicina, y CC-1065 y análogos de CC-1065, y

en donde Y es Y es N-succinimidiloxi, N-sulfosuccinimidiloxi, N-ftalimidiloxi, N-sulfoftalimidiloxi, 2-nitrofeniloxi, 4-nitrofeniloxi, 2,4-dinitrofeniloxi, 3-sulfonil-4-nitrofeniloxi, 3-carboxi-4-nitrofeniloxi, imidazolilo o átomo de halógeno.

En otro aspecto preferido, se describe un agente citotóxico, dicho agente citotóxico lleva un grupo de enlace de polietilenglicol (PEG) que tiene éster activo terminal y es de fórmula (II):



(II)

en donde Z es dicho agente citotóxico, dicho agente citotóxico se selecciona del grupo de maitansinoides y análogos de maitansinoide, derivado de tomaimicina, y CC-1065 y análogos de CC-1065, y

en donde Y es Y es N-succinimidiloxi, N-sulfosuccinimidiloxi, N-ftalimidiloxi, N-sulfoftalimidiloxi, 2-nitrofeniloxi, 4-nitrofeniloxi, 2,4-dinitrofeniloxi, 3-sulfonil-4-nitrofeniloxi, 3-carboxi-4-nitrofeniloxi, imidazolilo o átomo de halógeno.

Preparación del conjugado

En general, el conjugado se puede obtener mediante un proceso que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto una disolución acuosa, opcionalmente tamponada, de un agente de unión a célula con una disolución de un compuesto citotóxico;

(ii) después, separar opcionalmente el conjugado que se formó en (i) de los reactivos que no hicieron reacción y cualquier aglomerado que pueda estar presente en la disolución.

En un aspecto, el agente de unión a célula es un anticuerpo; más específicamente, el agente de unión a célula es el anticuerpo mu2H11R35R74 o una versión humanizada de este. En otro aspecto, el agente citotóxico es un compuesto fórmula (I) o (II), en donde Z es un maitansinoide; en particular, Z es DM4.

Se entenderá que los conjugados que se pueden obtener mediante este método están comprendidos dentro del alcance de la memoria descriptiva.

La disolución acuosa del agente de unión a célula se puede tamponar con tampones tales como, p. ej., fosfato potásico o ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (tampón HEPES). El tampón depende de la naturaleza del agente de unión a célula. El compuesto citotóxico está en disolución en un disolvente polar orgánico, p. ej., dimetilsulfóxido (DMSO) o dimetilacetamida (DMA).

La temperatura de reacción normalmente está comprendida entre 20 y 40 °C. El tiempo de reacción puede variar de 1 a 24 horas. La reacción entre el agente de unión a célula y el agente citotóxico se puede monitorear mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEG, por sus siglas en inglés) con un detector refractométrico y/o de UV. Si el rendimiento del conjugado es demasiado bajo, se puede extender el tiempo de reacción.

El experto en la técnica puede usar varios métodos cromatográficos diferentes para llevar a cabo la separación de la etapa (ii): el conjugado se puede purificar, p. ej., mediante SEG, cromatografía de adsorción (tal como cromatografía de intercambio iónico, IEC, por sus siglas en inglés), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés), cromatografía de afinidad, cromatografía con soporte mixto, tal como cromatografía en hidroxiapatita o cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés). También se puede usar purificación mediante diálisis o diafiltración.

Un ejemplo de un proceso que se puede usar se describe en el Ejemplo I.b.1.

Según se usa en la presente memoria, el término “aglomerados” significa las asociaciones que se pueden formar entre dos o más agentes de unión a célula, donde dichos agentes están modificados o no por conjugación. Los aglomerados se pueden formar por la influencia de una gran cantidad de parámetros, tales como alta concentración de agente de unión a célula en la disolución, el pH de la disolución, fuerzas de cizallamiento altas, la cantidad de dímeros unidos y su carácter hidrófobo, la temperatura (véase Wang & Gosh, 2008, J. Membrane Sci., 318: 311-316, y las referencias citadas en él); cabe señalar que la influencia relativa de algunos de estos parámetros no está establecida claramente. En el caso de proteínas y anticuerpos, el experto en la técnica consultará Cromwell et al. (2006, AAPS Jounal, 8(3): E572-E579). El contenido en los aglomerados se puede determinar con técnicas conocidas para el experto, tales como SEC (véase Walter et al., 1993, Anal. Biochem., 212(2): 469-480).

Después de la etapa (i) o (ii), la disolución que contiene conjugado se puede someter a una etapa adicional (iii) de ultrafiltración y/o diafiltración.

El conjugado se puede recuperar al final de estas etapas en una disolución acuosa.

Maitansinoides

Entre los agentes citotóxicos que se pueden usar en la presente memoria descriptiva para formar un conjugado citotóxico, están los maitansinoides y análogos de maitansinoide. Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides son fármacos que inhiben la formación de microtúbulos y que son altamente tóxicos para células de mamíferos.

Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Los maitansinoides adecuados se describen en las patentes estadounidenses núms. 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

Los ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

(1) C-19-descloro (patente estadounidense n.° 4.256.746) (preparado mediante reducción por LAH de ansamitocina P2);

(2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/-C-19-descloro (patentes estadounidenses núms. 4.361.650 y 4.307.016) (preparado mediante desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración usando LAH); y

(3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente estadounidense n.° 4.294.757) (preparado mediante acilación usando cloruros de acilo).

Los ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen:

(1) C-9-SH (patente estadounidense n.° 4.424.219) (preparado mediante la reacción de maitansinol con H_2S o P_2S_5);

(2) C-14-alcoximetilo (desmetoxi/CH_2OR) (patente estadounidense n.° 4.331.598);

(3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH_2OH o CH_2OAc) (patente estadounidense n.° 4.450.254) (preparado a partir de *Nocardia*);

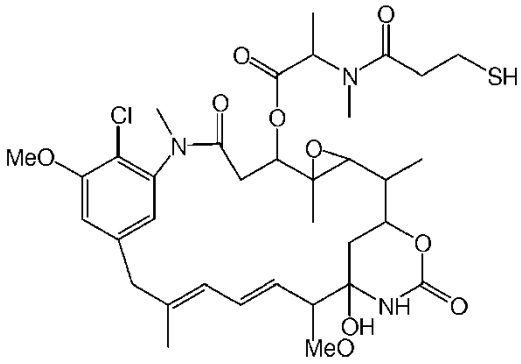
(4) C-15-hidroxi/aciloxi (patente estadounidense n.° 4.364.866) (preparado mediante la conversión de maitansinol mediante *Sreptomyces*);

(5) C-15-metoxi (patentes estadounidenses núms. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado a partir de *Trewia nudiflora*);

(6) C-18-*N*-desmetilo (patentes estadounidenses núms. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol mediante *Sreptomyces*); y

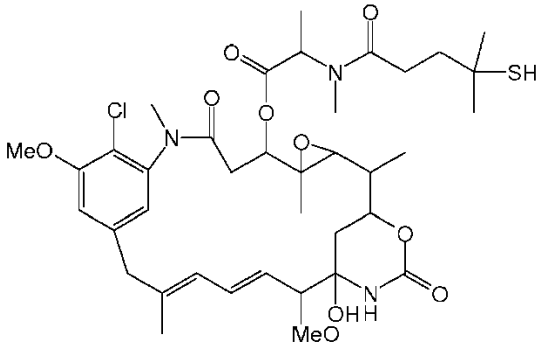
(7) 4,5-desoxi (patente estadounidense n.° 4.371.533) (preparado mediante la reducción por tricloruro de titanio/LHA de maitansinol).

En un aspecto, los conjugados citotóxicos de la presente memoria descriptiva utilizan el maitansinoide que contiene tiol (DM1), formalmente denominado *N*$^{2'}$-desacetil-*N*$^{2'}$-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como el agente citotóxico. El DM1 se representa mediante la siguiente fórmula estructural (III):



(III)

En otro aspecto, los conjugados citotóxicos de la presente memoria descriptiva utilizan el maitansinoide que contiene tiol DM4, formalmente denominado *N*$^{2'}$-desacetil-*N*-$^{2'}$(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, como el agente citotóxico. El DM4 se representa mediante la siguiente fórmula estructural (IV):

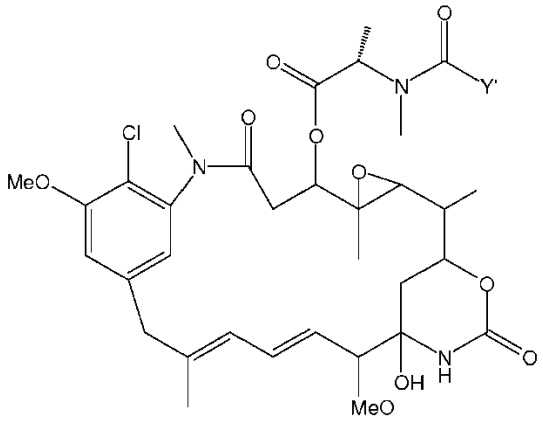


(IV)

En aspectos adicionales de la memoria descriptiva, se pueden usar otras maitansinas, incluidos maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que lleven una sustitución mono o di-alquilo en el átomo de carbono que lleva el átomo de azufre. Estos incluyen un maitansinoide que tiene, en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxi o C-20 desmetilo, una cadena lateral de aminoácido acilada con un grupo acilo que lleva un grupo sulfhidrilo impedido, en donde el átomo

de carbono del grupo acilo que lleva la funcionalidad de tiol tiene uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes son CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además, en donde uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad de carbonilo y el átomo de azufre.

Dichas maitansinas adicionales incluyen compuestos representados por la fórmula (V):



(V)

en donde:

Y' representa

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\Xi C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\Xi C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además, R_2 puede ser H;

A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m, n, o, p, q, r, s y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, siempre que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento; y Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

Las realizaciones preferidas de fórmula (V) incluyen compuestos de fórmula (V) en donde:

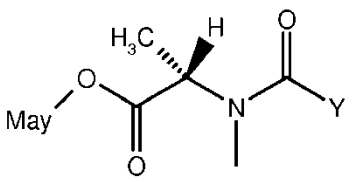
R_1 es metilo, R_2 es H y Z es H.

R_1 y R_2 son metilo y Z es H.

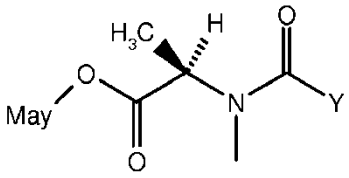
R_1 es metilo, R_2 es H y Z es -SCH_3.

R_1 y R_2 son metilo y Z es -SCH_3.

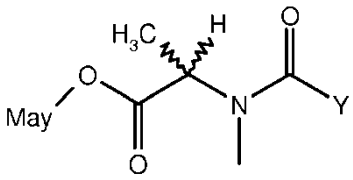
Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (VI-L), (VI-D) o (VI-D,L):



(VI-L)



(VI-D)



(VI-D,L)

en donde:

Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además, R_2 puede ser H;

R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 y R_8, son cada uno independientemente H, CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además, n puede ser 0;

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y

May representa un maitansinoide que lleva la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxi o C-20 desmetilo.

Las realizaciones preferidas de fórmulas (VI-L), (VI-D) y (VI-D,L) incluyen compuestos de fórmulas (VI-L), (VI-D) y (VI-D,L) en donde:

R_1 es metilo, R_2 es H, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0 y Z es H.

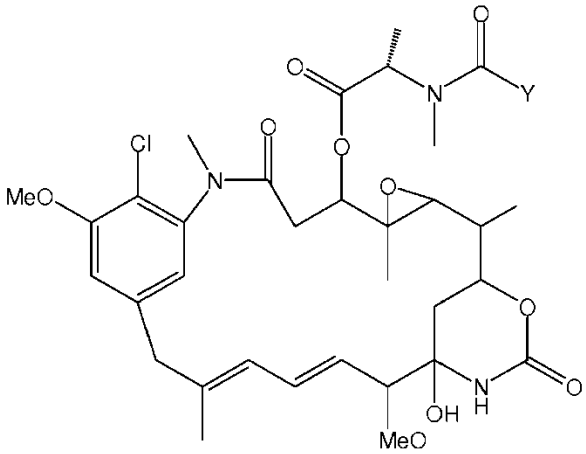
R_1 y R_2 son metilo, R_5, R_6, R_7, R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0 y Z es H.

R_1 es metilo, R_2 es H, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0 y Z es -SCH_3.

R_1 y R_2 son metilo, R_5, R_6, R_7, R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0 y Z es -SCH_3.

Preferiblemente, el agente citotóxico se representa mediante la fórmula (VI-L).

Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (VII):



(VII)

en donde:

Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además, R_2 puede ser H;

R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 y R_8, son cada uno independientemente H, CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además, n puede ser 0; y

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

Las realizaciones preferidas de fórmula (VII) incluyen compuestos de fórmula (VII) en donde:

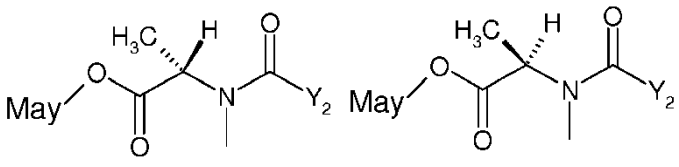
R_1 es metilo, R_2 es H, R5, R6, R7 y R8 son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0 y Z es H.

R_1 y R_2 son metilo; R_5, R_6, R_7, R_8 son cada uno H, l y m son 1; n es 0; y Z es H.

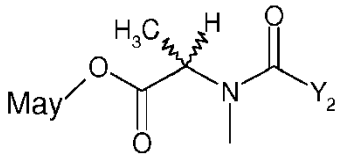
R_1 es metilo, R_2 es H, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0 y Z es $-SCH_3$.

R_1 y R_2 son metilo, R_5, R_6, R_7, R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0 y Z es $-SCH_3$.

Dichas maitansinas adicionales incluyen, además, compuestos representados por la fórmula (VIIII-L), (VIII-D) o (VIII-D,L):



(VIII -L) (VIII -D)



(VIII -D, L)

en donde:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

en donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además, R_2 puede ser H;

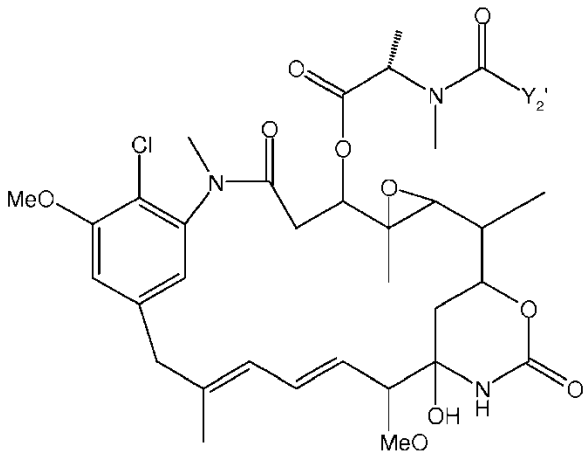
R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 y R_8, son cada uno independientemente H, CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además, n puede ser 0;

Z_2 es SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y

May es un maitansinoide.

Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (IX):



(IX)

en donde:

Y_2' representa

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_n(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

en donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además, R_2 puede ser H;

A, B y D son cada uno independientemente cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

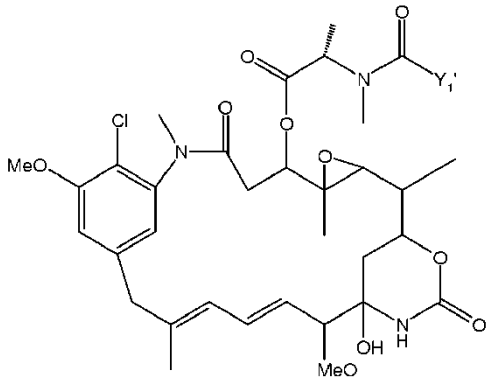
R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m, n, o, p, q, r, s y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, siempre que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento; y Z_2 es SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 - 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

Las realizaciones preferidas de fórmula (IX) incluyen compuestos de fórmula (IX) en donde: R_1 es metilo, R_2 es H.

Los maitansinoides mencionados anteriormente se pueden conjugar con un anticuerpo anti-EphA 2H11R35R74 o un homólogo o fragmento de este, en donde el anticuerpo se enlaza al maitansinoide usando la funcionalidad tiol o disulfuro que está presente en el grupo acilo de una cadena lateral de aminoácido acilada que se encuentra en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxi o C-20 desmetilo del maitansinoide, y en donde el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido acilada tiene su funcionalidad tiol o disulfuro ubicada en un átomo de carbono que tiene uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes son CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además, uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad de carbonilo y el átomo de azufre.

Un conjugado preferido de la presente memoria descriptiva es uno que comprende el anticuerpo anti-EphA 2H11R35R74 o un homólogo o fragmento de este, conjugado con, o que se puede obtener mediante conjugación con, un maitansinoide de fórmula (X):



(X)

en donde:

Y_1' representa

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\Xi C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_4(CR_{11}=CR_{12})_r(C\Xi C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2S$-,

en donde:

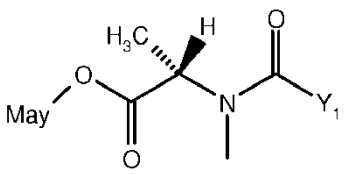
A, B y D son cada uno independientemente cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3 - 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y

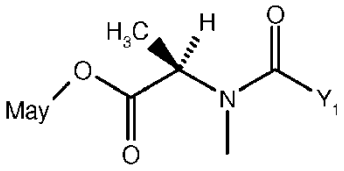
l, m, n, o, p, q, r, s y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, siempre que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento.

Preferiblemente, R_1 es metilo, R_2 es H, o R_1 y R_2 son metilo.

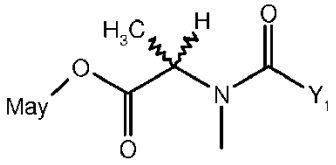
Un conjugado incluso más preferido de la presente memoria descriptiva es uno que comprende el anticuerpo anti-EphA 2H11R35R74 o un homólogo o fragmento de este, conjugado con un maitansinoide de fórmula (XI-L), (XI-D) o (XI-D,L):



(XI-L)



(XI-D)



(XI-D,L)

en donde:

Y_1 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S$-,

en donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además, R_2 puede ser H;

R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 y R_8, son cada uno independientemente H, CH_3, C_2H_5, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además, n puede ser 0; y

May representa un maitansinol que lleva la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxi o C-20 desmetilo.

Las realizaciones preferidas de fórmulas (XI-L), (XI-D) y (XI-D,L) incluyen compuestos de fórmulas (XI-L), (XI-D) y (XI-D,L) en donde:

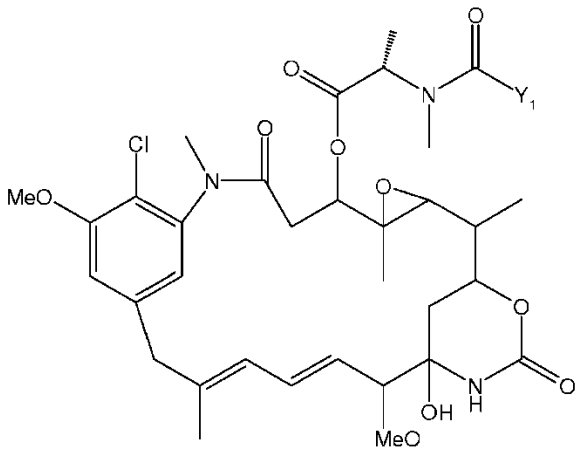
R_1 es metilo, R_2 es H, o R_1 y R_2 son metilo,

R_1 es metilo, R_2 es H, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0,

R_1 y R_2 son metilo; R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son 1; n es 0.

Preferiblemente, el agente citotóxico se representa mediante la fórmula (XI-L).

Un conjugado preferido adicional de la presente memoria descriptiva es uno que comprende el anticuerpo anti-EphA 2H11R35R74 o un homólogo o fragmento de este, conjugado con un maitansinoide de fórmula (XII):



(XII)

en donde los sustituyentes son como se definieron para la fórmula (XI) anteriormente.

Se prefieren especialmente cualesquiera de los compuestos descritos anteriormente, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1 y n es 0.

Se prefieren, además, especialmente cualesquiera de los compuestos descritos anteriormente, en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son 1 y n es 0

Además, se prefiere el estereoisómero L-aminoacilo.

Cada uno de los maitansinoides descritos en la solicitud de patente estadounidense pendiente con número 10/849.136, presentada el 20 de mayo de 2004, también se puede usar en el conjugado citotóxico de la presente memoria descriptiva.

Grupos de enlace que contienen disulfuro

Para enlazar el maitansinoide a un agente de unión a célula, tal como el anticuerpo 2H11R35R74, el maitansinoide comprende un resto de enlace. El resto de enlace contiene una unión química que posibilita la liberación de maitansinoides completamente activos en un sitio específico. Las uniones químicas adecuadas se conocen en la técnica e incluyen uniones disulfuro, uniones sensibles a ácido, uniones fotolábiles, uniones sensibles a peptidasa y uniones sensibles a esterasa.

El resto de enlace también comprende un grupo químico reactivo. En una realización preferida, el grupo químico reactivo se usa para unirse covalentemente al maitansinoide a través de un resto de enlace de unión disulfuro.

Los grupos químicos reactivos particularmente preferidos son ésteres de *N*-succinimidilo y ésteres de N-sulfosuccinimidilo.

Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden un resto de enlace que contiene un grupo químico reactivo son ésteres de maitansinol C-3 y sus análogos donde el resto de enlace contiene una unión disulfuro y el grupo reactivo químico comprende un éster de *N*-succinimidilo o *N*-sulfosuccinimidilo.

Muchas posiciones en maitansinoides pueden servir como la posición para enlazar químicamente el resto de enlace. Por ejemplo, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxi y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxi se espera que sean todas útiles. Sin embargo, se prefiere la posición C-3 y la posición C-3 de maitansinol se prefiere especialmente.

Aunque la síntesis de ésteres de maitansinol que tienen un resto de enlace se describe en relación con restos de enlace que contienen unión disulfuro, el experto en la técnica entenderá que también se pueden usar restos de enlace con otras uniones químicas (según se describieron anteriormente) con la presente memoria descriptiva, así como otros maitansinoides. Los ejemplos específicos de otras uniones químicas incluyen uniones sensibles a ácido, uniones fotolábiles, uniones sensibles a peptidasa y uniones sensibles a esterasa. La descripción de la patente estadounidense n.° 5.208.020 expone la producción de maitansinoides que llevan dichas uniones.

La síntesis de maitansinoides y derivados de maitansinoide que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo se describe en las patentes estadounidenses núms. 6.441.163 y 6.333.410 y la solicitud estadounidense n.° 10/161.651.

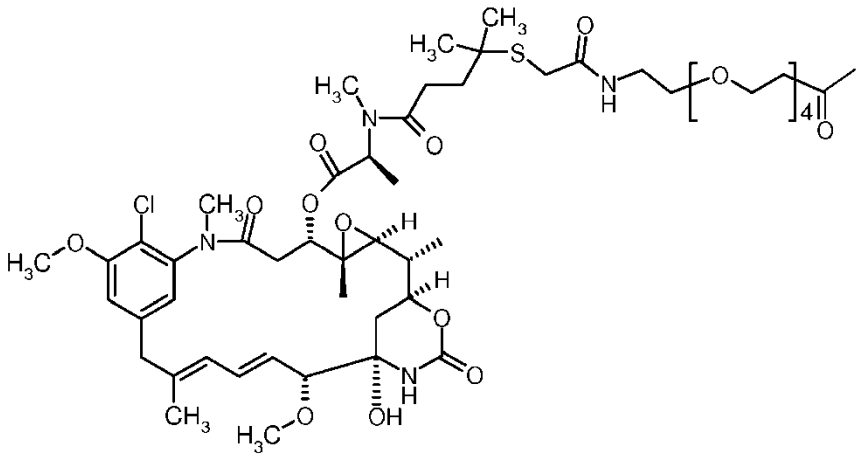
Grupos de enlace que contienen PEG

Los maitansinoides también se pueden enlazar al agente de unión a célula usando grupos de enlace de PEG como se expone en la patente estadounidense n.° 6.716.821. Estos grupos de enlace de PEG son solubles en agua y en disolventes no acuosos, y se pueden usar para ligar uno o más agentes citotóxicos a un agente de unión a célula. Los grupos de enlace de PEG de ejemplo incluyen enlazadores de PEG heterobifuncionales que se unen a los agentes citotóxicos y a los agentes de unión a célula en extremos opuestos de los enlazadores a través de un grupo sulfhidrilo o disulfuro funcional en un extremo y un éster activo en el otro extremo.

Como ejemplo general de la síntesis de un conjugado citotóxico usando un grupo de enlace de PEG, se hace referencia nuevamente a la patente estadounidense n.° 6.716.821 para obtener los detalles específicos.

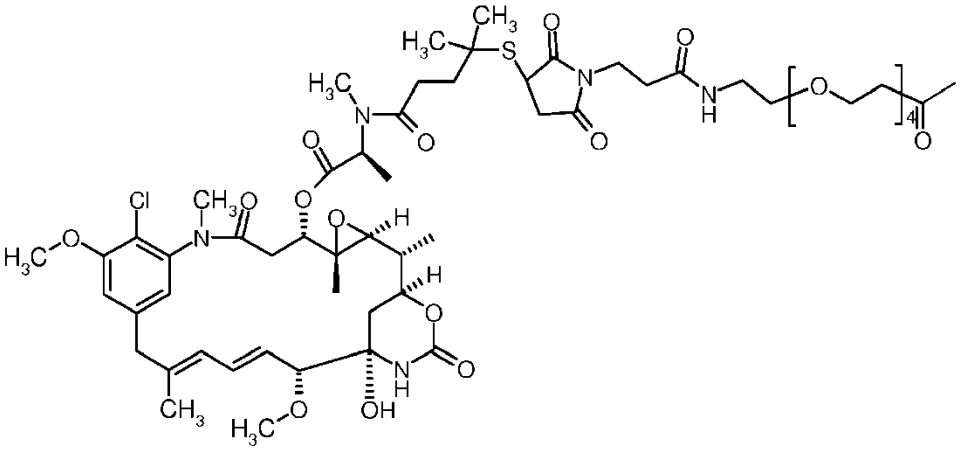
La síntesis comienza con la reacción de uno o más agentes citotóxicos que llevan un resto de PEG reactivo con un agente de unión a célula, que resulta en el desplazamiento del éster activo terminal de cada resto de PEG reactivo por un residuo aminoacídico del agente de unión a célula, tal como el anticuerpo 2H11R35R74, para proporcionar un conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos a un agente de unión a célula a través de un grupo de enlace de PEG. También se pueden usar grupos de enlace de PEG que no se unen a los agentes citotóxicos a través de un grupo sulfhidrilo o disulfuro funcional.

Por lo tanto, comprendido dentro del alcance de la memoria descriptiva se encuentra el maitansinoide de fórmula (XIII), denominado en la presente memoria PEG4-NHAc-DM4:



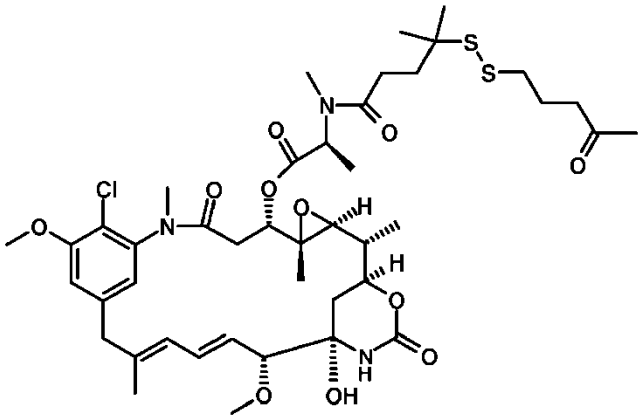
(XIII)

También comprendido dentro del significado de la memoria descriptiva se encuentra el maitansinoide de fórmula (XIV), denominado en la presente memoria PEG4-Mal-DM4:



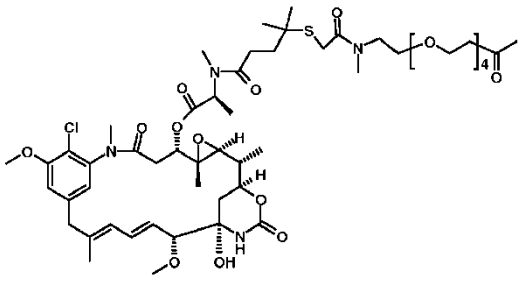
(XIV)

También comprendido dentro del significado de la memoria descriptiva se encuentra el maitansinoide de fórmula (XXIV), denominado en la presente memoria SPDB-DM4:



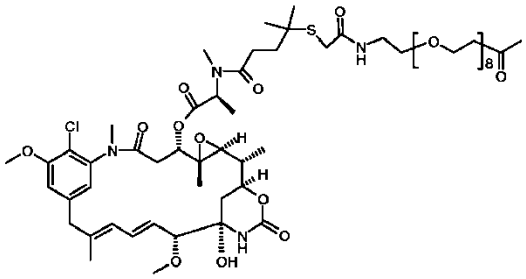
(XXIV)

También comprendido dentro del significado de la memoria descriptiva se encuentra maitansinoide de fórmula (XXV), denominado en la presente memoria: _PEG4-NMeAc-DM4



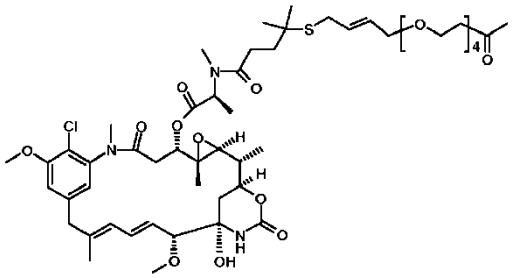
(XXV)

También comprendido dentro del significado de la memoria descriptiva se encuentra el maitansinoide de fórmula (XXVI), denominado en la presente memoria: PEG8-NHAc-DM4



(XXVI)

También comprendido dentro del significado de la memoria descriptiva se encuentra el maitansinoide de fórmula (XXVII), denominado en la presente memoria: _PEG4-Allyl-DM4

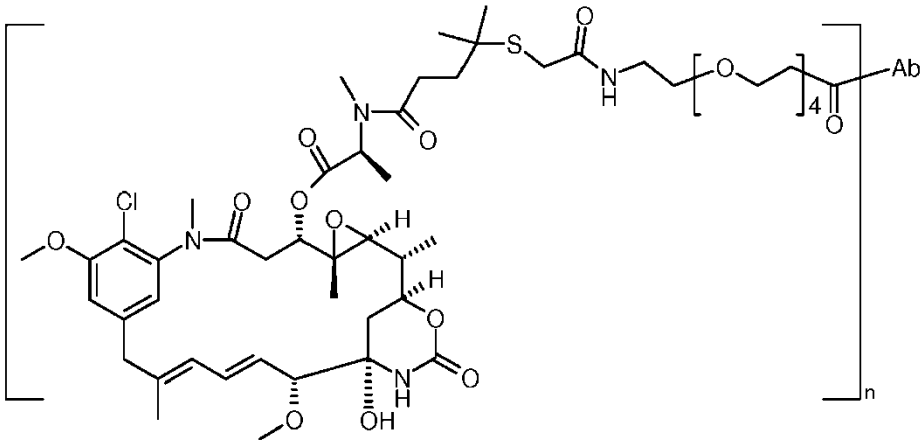


(XXVII)

Los maitansinoides que contienen un grupo reactivo, tal como DM4, se hacen reaccionar con un anticuerpo, tal como el anticuerpo 2H11R35R74, para producir conjugados citotóxicos, en donde el citotóxico se acopla covalentemente al anticuerpo. Estos conjugados se pueden purificar mediante HPLC o filtración en gel.

Un aspecto de la memoria descriptiva es un conjugado del anticuerpo 2H11R35R74, o de una versión humanizada de este, dicho conjugado comprende un agente citotóxico acoplado covalentemente a dicho anticuerpo 2H11R35R74, dicho agente citotóxico se elige entre el maitansinoide de fórmula (XIII) y el maitansinoide de fórmula (XIV). Según se describe en la presente memoria, la conjugación del maitansinoide de fórmula (XIII) con el anticuerpo 2H11R35R74 de la invención resultará en un conjugado 2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4. En otro aspecto, el maitansinoide de fórmula (XIV) se conjuga con el anticuerpo 2H11R35R74 de la invención para proporcionar un conjugado 2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4.

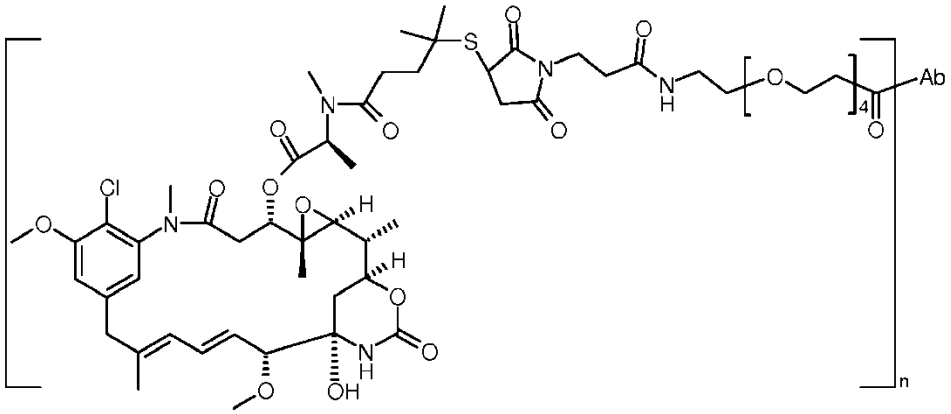
Por lo tanto, una realización preferida se refiere a un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene una estructura que consiste en la estructura de la fórmula (XV):



(XV)

en donde Ab es un anticuerpo de la invención y n es un número entero comprendido entre 1 y 15. Preferiblemente, n está comprendido entre 1 y 10. Incluso más preferiblemente, n está comprendido entre 5 y 7. En otra realización adicionalmente preferida, el anticuerpo de la invención es el anticuerpo 2H11R35R74 o una versión humanizada de este, y el conjugado es un conjugado 2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4.

Por lo tanto, otra realización preferida se refiere a un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene una estructura que consiste en la estructura de la fórmula (XVI):



(XVI)

en donde Ab es un anticuerpo de la invención y n es un número entero comprendido entre 1 y 15. Preferiblemente, n está comprendido entre 1 y 10. Incluso más preferiblemente, n está comprendido entre 5 y 7. En otra realización adicionalmente preferida, el anticuerpo de la invención es el anticuerpo 2H11R35R74 o una versión humanizada de este, y el conjugado es un conjugado 2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4.

Se proporcionan varios esquemas excelentes para producir dichos conjugados de anticuerpo-maitansinoide en la patente estadounidense n.° 6.333.410 y las solicitudes estadounidenses núms. 09/867.598, 10/161.651 y 10/024.290.

Según se explicó anteriormente, en general, el conjugado se puede obtener mediante un proceso que comprende las etapas de:

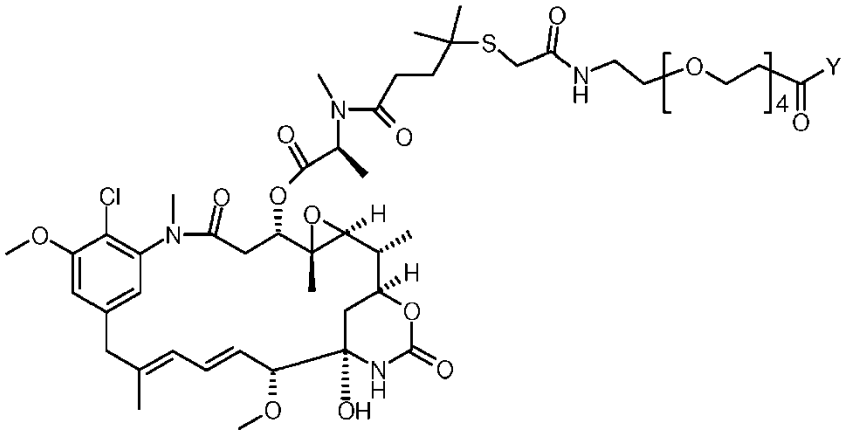
(i) poner en contacto una disolución acuosa, opcionalmente tamponada, de un anticuerpo con una disolución de un maitansinoide;

(ii) después, separar opcionalmente el conjugado que se formó en (i) de los reactivos que no hicieron reacción y cualquier aglomerado que pueda estar presente en la disolución.

Más específicamente, se puede incubar una disolución de un anticuerpo en tampón acuoso con un exceso molar de maitansinoide que tiene un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo. La mezcla de reacción se puede aplacar mediante la adición de un exceso de amina (tal como etanolamina, taurina, etc.). El conjugado de maitansinoide-anticuerpo a continuación se puede purificar mediante filtración en gel.

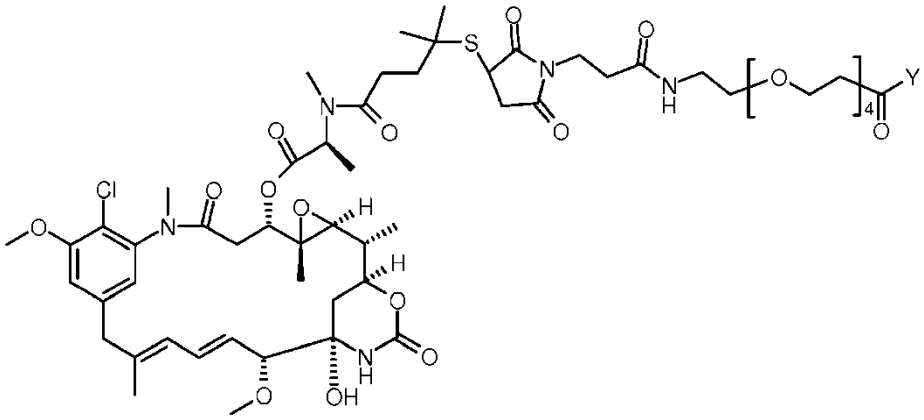
En un aspecto del proceso, el anticuerpo es el anticuerpo mu2H11R35R74 o una versión humanizada de este. En otro aspecto de dicho proceso, el agente citotóxico es un agente citotóxico elegido entre:

el compuesto de fórmula (XVII):



(XVII)

en donde Y es N-succinimidiloxi, N-sulfosuccinimidiloxi, N-ftalimidiloxi, N-sulfoftalimidiloxi, 2-nitrofeniloxi, 4-nitrofeniloxi, 2,4-dinitrofeniloxi, 3-sulfonil-4-nitrofeniloxi, 3-carboxi-4-nitrofeniloxi, imidazolilo o átomo de halógeno; y el compuesto de fórmula (XVIII):



(XVIII)

en donde Y es N-succinimidiloxi, N-sulfosuccinimidiloxi, N-ftalimidiloxi, N-sulfoftalimidiloxi, 2-nitrofeniloxi, 4-nitrofeniloxi, 2,4-dinitrofeniloxi, 3-sulfonil-4-nitrofeniloxi, 3-carboxi-4-nitrofeniloxi, imidazolilo o átomo de halógeno.

Un ejemplo de un proceso que se puede usar con el anticuerpo y un compuesto de fórmula (XVII) o (XVIII) se proporciona en el Ejemplo I.

La cantidad de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo ("relación entre fármaco y anticuerpo" o "DAR", por sus siglas en inglés) se puede determinar espectrofotométricamente al medir la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm de una disolución del conjugado sustancialmente purificado (es decir, después de la etapa (ii)). En particular, dicha DAR se puede determinar espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción medidos a respectivamente 280 y 252 nm para el anticuerpo: ε_{A280}= 224 000 M^{-1} cm^{-1} y ε_{A252} = 82 880 $M^{-1}cm^{-1}$; asumiendo un peso molecular promedio de 160 000 para el anticuerpo y para el maitansinoide, ε_{D280}= 5180 $M^{-1}cm^{-1}$ y ε_{D252}= 26 159 $M^{-1}cm^{-1}$). El método de cálculo se deriva de Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, Therapeutic Antibodies and Protocols, tomo 525, 445, Springer Science y se describe más detalladamente a continuación:

Las absorbancias para el conjugado a 252 nm (A_{252}) y a 280 nm (A_{280}) se miden en el pico monomérico del análisis SEC (que permite calcular el parámetro "DAR(SEC)") o usando un aparato espectrofotómetro clásico (que permite calcular el parámetro "DAR(UV)"). Las absorbancias se pueden expresar de la siguiente manera:

$$A_{252} = (c_D \times \varepsilon_{D252}) + (c_A \times \varepsilon_{A252})$$

$$A_{280} = (c_D \times \varepsilon_{D280}) + (c_A \times \varepsilon_{A280})$$

en donde:

c_D y c_A son, respectivamente, las concentraciones en la disolución del maitansinoide y del anticuerpo

ε_{D252} y ε_{D280} son, respectivamente, los coeficientes de extinción molar del maitansinoide a 252 nm y 280 nm

ε_{A252} y ε_{A280} son, respectivamente, los coeficientes de extinción molar del anticuerpo a 252 nm y 280 nm.

La resolución de estas dos ecuaciones con dos incógnitas conduce a las siguientes ecuaciones:

$$c_D = [(\varepsilon_{A280} \times A_{252}) - (\varepsilon_{A252} \times A_{280})] / [(\varepsilon_{D252} \times \varepsilon_{A280}) - (\varepsilon_{A252} \times \varepsilon_{D280})]$$

$$c_A = [A_{280} - (c_D \times \varepsilon_{D280})] / \varepsilon_{A280}$$

A continuación, se calcula la DAR promedio a partir de la relación entre la concentración del fármaco y la del anticuerpo:

$DAR = C_D / C_A$

La DAR promedio medida con un espectrofotómetro de UV (DAR(UV)) es más particularmente mayor que 4, más particularmente, entre 4 y 10, incluso más particularmente, entre 4 y 7, incluso más particularmente, entre 5,5 y 8 e incluso más particularmente entre 5,9 y 7,5

En un aspecto adicional, la memoria descriptiva describe un conjugado del anticuerpo 2H11R35R74, o de una versión humanizada de este, y un compuesto de fórmula (XVII) o (XVIII), en donde la DAR comprende entre 4 y 7 moléculas de maitansinoide/molécula de anticuerpo, dicha DAR se determina al medir por vía espectrofotométrica la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm de una disolución del conjugado sustancialmente purificado.

Los conjugados que se pueden obtener mediante el proceso descrito anteriormente están comprendidos dentro del alcance de la presente memoria descriptiva. En un aspecto particular, dichos conjugados tienen una estructura elegida entre la fórmula (XV) y la fórmula (XVI), en donde Ab es un anticuerpo de la invención y en donde n está comprendido entre 4 y 10. En una realización preferida, n está comprendido entre 4 y 7. En otra realización preferida, dichos conjugados tienen la estructura de la fórmula (XV).

Los conjugados de anticuerpos con fármacos maitansinoides se pueden evaluar para determinar su capacidad para suprimir la proliferación de diversas líneas celulares indeseadas *in vitro.* Por ejemplo, las líneas celulares tales como la línea de carcinoma epidermoide humano A-431, la línea celular de cáncer de pulmón microcítico humano SW2, la línea de tumor mamario humano SKBR3 y la línea celular de linfoma de Burkitt Namalwa se pueden usar fácilmente para evaluar la citotoxicidad de estos compuestos. Las células a evaluar se pueden exponer a los compuestos durante 24 horas y medir las fracciones de células supervivientes en ensayos directos mediante métodos conocidos. A continuación, se pueden calcular los valores de CI_{50} a partir de los resultados de los ensayos.

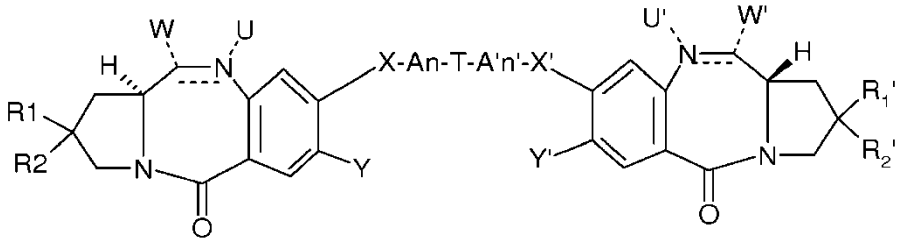
Derivados de tomaimicina

El citotóxico, según se describe en la presente memoria, también puede ser un derivado de tomaimicina. Los derivados de tomaimicina son pirrolo[1,4]benzodiazepinas (PBD), una clase conocida de compuestos que ejercen sus propiedades biológicas al unirse covalentemente al N2 De guanina en al surco menor del ADN. Los PBD incluyen varios que se unen al surco menor tales como antramicina, neotramicina y DC-81.

Los derivados nuevos de tomaimicina que conservan una citotoxicidad alta y pueden enlazarse de manera eficaz a agentes de unión a célula y se describen en la solicitud internacional n.° PCT/IB2007/000142. Los complejos de agente de unión a célula-derivado de tomaimicina permiten que se aplique la medición total de la acción citotóxica de los derivados de tomaimicina de manera dirigida solo contra células indeseadas y se evitan, de esta manera, efectos secundarios debido al daño a células sanas que no son diana.

El agente citotóxico según la presente memoria descriptiva comprende uno o más derivados de tomaimicina, enlazados a un agente de unión a célula, tal como el anticuerpo 2H11R35R74, a través de un grupo de enlace. El grupo de enlace es parte de un resto químico que se une covalentemente a un derivado de tomaimicina a través de métodos convencionales. En una realización preferida, el resto químico se puede unir covalentemente al resto de tomaimicina a través de una unión disulfuro.

Los derivados de tomaimicina útiles en la presente memoria descriptiva tienen la fórmula (XX) que se muestra a continuación:



(XX)

en donde

---- representa una unión simple opcional;

---- representa una unión simple o una unión doble;

siempre que cuando ---- representa una unión simple, U y U', iguales o diferentes, representan independientemente H, y W y W', iguales o diferentes, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (p. ej., un acetato), tal como -OCOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como -OCONRR', un carbamato cíclico, de manera que N10 y C11 sean una parte del ciclo, una urea tal como -NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico de manera que N10 y C11 sean una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfonato tal como -SO3 -, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como -NRR', amina opcionalmente cíclica de manera que N10 y C11 sean una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como -NRCOR, un azido tal como -N3, un ciano, un halo, un trialquil o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácido; Preferiblemente, W y W' son iguales o diferentes y son OH, OMe, OEt, $NHCONH_2$, SMe;

y cuando ---- representa una unión doble, U y U' están ausentes y W y W' representan H;

▪ R1, R2, R1', R2' son iguales o diferentes y se eligen independientemente de Haluro o Alquilo opcionalmente sustituido por uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, $S(O)_qR$, o R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos una unión doble que contiene grupo =B y =B' respectivamente.

Preferiblemente, R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos una unión doble que contiene grupo =B y =B' respectivamente.

▪ B y B' son iguales o diferentes y se eligen independientemente de Alquenilo que está opcionalmente sustituido por uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, $S(O)_qR$ o B y B' representan un átomo de oxígeno.

Preferiblemente, B=B'.

Más preferiblemente, B=B'= $=CH_2$ o $=CH\text{-}CH_3$,

▪ X, X' son iguales o diferentes y se eligen independientemente de uno o más -O-, -NR-, -(C=O)-, $-S(O)_q-$.

Preferiblemente, X=X'.

Más preferiblemente, X=X'=O.

▪ A, A' son iguales o diferentes y se eligen independientemente de Alquilo o Alquenilo que contiene opcionalmente un oxígeno, un nitrógeno o un átomo de azufre, cada uno opcionalmente sustituido por uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, Arilo, Het, Alquilo, Alquenilo.

Preferiblemente, A=A'.

Más preferiblemente, A=A'= alquilo insustituido lineal.

▪ Y, Y' son iguales o diferentes y se eligen independientemente de H, OR;

Preferiblemente, Y=Y'.

Más preferiblemente, Y=Y'=OAlquilo, más preferiblemente OMetilo.

▪ T s -NR-, -O-, $-S(O)_q-$, o un arilo, cicloalquilo, heterocíclico o heteroarilo de 4 a 10 miembros, cada uno opcionalmente sustituido por uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$ y/o enlazador(es), o un Alquilo

ramificado, opcionalmente sustituido por uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$ y/o enlazador(es), o un Alquilo lineal sustituido por uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$ y/o enlazador(es).

Preferiblemente, T es un arilo o heteroarilo de 4 a 10 miembros, más preferiblemente fenilo o piridilo, opcionalmente sustituido por uno o más enlazador(es).

Dicho enlazador comprende un grupo de enlace. Los grupos de enlace adecuados se conocen en la técnica e incluyen tiol, sulfuro, grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos sensibles a ácido, grupos fotolábiles, grupos sensibles a peptidasa y grupos sensibles a esterasa. Se prefieren los grupos disulfuro y grupos tioéter.

Cuando el grupo de enlace es un grupo que contiene tiol-, sulfuro (o el llamado tioéter -S-) o disulfuro (-S-S-), la cadena lateral que lleva el grupo tiol, sulfuro o disulfuro puede ser lineal o ramificada, aromática o heterocíclica. El experto en la técnica puede identificar sin inconvenientes las cadenas laterales adecuadas.

Preferiblemente, dicho enlazador es de fórmula:

-G-D-(Z)p-S-Z'

donde

G es una unión simple o doble, -O-, -S- o -NR-;

D es una unión simple o -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;

donde E y F son iguales o diferentes y se eligen independientemente de -(OCH2CH2)iAlquilo(OCH2CH2)j-, -Alquilo(OCH2CH2)i-Alquilo-, -(OCH2CH2)i-, - (OCH2CH2)iCicloalquilo(OCH2CH2)j-, -(OCH2CH2)iHeterocíclico(OCH2CH2)j-, - (OCH2CH2)iArilo(OCH2CH2)j-, -(OCH2CH2)iHeteroarilo(OCH2CH2)j-, -Alquilo-(OCH2CH2)iAlquilo(OCH2CH2)j-, -Alquilo-(OCH2CH2)i-, -Alquilo-(OCH2CH2)iCicloalquilo(OCH2CH2)j-, -Alquilo(OCH2CH2)iHeterocíclico(OCH2CH2)j-, - Alquilo-(OCH2CH2)iArilo(OCH2CH2)j-, -Alquilo(OCH2CH2)iHeteroarilo(OCH2CH2)j-, - Cicloalquilo-Alquilo-, -Alquilo-Cicloalquilo-, -Heterocíclico-Alquilo-, -Alquilo-Heterocíclico-, -AlquiloArilo-, -Arilo-Alquilo-, -Alquilo-Heteroarilo-, -Heteroarilo-Alquilo- lineal o ramificado;

donde i y j, idénticos o diferentes son números enteros y se eligen independientemente de 0, 1 a 2000;

Z es -Alquilo- lineal o ramificado;

p es 0 o 1;

Z' representa H, un grupo protector tiol tal como COR, R20 o SR20, en donde R20 representa H, metilo, Alquilo, Cicloalquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico opcionalmente sustituido, siempre que cuando Z' es H, dicho compuesto esté en equilibrio con el compuesto correspondiente formado median ciclación intramolecular que resulta de la adición del grupo tiol -SH en la unión imina -NH= de uno de los restos PBD.

- n, n', iguales o diferentes son 0 o 1.

- q es 0, 1 o 2.

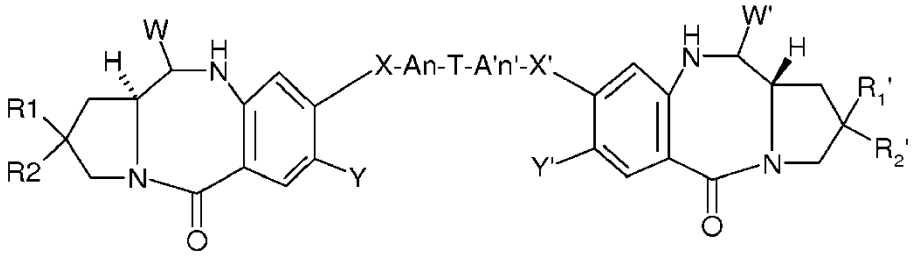
- R, R' son iguales o diferentes y se eligen independientemente de H, Alquilo, Arilo cada uno opcionalmente sustituido por Hal, CN, NRR', CF3, R, OR, $S(O)_qR$, Arilo, Het;

o sus sales, hidratos o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o la estructura polimórfica cristalina de estos compuestos o sus isómeros, racematos, diaestereómeros o enantiómeros ópticos.

Los compuestos de la fórmula general (XX) que tiene estereoisómeros y geométricos son también parte de la memoria descriptiva.

Se sabe que la unión doble N-10, C-11 de derivados de tomaimicina de fórmula (XX) se puede convertir sin inconvenientes de manera reversible en aductos de imina correspondientes en presencia de agua, un alcohol, un tiol, una amina primaria o secundaria, urea y otros nucleófilos. Este proceso es reversible y puede regenerar fácilmente los derivados de tomaimicina correspondientes en presencia de un agente deshidratante, en un disolvente orgánico no prótico, al vacío o a temperaturas elevadas (Z. Tozuka, 1983, J. Antibiotics, 36: 276).

Por lo tanto, los derivados de tomaimicina reversibles de fórmula general (XXI) también se pueden usar en la presente memoria descriptiva:

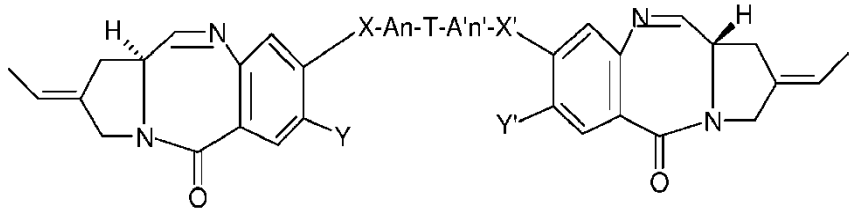


(XXI)

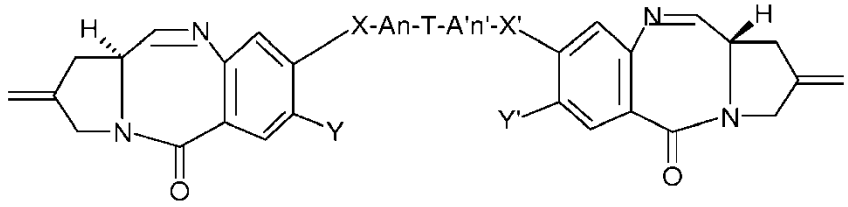
donde A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' se definen como en la fórmula (XX) y W y W' son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (p. ej., un acetato), tal como -OCOR, -COOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como - OCONRR', un carbamato cíclico, de manera que N10 y C11 sean una parte del ciclo, una urea tal como -NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico de manera que N10 y C11 sean una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfonato tal como -SO3 -, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como -NRR', amina opcionalmente cíclica de manera que N10 y C11 sean una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como -NRCOR, - NRCONRR', un azido tal como -N3, un ciano, un halo, un trialquil o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácido. Preferiblemente, W y W' son iguales o diferentes y son OH, Ome, Oet, NHCONH2, SMe.

Los compuestos de fórmula (XXI), por lo tanto, pueden considerarse como solvatos, incluida agua cuando el disolvente es agua; estos solvatos pueden ser particularmente útiles.

Los compuestos preferidos son los de fórmula (XXII) o (XXIII):



(XXII)



(XXIII)

donde X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' se definen como anteriormente.

Los compuestos de fórmula (XX) pueden prepararse de diversas formas conocidas para los expertos en la técnica. Los compuestos se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante aplicación o adaptación de los métodos descritos más adelante, o variaciones a estos según apreciará el experto. Las modificaciones y sustituciones adecuadas se apreciarán sin inconvenientes y se conocen o se pueden obtener sin inconvenientes en la literatura científica dirigida a los expertos en la técnica. En particular, dichos métodos se pueden encontrar en R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, Wiley-VCH Publishers, 1999.

Los métodos para sintetizar los derivados de tomaimicina que se pueden usar en la memoria descriptiva se describen en la solicitud internacional n.° PCT/IB2007/000142. Los compuestos de la presente memoria descriptiva se pueden preparar mediante una variedad de vías sintéticas. Los reactivos y materiales de partida están disponibles comercialmente, o se pueden sintetizar sin inconvenientes mediante técnicas conocidas para el experto en la técnica (véase, por ejemplo, WO 00/12508, WO 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260, FR1516743, M. Mori et al., 1986, Tetrahedron, 42: 3793-3806).

Las moléculas de conjugado de la memoria descriptiva se pueden formar mediante el uso de cualquier técnica. Los derivados de tomaimicina de la memoria descriptiva se pueden enlazar a un anticuerpo u otro agente de unión a célula a través de un enlazador sensible a ácido o mediante un enlazador fotolábil. Los derivados se pueden condensar con un péptido que tiene una secuencia adecuada y posteriormente enlazarse a un agente de unión a célula para producir un enlazador sensible a peptidasa. Los conjugados se pueden preparar para que contengan un grupo hidroxilo primario, que se pueden acilar y después enlazar a un agente de unión a célula para producir un conjugado que se puede escindir mediante esterasas intracelulares para liberar el derivado libre. Preferiblemente, los derivados se sintetizan para que contengan un grupo tiol libre o protegido, y después uno o más derivados que contienen disulfuro o tiol se enlazan cada uno covalentemente al agente de unión a célula a través de una unión disulfuro o un enlace tioéter.

Se describen numerosos métodos de conjugación en USP 5.416.064 y USP 5.475.092. Los derivados de tomaimicina se pueden modificar para proporcionar un grupo amino libre y después enlazarse a un anticuerpo u otro agente de unión a célula a través de un enlazador sensible a ácido o un enlazador fotolábil. Los derivados de tomaimicina con un grupo amino o carboxilo libre se pueden condensar con un péptido y posteriormente enlazarse a un agente de unión a célula para producir un enlazador sensible a peptidasa. Los derivados de tomaimicina con un grupo hidroxilo libre en el enlazador se pueden acilar y después enlazar a un agente de unión a célula para producir un conjugado que se puede escindir mediante esterasas intracelulares para liberar el fármaco libre. Lo más preferiblemente, los derivados de tomaimicina se tratan para crear un grupo tiol libre o protegido, y después los dímeros de tomaimicina que contienen disulfuro o tiol se enlazan al agente de unión a célula a través de uniones disulfuro.

Preferiblemente, los conjugados de anticuerpo monoclonal- o agente de unión a célula-derivado de tomaimicina son los que se ligan a través una unión disulfuro, según se describió anteriormente, que son capaces de suministrar derivados de tomaimicina. Dichos conjugados de unión a célula se preparan mediante métodos conocidos tales como modificar anticuerpos monoclonales son succinimidil piridil-ditiopropionato (SPDP) (Carlsson et al., 1978, Biochem. J., 173: 723-737). El grupo tiopiridilo resultante a continuación se desplaza mediante tratamiento con derivados de tomaimicina que contienen tiol para producir conjugados enlazados por disulfuro. Alternativamente, en el caso de derivados de tomaimicina con arilditio, la formación del conjugado de unión a célula se lleva a cabo mediante el desplazamiento directo del aril-tiol del derivado de tomaimicina mediante grupos sulfhidrilo introducidos previamente en las moléculas del anticuerpo. Los conjugados que contienen 1 a 10 fármacos derivados de tomaimicina enlazados a través de un puente disulfuro se preparan sin inconvenientes mediante cualquier método.

Más específicamente, una disolución del anticuerpo modificado por ditio-nitropiridilo a una concentración de 2,5 mg/ml en tampón de fosfato potásico 0,05 M, a pH 7,5 que contiene 2 mM de EDTA se trata con el derivado de tomaimicina que contiene tiol (1,3 eq. molar/grupo ditiopiridilo). La liberación de nitropiridinationa del anticuerpo modificado se monitorea espectrofotométricamente a 325 nm y se completa en aproximadamente 16 horas. El conjugado de anticuerpo-derivado de tomaimicina se purifica y libera del fármaco que no hizo reacción y otro material de bajo peso molecular mediante filtración en gel a través de una columna de Sephadex G-25 o Sephacryl S300. La cantidad de restos de derivado de tomaimicina unidos por molécula de anticuerpo se puede determinar al medir la relación de la absorbancia a 230 nm y 275 nm. Se puede enlazar un promedio de 1-10 moléculas de derivado de tomaimicina/molécula de anticuerpo a través de uniones disulfuro mediante este método.

El efecto de la conjugación sobre la afinidad de unión hacia las células que expresan antígeno se puede determinar usando los métodos descritos anteriormente por Liu et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93: 8618-8623. La citotoxicidad de los derivados de tomaimicina y sus conjugados con anticuerpo para líneas celulares se puede medir mediante retroextrapolación de curvas de proliferación celular, según se describe en Goldmacher et al., 1985, J. Immunol., 135: 3648-3651. La citotoxicidad de estos compuestos para líneas celulares adherentes se puede determinar mediante ensayos clonogénicos, según se describe en Goldmacher et al., 1986, J. Cell Biol., 102: 1312-1319.

Análogos de CC-1065

El agente citotóxico usado en los conjugados citotóxicos según la presente memoria descriptiva también puede ser un CC-1065 o un derivado de este.

CC-1065 es un potente antibiótico antitumoral aislado a partir de caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis.* CC-1065 es aproximadamente 1000 veces más potente *in vitro* que los fármacos antineoplásicos usados comúnmente, tales como doxorrubicina, metotrexato y vincristina (B.K. Bhuyan et al., 1982, Cancer Res., 42, 3532-3537). CC-1065 y sus análogos se describen en las patentes estadounidenses núms. 6.372.738, 6.340.701, 5.846.545 y 5.585.499.

La potencia citotóxica de CC-1065 se ha correlacionado con su actividad alquilante y su actividad de unión al ADN o de intercalación de ADN. Estas dos actividades residen en partes separadas de la molécula. Por lo tanto, la actividad alquilante está contenida en la subunidad ciclopropapirroloindol (CPI) y la actividad de unión a ADN residen en las dos subunidades pirroloindol.

Aunque CC-1065 tiene ciertas características atractivas como agente citotóxico, tiene limitaciones en el uso terapéutico. La administración de CC-1065 a ratones causó una hepatotoxicidad retardada que condujo a la mortalidad el día 50 después de una dosis intravenosa simple de 12,5 µg/kg (V. L. Reynolds et al., 1986, J. Antibiotics, XXIX: 319-334). Esto ha incentivado esfuerzos para desarrollar análogos que no causen toxicidad retardada, y se ha descrito la síntesis de análogos más simples modelados a partir de CC-1065 (M.A. Warpehoski et al., 1988, J. Med. Chem., 31: 590-603).

En otra serie de análogos, el resto CPI se reemplazó por un resto ciclopropa[c]benz[e]indol (CBI) (D.L. Boger et al., 1990, J. Org. Chem., 55: 5823-5833; D.L. Boger et al., 1991, BioOrg. Med. Chem. Lett., 1: 115-120). Estos compuestos mantienen la potencia *in vitro* alta del fármaco genitor, sin causar toxicidad retardada en ratones. Al igual que CC-1065, estos compuestos son agentes alquilantes que se unen al surco menor del ADN de manera covalente para provocar la muerte celular. Sin embargo, la evaluación clínica de los análogos más prometedores, Adozelesina y Carzelesina, condujo a resultados decepcionantes (B.F. Foster et al., 1996, Investigational New Drugs, 13: 321-326; I. Wolff et al., 1996, Clin. Cancer Res., 2: 1717-1723). Estos fármacos exhiben escasos efectos terapéuticos debido a su elevada toxicidad sistémica.

La eficacia terapéutica de los análogos de CC-1065 se puede mejorar en gran medida al cambiar la distribución *in vivo* a través del suministro dirigido al sitio del tumor, que resulta en toxicidad más baja en los tejidos que no son diana y, por lo tanto, toxicidad sistémica más baja. Para lograr este objetivo, se han descrito conjugados de análogos o derivados de CC-1065 con agentes de unión a célula que se dirigen específicamente a células tumorales (patentes estadounidenses; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545). Estos conjugados exhiben típicamente citotoxicidad específica para la diana elevada *in vitro* y excelente actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones (R.V. J. Chari et al., 1995, Cancer Res., 55: 4079-4084).

Recientemente, se han descrito profármacos de análogos de CC-1065 con solubilidad potenciada en medio acuoso (solicitud de patente europea n.° 06290379.4). En estos profármacos, el grupo fenólico de la porción alquilante de la molécula se protege con una funcionalidad que vuelve al fármaco estable tras el almacenamiento en disolución acuosa ácida, y confiere al fármaco solubilidad en agua aumentada en comparación con un análogo desprotegido. El grupo protector se escinde sin inconvenientes *in vivo* a pH fisiológico para proporcionar el fármaco activo correspondiente. En los profármacos descritos en EP 06290379.4, el sustituyente fenólico se protege como un ácido sulfónico que contiene fenilcarbamato que posee una carga a pH fisiológica y, por lo tanto, solubilidad en agua potenciada. Para potenciar adicionalmente la solubilidad en agua, se puede introducir un separador de polietilenglicol opcional en el enlazador entre la subunidad indolilo y la ligadura escindible tal como un grupo disulfuro. La introducción de este separador no altera la potencia del fármaco.

Los métodos para sintetizar los análogos de CC-1065 que se pueden usar en los conjugados citotóxicos de la presente memoria descriptiva, junto con métodos para conjugar los análogos a agentes de unión a célula tales como anticuerpos, se describen en detalle en EP 06290379.4 y las patentes estadounidenses núms. 5.475.092, 5.846.545, 5.585.499, 6.534.660 y 6.586.618 y en las solicitudes estadounidenses núms. 10/116.053 y 10/265.452.

Otros fármacos

Los fármacos tales como metotrexato, daunorrubicina, doxorrubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, derivados de leptomicina, mitomicina C, clorambucilo, caliqueamicina, tubulisina y análogos de tubulisina, duocarmicina y análogos de duocarmicina, dolastatina y análogos de dolastatina tales como auristatinas son también adecuados para la preparación de conjugados de la presente memoria descriptiva. Las moléculas de fármaco también se pueden enlazar a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula portadora intermediaria tal como seroalbúmina. Los compuestos de doxorrubicina y daunorrubicina, según se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.° 6.630.579, también pueden ser agentes citotóxicos útiles.

Composición terapéutica

La invención también se refiere a una composición terapéutica para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, dicha composición farmacéutica es para el tratamiento del cáncer que incluye (pero no se limita a) los siguientes: carcinoma, incluidos los de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; incluido el carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluida, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluidas leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluidos melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluidos astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; u otros tumores, incluido melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma, y otros cánceres todavía por determinar en los que EphA2 se expresa predominantemente. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención se usan

para el tratamiento del cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovarios, cuello uterino y órganos linfáticos, osteosarcoma, carcinoma sinovial, un sarcoma, de vías respiratorias y digestivas altas, un glioma, gástrico, hepático u otros carcinomas en los que se expresa EphA2. En particular, el cáncer es un cáncer metastásico. En otra realización, dicha composición farmacéutica se relaciona con otros trastornos tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injerto, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad del injerto contra el hospedante; infecciones víricas, tales como infección por mV, infección por VIH, SIDA, etc.; e infecciones parasitarias, tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras según lo determinar el experto en la técnica.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden:

una cantidad eficaz de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, y

un portador farmacéuticamente aceptable, que puede ser inerte o fisiológicamente activo.

Según se usa en la presente memoria, “portadores farmacéuticamente aceptables” incluyen todos y cualesquiera disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen uno o más de agua, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de estos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes o cloruro de sodio en la composición. En particular, los ejemplos relevantes de portador adecuado incluyen: (1) disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH ~ 7,4, que contiene o no contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de seroalbúmina humana, (2) disolución salina al 0,9 % (0,9 % p/v de cloruro de sodio (NaCl)), y (3) dextrosa al 5 % (p/v); y también pueden contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizante tal como Tween 20.

Las composiciones en la presente memoria también pueden contener un agente terapéutico adicional, según sea necesario para el trastorno específico que se esté tratando. Preferiblemente, el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, y el compuesto complementariamente activo tendrán actividades complementarias, no se afectan de manera adversa entre sí. En una realización preferida, el agente terapéutico adicional es un antagonista de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés), tromboplastina hística (TF, por sus siglas en inglés), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) o receptor HER2.

Las composiciones de la invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, pero la forma preferida depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica. Las composiciones típicas preferidas están en forma de disoluciones inyectables o infusionables. El modo de administración preferido es parenteral (p. ej. intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo). En una realización preferida, las composiciones de la invención se administran por vía intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo. En otra realización preferida, se inyectan por vía intramuscular, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales, así como sistémicos. También se pueden administrar por nebulización.

Se pueden preparar composiciones estériles para administración parenteral al incorporar el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención en la cantidad necesaria al disolvente adecuado y posteriormente someterlos a esterilización mediante microfiltración. Como disolvente o vehículo se puede usar agua, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como una combinación de estos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes o cloruro de sodio en la composición. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, en particular, agentes humectantes, isotonizantes, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. Las composiciones estériles para administración parenteral también se pueden preparar en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en el momento del uso en agua estéril o cualquier otro medio inyectable estéril.

Las dosis dependen del efecto deseado, la duración del tratamiento y la vía de administración usada; son generalmente de entre 5 mg y 1000 mg por día para un adulto con dosificaciones unitarias que varían de 1 mg a 250 mg de sustancia activa.

En general, el doctor determinará la dosificación adecuada dependiendo de la edad, peso y cualquier otro factor específico del sujeto que se va a tratar.

Métodos terapéuticos de uso

En otra realización, la presente memoria descriptiva describe un método para inhibir la actividad del receptor EphA2 mediante la administración de un anticuerpo que antagoniza con dicho receptor EphA2, a un paciente que lo necesita. Cualquiera del tipo de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o conjugados citotóxicos de la invención se puede usar terapéuticamente. La memoria descriptiva, por lo tanto, incluye el uso de anticuerpos anti-EphA2 antagonistas, fragmentos de estos, o conjugados citotóxicos de estos como medicamentos. En una realización preferida, el anticuerpo anti-EphA2 antagonista es el anticuerpo 2H11R35R74 o una variante humanizada de este.

Según se describe en la presente memoria, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o conjugados citotóxicos de la invención se usan para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero. En un aspecto, una de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, y que contiene un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado citotóxico de la invención se usa para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero. También es una realización de la invención que los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y conjugados citotóxicos de la invención también se pueden usar para producir un medicamento para tratar dicho trastorno hiperproliferativo en un mamífero. En una realización, el trastorno es un cáncer. En particular, el cáncer es un cáncer metastásico. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y conjugados citotóxicos de la invención también se pueden usar para tratar la neovascularización de dicho tumor neoplásico.

Por consiguiente, según se describe en la presente memoria, las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles para el tratamiento o prevención de una variedad de cánceres, que incluyen (pero no se limitan a) los siguientes: carcinoma, incluidos los de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; incluido el carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluida, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluidas leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluidos melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluidos astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; u otros tumores, incluido melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma, y otros cánceres todavía por determinar en los que EphA se expresa predominantemente. En una realización preferida, el cáncer es un cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, útero, ovario, cuello uterino y órganos linfáticos, osteosarcoma, carcinoma sinovial, un sarcoma, de vías respiratorias y digestivas altas, un glioma, gástrico, hepático u otros carcinomas en los que se expresa EphA. En otra realización, dicha composición farmacéutica se relaciona con otros trastornos tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injerto, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad del injerto contra el hospedante; infecciones víricas, tales como infección por mV, infección por VIH, SIDA, etc.; e infecciones parasitarias, tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras según lo determinar el experto en la técnica.

De manera similar, la presente memoria descriptiva describe un método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto las células diana o tejido que contiene células diana, con una cantidad eficaz de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, o un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o un agente terapéutico que comprende un conjugado citotóxico, ya sea solo o en combinación con otros agentes citotóxicos o terapéuticos.

El método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas se puede poner en práctica *in vitro, in vivo* o *ex vivo.* Según se usa en la presente memoria, “inhibir el crecimiento” significa retardar el crecimiento de una célula, disminuir la viabilidad celular, causar la muerte de una célula lisar una célula e inducir la muerte celular, ya sea en un período de tiempo corto o extenso.

Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante al mismo paciente para destruir las células enfermas o malignas; tratamientos de médula ósea antes de su trasplante para destruir linfocitos T competentes y evitar la enfermedad del injerto contra el hospedante (GVHD, por sus siglas en inglés); tratamientos de cultivos celulares para destruir todas las células excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno diana; o para destruir las variantes que expresar el antígeno indeseado.

Un experto en la técnica puede determinar sin inconvenientes las condiciones para el uso no clínico *in vitro*.

Los ejemplos de uso clínico *ex vivo* son extraer células tumorales o células linfoides de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer o en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, o extraer linfocitos T u otras células linfoides de médula ósea o tejido autólogo o alógeno antes del trasplante para evitar la enfermedad de injerto contra hospedante (GVHD). El tratamiento se puede llevar a cabo como se indica a continuación. Se recoge la médula ósea del paciente u otro individuo y después se incuba en medio que contiene suero al cual se agrega el agente citotóxico de la invención. Las concentraciones varían de aproximadamente 10 µM a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37 °C. Un experto

en la técnica puede determinar sin inconvenientes las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis. Después de la incubación, las células de médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente mediante infusión i.v. según métodos conocidos. En circunstancias donde el paciente recibe otro tratamiento tal como un ciclo de quimioterapia mielosupresora o irradiación corporal total entre el momento de la recolección de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de médula tratadas se almacenan congeladas en nitrógeno líquido usando equipo médico estándar.

Para el uso clínico *in vivo*, el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo de unión a epítopo o el conjugado citotóxico de la invención se suministrará como disoluciones que se someten a prueba para determinar su esterilidad y niveles de endotoxinas. Los ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugado citotóxico se describen a continuación. Los conjugados se suministran semanalmente durante 4 semanas como un bolo i.v. por semana. Las dosis de bolo se suministran en 50 a 100 ml de disolución salina normal a la cual se pueden agregar 5 a 10 ml de seroalbúmina humana. Las dosificaciones serán de 10 µg a 100 mg por administración, i.v. (intervalo de 100 ng a 1 mg/kg por día). Más preferiblemente, las dosificaciones variarán de 50 µg a 30 mg. Los más preferiblemente, las dosificaciones variarán de 1 mg a 20 mg. Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo el tratamiento semanalmente. El experto en la técnica puede determinar los protocolos clínicos específicos en relación con la vía de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones, tiempos, etc., según lo amerite la situación clínica.

Diagnóstico

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención también se pueden usar para detectar EphA2 en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo.* En un aspecto, los anticuerpos anti-EphA2 de la invención se usan para determinar el nivel de EphA2 en un tejido o en células derivadas del tejido. En un aspecto preferido, el tejido es un tejido enfermo. En un aspecto preferido del método, el tejido es un tumor o una biopsia de este. En un aspecto preferido del método, un tejido o una biopsia de este primero se extrae de un paciente y, a continuación, se pueden determinar los niveles de EphA2 en el tejido o biopsia en un inmunoensayo con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. El tejido o biopsia de este se puede congelar o fijar. El mismo método se puede usar para determinar otras propiedades de la proteína EphA2, tales como su nivel de fosforilación en tirosina, niveles en superficie celular o ubicación celular.

El método descrito anteriormente se puede usar para diagnosticar un cáncer en un sujeto que se sabe o se sospecha que tiene cáncer, en donde el nivel de EphA2 medido en dicho paciente se compara con el de un sujeto de referencia normal o patrón. Dicho método, a continuación, se puede usar para determinar si un tumor expresa EphA2, lo que puede sugerir que el tumor responderá bien al tratamiento con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o conjugados de anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, el tumor es un cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, útero, ovario, cuello uterino y órganos linfáticos, osteosarcoma, carcinoma sinovial, un sarcoma, un glioma, gástrico, hepático, de vías respiratorias y digestivas altas u otros carcinomas en los que se expresa EphA2, y otros cánceres que todavía se determinarán en los que EphA2 se expresa predominantemente.

La presente memoria descriptiva describe, además, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a epítopo de estos que se etiquetan adicionalmente para su uso en aplicaciones de investigación y diagnóstico. En un aspecto preferido, la etiqueta es una radioetiqueta, un fluoróforo, un cromóforo, un agente para generación de imágenes o un ion metálico.

También se describe un método para diagnóstico en el que dichos anticuerpos o fragmentos de unión a epítopo de estos etiquetados se administran a un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer y se mide o monitorea la distribución de la etiqueta dentro del cuerpo del sujeto.

Kit

La presente memoria descriptiva también incluye kits, p. ej., que comprenden un conjugado citotóxico descrito e instrucciones para el uso del conjugado citotóxico para destruir tipo de células específicos. Las instrucciones pueden incluir orientaciones para usar los conjugados citotóxicos *in vitro, in vivo* o *ex vivo.*

Típicamente, el kit tendrá un compartimento que contiene el conjugado citotóxico. El conjugado citotóxico puede estar en forma liofilizada, forma líquida u otra forma adecuada para incluirse en un kit. El kit puede contener, además, elementos adicionales necesarios para poner en práctica el método descrito en las instrucciones del kit, tal como una disolución esterilizada para reconstituir un polvo liofilizado, agentes adicionales para combinarlos con el conjugado citotóxico antes de la administración a un paciente, y herramientas que auxilian en la administración del conjugado a un paciente.

La presente invención también se refiere a un artículo de fabricación que comprende:

- a) un material de envasado

- b) un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este o un conjugado, y

c) una etiqueta o prospecto del envase contenido dentro de dicho material de envasado que indica que dicho anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este es eficaz para tratar el cáncer.

Ejemplos

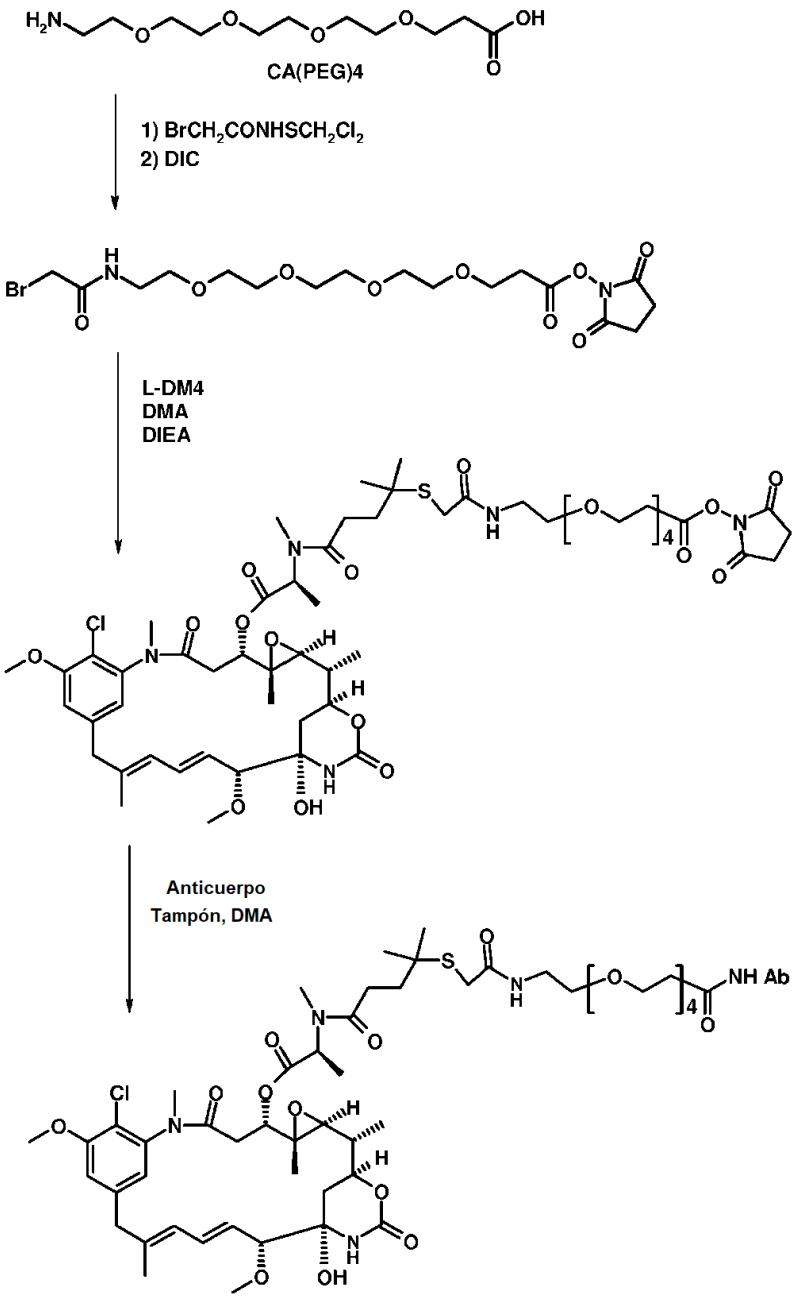
Ejemplo 1

Preparación de conjugados

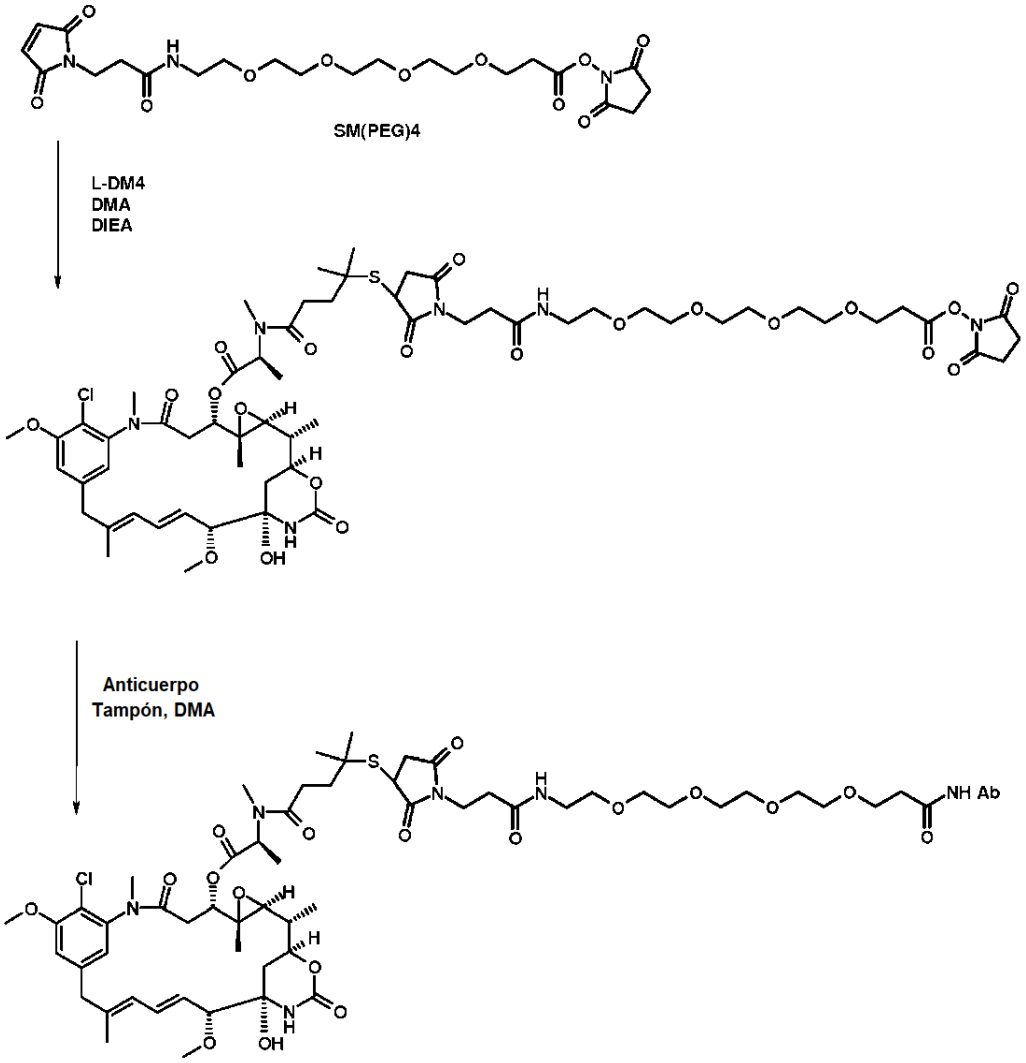
Conjugación de 2H11R35R74 con DM4

Esquemas sintéticos generales

Ejemplo 1a: hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4



Ejemplo 1b: hu2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4



Método A: Cromatografía líquida de presión elevada - Espectrometría de masas (LCMS)

Se obtuvieron espectros en un sistema Waters UPLC-SQD en modo de electropulverización positivo y/o negativo (ES+/-). Las condiciones cromatográficas son las siguientes: columna: ACQUITY BEH C18, 1,7 µm - 2,1x30 mm; disolventes: A: H_2O (ácido fórmico al 0,1 %) B: CH_3CN (ácido fórmico al 0,1 %); temperatura de columna: 45 °C; velocidad de flujo: 0,6 ml/min; gradiente (2 min): de 5 a 50 % de B en 1 min; 1,3 min: 100 % de B; 1,45 min: 100 % de B; 1,75 min: 5 % de B.

Método B: Cromatografía líquida de presión elevada - Espectrometría de masas (LCMS)

Se obtuvieron espectros en un sistema Waters ZQ en modo de electropulverización positivo y/o negativo (ES+/-). Las condiciones cromatográficas son las siguientes: columna: XBridge C18 2,5 µm 3x50 mm; disolventes: A: H_2O (ácido fórmico al 0,1 %) B: CH_3CN (ácido fórmico al 0,1 %); temperatura de columna: 70 °C; velocidad de flujo: 0,9 ml/min; gradiente (7 min): de 5 a 100 % de B en 5,3 min; 5,5 min: 100 % de B; 6,3 min: 5 % de B.

Método C: desglucosilación y espectrometría de masas de alta resolución de inmunoconjugado (HRMS)

Las desglucosilación es una técnica de digestión enzimática por medio de glucosidasa. La desglucosilación se hace a partir de 500 µl de conjugado + 100 µl de tampón Tris HCl 50 mM + 10 µl de enzima glucanasa-F (100 unidades de enzima liofilizada/ 100 µl de agua). El medio se somete a agitación vorticial y se mantiene una noche a 37 °C. La muestra desglucosilada a continuación está lista para analizarse en HRMS. Se obtuvieron espectros de masa en un sistema Waters Q-Tof-2 en modo de electropulverización positivo (ES+). Las condiciones cromatográficas son las siguientes: columna: 4 µm BioSuite 250 URH SEC 4,6x300 mm (Waters); disolventes: A: formiato de amonio 25 mM + ácido fórmico al 1 % B: CH_3CN; temperatura de columna: 30 °C; velocidad de flujo 0,4 ml/min; elución isocrática 70 % de A + 30 % de B (15 min).

Método D: Cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC)

- Columna: columna TSKgel G3000 SWXL 5 µm, 7,8 mm x 30 cm, TOSOH BIOSCIENCE, n.° de parte de LLC: 08541

- Fase móvil: KCl (0,2M), KH_2PO_4 (0,052M) K_2HPO_4 (0,107M), iPrOH (20 % en volumen)

- Condiciones de análisis: elución isocrática a 0,5 ml/min durante 30 minutos

Método E: espectrometría de masas (MS)

Se obtuvieron espectros a través de ionización química (gas reactivo: amoníaco) en un sistema WATERS GCTof (introducción directa sin LC).

Método F: Cromatografía líquida de presión elevada - Espectrometría de masas (LCMS)

Se obtuvieron espectros en un sistema Waters UPLC-SQD en modo de electropulverización positivo y/o negativo (ES+/-). Las condiciones cromatográficas son las siguientes: columna: ACQUITY BEH C18, 1,7 µm - 2,1x50 mm; disolventes: A: H_2O (ácido fórmico al 0,1 %) B: CH_3CN (ácido fórmico al 0,1 %); temperatura de columna: 50 °C; velocidad de flujo: 1 ml/min; gradiente (2 min): de 5 a 50 % de B en 0,8 min; 1,2 min: 100 % de B; 1,85 min: 100 % de B; 1,95: 5 % de B.

Abreviaturas:

AcOEt: acetato de etilo; ALK: grupo alquileno (C_1-C_{12}), particularmente alquileno (C_1-C_6); DAR: Relación entre fármaco y anticuerpo; DBU: 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno; DCC: N,N'-diciclohexilcarbodiimida; DCM: diclorometano; DEAD: dietilazodicarboxilato; DIC: N,N'-diisopropilcarbodiimide; DIPEA: N,N-diisopropiletilamina; DMA: dimetilacetamida; DMAP: 4-dimetilaminopiridina; DME: dimetoxietano; DMF: dimetilformamida; DMSO: dimetilsulfóxido; ε: coeficiente de extinción molar; EEDQ: 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina; EDCI: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; EDTA: ácido etileno-diamina-tetraacético; Fmoc: fluorenilmetoxocarbonilo; Hal: átomo de halógeno; HOBt: 1-hidroxibenzotriazol; HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico; NHS: N-hidroxisuccinimida; iPrOH: alcohol isopropílico; NMP: N-metilpirrolidinona; Rf: factor de retención; RP: presión reducida; RT: temperatura ambiente; SEC: cromatografía de exclusión por tamaño; TBDMS: *terc*-butildimetilsililo; TEA: trietilamina; TFA: ácido trifluoroacético; TFAA: anhídrido trifluoroacético; TFF: filtración de flujo tangencial; THF: tetrahidrofurano; TIPS: triisopropilsililo; TLC: cromatografía de capa delgada; t_R: tiempo de retención.

Contenido de tampones:

- Tampón A (pH 6,5): NaCl (50mM), KPi (50mM), EDTA (2mM)

- Tampón HGS (pH 5,5): Histidina (10mM), Glicina (130 mM), sacarosa al 5 % (p/v), HCl (8mM)

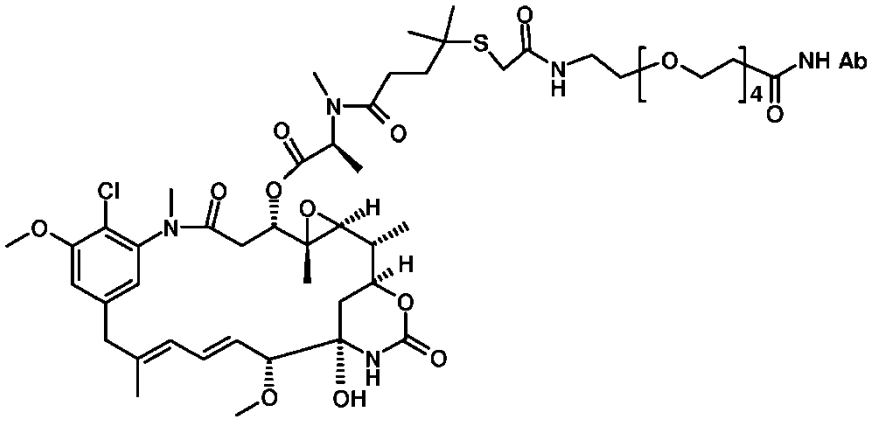
Parámetros para los cálculos de la concentración de Ab y L-DM4 (consultar el método de cálculo: Therapeutic Antibodies and Protocols, tomo 525, 445):

- Coeficientes de extinción molar para hu2H11R35R74 (224 000 a 280nM; 82 880 a 252nM) y L-DM4 (5180 a 280nM; 26 159 a 252nM), asumiendo un peso molecular promedio de 160 000 para el anticuerpo.

Ejemplo 1a:

1a.1. Preparación del conjugado enlazado con PEG4-acetamido:

hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4

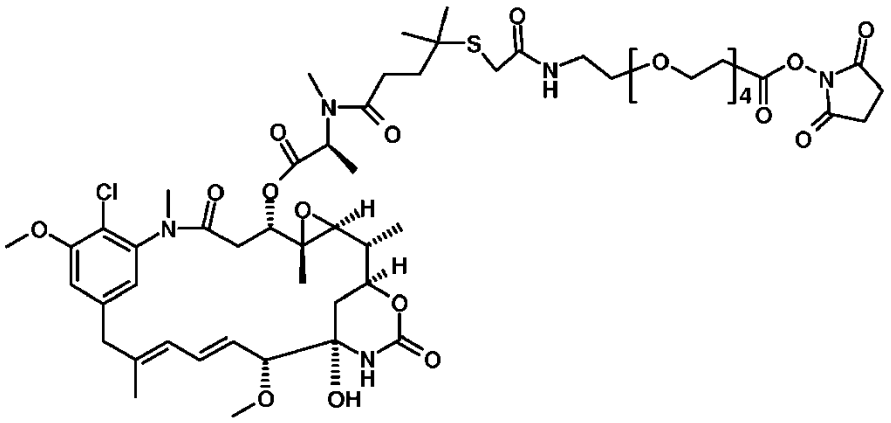


Con agitación magnética, a temperatura ambiente, se agregaron 9 ml de hu2H11R35R74 (14,36 mg/ml en tampón A), después 16,85 ml de tampón A, 3,23 ml de HEPES 1M, 1,59 ml de DMA y posteriormente 1,64 ml de una disolución en 10mM DMA de éster activado con L-DM4-AcNH-PEG4-CONHS. Después de 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 0,085 ml adicionales de la disolución en 10mM DMA del éster activado con L-DM4-AcNH-PEG4-CONHS. Después de 1 hora 45 minutos a temperatura ambiente, el medio de conjugación bruto se diluya con 60 ml de tampón HGS y se purifica mediante TFF en casetes Pellicon 3. La muestra se diafiltra contra ~ 10 volúmenes de muestra de tampón HGS y después se recoge. El tanque y los conductos de TFF se lavan con 10 ml adicionales de tampón HGS. Las dos disoluciones se mezclan, se esterilizan por filtro a través de PVDF de 0,22 µm, se concentran en Amicon 15 y se esterilizan por filtro a través de PVDF de 0,22 µm. Por lo tanto, se obtuvieron 17 ml de inmunoconjugado hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 (c = 5,76 mg/ml). A continuación, se analiza el inmunoconjugado para determinar la carga de fármaco final y la pureza monomérica.

Análisis SEC (método D): DAR (SEC) = 5,4; RT = 16,757; pureza monomérica = 99,5 %

Datos de HRMS (método C): véase la Figura 2

1a.2. Preparación de éster activado por L-DM4-AcNH-PEG4-CONHS:



Con agitación magnética, a temperatura ambiente, se introducen 154,3 mg de L-DM4 en un vial de vidrio. A continuación, se agrega una disolución de 90 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-[2-(2-{2-[2-(2-bromo-acetilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-propiónico en 0,94 ml de DMA y posteriormente 36 µl de DIEA. Después de 23 horas a temperatura ambiente, el medio de reacción se diluye con 5 ml de AcOEt y se lava con 7 ml de agua. La fase acuosa se extrae con 5 ml de AcOEt. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio, se concentrarse hasta secarse a presión reducida. Se obtienen 228 mg de aceite viscoso amarillo pálido, cuyo producto se diluye con una cantidad mínima de DMA y se purifica mediante cromatografía ultra rápida sobre 30g de gel de sílice injertado con C18 (gradiente de elución agua:acetonitrilo 95:5 a 5:95 en volumen). Después de la concentración de las fracciones 2 y 3 a presión reducida, se obtiene un aceite viscoso incoloro, cuyo producto se diluye con una cantidad mínima de DMA y se purifica mediante cromatografía ultra rápida sobre 30g de gel de sílice injertado con C18 (gradiente de elución agua:acetonitrilo 95:5 a 5:95 en volumen). Después de la concentración de las fracciones 33 a 35 a presión reducida, se obtienen 41 mg de éster activado por L-DM4-AcNH-PEG4-CONHS en forma de un producto blanco similar a merengue, cuyas características son las siguientes:

Espectro de masas: método B

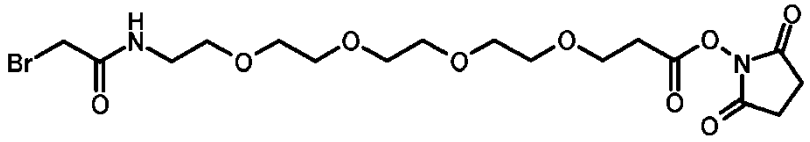
Tiempo de retención (min) = 4,06

[M+H-H2O]+: m/z 1164; [M+H]+: m/z 1182;

[M-H+HCO2H]-: m/z 1226

RMN análisis 1H (500 MHz, δ en ppm, cloroformo-d): 0,80 (s, 3 H); 1,21 (s, 3 H); 1,22 (s, 3 H); 1,25 (m, 1 H); 1,29 (d, *J*=6,7 Hz, 6 H); 1,46 (m, 1 H); 1,57 (d, *J*=13,4 Hz, 1 H); 1,64 (s, 3 H); 1,76 a 1,83 (m, 1 H); 1,88 a 1,96 (m, 1 H); 2,18 (dd, *J*=2,5 et 14,3 Hz, 1 H); 2,36 (m, 1 H); 2,53 (m, 1 H); 2,61 (dd, *J*=12,5 et 14,3 Hz, 1 H); 2,82 a 2,92 (m, 10 H); 2,98 (d, *J*=16,7 Hz, 1 H); 3,03 (d, *J*=9,6 Hz, 1 H); 3,15 (d, *J*=12,9 Hz, 1 H); 3,22 (s, 3 H); 3,32 (s a, 1 H); 3,36 (s, 3 H); 3,42 (m, 2 H); 3,50 (d, *J*=9,1 Hz, 1 H); 3,53 (t, *J*=5,2 Hz, 2 H); 3,58 a 3,67 (m, 13 H); 3,84 (t, *J*=6,4 Hz, 2 H); 3,99 (s, 3 H); 4,27 (m,1 H); 4,77 (dd, *J*=2,9 et 11,9 Hz, 1 H); 5,42 (q, *J*=6,7 Hz, 1 H); 5,66 (dd, *J*=9,1 et 15,4 Hz, 1 H); 6,23 (s,1 H); 6,43 (dd, *J*=11,3 et 15,4 Hz, 1 H); 6,64 (d, *J*=1,1 Hz, 1 H); 6,74 (d, *J=11,3* Hz, 1 H); 6,85 (d, *J*=1,1 Hz, 1 H); 7,08 (t, *J*=5,2 Hz, 1 H).

1a.3. Preparación de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-[2-(2-{2-[2-(2-bromo-acetilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-propiónico:



Con agitación magnética, a temperatura ambiente, se introducen 671,4 mg de ácido 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico (CA(PEG)4, Pierce) en un vial de vidrio. A continuación, se agrega una disolución de 597,4 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido bromo-acético en 14 ml de diclorometano. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, se agregan 0,396 ml de DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida). Después de 1 hora 30 minutos, el medio de reacción bruto se filtra sobre vidrio sinterizado y el filtrado se purifica mediante cromatografía ultra rápida en 100g de gel de sílice injertado con CN (gradiente de elución n.heptano/iPrOH/AcOEt con porción de iPrOH creciente). Después de la concentración de las fracciones 30 a 45 a presión reducida, se obtienen 761 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-[2-(2-{2-[2-(2-bromo-acetilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-propiónico en forma de un aceite incoloro, cuyas características son las siguientes:

Espectro de masas: método A

Tiempo de retención (min) = 0,74

[M+H]+: m/z 483/485

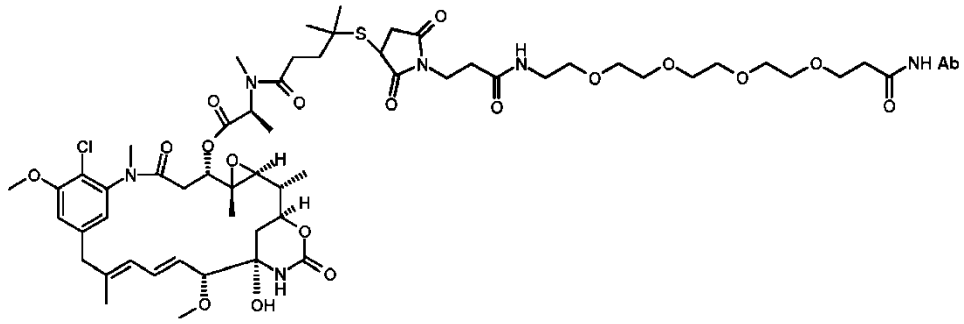
[M-H+HCO2H]-: m/z 527/529

Se podría preparar 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido bromo-acético siguiendo el protocolo publicado (Biochemistry, 1974, 481).

Ejemplo 1b:

1b.1. Preparación de conjugado enlazado con PEG4-Mal:

hu2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4



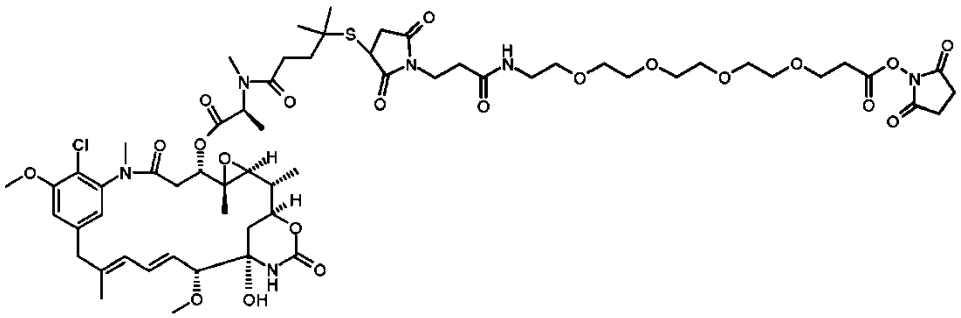
Con agitación magnética, a temperatura ambiente, se agregaron 4 ml de hu2H11R35R74 (14,36 mg/ml en tampón A), después 7,5 ml de tampón A, 1,45 ml de HEPES 1M, 1,15 ml de DMA y posteriormente 0,305 ml de una disolución en 10mM DMA de éster activado con L-DM4-Mal-PEG4-CONHS. Después de 7 horas a temperatura ambiente, el medio de conjugación bruto se diluye con 70 ml de tampón HGS y se purifica mediante TFF en casetes

Pellicon 3. La muestra se diafiltra contra ~ 10 volúmenes de muestra de tampón HGS y después se recoge. El tanque y los conductos de TFF se lavan con 10 ml adicionales de tampón HGS. Las dos disoluciones se mezclan, se concentran en Amicon 15 y se esterilizan por filtro a través de PVDF de 0,22 µm. Por lo tanto, se obtuvieron 8,0 ml de inmunoconjugado hu2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4 (c = 5,09 mg/ml). A continuación, se analiza el inmunoconjugado para determinar la carga de fármaco final y la pureza monomérica.

Análisis SEC (método D): DAR (SEC) = 5,3; RT = 16,680; pureza monomérica = 99,5 %

Datos de HRMS (método C): véase la Figura 3

1b.2. Preparación de éster activado por L-DM4-Mal-PEG4-CONHS:



Con agitación magnética, a temperatura ambiente, se agregan sucesivamente 50 mg de L-DM4, 17,2 mg de DIEA soportado (3,72 mmol/g) y una disolución de 36,2 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-{2-[2-(2-{2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propiónico (disponibles comercialmente, SM(PEG)4, Pierce) en 360 µl de DMA. Después de 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente, el medio de reacción se filtra, los sólidos se lavan con AcOEt y los filtrados combinados se purifica directamente mediante cromatografía ultra rápida en 14 g de gel de sílice injertado con CN (gradiente de elución heptano:AcOEt:iPrOH con contribución de iPrOH creciente). Después de la concentración de las fracciones que contienen el producto esperado a presión reducida, se obtienen 29,8 mg de éster activado por L-DM4-Mal-PEG4-CONHS en forma de un vidrio incoloro, cuyas características son las siguientes:

Espectro de masas: método A

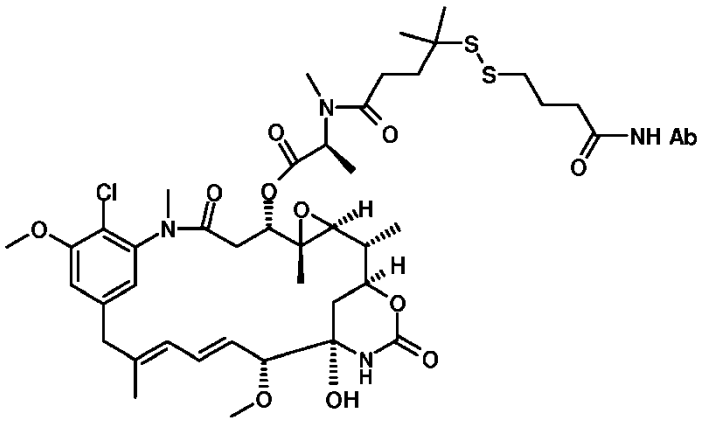
Tiempo de retención (min) = 1,24 / 1,25 (2 diaestereoisómeros)

[M+H]+: m/z 1293

[M-H+HCO2H]-: m/z 1337

Ejemplo 1c: Preparación de conjugado enlazado con SPDB:

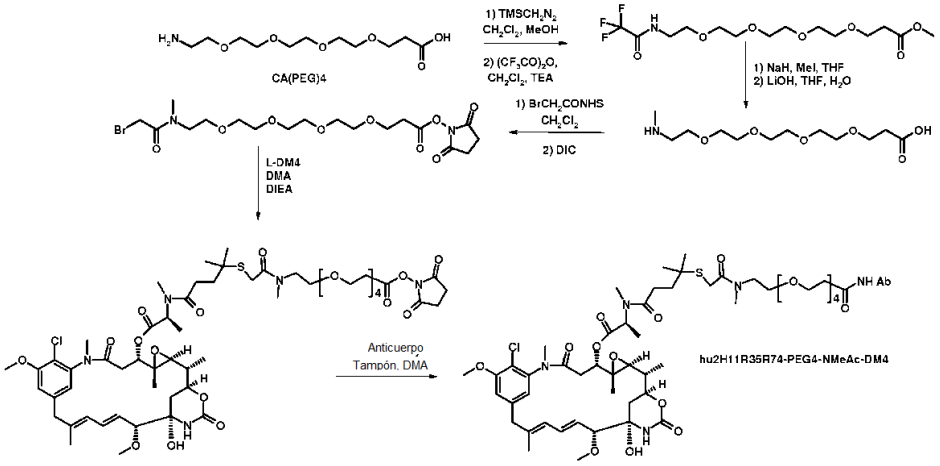
hu2H11R35R74-SPDB-DM_4



Se conjugaron anticuerpos 2H11R35R74 humanizados con L-DM4 N2'desacetil-N2'(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina usando el enlazador SPDB (N-hidroxsuccinimida éster de ácido 4-[2-piridilditio]butanoico) enlazador usando el mismo protocolo que se describió anteriormente en WO 2008010101A9 con otros anticuerpos hu2H11. De manera resumida, el anticuerpo se modificó a 8 mg/mL con un exceso molar de 5,5 o 6,5 veces de SPDB para

hu2H11 y hu37.3D7, respectivamente. La reacción se llevó a cabo en Tampón A (50 mM KPi/50 mM NaCl/2 mM EDTA, pH 6,5, 95 % v/v) con EtOH (5 % v/v) durante 90 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el anticuerpo modificado se purificó mediante la columna de desalación SephadexG25 con Tampón A. Después, el anticuerpo modificado se hizo reaccionar con un exceso molar de 1,7 veces de DM4 con respecto al enlazador SPDB. La reacción se llevó a cabo a 2,5 mg/mL de anticuerpo en Tampón A (97 % v/v) y DMA (dimetilacetamida, 3 % v/v) a temperatura ambiente durante 20 horas. El conjugado se purificó mediante una columna de desalación SephadexG25 con 10 mM de Histidina, 130 mM de Glicina, sacarosa al 5 %, pH5,5. La relación entre fármaco y anticuerpo fue de 4,0 para hu37.3D7-SPDB-DM4 y 3,1 para hu2H11-SPDB-DM4.

Ejemplo 1d: Preparación del conjugado hu2H11R35R74-PEG4-NMeAc-DM4



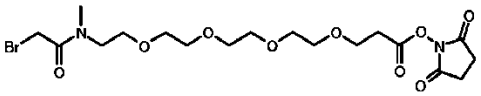
1d.1 Preparación del conjugado hu2H11R35R74-PEG4-NMeAc-DM4

Con agitación magnética a RT, se agregan 4 ml de hu2H11R35R74 (14,36 mg/ml en tampón A), después 7,5 ml de tampón A, 1,45 ml de HEPES 1M, 1,05 ml de DMA y posteriormente 0,39 ml de una disolución en 10mM DMA de éster activado con L-DM4-AcNMe-PEG4-CONHS. Después de 30 min a RT, se agregan 0,19 ml adicionales de la disolución en 10mM DMA del éster activado con L-DM4-AcNMe-PEG4-CONHS. Después de 3 horas a RT, el medio de conjugación bruto se diluye con 65 ml de tampón HGS y se purifica mediante TFF en casetes Pellicon 3. La muestra se diafiltra contra ~10 volúmenes de muestra de tampón HGS y después se recoge. El tanque y los conductos de TFF se lavan con 10 ml adicionales de tampón HGS. Las dos disoluciones se mezclan, se concentran en Amicon 15 y se esterilizan por filtro a través de PVDF de 0,22 µm. Por lo tanto, se obtuvieron 8,5 ml de conjugado hu2H11R35R74-PEG4-NMeAc-DM4 (c = 6,01 mg/ml). A continuación, se analiza el conjugado para determinar la carga de fármaco final y la pureza monomérica. Análisis SEC (D): DAR (SEC)= 5,5; RT= 16,7 min; pureza monomérica 99,4 %; datos de HRMS: véase la Figura 14.

1d.2 Preparación de éster activado por L-DM4-AcNMe-PEG4-CONHS

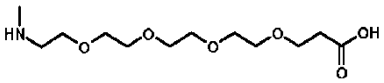
Con agitación magnética a RT, se introducen 133,4 mg de L-DM4 en un vial de vidrio. A continuación, se agrega una disolución de 85 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-{2-[2-(2-{2-[(2-bromo-acetil)-metil-amino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propiónico en 0,2 ml de DMA y posteriormente 32,9 µl de DIEA. Después de 1 hora a RT, el medio de reacción se purifica mediante cromatografía ultra rápida en 30 g de gel de sílice injertado con C18 (gradiente de elución agua:acetonitrilo 95:5 a 5:95 en volumen). Después de la concentración de las fracciones que contienen el producto deseado a RP, se obtienen 71,3 mg de éster activado por L-DM4-AcNMe-PEG4-CONHS en forma de un producto similar a vidrio incoloro. Espectro de masas (D): RT=0,98 min; $[M+H-H_2O]+$: m/z 1178 (señal principal); [M+Na]+ : m/z 1218; [M-H+HCO2H]- : m/z 1240 ; 1H RMN (500 MHz, δ en ppm, cloroformo-d) : 0,81 (s, 3 H) ; 1,20 a 1,33 (m, 13 H) ; 1,42 a 1,52 (m, 1 H) ; 1,56 a 1,61 (m, 1 H) ; 1,65 (s, 3 H) ; 1,73 a 1,83 (m, 1 H) ; 1,96 a 2,04 (m, 1 H) ; 2,19 (dd, J=2,8 y 14,4 Hz, 1 H) ; 2,29 a 2,41 (m, 1 H) ; 2,55 a 2,66 (m, 2 H) ; 2,83 a 2,93 (m, 12 H) ; 3,04 (d, J=9,8 Hz, 1 H) ; 3,12 (d, J=12,7 Hz, 1 H) ; 3,18 a 3,25 (m, 5 H) ; 3,37 (s, 3 H) ; 3,47 a 3,54 (m, 3 H) ; 3,57 a 3,68 (m, 15 H) ; 3,85 (t, J=6,6 Hz, 2 H) ; 3,99 (s, 3 H) ; 4,29 (m, 1 H) ; 4,79 (dd, J=2,8 y 12,2 Hz, 1 H) ; 5,41 (q, J=6,7 Hz, 1 H) ; 5,68 (dd, J=9,3 et 15,2 Hz, 1 H) ; 6,23 (s, 1 H) ; 6,43 (dd, J=11,0 y 15,2 Hz, 1 H) ; 6,66 (s, 1 H) ; 6,74 (d, J=11,0 Hz, 1 H) ; 6,83 (s, 1 H).

1d.3 Preparación de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-{2-[2-(2-{2-[(2-bromo-acetil)-metil-amino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propiónico



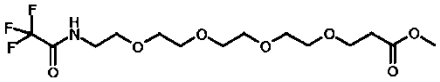
Con agitación magnética, a RT, en un matraz de fondo redondo, se introducen sucesivamente 115,1 mg de ácido 3-(2-{2-[2-(2-metilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico, 1,5 ml de DCM, 97,3 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido bromo-acético. Después de 2 h, se agregan 72 µl de DIEA y después de 1 hora adicional a RT, se agregan 70,2 µl de DIC. El medio de reacción bruto se mantiene 4 h a RT, 16 h a -20 °C y después se purifica mediante cromatografía ultra rápida en 30 g de gel de sílice (gradiente de elución DCM:metanol de 0:100 a 3:97 en volumen). Después de la concentración de las fracciones que contienen el producto deseado a RP, se obtienen 85,8 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-{2-[2-(2-{2-[(2-bromo-acetil)-metil-amino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propiónico en forma de un sólido blanco. Espectro de masas (A): TR= 0,84 min ; [M+H]+ : m/z 497/499

1d.4 Preparación de ácido 3-(2-{2-[2-(2-metilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico



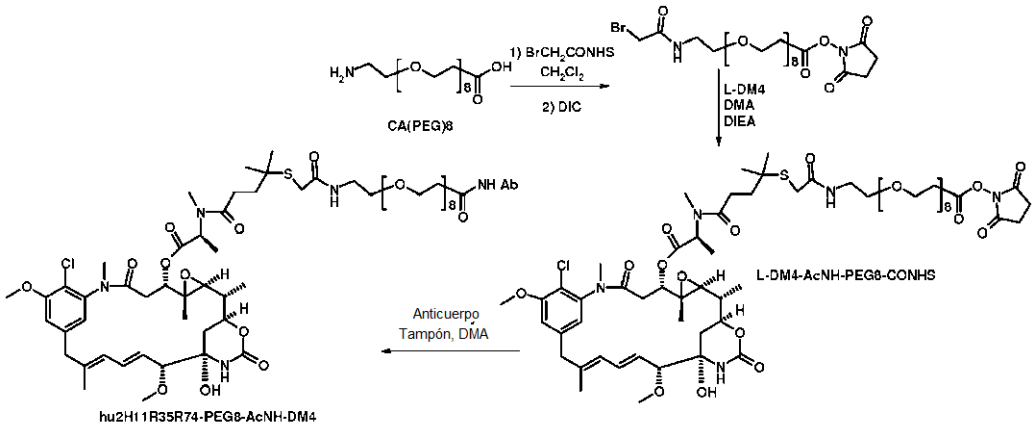
En una atmósfera inerte de argón, en un matraz de fondo redondo, con agitación magnética, se introducen sucesivamente 120,1 mg de éster metílico de ácido 3-[2-(2-{2-[2-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-propiónico, 1 ml de THF anhidro y 59,8 µl de CH_3I. El medio de reacción se enfría con un baño de hielo/agua a aproximadamente 0 °C, y se agregan lentamente 16,1 mg de NaH (50 % puro en aceite) en porciones pequeñas. Después de 15 min a 0 °C, y 1 h a RT, el medio de reacción bruto se concentra hasta secarse a RP, y se diluye con 0,5 ml de THF y 0,8 ml de agua. A continuación, a RT, se agregan 30,6 mg de LiOH al medio de reacción. El medio de reacción bruto se mantiene 2 h a RT, 16 h a -20 °C y después se purifica mediante cromatografía ultra rápida en 30 g de gel de sílice injertado con C18 (gradiente de elución agua:acetonitrilo de 95:5 a 5:95 en volumen). Después de la concentración de las fracciones que contienen el producto deseado a RP, se obtienen 115,3 mg de ácido 3-(2-{2-[2-(2-metilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico en forma de un aceite amarillo.

1d.5 Preparación de éster metílico de ácido 3-[2-(2-{2-[2-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-propiónico



En una atmósfera inerte de argón, en un matraz de fondo redondo, con agitación magnética, se introducen sucesivamente 230 mg de ácido 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico (CA(PEG)4, Pierce), 2 ml de DCM y 1 ml de metanol. A RT, se agrega lentamente 1 ml de trimetilsilildiazometano (disolución 2M en hexano) al medio de reacción. Después de 2 h a RT, el exceso de trimetilsilildiazometano se neutraliza mediante la adición de ácido acético. El medio de reacción bruto después se evapora hasta secarse a RP. El residuo obtenido se diluye con 2 ml de DCM, se enfría hasta 0 °C con un baño de agua-hielo, después se agregan sucesivamente 363 µl de TEA y 300 µl de TFAA. Después de 2 h 30 min a RT y 19 h a -20 °C, se agregan sucesivamente 363 µl de TEA y 300 µl de TFAA. Después de 4 h 30 min a RT y el medio bruto se concentra a -20 °C y después se purifica mediante cromatografía ultra rápida en 30 g de gel de sílice injertado con C18 (gradiente de elución agua:acetonitrilo de 95:5 a 5:95 en volumen). Después de la concentración de las fracciones que contienen el producto deseado a RP, se obtienen 123 mg de éster metílico de ácido 3-[2-(2-{2-[2-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-propiónico en forma de un aceite amarillo pálido. Espectro de masas (A): TR= 0,90 min ; [M+H]+ : m/z 376 ; [M-H]- : m/z 374.

Ejemplo 1e: Preparación del conjugado hu2H11R35R74-PEG8-NHAc-DM4



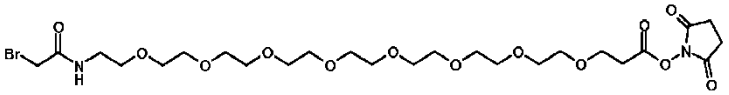
1e.1 Preparación del conjugado hu2H11R35R74-PEG8-NHAc-DM4

Con agitación magnética a RT, se agregan 4 ml de hu2H11R35R74 (14,36 mg/ml en tampón A), después 7,5 ml de tampón A, 1,45 ml de HEPES 1M, 1,05 ml de DMA y posteriormente 0,405 ml de una disolución en 10 mM DMA de éster activado con L-DM4-AcNMe-PEG8-CONHS. Después de 30 min a RT, se agrega 0,1 ml adicionales de la disolución en 10mM DMA del éster activado con L-DM4-AcNMe-PEG8-CONHS. Después de 1 hora 45 min a RT, el medio de conjugación bruto se diluye con 60 ml de tampón HGS y se purifica mediante TFF en casetes Pellicon 3. La muestra se diafiltra contra ~10 volúmenes de muestra de tampón HGS y después se recoge. El tanque y los conductos de TFF se lavan con 10 ml adicionales de tampón HGS. Las dos disoluciones se mezclan, se concentran en Amicon 15 y se esterilizan por filtro a través de PVDF de 0,22 µm. Por lo tanto, se obtuvieron 7,0 ml de conjugado hu2H11R35R74-PEG8-AcNMe-DM4 (c = 6,95 mg/ml). A continuación, se analiza el conjugado para determinar la carga de fármaco final y la pureza monomérica. Análisis SEC (D): DAR (SEC)= 5,0; RT= 16,593 min; pureza monomérica 99,5 %; datos de HRMS: véase la Figura 15.

1e.f Preparación de éster activado por L-DM4-AcNH-PEG8-CONHS

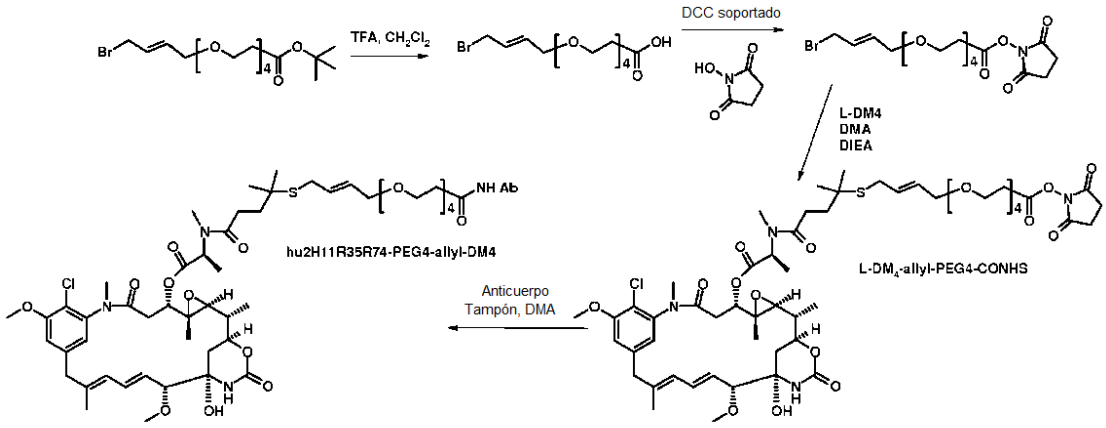
Con agitación magnética a RT, se introducen 65 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(3-bromo-propionilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propiónico en un vial de vidrio, posteriormente un disolución de 67,7 mg de L-DM4 en 0,85 ml de DMA y 16,5 µl de DIEA. Después de 48 horas a RT, el medio de reacción se purifica mediante cromatografía ultra rápida en 10 g de gel de sílice (gradiente de elución DCM:MeOH 100:0 a 90:10 en volumen). Después de la concentración de las fracciones 18 a 26 a RP, se obtienen 17 mg de éster activado por L-DM4-AcNH-PEG8-CONHS en forma de un producto similar a vidrio incoloro. Espectro de masas (B): RT= 4,08 min; [M+H-H_2O]+ : m/z 1340 (señal principal); [M+Na]+ : m/z 1380; [M-H+HCO2H]- : m/z 1402 ; 1H RMN (400 MHz, δ en ppm, cloroformo-d) : 0,81 (s, 3 H) ; 1,22 (s, 3 H) ; 1,23 (s, 3 H) ; 1,26 (m, 1 H) ; 1,30 (d, J=6,8 Hz, 6 H) ; 1,41 a 1,52 (m, 1 H) ; 1,65 (s, 3 H) ; 1,80 (m, 1 H) ; 1,89 a 1,99 (m, 1 H) ; 2,19 (m, 1 H) ; 2,37 (m, 1 H) ; 2,47 à 2,67 (m, 2 H) ; 2,81 à 2,93 (m, 10 H) ; 2,99 (d, J=16,6 Hz, 1 H) ; 3,04 (d, J=9,8 Hz, 1 H) ; 3,16 (d a, J=13,7 Hz, 1 H) ; 3,23 (s, 3 H) ; 3,32 (s a, 1 H) ; 3,37 (s, 3 H) ; 3,44 (m, 2 H) ; 3,51 (d, J=9,1 Hz, 1 H) ; 3,54 (t, J=5,4 Hz, 2 H) ; 3,59 à 3,73 (m, 29 H) ; 3,86 (t, J=6,6 Hz, 2 H) ; 4,00 (s, 3 H) ; 4,22 a 4,33 (m, 1 H) ; 4,78 (dd, J=2,9 y 12,2 Hz, 1 H) ; 5,43 (q, J=6,8 Hz, 1 H) ; 5,67 (dd, J=9,0 et 15,2 Hz, 1 H) ; 6,23 (s, 1 H) ; 6,44 (dd, J=11,2 et 15,2 Hz, 1 H) ; 6,65 (d, J=1,5 Hz, 1 H) ; 6,75 (d, J=11,2 Hz, 1 H) ; 6,86 (d, J=1,5 Hz, 1 H) ; 7,02 à 7,13 (m, 1 H).

1e.g Preparación de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(3-bromo-propionilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propiónico:



Con agitación magnética a RT, se introducen sucesivamente 100 mg de ácido 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico (CA(PEG)4, Pierce), 2 ml de DCM y 53,5 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido bromo-acético en un vial de vidrio. Después de 1 h a RT, se agregan 35,1 µl de DIC. Después 1 h, el medio de reacción bruto se filtra sobre vidrio sinterizado, se concentra hasta secarse a RP, se diluye con 10 ml de AcOEt, se filtra sobre vidrio sinterizado y se concentra hasta secarse a RP. Se obtienen 76,5 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(3-bromo-propionilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propiónico en forma de un aceite incoloro. Espectro de masas (A): TR= 0,80 min ; [M+H]+ : m/z 659/661 ; [M-H+HCO2H]- : m/z 703/705

Ejemplo 1f: Preparación del conjugado hu2H11R35R74-PEG4-Allyl-DM4



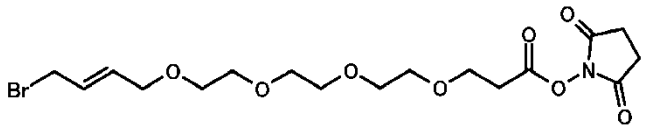
1f.1 Preparación del conjugado hu2H11R35R74-PEG4-Allyl-DM4

Con agitación magnética a RT, se agregan 4 ml de hu2H11R35R74 (14,36 mg/ml en tampón A), después 7,5 ml de tampón A, 1,45 ml de HEPES 1M, 1,14 ml de DMA y posteriormente 0,3 ml de una disolución en 10 mM DMA de éster activado con L-DM4-Allyl-PEG4-CONHS. Después de 30 min a RT, se agregan 0,125 ml adicionales de la disolución en 10mM DMA del éster activado con L-DM4-Allyl-PEG4-CONHS. Después de 1 hora 25 min a RT, el medio de conjugación bruto se diluye con 65 ml de tampón HGS y se purifica mediante TFF en casetes Pellicon 3. La muestra se diafiltra contra ~ 10 volúmenes de muestra de tampón HGS y después se recoge. El tanque y los conductos de TFF se lavan con 10 ml adicionales de tampón HGS. Las dos disoluciones se mezclan, se concentran en Amicon 15 y se esterilizan por filtro a través de PVDF de 0,22 µm. Por lo tanto, se obtuvieron 8,0 ml de conjugado hu2H11R35R74-PEG4-Allyl-DM4 (c = 5,22 mg/ml). A continuación, se analiza el conjugado para determinar la carga de fármaco final y la pureza monomérica. Análisis SEC (H): DAR (SEC)= 5,3; RT= 16,767 min; pureza monomérica 99,4 %; datos de HRMS: véase la Figura 16.

1f.2 Preparación de éster activado por L-DM4-Allyl-PEG4-CONHS

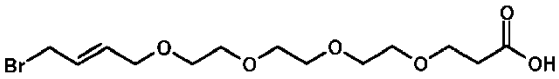
Con agitación magnética a RT, se introducen 70 mg de L-DM4, 45 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-(2-{2-[2-(4-bromo-but-2-eniloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico (Bromo-Allyl-PEG$_4$-CONHS), 0,5 mg de DMA y 23,5 µl de DIEA en un vial de vidrio. Después de 2 h a RT y 17 h a -20 °C, se agregan 50 µl de DIEA. Después de 24 horas a RT, el medio de reacción se purifica mediante cromatografía ultra rápida en 30 g de gel de sílice injertado con C-18 (gradiente de elución agua:acetonitrilo 95:5 a 5:95 en volumen). Después de la concentración de las fracciones que contienen el producto esperado a RP, se obtienen 47,1 mg de éster activado por L-DM4-Allyl-PEG4-CONHS en forma de un sólido blanco. Espectro de masas (D): TR= 1,06 min ; [M+Na]+ : m/z 1173 ; 1H RMN (500 MHz, δ en ppm , cloroformo-d) : 0,81 (s, 3 H) ; 1,18 à 1,39 (m, 13 H) ; 1,42 a 1,52 (m, 1 H) ; 1,58 (d, J=13,4 Hz, 1 H) ; 1,65 (s, 3 H) ; 1,73 a 1,82 (m, 1 H) ; 1,86 à 1,95 (m, 1 H) ; 2,19 (d, J=14,3 Hz, 1 H) ; 2,40 (m, 1 H) ; 2,51 a 2,65 (m, 2 H) ; 2,82 a 2,95 (m, 9 H) ; 2,98 a 3,07 (m, 2 H) ; 3,12 (d, J=12,6 Hz, 1 H) ; 3,18 a 3,27 (m, 1 H) ; 3,23 (s, 3 H) ;3,36 (s, 3 H) ; 3,51 (d, J=9,1 Hz, 1 H) ; 3,54 à 3,82 (m, 13 H) ; 3,86 (t, J=6,4 Hz, 2 H) ; 3,91 à 3,95 (m, 2 H) ; 3,99 (s, 3 H) ; 4,28 (t, J=11,0 Hz, 1 H) ; 4,78 (dd, J=2,6 et 11,9 Hz, 1 H) ; 5,44 (q, J=6,7 Hz, 1 H) ; 5,49 a 5,63 (m, 2 H) ; 5,68 (dd, J=9,1 y 15,0 Hz, 1 H) ; 6,24 (s, 1 H) ; 6,43 (dd, J=11,1 y 15,0 Hz, 1 H) ; 6,66 (s, 1 H) ; 6,77 (d, J=11,1 Hz, 1 H) ; 6,83 (s, 1 H).

1f.3 Preparación de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-(2-{2-[2-(4-bromo-but-2-eniloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico



A RT, se introducen sucesivamente 200 mg de ácido 3-(2-{2-[2-(4-bromo-but-2-eniloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico, 4 ml de DCM y 232,3 mg de DCC soportado (2 equivalentes) en un vial de vidrio. Después de 1 h a RT, se agregan 64,8 mg de NHS. Después 5 h a RT, el medio de reacción bruto se filtra sobre vidrio sinterizado, los sólidos se lavan con DCM y los filtrados combinados se concentran hasta secarse en RP. La purificación mediante cromatografía ultra rápida en 15 g de gel de sílice (gradiente de elución MeOH:DCM 0:100 a 10:90 en volumen) y la concentración de las fracciones que contenían el producto esperado a RP, proporcionaron 46 mg de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-(2-{2-[2-(4-bromo-but-2-eniloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico (Bromo-Allyl-PEG4-CONHS) obtenidos en forma de un aceite amarillo pálido. Espectro de masas (A): TR= 1,02 min ; [M+H]+ : m/z 454/456 ; [M+Na]+ : m/z 476/478 ; [M-H+HCO2H]- : m/z 498/500.

1f.4 Preparación de ácido 3-(2-{2-[2-(4-bromo-but-2-eniloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico



A RT, una disolución de 1 g de éster terc-butílico de ácido 3-(2-{2-[2-(4-bromo-but-2-eniloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico (comercialmente disponible), 6 ml de TFA y 3 ml de DCM se agita durante 3 h y después se concentra hasta secarse a RP. El residuo oleoso se diluye con tolueno y se concentra hasta secarse a RP para proporcionar 853 mg de ácido 3-(2-{2-[2-(4-bromo-but-2-eniloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico en forma de un aceite marrón.

Ejemplo 1g: Preparación del conjugado hu2H11-PEG4-NHAc-DM4

El conjugado hu2H11-PEG4-NHAc-DM4 podría prepararse de manera similar al ejemplo 1: con agitación magnética, a RT, se agrega 1 ml de hu2H11 (8,52 mg/ml en tampón A), después 0,7 ml de tampón A, 0,213 ml de HEPES 1M, 0,7 ml de DMA y posteriormente 0,085 ml de una disolución en 10 mM DMA de éster activado con L-DM4-AcNH-PEG4-CONHS diluido con 0,128 ml de DMA. Después de 2 h a RT, el medio se concentra en Amicon 4 a 7000 G, se intercambia el tampón con tampón HGS en columna Nap-10 y finalmente se purifica en una columna de 5 ml Zeba. Por lo tanto, se obtuvieron 1,15 ml de conjugado hu2H11-PEG4-NHAc-DM4 (c = 3,78 mg/ml). A continuación, se analiza el conjugado para determinar la carga de fármaco final y la pureza monomérica. Análisis SEC (método D): DAR (UV)= 6,6; DAR (SEC)= 5,6; RT= 15,387 min; pureza monomérica 99,7 %; datos de HRMS: véase la Figura 17.

Ejemplo 2

Inhibición de la actividad de autofosforilación de EphA2 mediante hu2H11R35R74

Materiales y métodos

Líneas celulares y anticuerpos

Se obtuvo la línea celular de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 de ECAAC (n.° de ref. 92020424). Se obtuvo la línea celular de carcinoma pulmonar no microcítico NCI-H1299 de ATCC (n.° de ref. CRL-5803). Ambas líneas celulares se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero de ternero fetal inactivado por al calor al 10 % y 2 mM de L-Gln. Se obtuvo la quimera de dominio extracelular/Fc de Ephrin-A1 de ratón recombinante (EphrinA1/Fc) de Sigma (n.° de ref. E 9902) o de R & D Systems (n.° de ref. 602-A1). Se obtuvieron el anticuerpo clon D7 anti-Eck/EphA2 (Ab) y el Ab anti-fosfotirosina 4G10 de Millipore (n.° de ref. 05-480 y 05-321 respectivamente). Se generó el Ab testigo de isotipo chKTI en Immunogen Inc. Corresponde a la versión quimérica del Ab anti-inhibidor de tripsina de grano de soja Kunitz (KTI, n.° de ref. de ATCC HB9515) donde las regiones constantes de cadena pesada y ligera de Ig se reemplazaron por la cadena ligera κ humana y la cadena pesada γ1 humana. El Ab recombinante se purificó en ImmunoGen (lote de chKTI n.° 2539-91) a partir de sobrenadantes de cultivo de células HEK293T transfectadas transitoriamente con un plásmido de expresión para las cadenas pesada y ligera. Se produjeron los Ab anti-EphA2 humanizados hu2H11(n.° de lote LP08191) y hu2H11R35R74 (n.° de lote LP09077) en Sanofi-Aventis a partir de líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO)/GS Lonza transfectadas de manera estable. Ambos Ab se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía de afinidad sobre proteína A-sefarosa y posteriormente cromatografía de intercambio aniónico según procedimientos estándares. Se llevó a cabo una etapa de cromatografía adicional sobre hidroxiapatita cerámica. Todas las preparaciones se almacenaron en 1xPBS a 4 °C y se sometieron a prueba para determinar niveles de endotoxina bajos usando el método LAL cinético. El clon C4 de anticuerpo anti-actina era de Millipore (n.° de ref. MAB1501). El Ab de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (PO) era de Jackson Immunoresearch (n.° de ref. 115-035-003).

Inducción de fosforilación

Se colocaron en placas células MDA-MB-231 en medio completo en discos de Petri P100 (5 placas por muestra) a 3 x 10^6 células por placa y se incubaron durante 48 h a 37 °C en una incubadora de CO_2. Las células se privaron de suero durante 18 h y posteriormente se trataron con 10 µg/mL de hu2H11 o hu2H11-R35/R74 o con EphrinA1/Fc a 2 µg/mL 10 min a 2 h a 37 °C.

Inhibición de la fosforilación

Se incubaron células MDA-MB-231 o NCI-H1299 privadas de suero con chKTI, hu2H11 o hu2H11R35R74 (10 µg/mL) 1 h a 37 °C. A continuación, se agregó 1 µg/mL de EphrinA1/Fc y las células se incubaron 10-30 min adicionales a 37 °C.

Preparación de extractos celulares

Se recogieron muestras celulares sobre hielo mediante raspado, se transfirieron a tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron 5 min a 1300 rpm. Después de un lavado con 1 x de disolución salina tamponada con fosfato (PBS; n.° de Invitrogen 14190), las células se resuspendieron en 300 µL de tampón de lisis (n.° de ref. de Biosource FNN0011) complementado improvisadamente con 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, por sus siglas en inglés), 1 x cóctel inhibidor de proteasa (n.° de ref. de Sigma P2714) y 1 x inhibidor de fosfatasa Halt (n.° de ref. de Pierce 78420). Los extractos celulares se mantuvieron sobre hielo 45 min con ocasional agitación vorticial, se centrifugaron 10 min a 15000 rpm y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso adicional. La concentración proteica se determinó mediante el método de ácido bicinconínico (BCA) usando un kit de Pierce (n.° de ref. 23227).

Inmunoprecipitación

Se llevó a cabo una etapa de prelimpieza de los extractos celulares (0,3-0,5 mg por muestra) al añadir flujo rápido de proteína G Sepharose 4 (n.° de ref. de GE Healthcare Life Sciences 17-0618-01) previamente equilibrado en tampón de lisis (1 h a 4 °C sobre un rotador). La incubación se llevó a cabo 30 min a 4 °C sobre un rotador. Las muestras se centrifugaron 2 min a 1500 rpm, se recogió el sobrenadante y se incubó durante toda la noche sobre un rotador con el clon D7 de Ab anti-EphA2 (4 µL por muestra). La inmunoprecipitación se llevó a cabo con proteína G Sepharose 4 h a 4 °C sobre un rotador. Las muestras se centrifugaron 2 min a 1500 rpm a 4 °C y se lavaron 3 veces 5 min con 100 µL de tampón de lisis. Las perlas inmunoprecipitadas se resuspendieron en 50 µL de 4 x tampón de muestra NuPAGE LDS (n.° de ref. de Invitrogen NP0007) complementado con agente reductor NuPAGE (n.° de ref. de Invitrogen NP0009), se calentaron 5 min a 95 °C, se centrifugaron 5 min 1500 rpm y se mantuvieron a -20 °C o se sometieron a electroforesis.

Inmunotransferencia

Los inmunoprecipitados o extractos celulares se cargaron sobre un gel Bis-Tris Midi al 4-12 % (n.° de Invitrogen NP0322BOX) con marcadores de peso molecular de referencia (n.° de ref. de GE healthcare Life Sciences RPN800) y se llevó a cabo la electroforesis durante 3 h a 150 V en tampón MOPS-SDS 1 x (n.° de ref. de Invitrogen NP0001). La electrotransferencia se llevó a cabo sobre membranas PVDF (n.° de ref. de Invitrogen LC2007) con un aparato i-blot™ (Invitrogen) usando el programa 3. El bloqueo de las membranas se llevó a cabo en TBST 1x (es decir, disolución salina tamponada con Tris n.° de ref. de Sigma T 5912, Tween 20 al 0,1 % n.° de ref. de Sigma P1379) complementada con seroalbúmina bovina al 5 %. El etiquetado con el clon D7 de Ab anti-EphA2 o el Ab anti-fosfotirosina 4G10 se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C en el mismo tampón. El etiquetado con el clon C4 de Ab anti-actina se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente. Después del posterior lavado de las membranas con 1 x TBST, se llevó a cabo el desarrollo de las inmunotransferencias usando el Ab anti-ratón de cabra conjugado con PO y el kit ECL de Perkin Elmer (n.° de ref. NEL 104001EA). La luminiscencia se leyó en un aparato Fuji4000.

Resultados

La inducción de la fosforilación de EphA2 mediante los Ab hu2H11 o hu2H11R35R74 se investigó en células MDA-MB231 usando EphrinA1/Fc recombinante como testigo positivo. Los resultados se presentan en la Figura 4. No se pudo detectar ninguna inducción de fosforilación con ninguno de los dos Ab después de 10 min a 2 h, mientras la EphrinA1/Fc recombinante indujo una intensa fosforilación del receptor EphA2 a los 10 min con una decaída de la señal que se inició después de 1 h y una degradación del receptor que comenzó a ser visible después de 2 h.

Se investigó la inhibición de la fosforilación de EphA2 después de la inducción mediante EphrinA1/Fc en células NCI-H1299 y MDA-MB-231. Los resultados se presentan en las Figuras 5A y 5B. En ambos casos, la preincubación de las células con cualquiera de los dos Ab inhibió la fosforilación del receptor EphA2 mediante EphrinA1/Fc.

Podemos concluir que hu2H11 y hu2H11R35R74 tienen actividad inhibidora similar sobre el receptor EphA2.

Ejemplo 3

Caracterización de la unión de anticuerpos anti-EphA2 conjugados, hu2H11R35R74 y hu2H11.

La interacción de los anticuerpos anti-EphA2 hu2H11 y hu2H11R35R74, ya sea no conjugados o conjugados con DM4 con el enlazador PEG4-NHAc, con EphA2-Fc inmovilizado se monitoreó mediante detección de resonancia en plasmones superficiales usando un instrumento BIAcore 3000 (GE healthcare, n.° CH321). EphA2-Fc (10 µg/ml; tampón acetato

pH = 4,5) se acopló a la matriz de un chip sensor C1 (GE healthcare BR-1005-40) a 10 µl/min usando un protocolo de acoplamiento por amina estándar con EDC (N-etil-N'-[dimetilaminopropil]carbodiimida)/NHS (N-hidroxisuccinimida). La densidad se controló a un nivel de respuesta aumentado de ~100 unidades de respuesta (RU, por sus siglas en inglés) en experimentos de unión cinéticos. Las IgG se diluyeron en 0,01 M de Hepes, pH 7,4 que contenía 0,15 M de NaCl, 3mM de EDTA y P20 al 0,005 %. Las diluciones posteriores se hicieron en el mismo tampón. Todos los experimentos de unión se llevaron a cabo a 25 °C con concentraciones de IgG típicamente que variaban de 50 a 0,2 nM a una velocidad de flujo de 50 µl/min.

Los datos se recogieron durante aproximadamente 12 min (2 min de tiempo de asociación y 10 min de tiempo de disociación) e impulso de 1 min a 30 µl/min de 1M de NaCl, se usaron 50 mM de NaOH para regenerar la superficie. Las IgG también se hicieron fluir sobre una célula no revestida y los sensogramas de las pasadas en blanco se restaron de los obtenidos con los chips acoplados a EphA2-Fc. Los datos se ajustaron a un modelo de unión 1:1 Langmuir con deriva del valor inicial. Este algoritmo calcula la k_{on} y la k_{off}, a partir de las cuales se deduce la constante de disociación en equilibrio aparente K_D, como la relación entre las dos constantes de velocidad (k_{off}/k_{on}). Los valores obtenidos se indican en la Tabla I.

La constante de afinidad se midió primero con hu2H11 y hu2H11R35R74 no conjugados. El análisis de los datos de unión de hu2H11 a EphA2-Fc proporcionan una K_D de 0,30 nM; este valor fue similar a la K_D de hu2H11R35R74 (0,22 nM). Sin embargo, cuando se usaron anticuerpos conjugados en el ensayo, los resultados fueron considerablemente diferentes: el hu2H11 conjugado con una relación entre fármaco y anticuerpo alta tal como 7,5 exhibió una K_D aumentada 5,4 veces, cuando se comparó con el anticuerpo no conjugado (1,62 nM con respecto a 0,30 nM). Por otro lado, la K_D de hu2H11R35R74 conjugado con una relación entre fármaco y anticuerpo de 7,4 no fue diferente de la del anticuerpo no conjugado (0,27 nM con respecto a 0,22 nM). Además, la K_D no fue significativamente diferente para las relaciones entre fármaco y anticuerpo de 5,6 a 8,4.

Concluimos que la afinidad del anticuerpo 2H11R35R74 no se ve afectada por la conjugación, incluso a relaciones entre fármaco y anticuerpo altas.

Ejemplo 4

Inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan EphA2 mediante 2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4 humanizado

Inhibición de células tumorales Lovo

Se colocaron en placas células tumorales Lovo (2000 por pocillo) en placas de cultivo tisular de 96 pocillos en medios que contenían suero completos. Los conjugados diluyeron en serie y se agregaron a pocillos por triplicado a concentraciones que variaban entre 10^{-7} y 10^{-12} M. Las células se cultivaron a 37 °C/CO_2 al 5 % en presencia de los conjugados de anticuerpo-compuesto citotóxico durante 5 días, después de este tiempo se llevó a cabo un ensayo de 4 h WST8 según las instrucciones del fabricante (Dojindo Cell Counting Kit-8, n.° de cat. CK04) para evaluar la supervivencia y el crecimiento celular. Las muestras en blanco con reactivos sin células se restaron de las lecturas de los pocillos de prueba y los datos se graficaron como fracciones de supervivencia obtenidas al dividir las lecturas de las células tratadas con conjugado entre el promedio de lecturas de los pocillos testigo de células tratadas con vehículo.

La potencia citotóxica de dos lotes de hu2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4 a relaciones altas de maitansina/anticuerpo (6,70 D/A y 7,00 D/A) se compararon con la de un conjugado de hu2H11 natural-PEG4-Mal-DM4 que tenía una relación entre maitansina/anticuerpo comparable (6,99 D/A). Como puede observarse en la Figura 7, los dos conjugados hu2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4 exhibieron potencia más alta que el conjugado correspondiente del hu2H11 natural contra la línea celular Lovo positiva para EphA2 (Tabla II).

Ejemplo 5

Inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan EphA2 mediante 2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 humanizado

Inhibición del crecimiento de MDA-MB231 y SKMEL28

Las células en fase exponencial de crecimiento se tripsinizaron y resuspendieron en su respectivo medio de cultivo (DMEM/F12 Gibco n.° 21331; SVF al 10 % Gibco n.° 10500-056; 2nM de Glutamina Gibco n.° 25030 para las células MDA-MB231; DMEM (Gibco n.° 11960) SVF al 10 % Gibco n.° 10500-056; 2nM de Glutamina Gibco n.° 25030 para las células SKMEL-28). La suspensión celular se distribuyó en placas de cultivo de 96 pocillos Cytostar (GE Healthcare Europe, n.° RPNQ0163) en medios que contenían suero completos a una densidad de 5000 células/pocillo (MDA-MB231, SKMEL-28). Después de revestimiento durante 4 horas, se agregaron diluciones en serie de los conjugados a pocillos por triplicado a concentraciones que variaban entre 10^{-7} y 10^{-12} M. Las células se cultivaron a 37 °C/CO_2 al 5 % en presencia de los conjugados de anticuerpo-compuesto citotóxico durante 3 días. El 4° día, se agregaron 10 µl de una disolución de 14C timidina (0,1 µCi/pocillo (Perkin Elmer n.° NEC56825000) a cada pocillo. La captación de 14C timidina se midió 96 horas después del inicio del experimento con un contador radioactivo microbeta (Perkin Elmer). Las muestras en blanco con reactivos sin células se restaron de las lecturas de los pocillos de prueba y los datos se graficaron como fracciones de supervivencia obtenidas al dividir las lecturas de las células tratadas con conjugado entre el promedio de lecturas de los pocillos testigo de células tratadas con vehículo. En algunos experimentos, se agregó anticuerpo no conjugado (2H11 o 2H11R35R74) a los pocillos a una concentración de 1 µM en el inicio del experimento y se midió la inhibición de la proliferación como se describió anteriormente.

Resultados

Los resultados que se indican en la tabla III sugiere que 2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4, así como los conjugados 2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4 son mejores que los conjugados anteriores en relación con la inhibición de la proliferación *in vitro* de las células MDA-MB231 y la selectividad *in vitro* contra células menos antígeno (SKMEL-28)

Ejemplo 6

Estudio de farmacocinética

El presente estudio se diseñó para evaluar el comportamiento farmacocinético del conjugado hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 (DAR = 5,5) en comparación con el conjugado hu2H11-SPDB-DM4 (DAR = 3,9) en ratones CD-1. Los animales recibieron 20 mg/kg mediante vía IV de cada conjugado y se recogió sangre después de 0, 8, 24, 48, 72, 120, 168, 240, 336, 504, 672 h de la inyección. Se midieron los niveles en plasma de los conjugados de anticuerpo y fármaco para establecer los parámetros farmacocinéticos de dosis simple básicos en condiciones estándares. Las concentraciones en plasma de los conjugados y su componente de anticuerpo (anticuerpo total, una suma del anticuerpo conjugado y todo anticuerpo desconjugado) se midieron mediante técnicas ELISA específicas.

Los parámetros farmacocinéticos relacionados con el aclaramiento para el componente de anticuerpo de hu2H11-SPDB-DM4 (total) se calcularon como Cl (aclaramiento) de 0,00043 L/h/kg, T1/2 (semivida terminal) de 160 h, AUC 0-inf (área debajo de las curvas de concentración-tiempo desde el tiempo cero hasta infinito) de 47 000 000 ng.h/mL, Vdss (volumen de distribución en estado estacionario) de 0,095 L/kg y C0 (concentración en tiempo 0) de 270 000 ng/mL.

Los parámetros farmacocinéticos para el conjugado hu2H11-SPDB-DM4 se calcularon como Cl de 0,00070 L/h/kg, T1/2 de 87 h, AUC 0-inf de 28 000 000 ng.h/mL, Vdss de 0,080 L/kg y C0 de 360 000 ng/mL.

Los parámetros PK para el componente de anticuerpo de hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 (total) fueron Cl de 0,00027 L/h/kg, T1/2 de 190 h, AUC 0-inf de 73 000 000 ng.h/mL, Vdss de 0,068 L/kg y C0 de 530 000 ng/mL.

Finalmente, el conjugado hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 exhibió los valores: 0,00036 L/h/kg para aclaramiento, T1/2 de 150 h, AUC 0-inf de 56 000 000 ng.h/mL, Vdss de 0,069 L/kg y C0 de 600 000 ng/mL.

En conclusión, el conjugado hu2H11-SPDB-DM4 se aclara más rápidamente que hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4. Además, en comparación con hu2H11-SPDB-DM4, hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 exhibió una exposición mejor (AUC 0-inf) y una separación más estrecha entre las curvas de anticuerpo total conjugado y anticuerpo total (comparar las Figuras 7 y 8).

Ejemplo 7

Efecto antitumoral del conjugado hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 y hu2H11-PEG4-NHAc-DM4 contra un tumor de colon primario, CR-LRB-004P implantado en ratones SCID hembra

Materiales y métodos

Para la evaluación de la actividad antitumoral de los conjugados, los animales se pesaron a diario y los tumores se midieron de 2 veces por semana mediante calibre. Los pesos tumorales se calcularon usando la fórmula masa (mg) = [longitud (mm) × ancho $(mm)^2$]/2. La evaluación de la actividad antitumoral se hizo a la dosis no tóxica más alta (HNTD, por sus siglas en inglés).

Una dosificación que producía una pérdida de peso corporal (bwl, por sus siglas en inglés) de 20 % en el nadir (media de grupo) o 10 % o más muertes por fármaco, se consideró una dosificación excesivamente tóxica. Los pesos corporales de los animales incluían los pesos tumorales. Los criterios de valoración de la eficacia primaria son □ΔT/ΔC, porcentaje de mediana de regresión, regresiones parciales y completas (PR y CR, por sus siglas en inglés) y sobrevivientes sin tumor (TFS, por sus siglas en inglés).

Los cambios en el volumen del tumor de cada tumor para cada tratado (T) y testigo (C) se calcularon al restar el volumen del tumor en el día del primer tratamiento (día de estadificación) del volumen del tumor en el día de la observación especificado. La mediana ΔT se calcula para el grupo tratado y la mediana ΔC se calcula para el grupo testigo. A continuación, se calcula la relación ΔT/ΔC y se expresa como un porcentaje:

$$\% \Delta T/\Delta C = \frac{mediana(Tt - T0)}{mediana(Ct - C0)} \times 100$$

La dosis se considera terapéuticamente activa cuando ΔT/ΔC es menor que 40 % y muy activa cuando ΔT/ΔC es menor que 10 %. Si la ΔT/ΔC es menor que 0, la dosis se considera altamente activa y se registra la fecha del porcentaje de regresión (ref 1):

% de regresión tumoral: se define como el % de disminución del volumen tumoral en el grupo tratado en un día de observación especificado en comparación con su volumen en el primer día del primer tratamiento.

En un punto de tiempo específico y para cada animal, se calcula el % de regresión. A continuación, se calcula la mediana del % de regresión para el grupo.

$$\%\ \text{de regresión (a t)} = \frac{\text{volumen}_{(0)} - \text{volumen}_{t}}{\text{volumen}_{(0)}} \times 100$$

Regresión parcial (PR): Las regresiones se definen como parciales si el volumen tumoral disminuye hasta el 50 % del volumen tumoral en el inicio del tratamiento.

Regresión completa (CR): La regresión completa se alcanza cuando el volumen tumoral = 0 mm^3 (se considera CR cuando el volumen tumoral no se puede registrar).

TFS: Sin tumor se define como los animales con tumores indetectables al finalizar el estudio (>100 días después del último tratamiento)

Resultados

El efecto antitumoral del conjugado hu2H11-PEG4-NHAc-DM4 y hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 se evaluó a 2 niveles de dosis contra un tumor de colon primario, CR-LRB-004P, que expresa intensamente la diana, implantado S.C. en ratones SCID hembra. El grupo testigo se dejó sin tratar. Las dosis se expresaron en milígramos de proteína por kilogramo. Se administró hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 a 40 y 10 mg/kg, mediante una inyección de bolo intravenosa (IV), el día 15. Para proporcionar la dosis equivalente de DM4, se administró hu2H11-PEG4-NHAc-DM4 a 44 y 11 mg/kg.

Como se muestra en la Tabla V, usando una pauta de administración simple en el tumor CR-LRB-004P, hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 fue activo a 40 y 10 mg/kg con una ΔT/ΔC de 28 y 39 % respectivamente, mientras que hu2H11-PEG4-NHAc-DM4 fue activo solo a 44 mg/kg con una ΔT/ΔC de 26 %. A 10 mg/kg, hu2H11-PEG4-NHAc-DM4 no fue activo en este modelo.

A partir de estos resultados, el conjugado hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 a una dosis más baja exhibió una actividad mejor que el conjugado hu2H11-PEG4-NHAc-DM4.

Ejemplo 8

Impacto de la DAR sobre la actividad antitumoral de hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 contra el adenocarcinoma prostático PC-3 en ratones SCID hembra

Se evaluó el efecto de la DAR en la actividad antitumoral del conjugado de anticuerpo y fármaco hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 al comparar dos dosis eficaces bajas a seis relaciones diferentes entre fármaco y anticuerpo (DAR) en tumores prostáticos PC-3 implantados S.C. en SCID hembra. El grupo testigo se dejó sin tratar. Las dosis se expresaron en milígramos de proteína por kilogramo La DAR se determinó mediante un método UV. Se administró hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 a 10 y 5 mg/kg con DAR de 3,4, 4,4, 5,9, 6,2, 7,4 y 8,4, respectivamente, mediante una inyección de bolo intravenosa (IV), el día 16.

Materiales y métodos

Para la evaluación de la actividad antitumoral de los conjugados, los animales se pesaron a diario y los tumores se midieron de 2 veces por semana mediante calibre. Los pesos tumorales se calcularon usando la fórmula masa (mg) = [longitud (mm) × ancho $(mm)^2$]/2. La evaluación de la actividad antitumoral se hizo a la dosis no tóxica más alta (HNTD, por sus siglas en inglés).

Una dosificación que producía una pérdida de peso corporal (bwl, por sus siglas en inglés) de 20 % en el nadir (media de grupo) o 10 % o más muertes por fármaco, se consideró una dosificación excesivamente tóxica. Los pesos corporales de los animales incluían los pesos tumorales. Los criterios de valoración de la eficacia primaria son □ΔT/ΔC, porcentaje de mediana de regresión, regresiones parciales y completas (PR y CR, por sus siglas en inglés) y sobrevivientes sin tumor (TFS, por sus siglas en inglés).

Los cambios en el volumen del tumor de cada tumor para cada tratado (T) y testigo (C) se calcularon al restar el volumen del tumor en el día del primer tratamiento (día de estadificación) del volumen del tumor en el día de la

observación especificado. La mediana ΔT se calcula para el grupo tratado y la mediana ΔC se calcula para el grupo testigo. A continuación, se calcula la relación ΔT/ΔC y se expresa como un porcentaje:

$$\% \Delta T/\Delta C = \frac{mediana(Tt - T0)}{mediana(Ct - C0)} \times 100$$

La dosis se considera terapéuticamente activa cuando ΔT/ΔC es menor que 40 % y muy activa cuando ΔT/ΔC es menor que 10 %. Si la ΔT/ΔC es menor que 0, la dosis se considera altamente activa y se registra la fecha del porcentaje de regresión (ref 1):

% de regresión tumoral: se define como el % de disminución del volumen tumoral en el grupo tratado en un día de observación especificado en comparación con su volumen en el primer día del primer tratamiento.

En un punto de tiempo específico y para cada animal, se calcula el % de regresión. A continuación, se calcula la mediana del % de regresión para el grupo.

$$\% \text{ de regresión (a t)} = \frac{\text{volumen}_{t0} - \text{volumen}_{t}}{\text{volumen}_{t0}} \times 100$$

Regresión parcial (PR): Las regresiones se definen como parciales si el volumen tumoral disminuye hasta el 50 % del volumen tumoral en el inicio del tratamiento.

Regresión completa (CR): La regresión completa se alcanza cuando el volumen tumoral = 0 mm^3 (se considera CR cuando el volumen tumoral no se puede registrar).

TFS: Sin tumor se define como los animales con tumores indetectables al finalizar el estudio (>100 días después del último tratamiento)

Resultados

Como se ilustra en la tabla VI, usando una pauto de administración simple, hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 a 10 mg/kg exhibió actividad desde una DAR de 4,4 hasta la DAR más alta de 8,4.

A 5 mg/kg, hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 exhibió actividad desde una DAR de 5,9 hasta la DAR más alta de 8,4.

En conclusión, la DAR tiene un efecto sobre la actividad en el tumor de hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 y se puede deducir a partir de estos resultados que la DAR óptima de hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 es al menos igual a 5,9.

Ejemplo 9

Impacto de la DAR sobre los parámetros PK de hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4.

Se evaluaron las propiedades farmacocinéticas de hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 a diferentes relaciones fármaco-anticuerpo (DAR) en ratones CD-1 macho después de una administración intravenosa simple de 20 mg/kg de conjugado. Se midieron los niveles en plasma de los conjugados para establecer los parámetros farmacocinéticos de dosis simple básicos en condiciones estándares. Los parámetros PK se compararon con los del anticuerpo genitor no conjugado. Las concentraciones en plasma de los conjugados y su componente de anticuerpo (anticuerpo total, una suma del anticuerpo conjugado y todo anticuerpo desconjugado) se midieron mediante técnicas ELISA específicas.

Los resultados (véanse las Figures 9A y 9B) muestran una correlación inversa entre los valores de DAR y la exposición a los componentes de anticuerpo totales con valores de AUC 0-inf de 83 000 000, 61 000 000, 48 000 000, 46 000 000, 41 000 000 y 27 000 000 ng·h/mL para la DAR de 0, 3,4, 4,3, 5,9, 6,6 y 7,4, respectivamente.

De manera similar, existe una correlación inversa entre los valores de DAR y la exposición al conjugado con valores de AUC 0-inf de 39 000 000, 30 000 000, 27 000 000, 29 000 000 y 20 000 000 ng·h/mL para la DAR de 3,4, 4,3, 5,9, 6,6 y 7,4, respectivamente.

Existe una correlación perfecta entre los valores de DAR y la eliminación del componente de anticuerpo con valores de Cl de 0,00024, 0,00033, 0,00042, 0,00043, 0,00049 y 0,00074 L/h/kg para la DAR de 0, 3,4, 4,3, 5,9, 6,6 y 7,4, respectivamente.

De manera similar, existe una correlación casi perfecta entre los valores de DAR y la eliminación del conjugado con valores de Cl de 0,00051, 0,00066, 0,00075, 0,00069, 0,00099 L/h/kg para la DAR de 3,4, 4,3, 5,9, 6,6 y 7,4, respectivamente.

En conclusión, la DAR tiene un impacto sobre los parámetros PK con una exposición disminuida y una eliminación aumentada cuando aumenta la DAR.

Según los resultados de la evaluación de eficacia y PK, el DAR óptimo se incluirá entre 5,9 y 7,4.

Ejemplo 10

Evaluación de hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 contra el adenocarcinoma prostático PC-3 en ratones SCID hembra

El efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo y fármaco hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 se evaluó a 8 niveles de dosis contra un tumor prostático medible PC-3, que expresa intensamente la diana, implantado S.C. en ratones SCID hembra. El grupo testigo se dejó sin tratar. Las dosis se expresan en milígramos de proteína por kilogramo

Se administraron a 160, 120, 80, 40, 20, 10, 5 y 2,5 mg/kg, mediante una inyección de bolo intravenosa (IV) el día 17.

Materiales y métodos

Para la evaluación de la actividad antitumoral de los conjugados, los animales se pesaron a diario y los tumores se midieron de 2 veces por semana mediante calibre. Los pesos tumorales se calcularon usando la fórmula masa (mg) = [longitud (mm) × ancho (mm)^2]/2. La evaluación de la actividad antitumoral se hizo a la dosis no tóxica más alta (HNTD, por sus siglas en inglés).

Una dosificación que producía una pérdida de peso corporal (bwl, por sus siglas en inglés) de 20 % en el nadir (media de grupo) o 10 % o más muertes por fármaco, se consideró una dosificación excesivamente tóxica. Los pesos corporales de los animales incluían los pesos tumorales. Los criterios de valoración de la eficacia primaria son □ΔT/ΔC, porcentaje de mediana de regresión, regresiones parciales y completas (PR y CR, por sus siglas en inglés) y sobrevivientes sin tumor (TFS, por sus siglas en inglés).

Los cambios en el volumen del tumor de cada tumor para cada tratado (T) y testigo (C) se calcularon al restar el volumen del tumor en el día del primer tratamiento (día de estadificación) del volumen del tumor en el día de la observación especificado. La mediana ΔT se calcula para el grupo tratado y la mediana ΔC se calcula para el grupo testigo. A continuación, se calcula la relación ΔT/ΔC y se expresa como un porcentaje:

$$\% \ \Delta T/\Delta C = \frac{mediana(Tt - T0)}{mediana(Ct - C0)} \times 100$$

La dosis se considera terapéuticamente activa cuando ΔT/ΔC es menor que 40 % y muy activa cuando ΔT/ΔC es menor que 10 %. Si la ΔT/ΔC es menor que 0, la dosis se considera altamente activa y se registra la fecha del porcentaje de regresión (ref 1):

% de regresión tumoral: se define como el % de disminución del volumen tumoral en el grupo tratado en un día de observación especificado en comparación con su volumen en el primer día del primer tratamiento.

En un punto de tiempo específico y para cada animal, se calcula el % de regresión. A continuación, se calcula la mediana del % de regresión para el grupo.

$$\% \text{ de regresión (a t)} = \frac{\text{volumen}_{t0} - \text{volumen}_{t}}{\text{volumen}_{t0}} \times 100$$

Regresión parcial (PR): Las regresiones se definen como parciales si el volumen tumoral disminuye hasta el 50 % del volumen tumoral en el inicio del tratamiento.

Regresión completa (CR): La regresión completa se alcanza cuando el volumen tumoral = 0 mm^3 (se considera CR cuando el volumen tumoral no se puede registrar).

TFS: Sin tumor se define como los animales con tumores indetectables al finalizar el estudio (>100 días después del último tratamiento)

Resultados

Con una pauta de administración simple, se halló que la dosis de conjugado más alta evaluada (160 mg/kg) era tóxica, indujo pérdida de peso corporal y muertes relacionadas con el fármaco.

Como se ilustra en la tabla VIII a la HNTD (120 mg/kg) y otras dosis más bajas, el compuesto fue altamente activo. Para todas las dosis excepto para 2,5 mg/kg, hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 indujo regresiones parciales y para 120, 80 y 20 mg/kg indujo regresiones completas. Además, el modelo tumoral era caquéxico y la administración del compuesto redujo la pérdida de peso corporal en el nadir en comparación con el testigo

En conclusión, hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 exhibió una actividad alta con una buena dosis-efecto sobre el modelo tumoral prostático PC-3.

Ejemplo 11

Mapeo del epítopo e identificación del parátopo mediante determinación estructural de la estructura de cristal del dominio extracelular del receptor EphA2 en complejo con el fragmento Fab de hu2H11-R35-R74 a resolución 2,1 Å.

Material y métodos

Se llevaron a cabo ensayos de cristalización iniciales en el dominio extracelular glucosilado del receptor EphA2-Fc en complejo con el Fab de hu2H11R35-74. Se obtuvieron cristales solo en presencia de tripsina. Estos cristales se analizaron y el mapeo peptídico mostró que contenían el Fab, alguna porción del dominio de extremo N del dominio extracelular de EphA2 y de Fc. Se produjo otro lote de complejo, esta vez usando dominio extracelular aglucosilado del dominio extracelular del receptor EphA2 con etiqueta His terminal, en complejo con el fragmento Fab recombinante de hu2H11R34-R74-His. Ambas construcciones del receptor EphA2 proporcionan la misma estructura del complejo entre el receptor EphA2 y hu2H11R34-R75.

La región extracelular del receptor EphA2 está compuesta por 4 dominios y se ha demostrado que es muy flexible: el LBD (dominio de unión a ligando), el CRD (dominio rico en cisteína) y dos repeticiones de fibronectina, nFN3 y cFN3. Los diferentes dominios se usaron como modelos de búsqueda para el cálculo del reemplazo molecular ya sea solos o en combinación; también se produjeron y usaron modelos de los dominios variables y constantes de Fab, así como un modelo del Fc (pdb código 1IGT) para resolver la estructura de cristal.

Se sometieron a prueba diversas condiciones de cristalización y se usó un conjunto de datos a 2,1 Å recogidos en el ESRF para resolver la estructura del complejo. Nos ha permitido analizar la interfaz entre el dominio extracelular del receptor EphA2 y hu2H11R34-R74.

Aunque la longitud completa de la región extracelular de EphA2 (25-534) estuvo presente inicialmente, los cristales contenían solo los dominios LBD y CRD de la proteína (residuos 25-325 o 327 dependiendo del cristal (aquí se usa una numeración secuencial).

Resultados

Mapeo de epítopos

Figura 10: ilustra el mapeo del epítopo del dominio extracelular del receptor EphA2 para hu2H11R34-R75 (los residuos del epítopo se definen como los residuos que contienen átomos que están a 4 Å de cualquier átomo de los residuos de CDR del fragmento Fab de hu2H11R34-R74).

El epítopo del dominio extracelular del receptor EphA2 cuando se une al fragmento Fab de hu2H11R34-R74 es un epítopo conformacional que incluye los residuos del dominio LBD Gly49, Lys50, Gly51, Asp53, Cys70, Asn71, Val72, Met73, Ser74, Gly75, Gln77, Phe108, Pro109, Gly110, Gly111, Ser113 y Ser114.

Figura 11: muestra los residuos del dominio extracelular del receptor EphA2 que son parte del epítopo (representados en gris oscuro); los residuos en gris claro no son visibles en las estructuras de cristal.

Figura 12 A: representa la estructura general del complejo y la Figura 11B es una ampliación de la parte con las dos mutaciones de introducidas en la posición 35 y 74.

La conjugación de hu2H11 se produce en los residuos lisina superficiales. Dos de estos se mutaron en arginina. Estos dos residuos, R74 de cadena pesada y R35 de cadena ligera se representan en la Figura 12B:

R74 se encuentra próximo a la interfaz, orientado de manera opuesta al dominio extracelular del receptor EphA2 y a aproximadamente 10 Å del dominio extracelular más cercano

R35 es uno de los residuos de parátopo y forma una unión H con Asp53 del dominio extracelular del receptor EphA2. Sería muy probable que un residuo lisina hiciera las mismas interacciones con el antígeno y su conjugación claramente sería nociva para la unión al anticuerpo.

Análisis del parátopo

En la interfaz entre el dominio extracelular del receptor EphA2 y hu2H11R35-R74 no participa todo el bucle de CDR. Como puede observarse en la Figura 12, participan en la unión principalmente las CDR de cadena pesada. Esto sugiere que se pueden introducir cambios en las CDR de hu2H11, particularmente en la cadena ligera, pero no exclusivamente, sin afectar de manera adversa la unión al receptor EphA2. El bucle L3 de la cadena ligera no participa en absoluto en la interfaz, mientras que solo un residuo en el extremo de L1 (Arg35) interactúa con el dominio de extracelular de EphA2. Esto implica que cambios en el bucle L3 no impactarían la unión a EphA2 y que el bucle L1 debería tolerar mutaciones/inserciones de residuos aminoacídicos, siempre que no desestabilicen la conformación y orientación del residuo Arg35.

En el parátopo de hu2H11-R35-R74 para el receptor EphA2 participan los siguientes residuos de la cadena ligera: Arg35 del bucle L1, Tyr54, Arg58 y Asp60 de L2. En la cadena pesada participan los siguientes residuos: Thr30, Ala31, Tyr32 y Tyr33 del bucle H1, Asn52, Tyr54, Asn55 y Phe57 de H2 y Glu99, Phe100, Tyr101, Gly102, Tyr103 y Tyr105 de H3. Se usa un esquema de numeración secuencial para las cadenas ligera y pesada.

Podría ser posible mejorar la afinidad del anticuerpo hu2H11-R35-R74 por el receptor EphA2 usando los datos estructurales y, por ejemplo, la estrategia descrita en Clark et al (Protein Science (2006), 15:949-960) o Lippow et al (Nature Biotech (2007), 10:1171-76).

Bucle H1: podría ser posible crear interacciones adicionales, por ejemplo, con Asp76, mediante mutación sensata de Thr H28.

En las interacciones entre la cadena ligera y el receptor Epha2 no participan residuos. Sin embargo, crear nuevas interacciones probablemente requería inserciones significativas en el bucle L1 o L3.

Las interacciones entre estos bucles y el receptor EphA2 se produce a través de residuos bastante grandes o largos: cualquier cambio en este entorno podría resultar en la pérdida de la afinidad de unión.

Esta estructura de rayos X destaca los residuos de las CDR que se pueden mutar y que esto no afectaría la unión a EphA2.

En las siguientes descripciones, los residuos del parátopo no se deben modificar, a menos que se especifique para conservar la unión al receptor EphA2. También se entiende que las mutaciones en las CDR no afectarían la conformación y orientación de los residuos del parátopo para conservarla unión al receptor EphA2. La numeración de los residuos es secuencial y no sigue las convenciones de Kabbat, según se usan en Al-Lazikani ((1997) J. Mol. Biol. 273, 927-948). “X” representa “cualquier residuo”, mientras que “-” indica que no se debe hacer ninguna modificación en esta posición.

En la L1 de CDR (SEQ ID °4), excepto D 33 y R35, no hay restricción en la secuencia siempre que la longitud del bucle se conserve y adopte la estructura canónica L1-kappa4 según se describe en J. Mol. Biol. (1992) 227: 799-817, J. Mol. Biol. (1992) 227: 776-798 y en Al-Lazikani et al (mencionado supra). Esto significa que los ángulos de torsión de las uniones peptídicas están dentro del intervalo aceptado definido en la Figura 5 de Al-Lazikani et al (citado supra).

Arg35 se ha mutado para evitar la conjugación en este residuo. Sin embargo, un Lys haría las mismas interacciones con EphA2 y, por lo tanto, se pronostica que el anticuerpo hu2H11 genitor hará la misma interacción con el receptor EphA2 y se unirá con el mismo epítopo del receptor EphA2.

Un Asp es el residuo preferido en la posición 33.

Numeración	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Secuencia inicial	S	Q	S	L	I	H	S	D	G	R	T	Y
Mutaciones sugeridas	X	X	X	X	X	X	X	D	X	R/K	X	X

En la L2 de CDR (SEQ ID N°5) ambos Leu podrían reemplazarse por una sustitución conservadora tal como Ile. Val podría reemplazarse por Ile (menos favorable). El primer Ser del bucle se puede reemplazar por cualquier residuo, mientras que el segundo podría reemplazarse por otro residuo hidrófilo/cargado. El residuo Tyr (54) no se debería cambiar.

Numeración	54	55	56	57	58	59	60	61
Secuencia inicial	Y	L	V	S	R	L	D	S
Mutaciones sugeridas	-	L/I	V/i	X	-	L/I	-	S/T/D/N/E/Q

En la L3 de CDR (SEQ ID N°6) no hay restricción en la secuencia ni longitud del bucle, siempre que adopte la estructura canónica L3-kappa1 según se describe en Al-Lazikani et al (citado supra).

Numeración	94	95	96	97	98	99	100	101	102
Secuencia inicial	W	Q	G	S	H	F	P	R	T
Mutaciones sugeridas	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Alrededor de la H1 de CDR (SEQ ID N°1) GYTFTAYY) el primer Thr del bucle (Thr 28) es una posible posición para la maduración de la afinidad.

Numeración	26	27	28	29	30	31	32	33
Secuencia inicial	G	Y	T	F	T	A	Y	Y
Mutaciones sugeridas	-	-	Especial	-	-	-	-	-

En la H2 de CDR (SEQ ID N°2) el Phe y el Tyr se pueden reemplazar por cualquier residuo aromático (F/Y/W).

Numeración	52	53	54	55	56	57
Secuencia inicial	N	P	Y	N	G	F
Mutaciones sugeridas	-	-	Y/F/W	-	-	F/Y/W

En la H3 de CDR (EFYGYRYFDV) no se debería hacer ningún cambio en este bucle.

Numeración	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
Secuencia inicial	E	F	Y	G	Y	R	Y	F	D	V
Mutaciones sugeridas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sitio de unión a Ephrin

El anticuerpo hu2H11 muestra actividad funcional: inhibe la unión a ephrin-A1 y la fosforilación inducida por ephrin-A1 de EphA2. Se ha publicado la estructura de los dominios LBD y CRD del receptor EphA2 en complejo con ephrinA1 (PDB código 3MBW). Cuando se superpone esta estructura con la de EphA2 en complejo con el fragmento Fab de hu2H11R35R74, aparece de manera clara que la cadena ligera del fragmento Fab de 2H11R35R74 se superpone con el área de unión de ephrin-A1 en EphA2 y, por lo tanto, confirma la naturaleza competitiva del anticuerpo hu2H11.

Ejemplo 12

Inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan EphA2 mediante conjugados de 2H11R35R74-DM4 humanizados

Las células MDA-MB231 en fase exponencial de crecimiento se tripsinizaron y resuspendieron en medio de cultivo (DMEM/F12 Gibco n.° 21331; SVF al 10 % Gibco n.° 10500-056; 2nM de Glutamina Gibco n.°). La suspensión celular se distribuyó en placas de cultivo de 96 pocillos Cytostar (GE Healthcare Europe, n.° RPNQ0163) en medios que contenían suero completo a una densidad de 5000 células/pocillo. Después de revestimiento durante 4 horas, se agregaron diluciones en serie de los conjugados a pocillos por triplicado a concentraciones que variaban entre 10^{-7} y 10^{-12} M. Las células se cultivaron a 37 °C/CO_2 al 5 % en presencia de los conjugados de anticuerpo-compuesto citotóxico durante 3 días. El 4° día, se agregaron 10 µl de una disolución de 14C timidina (0,1 µCi/pocillo (Perkin Elmer n.° NEC56825000) a cada pocillo. La captación de 14C timidina se midió 96 horas después del inicio del experimento con un contador radioactivo microbeta (Perkin Elmer). Las muestras en blanco con reactivos sin células se restaron de las lecturas de los pocillos de prueba y los datos se graficaron como fracciones de supervivencia obtenidas al dividir las lecturas de las células tratadas con conjugado entre el promedio de lecturas de los pocillos testigo de células tratadas con vehículo. En algunos experimentos, se agregó anticuerpo no conjugado (2H11 o 2H11R35R74) a los pocillos a una concentración de 1 µM en el inicio del experimento y se midió la inhibición de la proliferación como se describió anteriormente.

Resultados

Los resultados que se indican en la tabla IX sugieren que todos los conjugados de 2H11R35R74 DM4 evaluados son tan potentes como hu2H11R35R74-Peg4-AcNH-DM4 para inhibir el crecimiento de células MDA-MB231.

Ejemplo 13

Evaluación de diferentes enlazadores sobre la actividad antitumoral de conjugados de 2h11-DM4 contra adenocarcinoma de colon Lovo en ratones SCID hembra

Materiales y métodos

Para la evaluación de la actividad antitumoral de los conjugados, los animales se pesaron a diario y los tumores se midieron de 2 veces por semana mediante calibre. Los pesos tumorales se calcularon usando la fórmula masa (mg) = [longitud (mm) × ancho $(mm)^2$]/2. La evaluación de la actividad antitumoral se hizo a la dosis no tóxica más alta (HNTD, por sus siglas en inglés).

Una dosificación que producía una pérdida de peso corporal (bwl, por sus siglas en inglés) de 20 % en el nadir (media de grupo) o 10 % o más muertes por fármaco, se consideró una dosificación excesivamente tóxica. Los pesos corporales de los animales incluían los pesos tumorales. Los criterios de valoración de la eficacia primaria son □ΔT/ΔC, porcentaje de mediana de regresión, regresiones parciales y completas (PR y CR, por sus siglas en inglés) y sobrevivientes sin tumor (TFS, por sus siglas en inglés).

Los cambios en el volumen del tumor de cada tumor para cada tratado (T) y testigo (C) se calcularon al restar el volumen del tumor en el día del primer tratamiento (día de estadificación) del volumen del tumor en el día de la observación especificado. La mediana ΔT se calcula para el grupo tratado y la mediana ΔC se calcula para el grupo testigo. A continuación, se calcula la relación ΔT/ΔC y se expresa como un porcentaje:

$$\% \ \Delta T/\Delta C = \frac{mediana(Tt - T0)}{mediana(Ct - C0)} \times 100$$

La dosis se considera terapéuticamente activa cuando ΔT/ΔC es menor que 40 % y muy activa cuando ΔT/ΔC es menor que 10 %. Si la ΔT/ΔC es menor que 0, la dosis se considera altamente activa y se registra la fecha del porcentaje de regresión (ref 1):

% de regresión tumoral: se define como el % de disminución del volumen tumoral en el grupo tratado en un día de observación especificado en comparación con su volumen en el primer día del primer tratamiento.

En un punto de tiempo específico y para cada animal, se calcula el % de regresión. A continuación, se calcula la mediana del % de regresión para el grupo.

$$\% \text{ de regresión (a t)} = \frac{\text{volumen}_{t0} - \text{volumen}_{t}}{\text{volumen}_{t0}} \times 100$$

Regresión parcial (PR): Las regresiones se definen como parciales si el volumen tumoral disminuye hasta el 50 % del volumen tumoral en el inicio del tratamiento.

Regresión completa (CR): La regresión completa se alcanza cuando el volumen tumoral = 0 mm^3 (se considera CR cuando el volumen tumoral no se puede registrar).

TFS: Sin tumor se define como los animales con tumores indetectables al finalizar el estudio (>100 días después del último tratamiento)

Resultados

La actividad antitumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 2h11-DM4 con diferentes enlazadores no escindibles hu2H11-R35R74-PEG4-AcNH-DM4, hu2H11-R35R74-PEG8-AcNH-DM4, hu2H11-R35R74-PEG4-AcNMe-DM4, hu2H11-R35R74-PEG4-Allyl-DM4 y hu2H11-R35R74-Acetilo-DM4 se evaluó al comparar la misma dosis de 600 µg de DM4/kg en tumores de colon Lovo implantados S.C. en SCID hembra. El grupo testigo se dejó sin tratar. Las dosis se expresaron en microgramos de DM4 por kilogramo. Los conjugados de administraron mediante una inyección de bolo intravenosa (IV) el día 14.

Como se ilustra en la Tabla X, usando una pauta de administración simple, los cinco conjugados exhibieron la misma actividad alta sobre el modelo de tumor Lovo con una $\Delta T/\Delta C < 0$ y el mismo impacto sobre la pérdida de peso corporal (-13,3 % en el grupo testigo frente a -9,5 % a 11,2 % para los grupos tratados). El hu2H11-R35R74-PEG4-AcNH-DM4 exhibió la mejor eficacia con una regresión tumoral de 82 % y 1CR en comparación con regresiones tumorales de 72 %, 69 %, 41 % y 33 % sin CR para hu2H11-R35R74-PEG4-AcNMe-DM4, hu2H11-R35R74-Acetilo-DM4, hu2H11-R35R74-PEG4-Allyl-DM4 y hu2H11-R35R74-PEG8-AcNH-DM4, respectivamente.

TABLAS

Tabla I: Análisis Biacore de la unión de hu2H11R35R74 y conjugados de este a EphA2

Datos de cinética de unión a huEphA2-mFc (133RU) / Biacore							
Anticuerpo huEphA2	D/A	K_a (K_{on}) ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (K_{off}) (s^{-1})	K_A (M^{-1})	K_D (M)	DES. TÍP.	Relación
hu2H11	0	3.71E+06	1.10E-03	3.39E+09	2.98E-10	3.61E-11	1.0
hu2H11R35R74	0	5.25E+06	1.15E-03	4.59E+09	2.18E-10	1.13E-11	0.7
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4	5.6	4.35E+06	1.15E-03	3.80E+09	2.63E-10	***	0.9
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4	6.3	4.21E+06	1.19E-03	3.55E+09	2.82E-10	***	0.9
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4	7.4	4.47E+06	1.23E-03	3.64E+09	2.75E-10	***	0.9
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4	8.4	4.15E+06	1.11E-03	3.76E+09	2.66E-10	***	0.9
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4	9.3	3.08E+06	1.29E-03	2.38E+09	4.21E-10	***	1.4
hu2H11-PEG4-NHAc-DM4	7.5	1.49E+06	2.42E-03	6.16E+08	1.62E-09	***	5.4

Tabla II: Actividad citotóxica de hu2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4 en células Lovo

Conjugado	DAR	CI_{50} (M)
hu2H11-PEG4-Mal-DM4	6.99	1.22 E-10
hu2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4	6.70	7.96 E-11
hu2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4	7.00	1.16 E-11

Tabla III: Citotoxicidad de hu2H11R35R74 y conjugados de este en células MDA MB231 y células SKMEL-28

2H11 ADC	CI50 de MDA-MB231 (nM)	CI50 de MDA-MB231 + 2H11 no conjugado (nM)	CI50 de relación	CI50 de SKMEL28 (nM)
hu2H11-SPDB-DM4 DAR:3.93	1.1	8.1	7	8.4
hu2H11R35R74-SPDB-DM4 DAR:3.97	1.2	11.5	9	13.1
hu2H11R35R74-PEG4-Mal-DM4 DAR:6.1	0.1	25.1	228	51
hu2H11-PEG4-NHAc-DM4 DAR = 5.3	0.2	27.4	114	26
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 DAR = 5.5	0.06	80.8	1346	104.4

Tabla IV: Parámetros farmacocinéticos de conjugados tras una administración intravenosa simple de 20 mg/kg de hu2H11-SPDB-DM4 y hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 en tampón HGS a ratones CD-1. Los valores se determinaron a partir de las concentraciones en plasma medias

Administración intravenosa									
Compuesto (DAR)	Detección	C0 [ng/mL]	AUC(0-672h) [ng.h/mL]	Túlt. [hora]	AUC(0-inf) [ng.h/mL]	Extrap [%]	T1/2 [hora]	Cl [L/h/kg]	VdSS [L/kg]
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 DAR = 5.5	Total	530,000	69,000,000	672	73,000,000	4.6	190	0.00027	0.068
	Conjugado	600,000	54,000,000	672	56,000,000	3.5	150	0.00036	0,069
hu2H11-SPDB-DM4 DAR = 3.9	Total	270,000	45,000,000	672	47,000,000	3.2	160	0.00043	0.095
	Conjugado	360,000	28,000,000	672	28,000,000	0.29	87	0.00070	0,080

Tabla V: Evaluación de la actividad antitumoral del conjugado hu2H11- PEG4-NHAc -DM4 y el conjugado hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 contra tumor de colon humano avanzado en ratones SCID hembra.

Agente	Vía/ Dosificación en mL/kg por inyección	Pauta en días	Dosificación en mg/kg de proteína por inyección (mg de DM4)	Muerte por fármaco (Día de la muerte)	Bwc promedio en % por ratón en el nadir (día del nadir)	Mediana de ΔT/ΔC en % el día 21 si <0 (% de regresión)	Regresiones		Sobrevivientes sin tumores el día 30	Valor de la p bioestadístico[a]	Comentarios
							PR	CR		Día 21	
hu2H11R35 R74-PEG4-NHAc-DM4 DAR =	IV 16mL/kg	15	40 (1.6)	0/6	-14.7(25)	28	0/6	0/6	0/6	0,011	Activo
			10 (0.4)	0/6	-18.2	39	0/6	0/6	0/6	0.0174	Activo

Agente	Vía/ Dosificación en mL/kg por inyección	Pauta en días	Dosificación en mg/kg de proteína por inyección (mg de DM4)	Muerte por fármaco (Día de la muerte)	Bwc promedio en % por ratón en el nadir (día del nadir)	Mediana de ΔT/ΔC en % el día 21 si <0 (% de regresión)	Regresiones		Sobrevivientes sin tumores el día 30	Valor de la p bioestadístico[a]	Comentarios
							PR	CR		Día 21	
5,9					(25)						
hu2H11-PEG4-NHAc-DM4 DAR = 5.3	IV 16mL/kg	15	44 (1.6)	0/6	-13.6 (25)	26	0/6	0/6	0/6	0.0008	Activo
			11 (0.4)	0/6	-15.8 (25)	76	0/6	0/6	0/6	NS	Inactivo
Testigo	-	-	-	0/8	-14,7 (27)	-	0/8	0/8	0/8		

Tabla VI - Evaluación de la actividad antitumoral del conjugado hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 a diferentes DAR contra el adenocarcinoma prostático humano avanzado PC-3 en ratones SCID hembra

Agente (lote)	Vía/ Dosificación en mL/kg por inyección	Pauta en días	Dosificación en mg/kg por inyección (dosis total)	Muerte por fármaco (Día de la muerte)	Bwc promedio en % por ratón en el nadir (día del nadir)	Mediana de ΔT/ΔC en % el día 27 si <0 (% de regresión)	Regresiones		TFS el día 34	Valor de la p bioestadístico[a]	Comentarios
							PR	**CR**			
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 *D/A=3,4*	IV 16mL/kg	16	10	0/8	-3.4(23)	20	0/8	0/8	0/8	NS	Activo
			5	0/8	-11.9(30)	52	0/8	0/8	0/8	NS	Inactivo
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 *D/A=4,4*	IV 16mL/kg	16	10	0/8	-4.4(17)	<0(6.8)	1/8	0/8	0/8	0.0020	Altamente activo
			5	0/8	-4.5(25)	40	0/8	0/8	0/8	NS	Inactivo
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 *D/A=5,9*	IV 16mL/kg	16	10	0/8	-5.3(17)	<0(42.8)	5/8	0/8	0/8	<0.0001	Altamente activo
			5	0/8	-9.3(34)	3	5/8	1/8	0/8	0.0013	Muy activo
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 *D/A=6,2*	IV 16mL/kg	16	10	0/8	-5.4(17)	<0(13.4)	2/8	0/8	0/8	<0.0001	Altamente activo
			5	0/8	-8.0(34)	10	2/8	0/8	0/8	0.0043	Muy activo

Agente (lote)	Vía/ Dosificación en mL/kg por inyección	Pauta en días	Dosificación en mg/kg por inyección (dosis total)	Muerte por fármaco (Día de la muerte)	Bwc promedio en % por ratón en el nadir (día del nadir)	Mediana de ΔT/ΔC en % el día 27 si <0 (% de regresión)	Regresiones		TFS el día 34	Valor de la p bioestadístico[a]	Comentarios
							PR	**CR**			
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 *D/A=7,4*	IV 16mL/kg	16	10	0/8	-5.0(17)	<0(66)	6/8	0/8	0/8	<0.0001	Altamente activo
			5	0/8	-6.3(17)	<0(35.5)	4/8	0/8	0/8	<0.0001	Altamente activo
hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 *D/A=8,4*	IV 16mL/kg	16	10	0/8	-6.3(17)	<0(59.6)	7/8	2/8	0/8	<0.0001	Altamente activo
			5	0/8	-15.6(34)	8	2/8	0/8	0/8	0.0014	Muy activo
Testigo				0/10	-19.6(27)	100	0/10	0/10	0/10		

Tabla VIII - Evaluación de la actividad antitumoral del conjugado hu2H11R35R74-PEG4-NHAc-DM4 contra el adenocarcinoma prostático humano avanzado PC-3 en ratones SCID hembra.

Agente (lote)	Vía/ Dosificación en mL/kg por inyección	Pauta en días	Dosificación en mg/kg por inyección (dosis total)	Muerte por fármaco (Día de la muerte)	Bwc promedio en % por ratón en el nadir (día del nadir)	Mediana de ΔT/ΔC en % (día)	Regresiones		TFS el día 49	Valor de la p bioestadístico[a]		Comentarios
							PR	**CR**		**D26**	**D31**	
hu2H11R35R7 4-PEG4-NHAc-DM4 ***DAR=5.9***	IV 25mL/kg	17	160.0	1/5(24)	-21.0(26)	-	-	-	-			Tóxico
			120.0	0/5	-14.4(24)	<0 (31)	5/5	1/5	0/5		<0.0001	HNTD Altamente activo
	IV	17	80.0	0/5	-10.3 (24)	<0 (31)	5/5	2/5	0/5		<0.0001	Altamente activo
	16mL/kg		40.0	0/6	-6.9 (20)	<0 (31)	6/6	0/6	0/6		<0.0001	Altamente activo
			20.0	0/6	-3.7 (49)	<0 (31)	6/6	1/6	0/6		<0.0001	Altamente activo

Agente (lote)	Vía/ Dosificación en mL/kg por inyección	Pauta en días	Dosificación en mg/kg por inyección (dosis total)	Muerte por fármaco (Día de la muerte)	Bwc promedio en % por ratón en el nadir (día del nadir)	Mediana de ΔT/ΔC en % (día)	Regresiones		TFS el día 49	Valor de la p bioestadístico[a]		Comentarios
							PR	**CR**		**D26**	**D31**	
			10.0	0/6	-10.9 (35)	19 (26)	1/6	0/6	0/6	0.0002		Activo
			5.0	0/6	-2.8 (33)	3 (26)	1/6	0/6	0/6	<0.0001		Muy activo
			2.5	0/6	-9.4 (33)	5 (26)	0/6	0/6	0/6	<0.0001		Muy activo
Testigo	-	-	-	0/8	-29.1 (35)	100	1/8	0/8	0/8			-

Tabla IX: Citotoxicidad de hu2H11R35R74 y conjugados de hu2H11R35R74 y DM4 en células MDA MB231

		CI50 (pM)		
Conjugado	DAR	ADC solo	+ hu2H11R35R74 no conjugado	relación
hu2H11-R35R74-PEG4-AcNH-DM4	5.9	147	29731	202
hu2H11-R35R74-PEG8-AcNH-DM4	4.9	400	24955	62
hu2H11-R35R74-PEG4-Allyl-DM4	5.3	161	7820	49
hu2H11-R35R74-PEG4-AcNMe-DM4	5.4	217	36400	168
hu2H11-R35R74-Acetyl-DM4	6.5	185	19514	105

Tabla X: Evaluación de la actividad antitumoral del conjugado hu2H11-R35R74-DM4 con diferentes enlazadores no escindibles contra adenocarcinoma de colon humano avanzado Lovo en ratones SCID hembra.

Agente	Dosificación en mL/kg por inyección	Dosificación en µg de DM4/kg por inyección	Pauta en días	Muerte por fármaco (Día de la muerte)	Bwc promedio en % por ratón en el nadir (día del nadir)	Mediana de ΔT/ΔC en % el día 26	% de regresión el día 26 (mediana)	Regresiones		Comentarios
								PR	CR	
hu2H11-R35R74-PEG4-AcNH-DM4	16 ml/kg	600	14	0/6	-9.5 (23)	<0	82	5/6	1/6	Altamente activo

Agente	Dosificación en mL/kg por inyección	Dosificación en µg de DM4/kg por inyección	Pauta en días	Muerte por fármaco (Día de la muerte)	Bwc promedio en % por ratón en el nadir (día del nadir)	Mediana de ΔT/ΔC en % el día 26	% de regresión el día 26 (mediana)	Regresiones		Comentarios
								PR	CR	
hu2H11-R35R74-PEG8-AcNH-DM4	16 ml/kg	600	14	0/6	-11.2 (32)	<0	33	2/6	0/6	Altamente activo
hu2H11-R35R74-PEG4-AcNMe-DM4	16 ml/kg	600	14	0/6	-8.5 (23)	<0	72	6/6	0/6	Altamente activo
hu2H11-R35R74-PEG4-Allyl-DM4	16 ml/kg	600	14	0/6	-10.6 (23)	<0	41	2/6	0/6	Altamente activo
hu2H11-R35R74-Acetyl-DM4	16 ml/kg	600	14	0/6	-10.8 (25)	<0	69	6/6	0/6	Altamente activo
Testigo	-	-	-	0/10	-13.3 (30)	-	-	-	-	

Listado de secuencias

<110> SANOFI-AVENTIS

<120> NUEVO ANTICUERPO ANTAGONISTA DIRIGIDO A EPHA2 PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> FR2009-082 PCT

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 2

< 211> **17**

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 2

Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 3

Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 4

< 211> 16

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 5

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 5

Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser
1 5

<210> 6

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 6

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 7

< 211> 357

< 212> ADN

< 213> Mus musculus

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(357)

<400> 7

```
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct       48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act gcc tac       96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
            20                  25                  30

tac atg cac tgg gtg aag caa agt cat gta aag agt ctt gag tgg att      144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

gga ctt gtt aat cct tac aat ggt ttt agt agc tac aac cag aat ttc      192
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
    50                  55                  60

gag gac aag gcc agc ttg act gta gat aga ttc tcc agc acc gcc tac      240
Glu Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Phe Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg gaa ctc cac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt      288
Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca aga gaa ttc tac ggc tac cgg tac ttc gat gtc tgg ggc gca ggg      336
Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
            100                 105                 110

acc gcg gtc acc gtc tcc tca                                         357
Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 8

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 8

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

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

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

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

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

Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
            100                 105                 110

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 9

< 211> 339

< 212> ADN

< 213> Mus musculus

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(339)

<400> 9

```
gat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt acc att gga       48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1               5                   10                  15

caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc ata cat agt       96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
            20                  25                  30

gat gga aga aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct      144
Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

cca aag cgc cta att tat ctg gtg tct aga ctg gac tct gga gtc cct      192
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc      240
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
```

```
65                  70                  75                  80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa ggt      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

tca cat ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa      336
Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

cgg                                                                  339
Arg
```

<210> 10

< 211> 113

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 10

```
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1               5                   10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
            20                  25                  30

Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp 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 Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Arg
```

<210> 11

< 211> 357

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(357)

<400> 11

```
cag gtg caa ctg gtg caa tcc ggt gcc gag gtc gtc aaa ccc gga gca       48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

tct gtg aag ata tcc tgt aag gcc tcc ggc tac act ttt aca gcc tac       96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
            20                  25                  30

tat atg cat tgg gtt aaa cag agt ccc gtg cag tcc ctg gaa tgg atc      144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

ggc ttg gtg aac cct tat aac gga ttc tca agt tac aat caa aag ttt      192
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

cag ggc aag gct tcc ctg act gta gac aga tct agt tcc aca gcc tac      240
Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg gag ctc cat tca ctg aca tca gaa gac agc gcc gta tac tat tgc      288
Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca cgt gag ttc tac ggc tat aga tac ttt gac gtc tgg ggc caa ggc      336
Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

aca gcc gtc aca gtg agc tct                                         357
Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 12

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

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

Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

            100                 105                 110

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 13

< 211> 336

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(336)

<400> 13

```
gac gtc gtg atg aca caa acc cct ctg tcc ctg agc gtc act ctg gga       48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
1               5                   10                  15

caa ccc gct tcc att agc tgc aaa tca tca caa tct ctc atc cac tca       96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
            20                  25                  30

gac ggc cgt acg tac ctc aat tgg ctg ctg cag aga cca gga cag tcc      144
Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

cct aaa agg ctt atc tac ctg gtc tct cgt ttg gac tct ggt gta cca      192
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

gac cgg ttt act ggt tcc ggg gcc gga acc gat ttc act ctg aag att      240
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

tcc agg gtg gaa gct gaa gat ctc gga gtg tat tat tgc tgg cag ggc      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

agc cat ttc ccc cgt act ttt ggt ggg ggt acc aaa ttg gaa att aag      336
Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 14

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 14

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
            20                  25                  30

Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 15

< 211> 717

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(717)

<400> 15

```
atg gga tgg tct tgc atc atc ctg ttt ctc gtg gct act gcc acc gga       48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                  10                  15

gtg cac agt gac gtc gtg atg aca caa acc cct ctg tcc ctg agc gtc       96
Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val
            20                  25                  30

act ctg gga caa ccc gct tcc att agc tgc aaa tca tca caa tct ctc      144
Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
        35                  40                  45

atc cac tca gac ggc cgt acg tac ctc aat tgg ctg ctg cag aga cca      192
Ile His Ser Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
    50                  55                  60

gga cag tcc cct aaa agg ctt atc tac ctg gtc tct cgt ttg gac tct      240
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser
65                  70                  75                  80

ggt gta cca gac cgg ttt act ggt tcc ggg gcc gga acc gat ttc act      288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg aag att tcc agg gtg gaa gct gaa gat ctc gga gtg tat tat tgc      336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

tgg cag ggc agc cat ttc ccc cgt act ttt ggt ggg ggt acc aaa ttg      384
Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
        115                 120                 125

gaa att aag cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca      432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg      480
```

```
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag          717
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 16

< 211> 238

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 16

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                   10                  15

Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val
            20                  25                  30

Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
        35                  40                  45

Ile His Ser Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
    50                  55                  60

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
        115                 120                 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140
```

```
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 17

< 211> 1404

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(1404)

<400> 17

```
atg gga tgg tcc tgt att att ctg ttt ctc gtg gct aca gcc aca ggc       48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                  10                  15

gtt cat agt cag gtg caa ctg gtg caa tcc ggt gcc gag gtc gtc aaa       96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys
            20                  25                  30

ccc gga gca tct gtg aag ata tcc tgt aag gcc tcc ggc tac act ttt      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

aca gcc tac tat atg cat tgg gtt aaa cag agt ccc gtg cag tcc ctg      192
Thr Ala Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu
    50                  55                  60

gaa tgg atc ggc ttg gtg aac cct tat aac gga ttc tca agt tac aat      240
Glu Trp Ile Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn
65                  70                  75                  80

caa aag ttt cag ggc aag gct tcc ctg act gta gac aga tct agt tcc      288
Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser
                85                  90                  95

aca gcc tac atg gag ctc cat tca ctg aca tca gaa gac agc gcc gta      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
            100                 105                 110
```

```
tac tat tgc gca cgt gag ttc tac ggc tat aga tac ttt gac gtc tgg      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp
        115                 120                 125

ggc caa ggc aca gcc gtc aca gtg agc tct gct tcc act aag ggc cca      432
Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
    130                 135                 140

tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca      480
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145                 150                 155                 160

gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg      528
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
                165                 170                 175

gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg      576
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
            180                 185                 190

gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc      624
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
        195                 200                 205

gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat      672
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
    210                 215                 220

cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct      720
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225                 230                 235                 240

tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg      768
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
                245                 250                 255

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc      816
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            260                 265                 270

atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc      864
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        275                 280                 285

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag      912
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    290                 295                 300

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg      960
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305                 310                 315                 320

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat     1008
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                325                 330                 335

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc     1056
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            340                 345                 350

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag     1104
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        355                 360                 365

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc     1152
```

```
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    370                 375                 380

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg     1200
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385                 390                 395                 400

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct     1248
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                405                 410                 415

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc     1296
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            420                 425                 430

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg     1344
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        435                 440                 445

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg     1392
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    450                 455                 460

tct ccg ggt tga                                                    1404
Ser Pro Gly
465
```

<210> 18

< 211> 467

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 18

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                   10                  15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

Thr Ala Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Ile Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn
65                  70                  75                  80

Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser
                85                  90                  95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp
        115                 120                 125
```

```
Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
    130                 135                 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145                 150                 155                 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
                165                 170                 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
            180                 185                 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
        195                 200                 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
    210                 215                 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225                 230                 235                 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
                245                 250                 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            260                 265                 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        275                 280                 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    290                 295                 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305                 310                 315                 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                325                 330                 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            340                 345                 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        355                 360                 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    370                 375                 380
```

```
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385                 390                 395                 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                405                 410                 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            420                 425                 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        435                 440                 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Pro Gly
465
```

<210> 19

< 211> 510

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 19

```
Gln Gly Lys Glu Val Val Leu Leu Asp Phe Ala Ala Ala Gly Gly Glu
1               5                   10                  15

Leu Gly Trp Leu Thr His Pro Tyr Gly Lys Gly Trp Asp Leu Met Gln
            20                  25                  30

Asn Ile Met Asn Asp Met Pro Ile Tyr Met Tyr Ser Val Cys Asn Val
        35                  40                  45

Met Ser Gly Asp Gln Asp Asn Trp Leu Arg Thr Asn Trp Val Tyr Arg
    50                  55                  60

Gly Glu Ala Glu Arg Ile Phe Ile Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg Asp
65                  70                  75                  80

Cys Asn Ser Phe Pro Gly Gly Ala Ser Ser Cys Lys Glu Thr Phe Asn
                85                  90                  95

Leu Tyr Tyr Ala Glu Ser Asp Leu Asp Tyr Gly Thr Asn Phe Gln Lys
            100                 105                 110

Arg Leu Phe Thr Lys Ile Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ile Thr Val
        115                 120                 125

Ser Ser Asp Phe Glu Ala Arg His Val Lys Leu Asn Val Glu Glu Arg
```

```
    130                 135                 140

Ser Val Gly Pro Leu Thr Arg Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp
145                 150                 155                 160

Ile Gly Ala Cys Val Ala Leu Leu Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Lys
                165                 170                 175

Cys Pro Glu Leu Leu Gln Gly Leu Ala His Phe Pro Glu Thr Ile Ala
            180                 185                 190

Gly Ser Asp Ala Pro Ser Leu Ala Thr Val Ala Gly Thr Cys Val Asp
        195                 200                 205

His Ala Val Val Pro Pro Gly Gly Glu Glu Pro Arg Met His Cys Ala
    210                 215                 220

Val Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Gln Cys Leu Cys Gln Ala
225                 230                 235                 240

Gly Tyr Glu Lys Val Glu Asp Ala Cys Gln Ala Cys Ser Pro Gly Phe
                245                 250                 255

Phe Lys Phe Glu Ala Ser Glu Ser Pro Cys Leu Glu Cys Pro Glu His
            260                 265                 270

Thr Leu Pro Ser Pro Glu Gly Ala Thr Ser Cys Glu Cys Glu Glu Gly
        275                 280                 285

Phe Phe Arg Ala Pro Gln Asp Pro Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro
    290                 295                 300

Pro Ser Ala Pro His Tyr Leu Thr Ala Val Gly Met Gly Ala Lys Val
305                 310                 315                 320

Glu Leu Arg Trp Thr Pro Pro Gln Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Ile
                325                 330                 335

Val Tyr Ser Val Thr Cys Glu Gln Cys Trp Pro Glu Ser Gly Glu Cys
            340                 345                 350

Gly Pro Cys Glu Ala Ser Val Arg Tyr Ser Glu Pro Pro His Gly Leu
        355                 360                 365

Thr Arg Thr Ser Val Thr Val Ser Asp Leu Glu Pro His Met Asn Tyr
    370                 375                 380

Thr Phe Thr Val Glu Ala Arg Asn Gly Val Ser Gly Leu Val Thr Ser
385                 390                 395                 400
```

```
Arg Ser Phe Arg Thr Ala Ser Val Ser Ile Asn Gln Thr Glu Pro Pro
                405                 410                 415

Lys Val Arg Leu Glu Gly Arg Ser Thr Thr Ser Leu Ser Val Ser Trp
            420                 425                 430

Ser Ile Pro Pro Pro Gln Gln Ser Arg Val Trp Lys Tyr Glu Val Thr
        435                 440                 445

Tyr Arg Lys Lys Gly Asp Ser Asn Ser Tyr Asn Val Arg Arg Thr Glu
    450                 455                 460

Gly Phe Ser Val Thr Leu Asp Asp Leu Ala Pro Asp Thr Thr Tyr Leu
465                 470                 475                 480

Val Gln Val Gln Ala Leu Thr Gln Glu Gly Gln Gly Ala Gly Ser Lys
                485                 490                 495

Val His Glu Phe Gln Thr Leu Ser Pro Glu Gly Ser Gly Asn
            500                 505                 510
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo de este que se une específicamente a un receptor EphA2 y comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera,

en donde dicha cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 12, y en donde dicha cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 14.

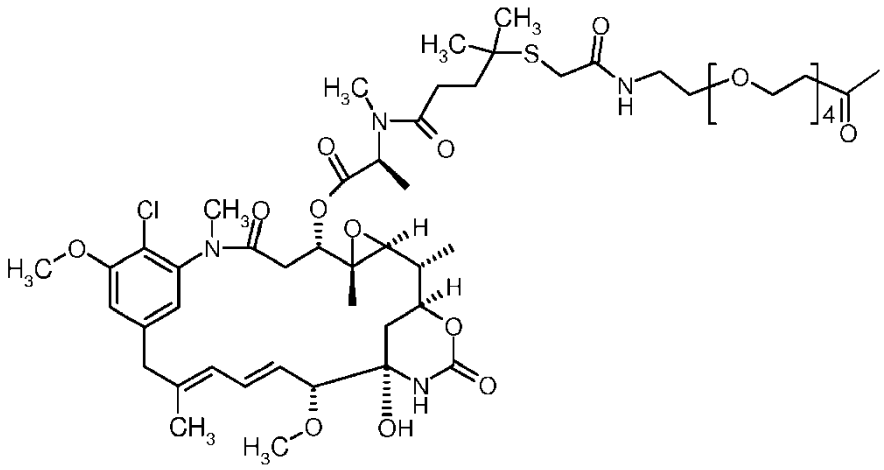
2. Un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo de este según la reivindicación 1, en donde dicha cadena pesada consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, y en donde dicha cadena ligera consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.

3. Un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo de este según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a epítopo de este es un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este humanizado o acondicionado:

4. Un conjugado de un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo según las reivindicaciones 1-3,

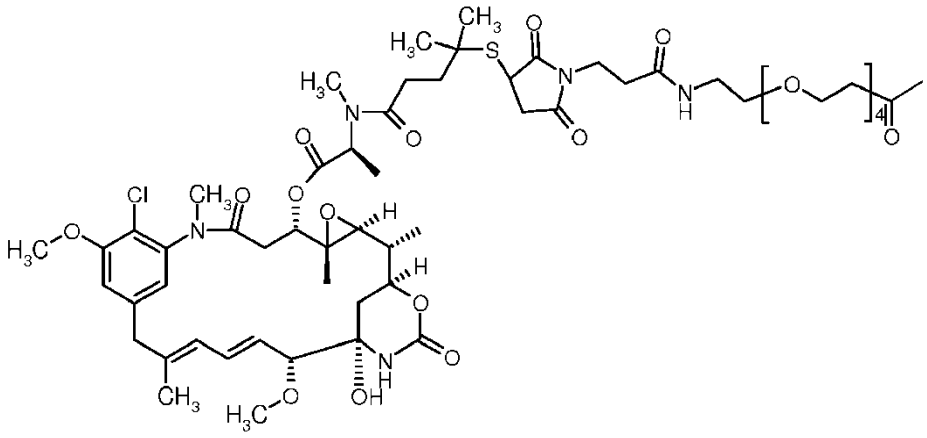
en donde dicho conjugado comprende un agente citotóxico elegido entre:

a) el maitansinoide de fórmula (XIII):



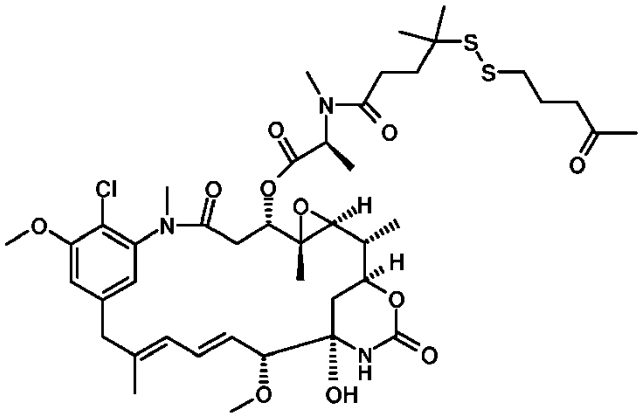
(XIII)

b) el maitansinoide de fórmula (XIV):



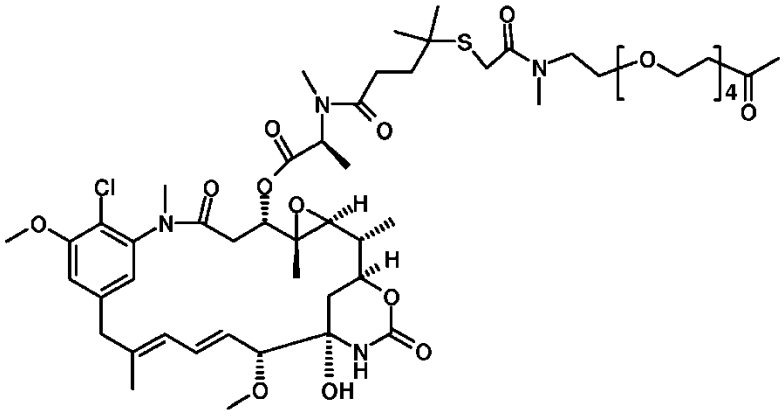
(XIV)

c) el maitansinoide de fórmula (XXIV):



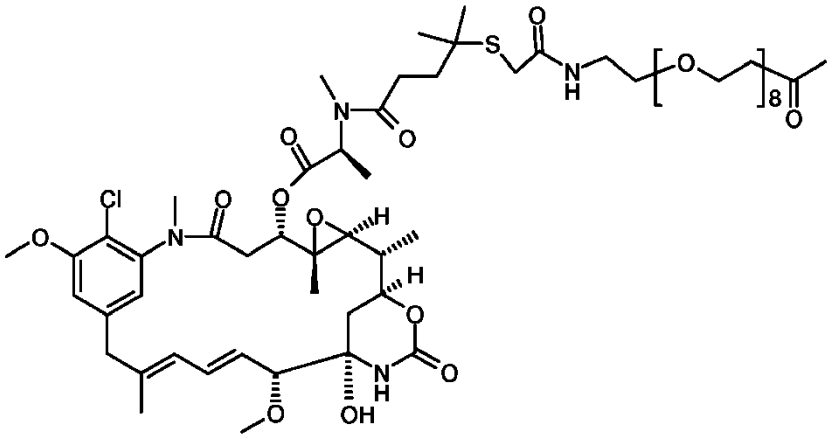
(XXIV)

d) el maitansinoide de fórmula (XXV):



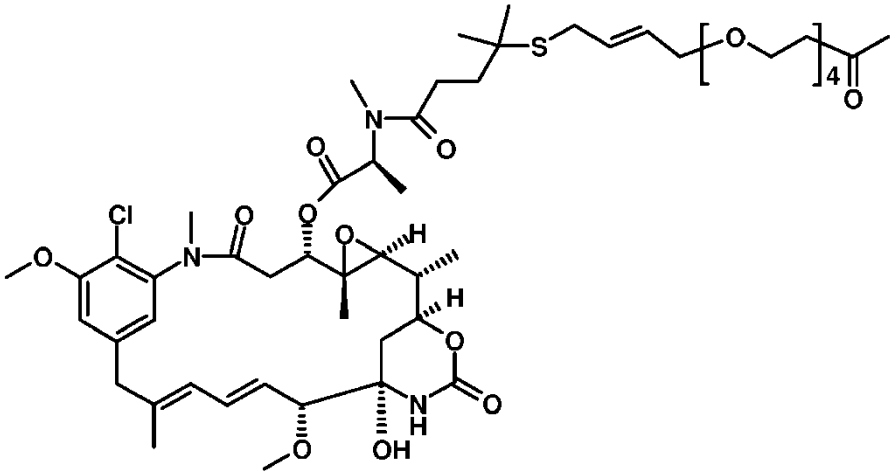
(XXV)

e) el maitansinoide de fórmula (XXVI):



(XXVI)

f) el maitansinoide de fórmula (XXVI):

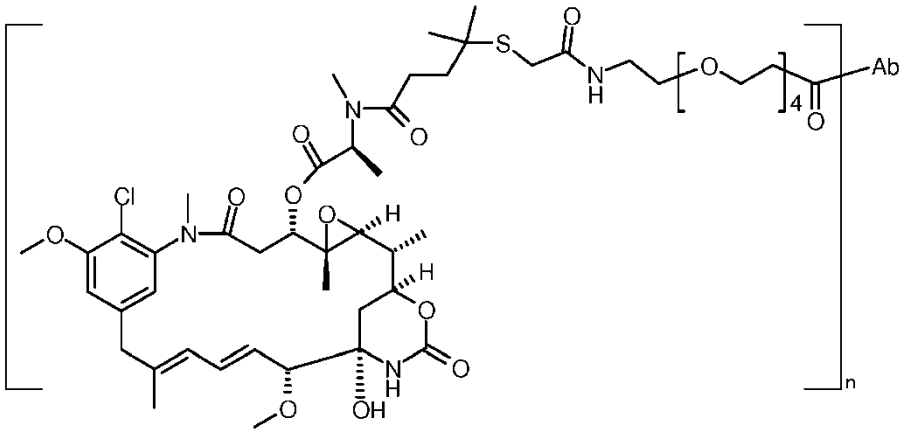


(XXVII)

5. Un conjugado según la reivindicación 4, en donde dicho agente citotóxico se une covalentemente al anticuerpo.

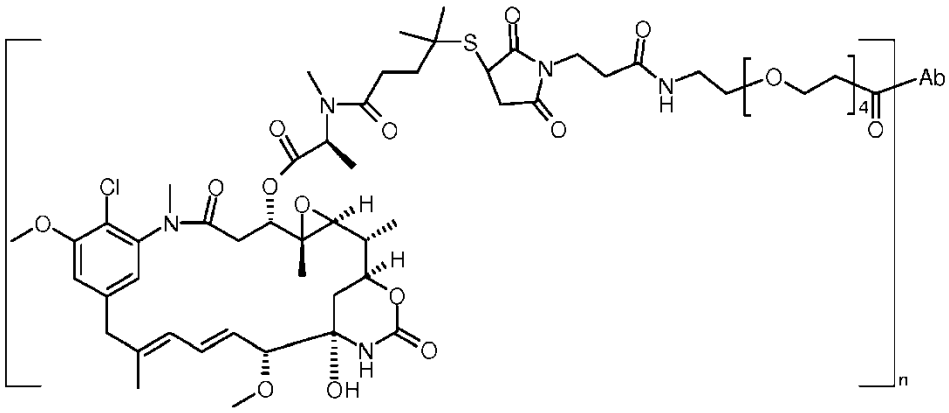
6. Un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en donde el agente citotóxico es el maitansinoide de fórmula (XIII).

7. Un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, dicho conjugado tiene una estructura elegida entre las estructuras de la fórmula (XV):



(XV)

y de la fórmula (XVI):



(XVI)

en donde Ab es un anticuerpo según las reivindicaciones 1-3 y n es un número entero comprendido entre 1 y 15.

8. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 7, en donde n está comprendido entre 4 y 7.

9. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 8 que tiene la estructura de fórmula (XV).

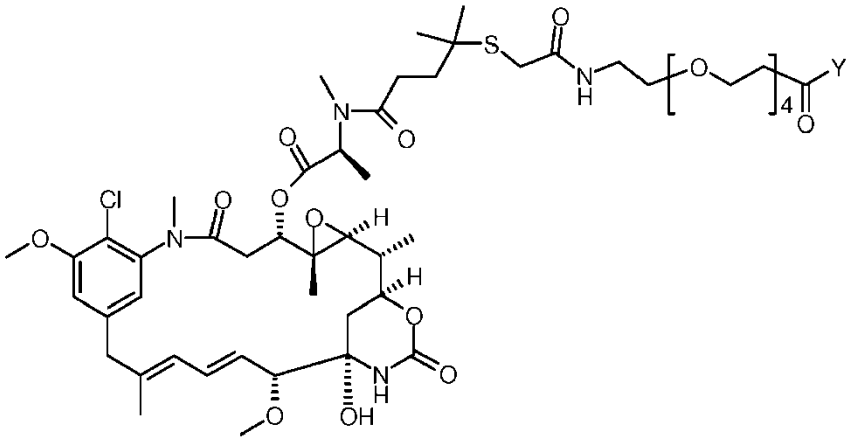
10. Un método para preparar un conjugado que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto una disolución acuosa, opcionalmente tamponada, de un agente de unión a célula con una disolución de un compuesto citotóxico;

(ii) después, separar opcionalmente el conjugado que se formó en (i) de los reactivos que no hicieron reacción y cualquier aglomerado que pueda estar presente en la disolución;

en donde el agente de unión a célula es un anticuerpo según las reivindicaciones 1-3, y un agente citotóxico elegido entre:

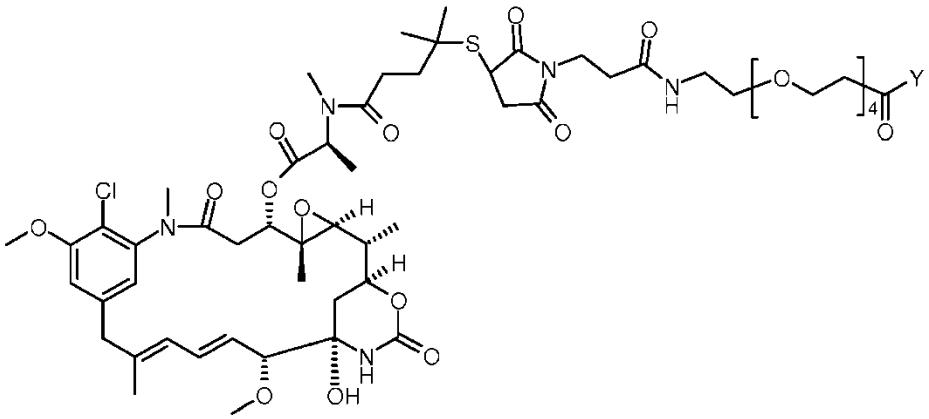
el compuesto de fórmula (XVII):



(XVII)

en donde Y es N-succinimidiloxi, N-sulfosuccinimidiloxi, N-ftalimidiloxi, N-sulfoftalimidiloxi, 2-nitrofeniloxi, 4-nitrofeniloxi, 2,4-dinitrofeniloxi, 3-sulfonil-4-nitrofeniloxi, 3-carboxi-4-nitrofeniloxi, imidazolilo o átomo de halógeno; y

el compuesto de fórmula (XVIII):



(XVIII)

en donde Y es N-succinimidiloxi, N-sulfosuccinimidiloxi, N-ftalimidiloxi, N-sulfoftalimidiloxi, 2-nitrofeniloxi, 4-nitrofeniloxi, 2,4-dinitrofeniloxi, 3-sulfonil-4-nitrofeniloxi, 3-carboxi-4-nitrofeniloxi, imidazolilo o átomo de halógeno.

11. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, para su uso como un medicamento.

13. El uso de anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, para producir un medicamento para tratar el cáncer.

14. El uso de la reivindicación 13, en donde el cáncer se elige entre carcinoma, incluidos los de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; incluido el carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluida, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluidas leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluidos melanoma, seminoma,

teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluidos astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; u otros tumores, incluido melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma.

15. Un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo de este según las reivindicaciones 1-3, en donde el parátopo de dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a epítopo de este comprende en la cadena ligera: Arg35 del bucle L1, Tyr54, Arg58 y Asp60 de L2.

16. Un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo de este según las reivindicaciones 1-3, en donde el parátopo de dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a epítopo de este comprende en la cadena pesada: Thr30, Ala31, Tyr32 y Tyr33 del bucle H1, Asn52, Tyr54, Asn55 y Phe57 de H2 y Glu99, Phe100, Tyr101, Gly102, Tyr103 y Tyr105 de H3.

17. Un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo de este según las reivindicaciones 1-3, en donde dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a epítopo de este comprende una mutación en la posición: Thr H28.

18. Un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo de este según las reivindicaciones 1 a 3, que une específicamente a un epítopo del receptor EphA2 humano que comprende los residuos Gly49, Lys50, Gly51, Asp53, Cys70, Asn71, Val72, Met73, Ser74, Gly75, Gln77, Phe108, Pro109, Gly110, Gly111, Ser113 y Ser114 del LBD del dominio extracelular del receptor EphA2 o una forma conservadoramente sustituida de estos.

19. Un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 que tiene una DAR promedio mayor que 4, la DAR se mide con un espectrofotómetro de UV y se determina mediante la siguiente ecuación

$$DAR = c_D / c_A$$

con:

$$c_D = [(\varepsilon_{A280} \times A_{252}) - (\varepsilon_{A252} \times A_{280})] / [(\varepsilon_{D252} \times \varepsilon_{A280}) - (\varepsilon_{A252} \times \varepsilon_{D280})]$$

$$c_A = [A_{280} - (c_D \times \varepsilon_{D280})] / \varepsilon_{A280}$$

$$\varepsilon_{D252} = 26{,}159\ M^{-1}cm^{-1}$$

$$\varepsilon_{D280} = 5{,}180\ M^{-1}cm^{-1}$$

$$\varepsilon_{A280} = 224{,}000\ M^{-1}\ cm^{-1}$$

$$\varepsilon_{A252} = 82{,}880\ M^{-1}cm^{-1}$$

A_{252} y A_{280} como las absorbancias del conjugado medidas en un espectrofotómetro de UV a 252 y 280 nm, respectivamente.

20. Un conjugado según la reivindicación 19 que tiene una DAR promedio comprendida entre 4 y 10 o 5 y 8.

21. Un conjugado según la reivindicación 20 que tiene una DAR promedio comprendida entre 5,9 y 7,5.

22. Un artículo de fabricación que comprende:

- a) un material de envasado

- b) un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 4-9 y 21 a 23, y

- c) una etiqueta o prospecto del envase contenido dentro de dicho material de envasado que indica que dicho anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este es eficaz para tratar el cáncer.

23. El anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, para su uso en el tratamiento del cáncer.

24. El anticuerpo o fragmento de unión a epítopo de este, o el conjugado para su uso según la reivindicación 23, caracterizado porque dicho cáncer se elige entre carcinoma, incluidos los de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; incluido el carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluida, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluidas leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso,

incluidos fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluidos melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluidos astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; u otros tumores, incluido melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma.

Fig. 1A

SEQ ID N° 1

AYYMH

SEQ ID N° 2

LVNPYNGFSSYNQKFQG

SEQ ID N° 3

EFYGYRYFDV

SEQ ID N° 4

KSSQSLIHSDGRTYLN

SEQ ID N° 5

LVSRLDS

SEQ ID N° 6

WQGSHFPRT

SEQ ID N° 7

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG
TGAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACTACATGCACT
GGGTGAAGCAAAGTCATGTAAAGAGTCTTGAGTGGATTGGACTTGTTAATCCT
TACAATGGTTTTAGTAGCTACAACCAGAATTTCGAGGACAAGGCCAGCTTGAC
TGTAGATAGATTCTCCAGCACCGCCTACATGGAACTCCACAGCCTGACATCTG
AGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAATTCTACGGCTACCGGTACTTC
GATGTCTGGGGCGCAGGGACCGCGGTCACCGTCTCCTCA

Fig. 1B

SEQ ID N° 9

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAA
CCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCATACATAGTGATGGA
AGAACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGC
CTAATTTATCTGGTGTCTAGACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACT
GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGC
TGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTTCACATTTTCCTCGGAC
GTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID N° 11

CAGGTGCAACTGGTGCAATCCGGTGCCGAGGTCGTCAAACCCGGAGCATC
TGTGAAGATATCCTGTAAGGCCTCCGGCTACACTTTTACAGCCTACTATAT
GCATTGGGTTAAACAGAGTCCCGTGCAGTCCCTGGAATGGATCGGCTTGG
TGAACCCTTATAACGGATTCTCAAGTTACAATCAAAAGTTTCAGGGCAAGG
CTTCCCTGACTGTAGACAGATCTAGTTCCACAGCCTACATGGAGCTCCATT
CACTGACATCAGAAGACAGCGCCGTATACTATTGCGCACGTGAGTTCTACG
GCTATAGATACTTTGACGTCTGGGGCCAAGGCACAGCCGTCACAGTGAGC
TCT

SEQ ID N° 13

GACGTCGTGATGACACAAACCCCTCTGTCCCTGAGCGTCACTCTGGGACA
ACCCGCTTCCATTAGCTGCAAATCATCACAATCTCTCATCCACTCAGACGG
CCGTACGTACCTCAATTGGCTGCTGCAGAGACCAGGACAGTCCCCTAAAA
GGCTTATCTACCTGGTCTCTCGTTTGGACTCTGGTGTACCAGACCGGTTTA
CTGGTTCCGGGGCCGGAACCGATTTCACTCTGAAGATTTCCAGGGTGGAA
GCTGAAGATCTCGGAGTGTATTATTGCTGGCAGGGCAGCCATTTCCCCCG
TACTTTTGGTGGGGGTACCAAATTGGAAATTAAG

Fig. 1C

SEQ ID N° 15

atgggatggtcttgcatcatcctgtttctcgtggctactgccaccggagtgcacagtgacgtcgtgatgacacaaaccc
ctctgtccctgagcgtcactctgggacaacccgcttccattagctgcaaatcatcacaatctctcatccactcagacgg
ccgtacgtacctcaattggctgctgcagagaccaggacagtcccctaaaaggcttatctacctggtctctcgtttggac
tctggtgtaccagaccggtttactggttccggggccggaaccgatttcactctgaagatttccagggtggaagctgaa
gatctcggagtgtattattgctggcagggcagccatttcccccgtacttttggtgggggtaccaaattggaaattaagc
gtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcct
gctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccca
ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagc
agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagct
tcaacaggggagagtgttag

SEQ ID N° 17

atgggatggtcctgtattattctgtttctcgtggctacagccacaggcgttcatagtcaggtgcaactggtgcaatccggt
gccgaggtcgtcaaacccggagcatctgtgaagatatcctgtaaggcctccggctacacttttacagcctactatatg
cattgggttaaacagagtcccgtgcagtccctggaatggatcggcttggtgaacccttataacggattctcaagttaca
atcaaaagtttcagggcaaggcttccctgactgtagacagatctagttccacagcctacatggagctccattcactga
catcagaagacagcgccgtatactattgcgcacgtgagttctacggctatagatactttgacgtctggggccaaggc
acagccgtcacagtgagctctgcttccactaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctct
gggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggc
gccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgac
cgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgg
acaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggg
gaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtg
gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
aagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccagg
actggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatc
tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaaga
accaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggc
agccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcac
cgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccacta
cacgcagaagagcctctccctgtctccgggttga

Fig. 2

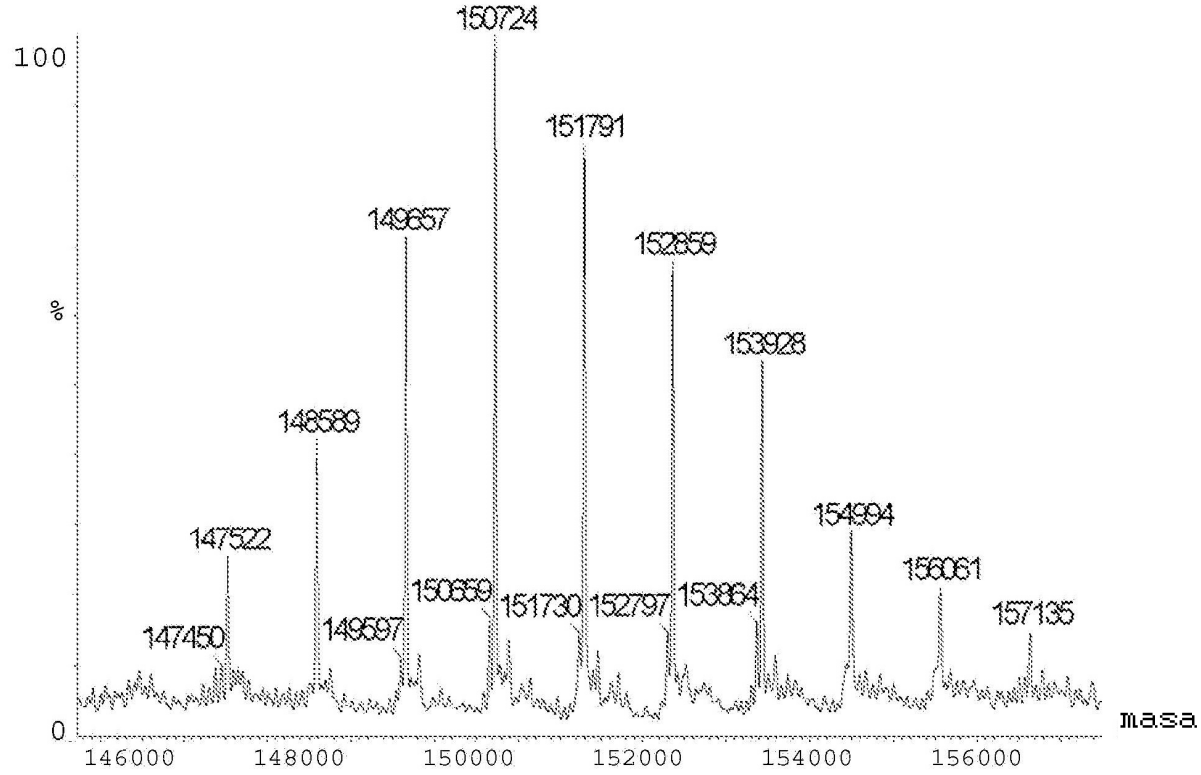

100
%
0
150724
151791
149657
152859
153928
148589
147522
154994
156061
150559
151730
152797
153864
157135
147450
149597
146000
148000
150000
152000
154000
156000
masa

Fig. 3

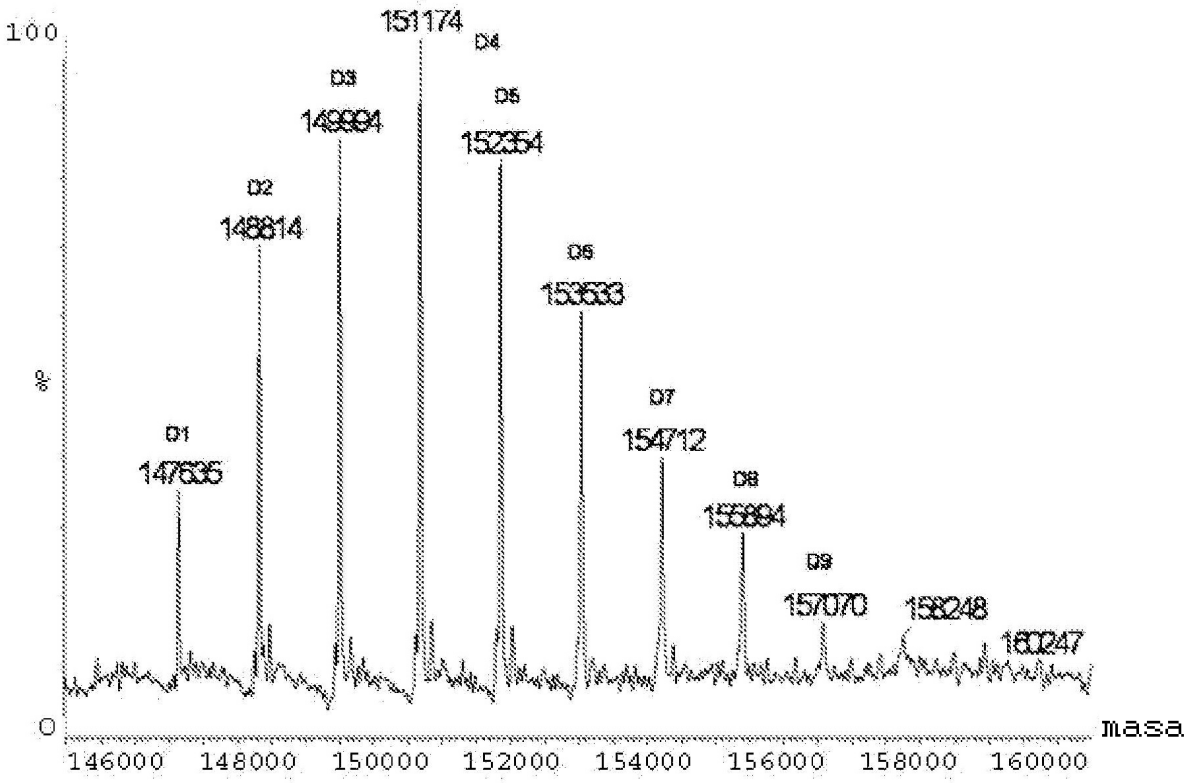

100
%
0
D1
147636
D2
148814
D3
149994
151174
D4
D5
152354
D6
153533
D7
154712
D8
155894
D9
157070
158248
160247
masa
146000
148000
150000
152000
154000
156000
158000
160000

Fig. 4

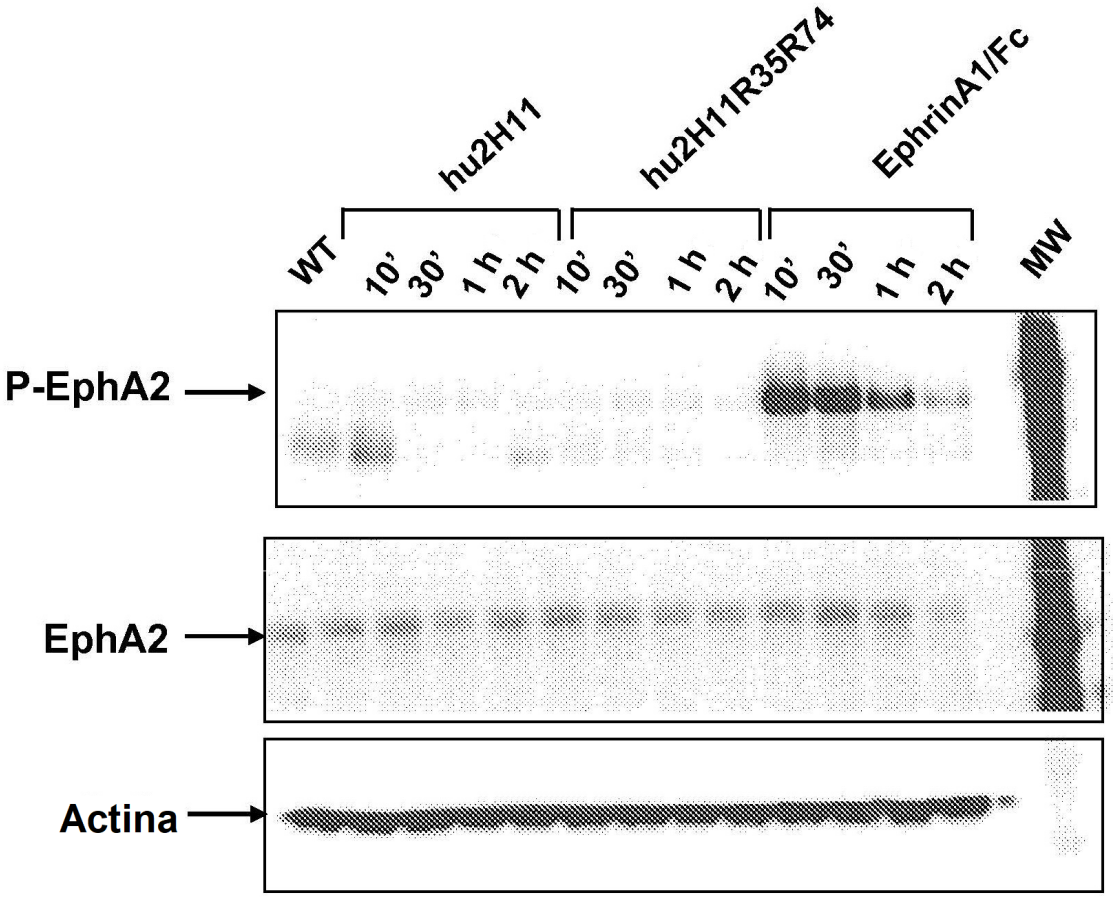

hu2H11
hu2H11R35R74
EphrinA1/Fc
WT
10'
30'
1 h
2 h
10'
30'
1 h
2 h
10'
30'
1 h
2 h
MW
P-EphA2
EphA2
Actina

Fig. 5A

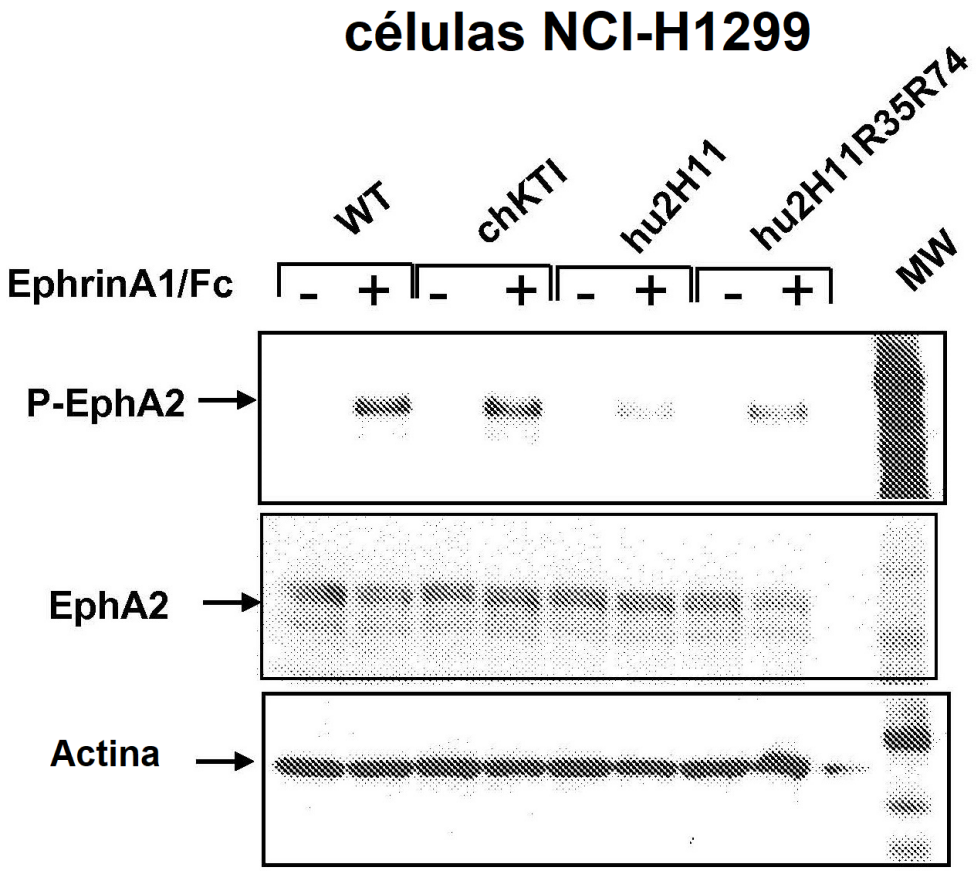

células NCI-H1299
WT
chKTI
hu2H11
hu2H11R35R74
MW
EphrinA1/Fc
- + - + - + - +
P-EphA2
EphA2
Actina

Fig. 5B

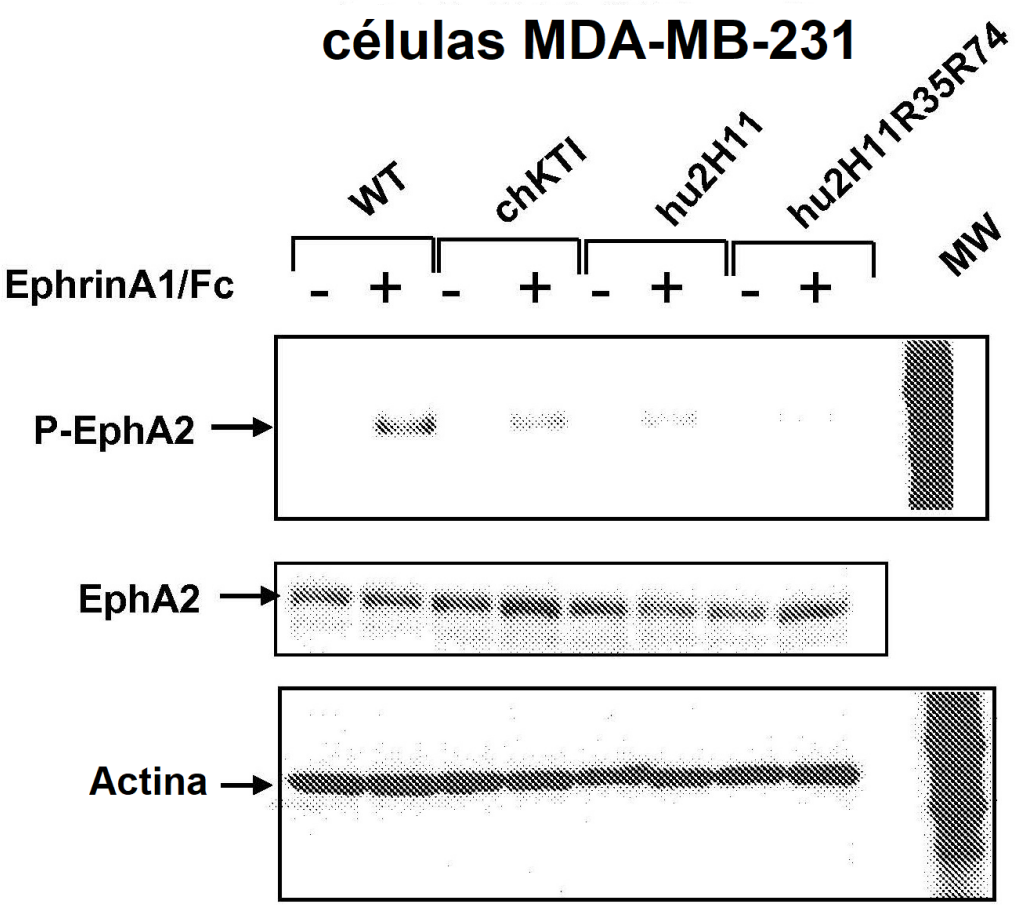

células MDA-MB-231
WT
chKTI
hu2H11
hu2H11R35R74
MW
EphrinA1/Fc
- + - + - + - +
P-EphA2
EphA2
Actina

Fig. 6

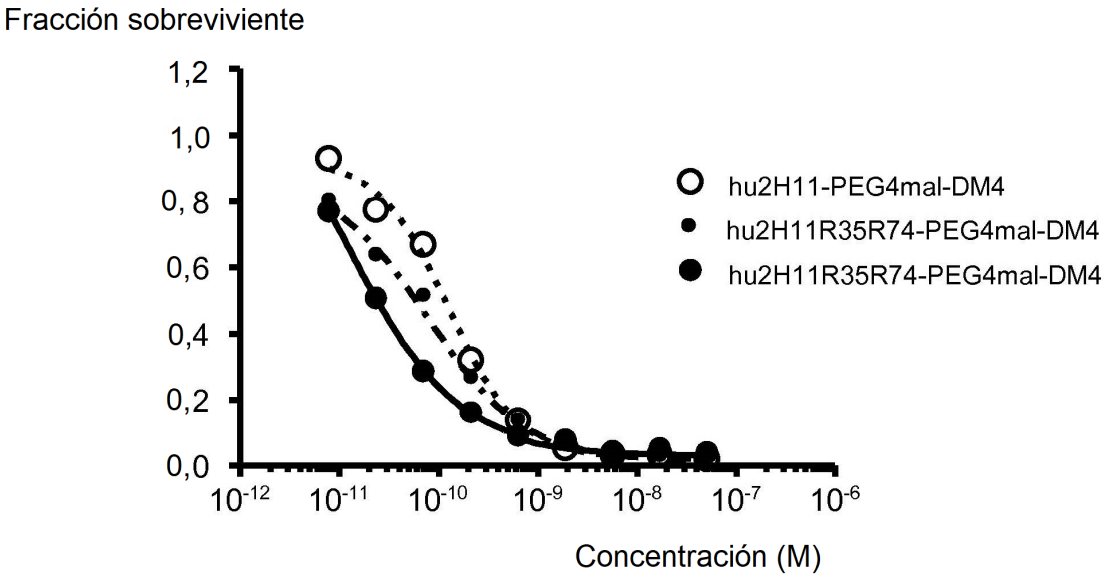

Fracción sobreviviente
1,2
1,0
0, 8
0,6
0,4
0,2
0,0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Concentración (M)
hu2H11-PEG4mal-DM4
hu2H11R35R74-PEG4mal-DM4
hu2H11R35R74-PEG4mal-DM4

Fig. 7

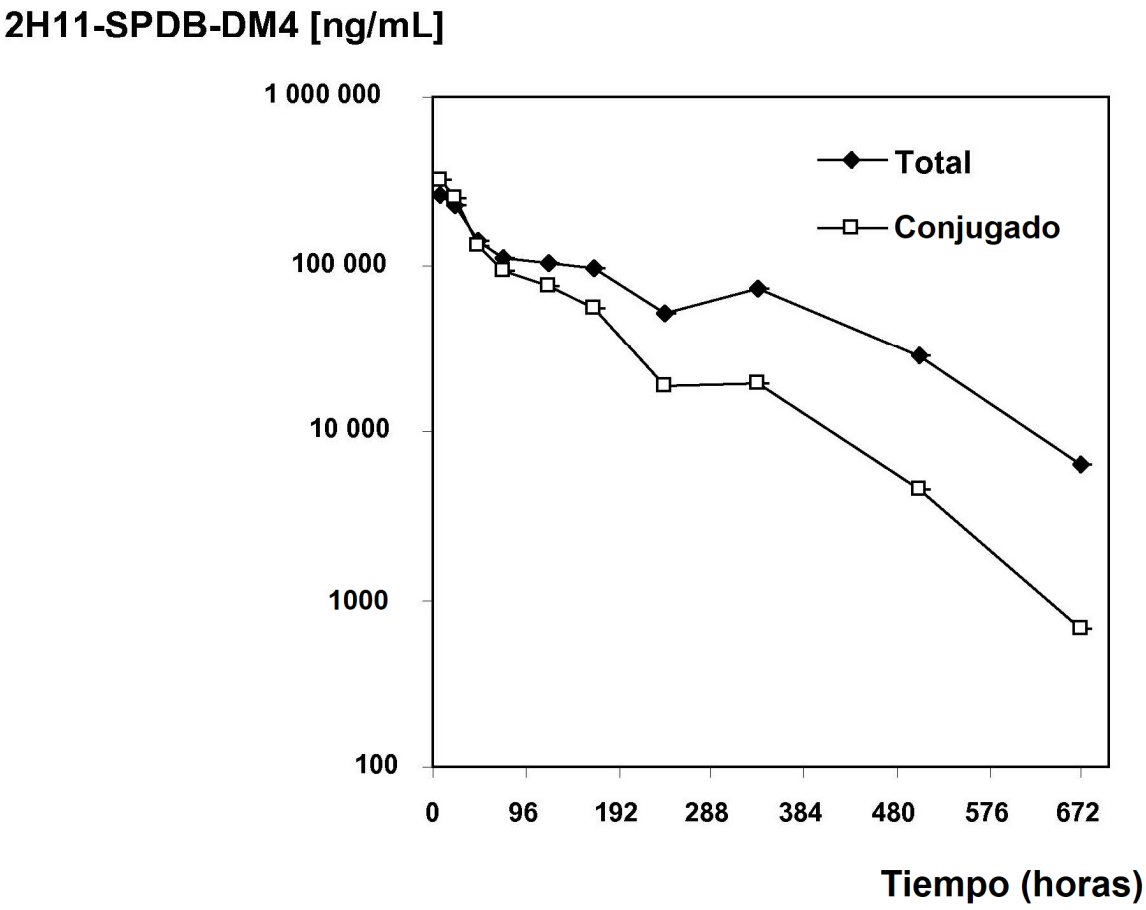

2H11-SPDB-DM4 [ng/mL]
1 000 000
100 000
10 000
1000
100
0
96
192
288
384
480
576
672
Total
Conjugado
Tiempo (horas)

Fig. 8

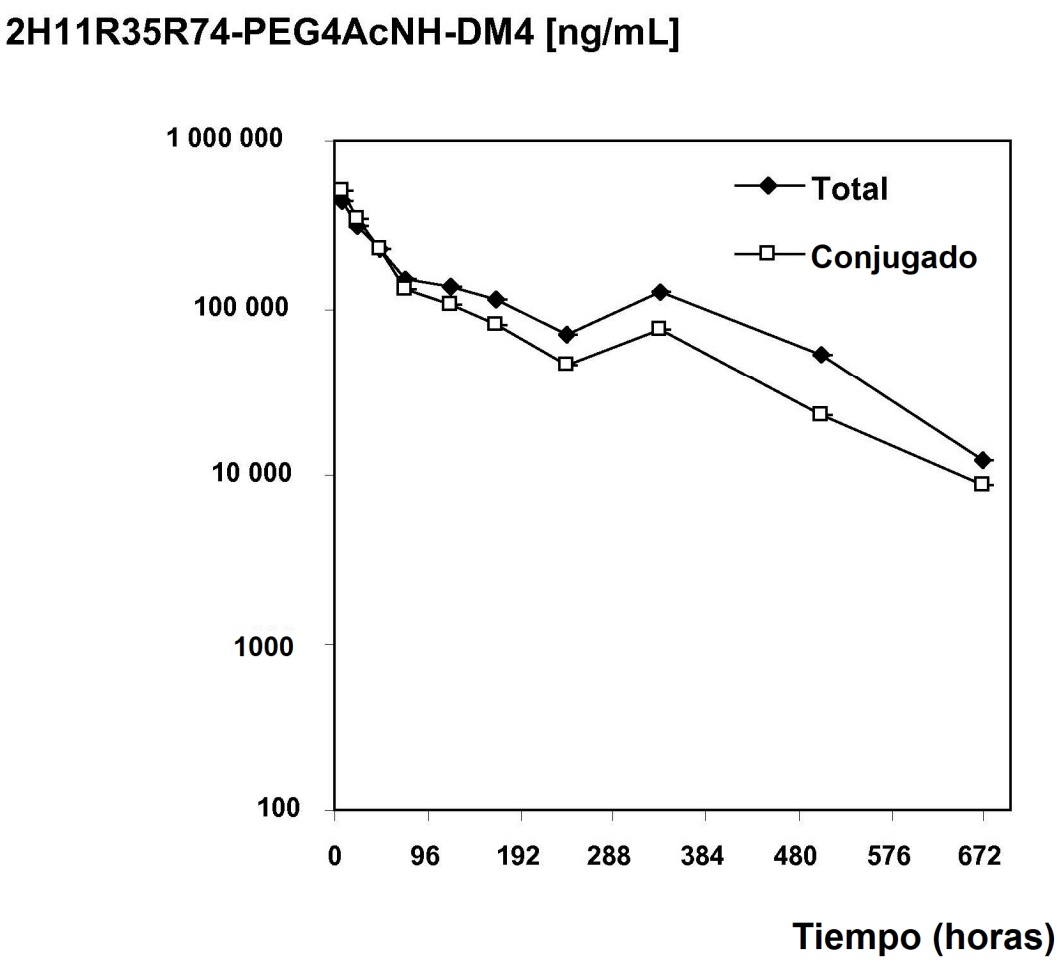

2H11R35R74-PEG4AcNH-DM4 [ng/mL]
1 000 000
100 000
10 000
1000
100
0
96
192
288
384
480
576
672
Total
Conjugado
Tiempo (horas)

Fig. 9A

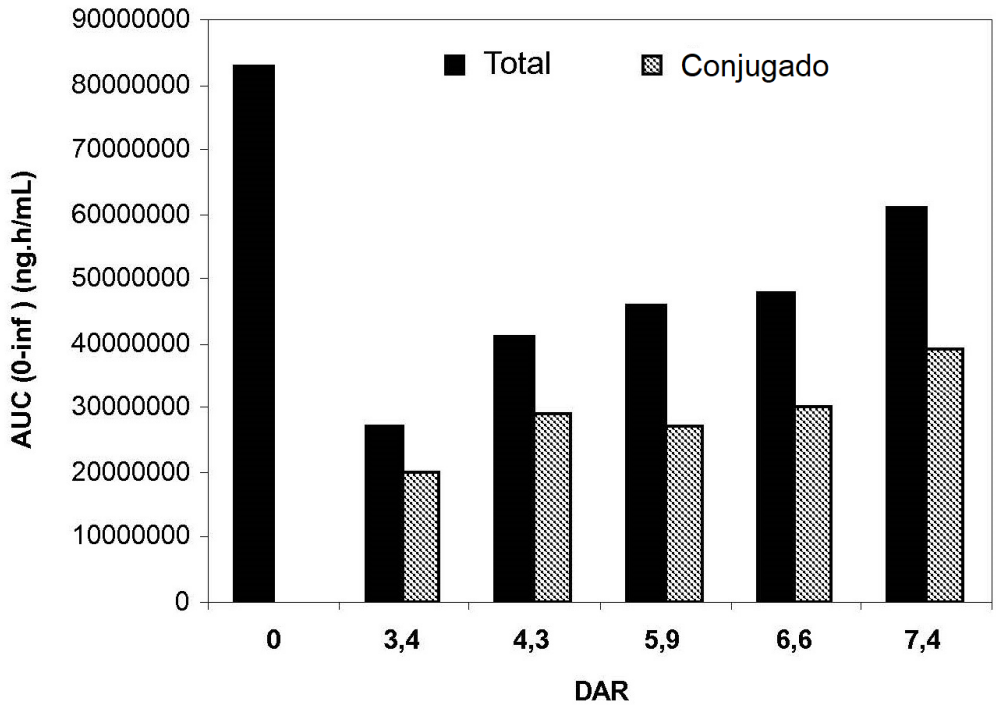

90000000
80000000
70000000
60000000
50000000
40000000
30000000
20000000
10000000
0
AUC (0-inf) (ng.h/mL)
Total
Conjugado
0
3,4
4,3
5,9
6,6
7,4
DAR

Fig. 9B

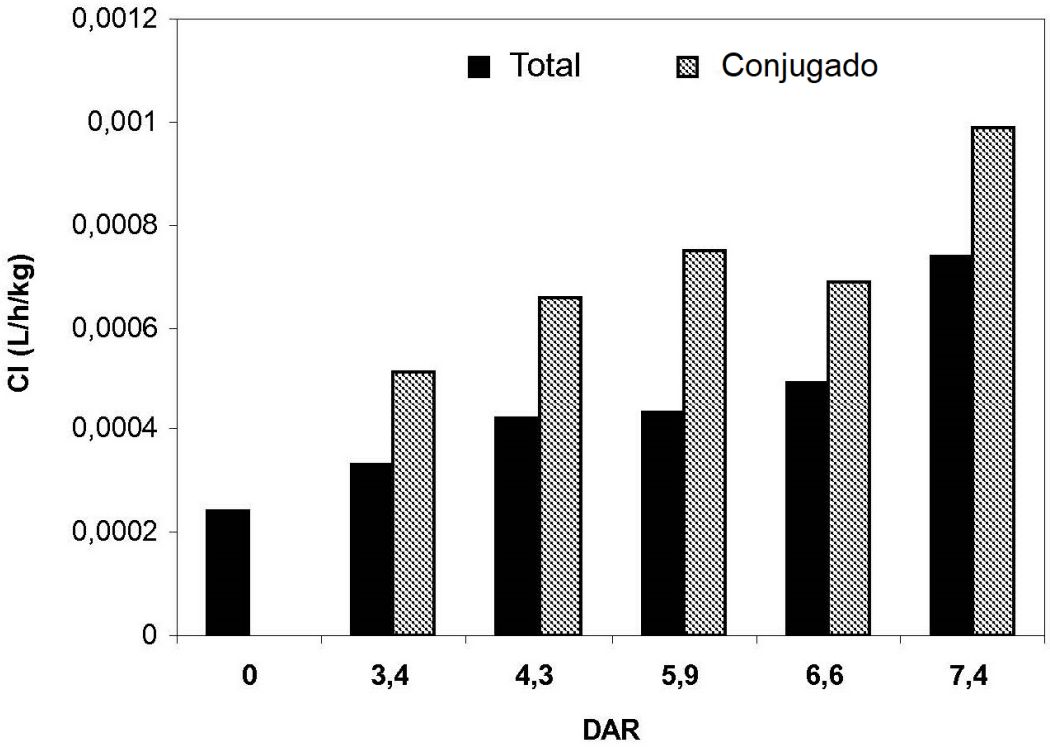

0,0012
0,001
0,0008
0,0006
0,0004
0,0002
0
Cl (L/h/kg)
Total
Conjugado
0
3,4
4,3
5,9
6,6
7,4
DAR

Fig. 10

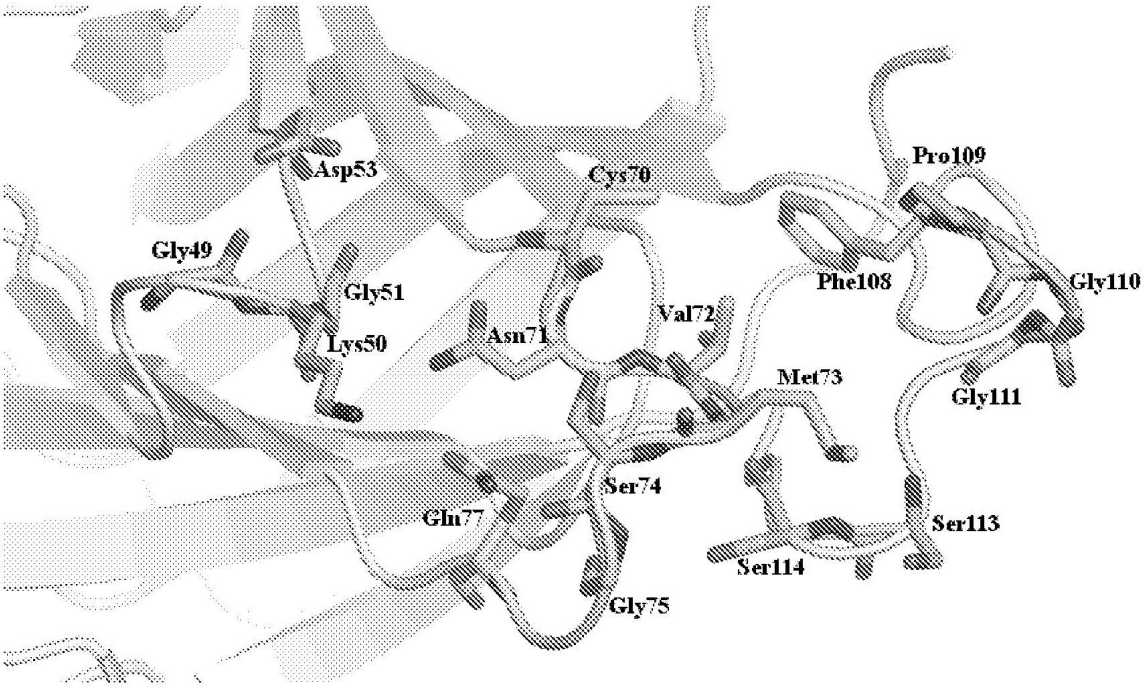

Asp53
Cys70
Pro109
Gly49
Phe108
Gly110
Gly51
Val72
Asn71
Lys50
Met73
Gly111
Ser74
Gln77
Ser113
Ser114
Gly75

Fig. 11

QGKEVVLLDF AAAGGELGWL THPYGKGWDL MQNIMNDMPI YMYSVCNVMS
GDQDNWLRTN WVYRGEAERI FIELKFTVRD CNSFPGGASS CKETFNLYYA
ESDLDYGTNF QKRLFTKIDT IAPDEITVSS DFEARHVKLN VEERSVGPLT
RKGFYLAFQD IGACVALLSV RVYYKKCPEL LQGLAHFPET IAGSDAPSLA
TVAGTCVDHA VVPPGGEEPR MHCAVDGEWL VPIGQCLCQA GYEKVEDACQ
ACSPGFFKFE ASESPCLECP EHTLPSPEGA TSCECEEGFF RAPQDPASMP
CTRPPSAPHY LTAVGMGAKV ELRWTPPQDS GGREDIVYSV TCEQCWPESG
ECGPCEASVR YSEPPHGLTR TSVTVSDLEP HMNYTFTVEA RNGVSGLVTS
RSFRTASVSI NQTEPPKVRL EGRSTTSLSV SWSIPPPQQS RVWKYEVTYR
KKGDSNSYNV RRTEGFSVTL DDLAPDTTYL VQVQALTQEG QGAGSKVHEF
QTLSPEGSGN

Fig. 12A

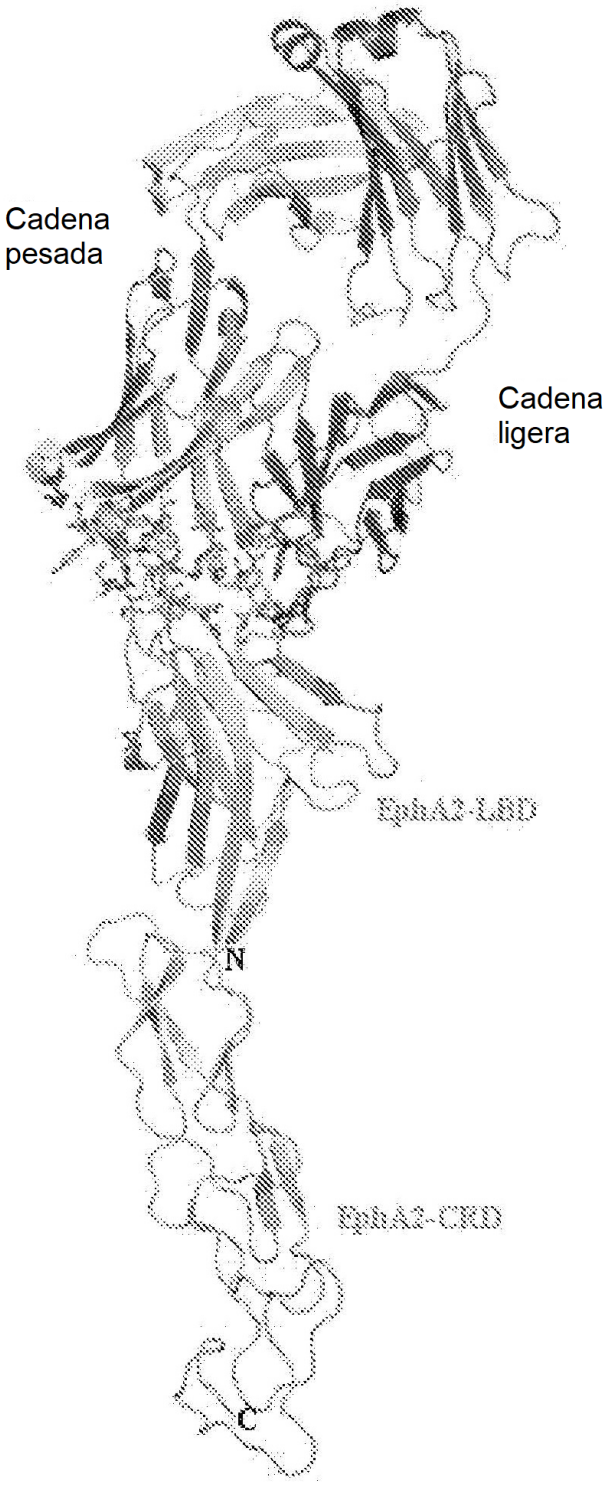


Fig. 12B

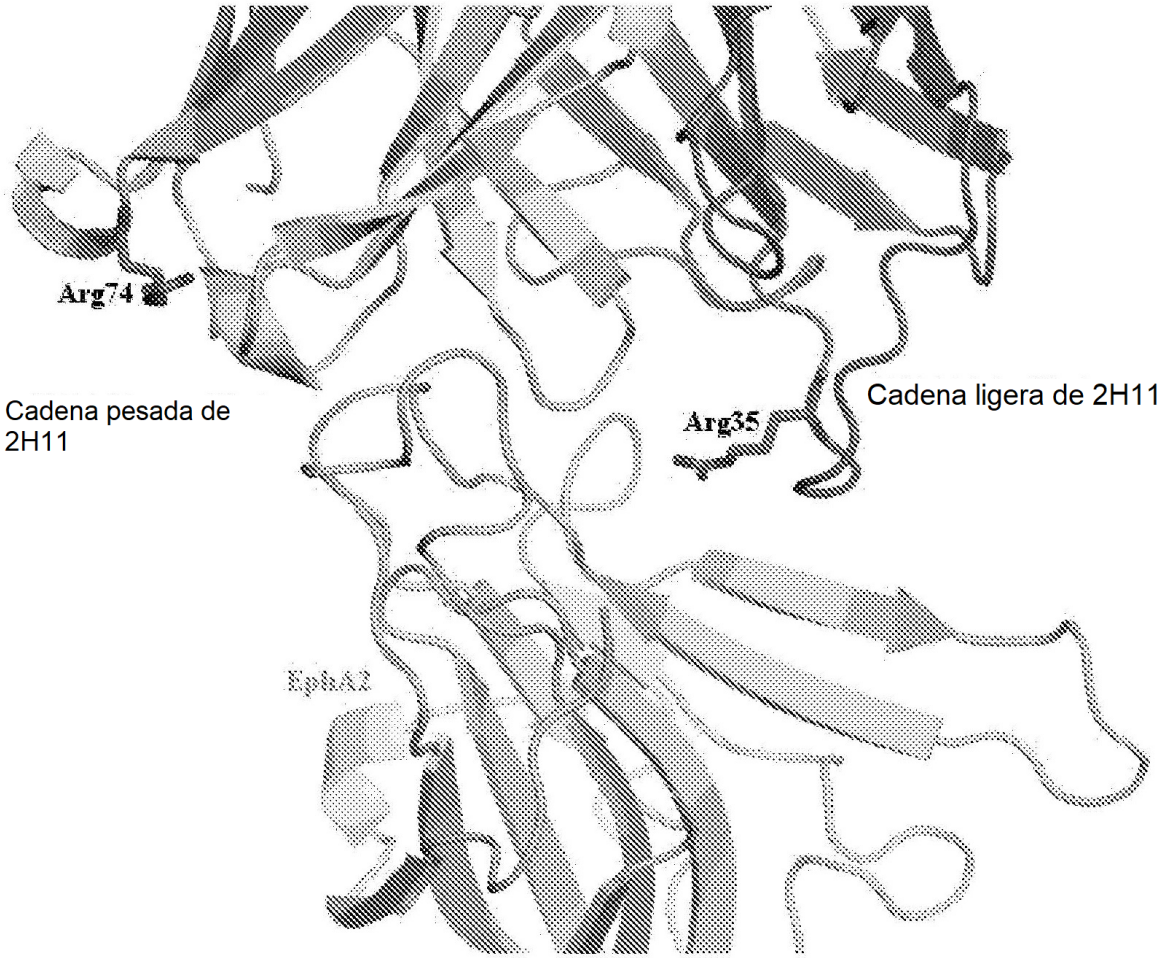

Arg74
Cadena pesada de 2H11
Arg35
Cadena ligera de 2H11
EphA2

Fig. 13

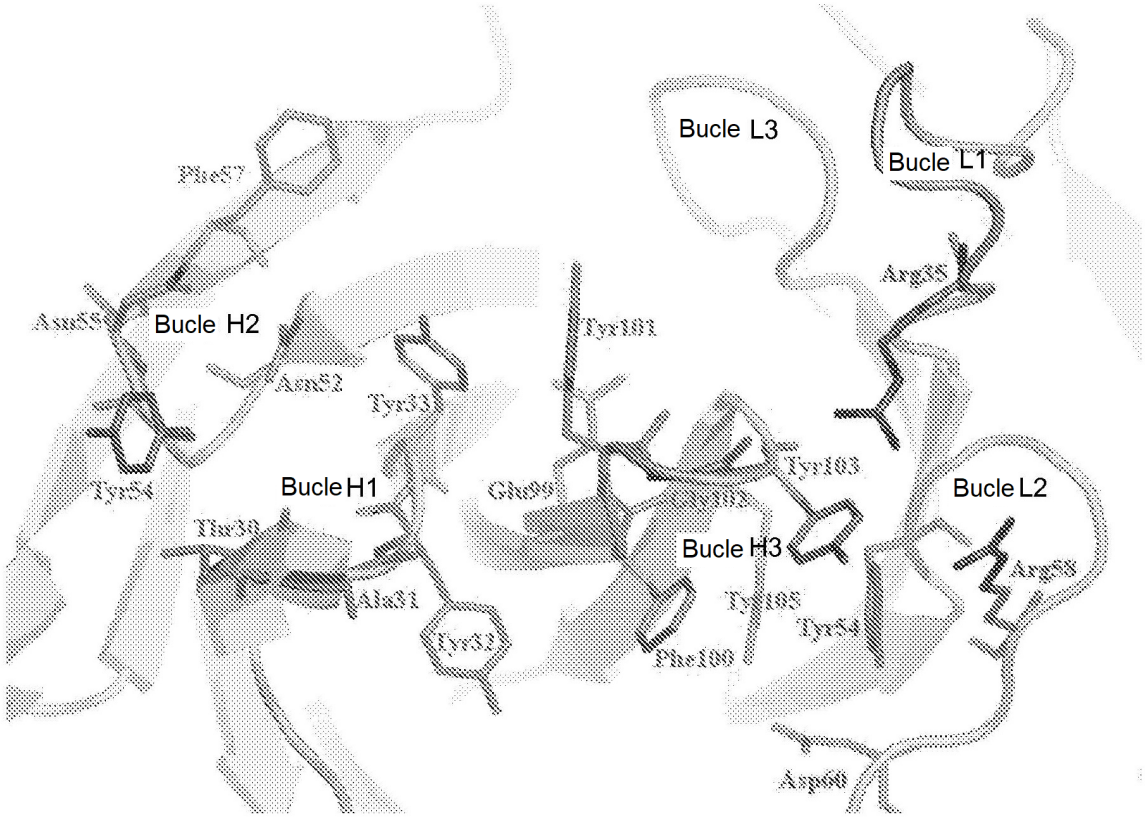

Bucle L3
Bucle L1
Phe57
Arg35
Asn55
Bucle H2
Tyr101
Asn52
Tyr33
Tyr103
Tyr54
Bucle H1
Gly99
Bucle L2
Thr30
Bucle H3
Arg98
Ala31
Tyr105
Tyr32
Tyr54
Phe100
Asp60

Fig. 14

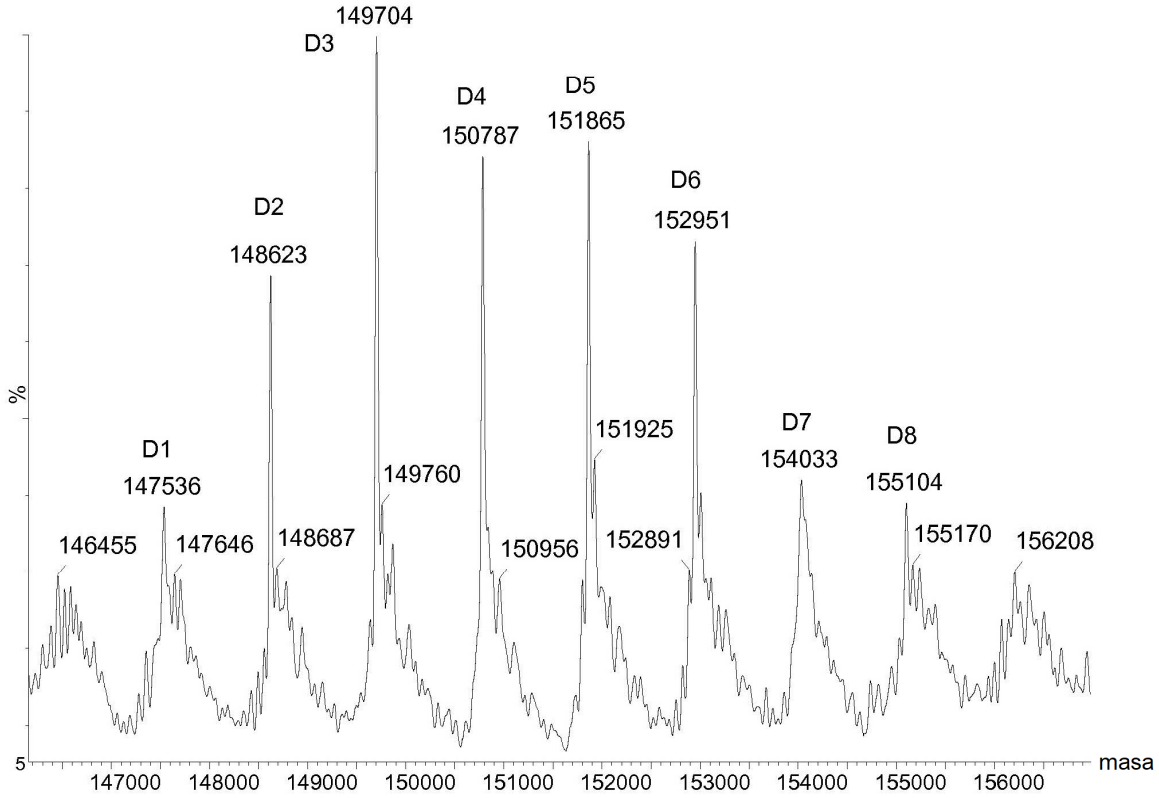

149704
D3
D4
150787
D5
151865
D6
152951
D2
148623
D1
147536
146455
147646
148687
149760
150956
151925
152891
D7
154033
D8
155104
155170
156208
%
5
147000
148000
149000
150000
151000
152000
153000
154000
155000
156000
masa

Fig. 15

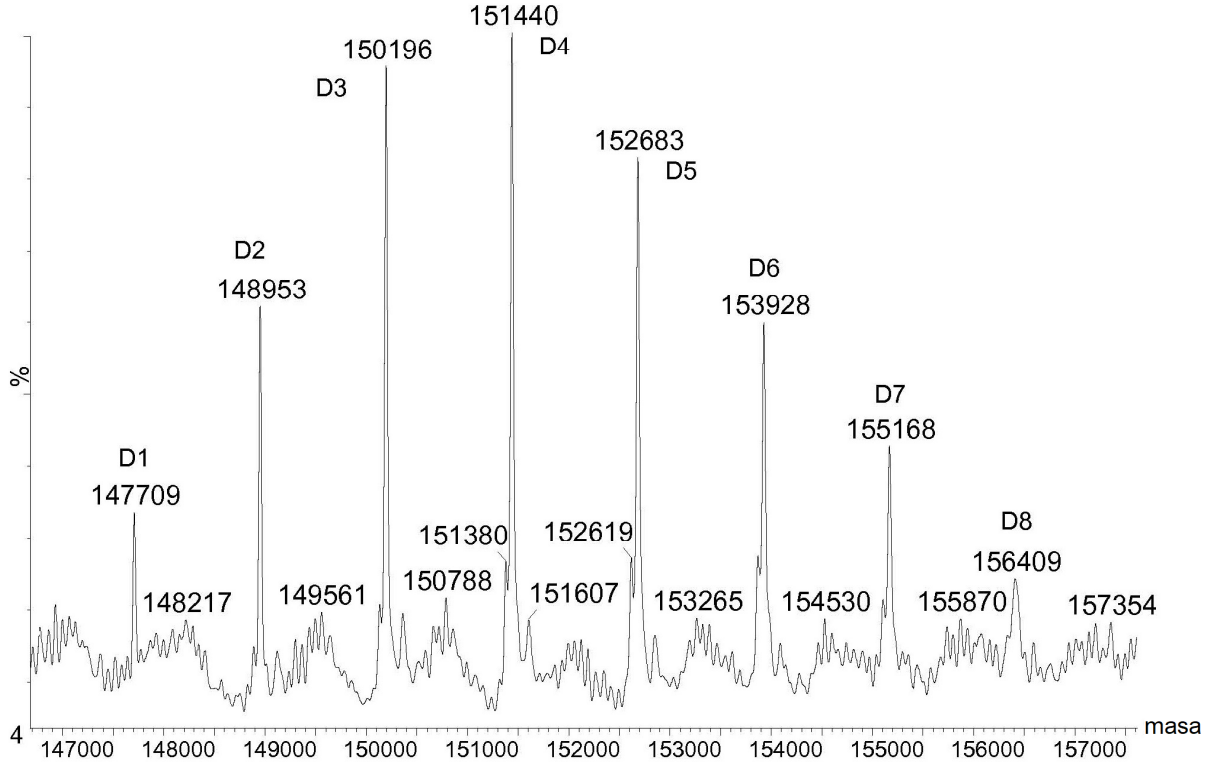

151440
150196
D4
D3
152683
D5
D2
148953
D6
153928
D7
155168
D1
147709
151380
152619
D8
156409
150788
148217
149561
151607
153265
154530
155870
157354
%
4
masa
147000
148000
149000
150000
151000
152000
153000
154000
155000
156000
157000

Fig. 16

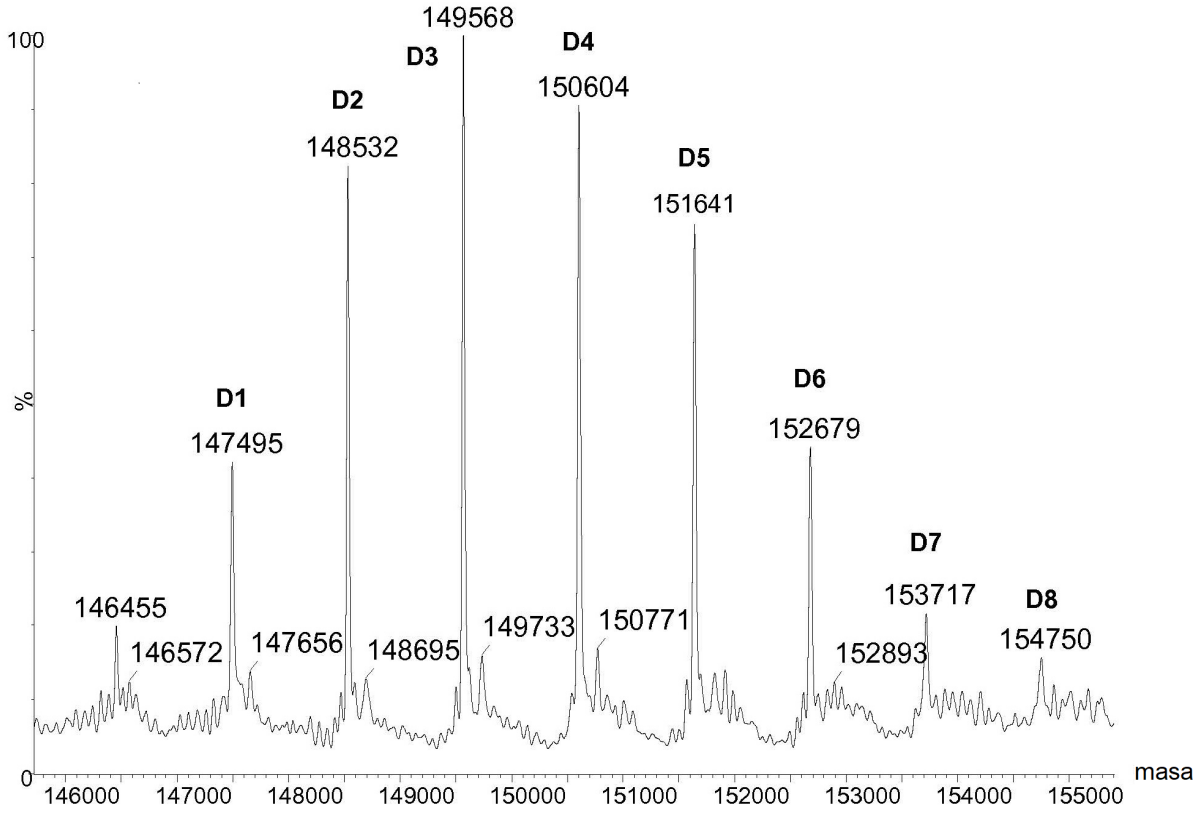
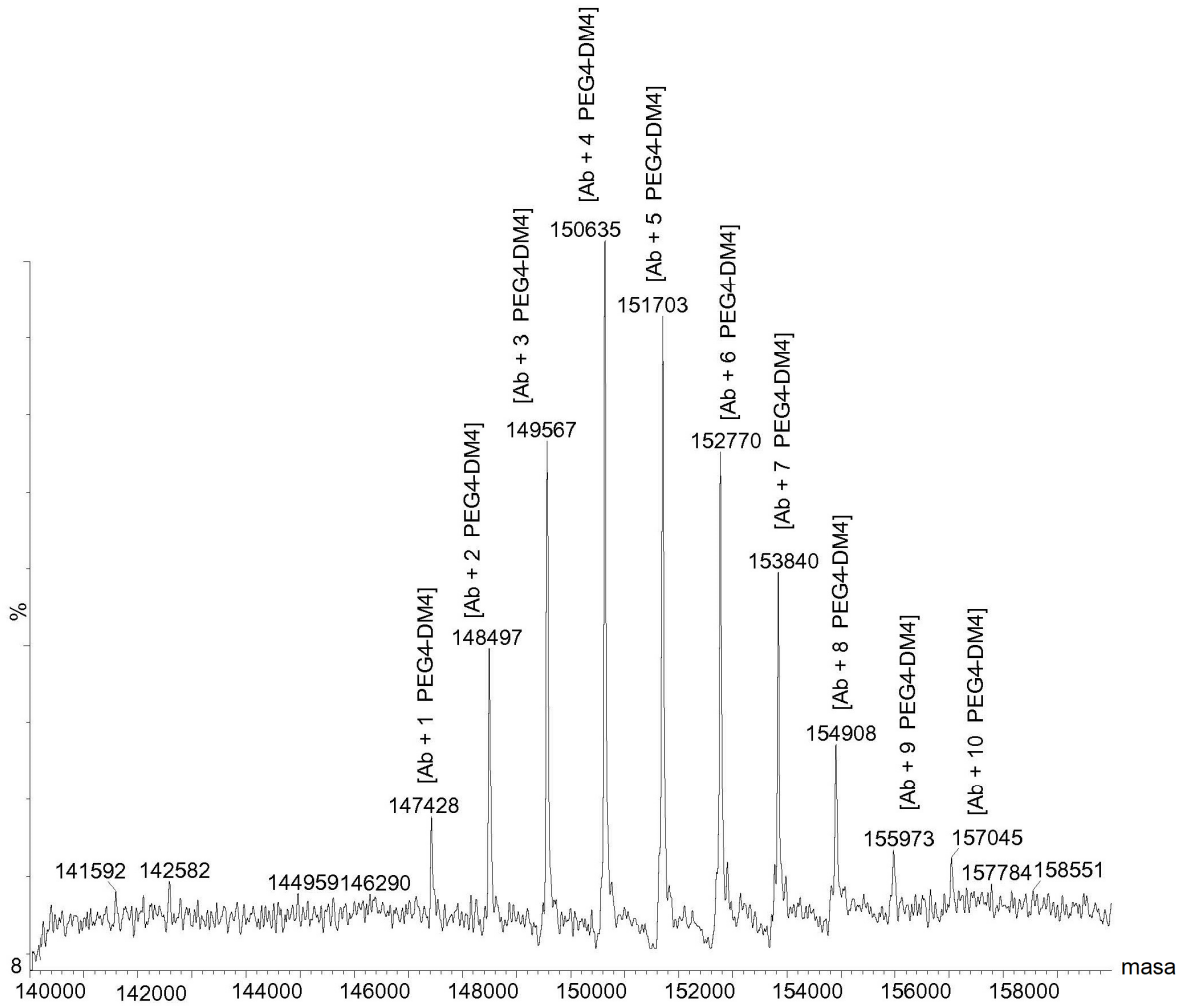

100
%
0
D1
147495
D2
148532
D3
149568
D4
150604
D5
151641
D6
152679
D7
153717
D8
154750
146455
146572
147656
148695
149733
150771
152893
masa
146000
147000
148000
149000
150000
151000
152000
153000
154000
155000

Fig. 17


%
8
masa
140000
142000
144000
146000
148000
150000
152000
154000
156000
158000
141592
142582
144959146290
147428
[Ab + 1 PEG4-DM4]
148497
[Ab + 2 PEG4-DM4]
149567
[Ab + 3 PEG4-DM4]
150635
[Ab + 4 PEG4-DM4]
151703
[Ab + 5 PEG4-DM4]
152770
[Ab + 6 PEG4-DM4]
153840
[Ab + 7 PEG4-DM4]
154908
[Ab + 8 PEG4-DM4]
155973
[Ab + 9 PEG4-DM4]
157045
[Ab + 10 PEG4-DM4]
157784
158551