

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-109443- -00013-0000

Fecha: 2010-04-15 08:50:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 151

Re: P1.-WYETH HOLDINGS CORPORATION.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA".-Clase A61K 39/395.- Expediente número 04-109.443.-

1. Me refiero mi memorial de 12 de Febrero de 2010.
2. **MODIFICACIONES VOLUNTARIAS.**

Con el fin de dar alcance al citado memorial de Febrero 12 de 2010, me permito manifestar que es deseo del Solicitante modificar voluntariamente la solicitud antes referenciada, con el fin de clarificar el objeto de la invención.

2.1. **Modificaciones al Capítulo Descriptivo.**

En primera instancia, el solicitante desea hacer más clara la referencia incluida dentro del texto de la descripción con respecto a la materia revelada en la patente US 5,773,001 (página 43 de la solicitud, página 28 de la solicitud internacional WO03/092623).

En la mencionada sección de la descripción de la solicitud en estudio se declara que esta incorpora como referencia todo el contenido del documento US 5,773,001, el cual revela ligaduras hidrolizables adecuadas para ser empleadas dentro del conjugado objeto de la presente invención de la siguiente manera:

*"La patente de E.U. No. 5,773, 001, **que se incorpora aquí en su totalidad**, describe enlaces que se pueden usar con derivados nucleofílicos, particularmente hidrazidas y nucleófilos relacionados preparados a partir de las caliqueamicinas. Estas ligaduras son especialmente útiles en donde una mejor actividad se obtiene cuando la ligadura formada entre en fármaco y el enlace es hidrolizable."* (Resaltado fuera de texto).

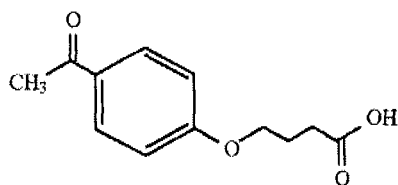
Para mejorar la comprensión con respecto a la identidad química particular de dichas ligaduras hidrolizables, el solicitante ha introducido dentro de la página 44 de la descripción de la solicitud una lista de ligaduras preferidas de acuerdo a lo expuesto en las columnas 21 a 25 del documento US 5,773,001, haciendo referencia a que estas son las ligaduras bifuncionales preferidas de la invención (para su pronta referencia se anexa

al presente memorial una copia de las páginas del documento US 5,773,001 donde se incluyen dichos compuestos).

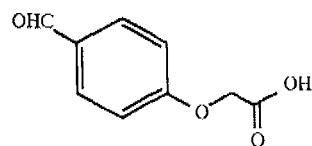
Sobre este particular, me permito muy respetuosamente llamar la atención a ese Despacho al hecho que dicha modificación no constituye de manera alguna una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que se está haciendo más clara aún una parte constitutiva de la invención a la cual se hacía alusión indirectamente por estar contenida dentro de un documento del estado del arte, pero sin hacer una exhaustiva descripción de esta materia.

Por lo tanto, esta lista de compuestos incorpora de manera particular enseñanzas que ya habían sido tomadas en consideración en la respectiva solicitud internacional, sin introducir materia adicional que no haya sido incluida en el momento de la presentación de la misma.

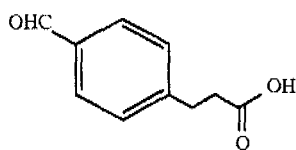
Este hecho es también claramente demostrado si se observa la alta similitud estructural que poseen los compuestos ahora citados dentro de la descripción de la solicitud con la ligadura hidrolizable preferida de la invención, el ácido 4-(4-acetifenoxi) butanoico (AcBut), el cual corresponde al **compuesto 7** de la mencionada lista de compuestos:



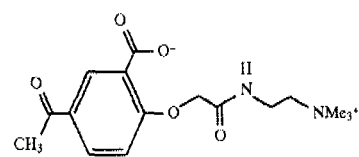
**ácido 4-(4-acetifenoxi) butanoico (AcBut)**



**Ácido 2-(4-formilfenoxi) acético**  
Primer compuesto de la lista



**Ácido 3-(4-formilfenil) propanoico**  
Compuesto 13 de la lista



**Benzoato de 5-acetil-2-(2-oxo-2-(2-(trimetilamonio) etilamino) etoxi)**  
Último compuesto en la lista

De esta forma, todas las ligaduras específicamente referenciadas en la mencionada lista poseen una alta relación estructural entre sí y con la ligadura preferida de la invención (AcBut), como es que todas ellas poseen un grupo aldehído o cetona en uno de los extremos de la molécula, el cual se convierte en una acil hidrazona luego del ensamble de la ligadura, y un ácido carboxílico en el otro extremo de la molécula, que forma el sitio de unión con un residuo de lisina del anticuerpo anti-CD22. Así mismo, cada una de estas ligaduras es hidrolizable de forma que la reacción de formación de acil hidrazona usada durante el ensamblaje de la ligadura es reversada cuando el complejo se expone a el ambiente ácido dentro del lisosoma.

En conexión con lo anterior, me permito resaltar que estas características estructurales ya eran descritas dentro de la página 44 de la descripción de la solicitud (página 28 línea 29 hasta página 29 línea 4 de WO03/092623):

*"Estas ligaduras contienen dos grupos funcionales. Un grupo típicamente es un ácido carboxílico que se utiliza para reaccionar con el portador. El grupo funcional ácido cuando se activa adecuadamente, puede formar una ligadura de amida con un grupo amina libre del portador tal como por ejemplo, la amida en la cadena lateral de una lisina de un anticuerpo u otro portador proteínico. El otro grupo funcional comúnmente es un grupo carbonilo, esto es, un aldehído o una acetona que reaccionará con el agente terapéutico modificado adecuadamente. Los grupos carbonilo pueden reaccionar en un grupo hidrazida en el fármaco para formar una ligadura de hidrazona. Esta ligadura se hidroliza lo que permite la liberación del agente terapéutico del conjugado después de enlazarse a las células objetivo."*

Consecuentemente, dado que se están introduciendo nombres específicos de compuestos que eran referidos antes de manera indirecta por la descripción, en virtud de esta modificación se está clarificando aún más la divulgación de la presente solicitud sin incurrir en una ampliación del alcance de la invención tal como fue originalmente presentada.

## **2.2. Modificaciones al Capítulo Reivindicatorio.**

De otra parte, **muy comedidamente solicito a ese Despacho NO tomar en consideración las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio que fueron incluidas dentro de mi mencionado memorial de Febrero 12 de 2010, y por lo tanto NO estudiar la solicitud divisional presentada junto con dicho memorial.**

Así mismo, me permito manifestar que **es deseo del solicitante presentar en reemplazo de dichas modificaciones de Febrero 12 de 2010 un nuevo capítulo reivindicatorio modificado**, el cual responde totalmente a las objeciones presentadas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico **No. 2968** de 2 de Octubre de 2009.

En conexión con lo anterior, me permito resaltar que las modificaciones realizadas dentro del capítulo reivindicatorio en virtud de la presente no constituyen de manera alguna una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que se está delimitando de forma más precisa el objeto de la invención según lo revelado en la descripción de la solicitud, como se muestra a continuación **(las modificaciones resumidas en el presente escrito tienen como base el capítulo reivindicatorio presentado junto con mi memorial de Julio 7 de 2009).**

- **Reivindicación 1.** Con el propósito de clarificar aún más el objeto de la invención se ha modificado el preámbulo de esta reivindicación para que haga referencia a un "método para preparar *una composición que comprende conjugados de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo*", lo cual mejora la claridad del capítulo reivindicatorio, por cuanto una de las características distintivas de la invención, la fracción de baja conjugación (LCF), se entiende dentro del contexto de una composición que comprende anticuerpos tanto conjugados como no conjugados. Por otro lado, se ha restringido el componente **Pr** del conjugado, definiéndolo como un anticuerpo anti-CD22 de acuerdo con las realizaciones preferidas de la invención como es evidente en las páginas 6 a 118 de la descripción de la solicitud.

Adicionalmente, se ha introducido la clarificación con respecto a que dentro de la fórmula del conjugado del derivado de caliqueamicina  $\text{Pr}(-\text{X}-\text{S}-\text{S}-\text{W})_m$  la porción **"-S-S-"** corresponde a un enlace disulfuro, tal como es conocido dentro del estado de la técnica.

Así mismo, se ha definido la ligadura hidrolizable **X** como seleccionada dentro del grupo de ligaduras que son reveladas de forma específica en el documento US 5,773,001, al cual se hace referencia en la página 43 de la descripción de la solicitud (página 28 de la correspondiente solicitud internacional WO03/092623). Dicha lista específica de ligaduras es ahora revelada dentro de la descripción de la solicitud en estudio (página 44) en virtud de las modificaciones expuestas en el numeral anterior de este mismo memorial

De forma similar, se ha definido **W** como  $\beta$ -caliqueamicina,  $\gamma$ -caliqueamicina o N-acetil  $\gamma$  caliqueamicina, tal como se encuentra en las realizaciones preferidas de la invención, de acuerdo con lo revelado en la página 46 y en el ejemplo 3 de la página 81 de la descripción.

- **Reivindicación 2.** Se han restringido los posibles tipos de anticuerpos que hacen parte del conjugado de la invención solo a anticuerpos quiméricos y humanizados, de acuerdo con las realizaciones preferidas de la invención.

- **Reivindicación 3.** Como consecuencia de las modificaciones realizadas sobre la reivindicación 1 esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.

- **Reivindicaciones 4 y 5 (nuevas reivindicaciones 3 y 4).** Estas reivindicaciones no han sido modificadas y corresponden a las anteriormente presentadas.

- **Reivindicación 6 (nueva reivindicación 5).** Se ha clarificado la secuencia de aminoácidos referida como los residuos 50 a 66 de gH1 en la figura 6 reemplazando esta expresión por la secuencia particular de aminoácidos a la cual se está haciendo referencia.

761 308

- **Reivindicaciones 7 a 13 (nuevas reivindicaciones 6 a 12)**. Donde ha sido necesario se ha ajustado la dependencia acorde con la nueva numeración.
- **Reivindicación 14**. Esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 15 a 20 (nuevas reivindicaciones 13 a 18)**. Estas reivindicaciones corresponden a las anteriormente presentadas, ajustando la dependencia acorde con la nueva numeración.
- **Reivindicación 21 (nueva reivindicación 19)**. Se han realizado las mismas modificaciones que fueron expuestas para la reivindicación 1, modificado el preámbulo para que haga referencia a "**una composición que comprende conjugado de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo anti-CD22**", clarificando que la porción "**-S-S-**" corresponde a un enlace de disulfuro y definiendo los componentes **Pr**, **X** y **W** del conjugado congruentemente de acuerdo con las realizaciones preferidas de la invención.
- **Reivindicación 22 (nueva reivindicación 20)**. Se ha modificado el preámbulo para que hagan referencia a "**la composición de la reivindicación 19**", y se han limitado el tipo de anticuerpos que hacen parte del conjugado de la invención únicamente a anticuerpos quiméricos y humanizados.
- **Reivindicaciones 23 a 35 (nuevas reivindicaciones 21 y 33)**. Al igual que en el caso anterior, el preámbulo ha sido modificado para que se refiera a "**la composición...**", y se ha modificado la dependencia acorde con la nueva numeración. En la reivindicación 25 (nueva reivindicación 23) se han reemplazado la expresión "**los residuos 50 a 66 de gH1 de la figura 6...**" por la correspondiente secuencia de aminoácidos. En las reivindicaciones 27 y 30 (nuevas reivindicaciones 25 y 28) se ha eliminado la expresión "**y CDRs donadores no humanos**".
- **Reivindicación 36 (nueva reivindicación 34)**. Se ha modificado el paso (a) del método reclamado para que haga referencia a "**la composición que comprende un conjugado de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo de conformidad con la reivindicación 19**", y se ha definido de forma más precisa el paso (d) de dicho proceso limitando el tiempo a máximo **72** horas, en concordancia con lo revelado en los ejemplos 3 y 9 de las páginas 81 y 113 de la descripción de la solicitud.
- **Reivindicación 37 (nueva reivindicación 35)**. Se han restringido los posibles crioprotectores únicamente a dextrano y sacarosa, tal como se ilustra en los ejemplos específicos de la página 117 de la descripción de la presente solicitud.

- **Reivindicaciones 38 a 52 (nuevas reivindicaciones 36 a 50)**. Se han ajustado las dependencias acorde con la nueva numeración. Dentro de la reivindicación 52 (nueva reivindicación 50) se ha restringido el posible anticuerpo que hace parte del conjugado de la invención únicamente a anticuerpos quiméricos o humanizados.
- **Reivindicaciones 53 y 55**. Estas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 54 y 56 a 66 (nuevas reivindicaciones 51 a 62)**. Se ha modificado la dependencia en concordancia con la nueva numeración. Dentro de la reivindicación 59 (nueva reivindicación 55) se ha reemplazado la alusión a los residuos 50 a 66 de gH6 en la Figura 6 por la secuencia específica de aminoácidos a la cual se hace referencia.
- **Reivindicaciones 67 a 89**. Estas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.

Como consecuencia de las modificaciones anteriores, el capítulo reivindicatorio modificado queda constituido por **62** reivindicaciones que definen de forma clara el objeto de la invención y que hacen únicamente referencia a las realizaciones preferidas que cuentan con pleno sustento en la descripción, superando de esta forma las objeciones presentadas por el Señor Examinador a este respecto en el mencionado Concepto Técnico **No. 2968** de Octubre 2 de 2009.

De esta forma, el capítulo reivindicatorio modificado es totalmente claro y conciso al reclamar el método y la composición objeto de la presente solicitud, cumpliendo a cabalidad con lo preceptuado en el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

3. Anexo me permito presentar:

- i) Recibo número 10- 7,711, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones mencionadas;
- ii) Copia de las páginas Resumen, Objeto y finalidad y 1 a 122 correspondientes al capítulo descriptivo modificado;
- iii) Copia de las páginas 123 a 139 correspondientes al nuevo capítulo reivindicatorio, constituido por **62** reivindicaciones; y
- iv) Copia de la portada y de las páginas que contienen las columnas 1 a 2 y 19 a 26 del documento US 5,773,001 referenciado en el texto.



JOSE LLORED CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

762 715

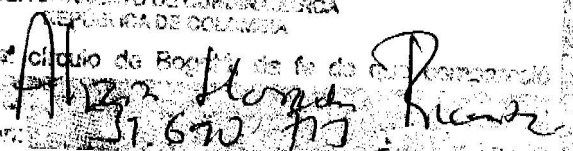
En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las argumentaciones presentadas en mi referenciado memorial de Febrero 12 de 2010 y de las modificaciones que han sido expuestas en el presente escrito y conceder el privilegio de patente solicitado.

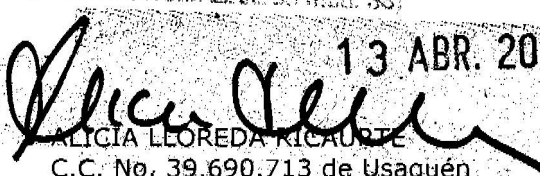
Señor Superintendente,

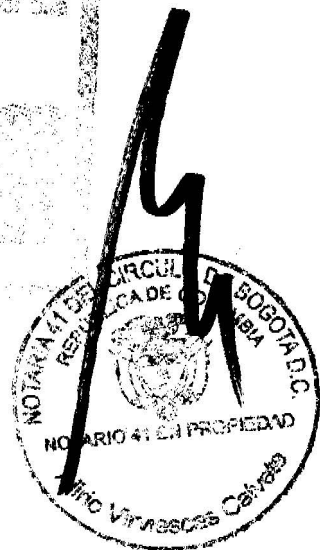
  
ALICIA LLORED RICAURTE  
T. P. 53.215



NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.  
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA  
REPUBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá D.C. de fe de que he presenciado personalmente   
identificada (o) con: 31.690.713  
profesional de abogado No. 53215  
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella  
(o) mismo en este escrito.  
(Art. 64 C. P. C. Decreto. 2282/03 mod. 35)

  
13 ABR. 2010  
ALICIA LLORED RICAURTE  
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén



CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 7.711  
FECHA : FEBRERO 1 DE 2010

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE        | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO | FECHA PAGO | Vr. PAGO      |
|--------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|---------------|
| LLOREDA Y CIA S. A | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 36907942 | 01/02/2010 | 11,717,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                       | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|--------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-03 | CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA |                |
|       |             | 12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES  | 114,000.00     |
|       |             | TOTAL :                        | \$ 114,000.00  |

SON: CIENTO CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

~~778.~~  
764

## CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA

### **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a métodos para la producción de conjugados de portador/fármaco citotóxico monomérico (los "conjugados") con una carga superior de fármaco y una fracción de conjugado bajo substancialmente reducida (LFC, por sus siglas en inglés). Particularmente, la invención se refiere a conjugados de caliqueamicina monoméricos del anticuerpo anti-CD22. La invención también se refiere a conjugados de la invención, a métodos de purificación de los conjugados, a composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados y a usos de los conjugados.

### **Antecedentes de la Invención**

Los conjugados de fármacos desarrollados para la farmacoterapia sistémica son agentes citotóxicos específicos del objetivo. El concepto involucra el acoplamiento de un agente terapéutico a una molécula portadora con especificidad para una población definida de células objetivo. Los anticuerpos con alta afinidad para los antígenos son una elección natural como porciones de direccionamiento. Con la disponibilidad de anticuerpos monoclonales de alta afinidad, los prospectos de la terapéutica para direccionamiento de anticuerpos han sido prometedores. Las sustancias tóxicas que se han conjugado con los anticuerpos monoclonales incluyen toxinas, fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, modificadores de respuesta biológica y radionúclidos. Los conjugados de toxina y anticuerpos se denominan frecuentemente

inmunotoxinas, mientras que los inmunoconjugados consisten de anticuerpos y de fármacos de alto peso molecular tales como el metotrexato y la adriamicina se denominan quimioinmunoconjugados. Los inmunomoduladores contienen modificadores de la respuesta biológica que se sabe que tienen funciones reguladoras tales como linfocinas, factores de crecimiento y factor del veneno de cobra (CVF, por sus siglas en inglés) que activa el complemento. Los radioinmunoconjugados consisten de isótopos radioactivos, que se pueden usar como terapéuticos para exterminar células por su radiación o usarse para la formación de imágenes. El suministro específico mediado por anticuerpos de los fármacos citotóxicos a células de tumor, se espera que no solamente aumente su eficacia antitumor, sino que también evite la absorción no dirigida por los tejidos normales, incrementado así sus índices terapéuticos.

La presente invención se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo como un vehículo de direccionamiento y que tienen especificidad para determinantes antigénicas en la superficie de las células malignas conjugadas a un fármaco citotóxico. La invención se refiere a conjugados de anticuerpo a fármaco citotóxico en donde el anticuerpo tiene especificidad para las determinantes antigénicas para las malignidades B, trastornos linfoproliferativos y trastornos inflamatorios crónicos. La presente invención también se refiere a métodos para la producción de inmunoconjugados y sus usos terapéuticos.

Se han aprobado diversos terapéuticos basados en anticuerpos para el tratamiento de una diversidad de enfermedades que incluyen cáncer y artritis reumatoide,

para el uso clínico, o están en ensayos clínicos para una diversidad de malignidades que incluyen malignidades de células B tales como el linfoma que no es de Hodgkin. Uno de tales terapéuticos basados en anticuerpos es el rituximab, (Rituxan<sup>TM</sup>) un anticuerpo humano quimérico no etiquetado  $\gamma_1$  (región +my1V), que es específico para el antígeno de superficie celular CD20 que se expresa en las células B. Estos terapéuticos basados en anticuerpos se soportan en la citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) contra las células B o en el uso de radionúclidos tales como  $^{131}\text{I}$  o  $^{90}\text{Y}$ , que tienen problemas asociados de preparación y de uso para los médicos y los pacientes. Consecuentemente, hay una necesidad para la generación de inmunoconjugados que puedan superar los inconvenientes de la terapéutica actual basada en anticuerpos para tratar una diversidad de malignidades que incluyen malignidades hematopoyéticas como el linfoma que no es de Hodgkin (NHL), que se puede producir fácilmente o eficientemente y que se pueden usar repetidamente sin inducir una respuesta inmune.

Los inmunoconjugados que comprenden un miembro de la familia potente de agentes antibacterianos y antitumor, conocidos colectivamente como caliqueamicinas o el complejo LL-E33288 (ver patente de E.U.A No. 4,970,198 (1990)), se desarrollaron para el tratamiento de mieloma. La más potente de las caliqueamicinas se designa  $\gamma_1$ , que se hace referencia aquí simplemente como gamma. Estos compuestos contienen un metil trisulfuro que pueden reaccionar con tioles adecuados para formar bisulfuros, al mismo tiempo al introducir un grupo funcional tal como una

hidrazida u otro grupo funcional que sea útil en la colocación de un derivado de caliqueamicina a un portador (ver patente de E.U.A No. 5,053,394). El uso de los conjugados del portador/derivado de caliqueamicina monomérico en el desarrollo de terapias para una amplia variedad de cánceres se ha limitado por la disponibilidad de agentes de direccionamiento específicos (portadores), así como por las metodologías de conjugación que resultan en la formación de agregados de proteínas cuando se incrementa la cantidad del derivado de caliqueamicina que se conjuga al portador (esto es, la carga de fármacos). Ya que una carga mayor de fármaco incrementa la potencia inherente del conjugado, es deseable tener la mayor cantidad del fármaco cargada en el portador, que sea consistente con la retención de la afinidad de la proteína portadora. La presencia de la proteína agregada que puede ser no específicamente tóxica e inmunogénica, y por lo tanto se debe retirar para aplicaciones terapéuticas, hace al proceso de escalamiento para la producción de estos conjugados más difícil y disminuye el rendimiento de los productos. La cantidad de caliqueamicina cargada en la proteína portadora (la carga de fármacos), la cantidad de agregado que se forma en la reacción de conjugación, y el rendimiento del conjugado final monomérico purificado que se puede obtener, todo se relaciona. Por lo tanto se debe hacer un compromiso entre una carga mayor de fármaco y el rendimiento del monómero final al ajustar la cantidad del derivado reactivo de caliqueamicina que se agrega a la reacción de conjugación.

La tendencia de los conjugados de fármacos citotóxicos, especialmente los conjugados de

caliqueamicina, para agregarse es especialmente problemática cuando se efectúan las reacciones de conjugación con los enlazadores descritos en la patente de E.U.A No. 5,877,296 y la patente de E.U.A No. 5,773,001 que se incorporan aquí en su totalidad. En este caso, un gran porcentaje de los conjugados producidos están en forma agregada y es bastante difícil purificar conjugados hechos por estos procesos originales (procesos CMA) para uso terapéutico. Para algunas proteínas portadoras, los conjugados con cargas aun modestas son virtualmente imposibles de hacer excepto a una escala pequeña. Consecuentemente, existe una necesidad crítica de mejorar los métodos para conjugar los fármacos citotóxicos tales como las caliqueamicinas, a portadores que minimizan la cantidad de agregación y con ello permiten una carga de fármaco tan alta como sea posible con un rendimiento razonable de producto.

Previamente, se describieron métodos de conjugación para la preparación de un derivado/portador de caliqueamicina monomérico con una agregación disminuida y una carga/rendimiento de fármacos superior (ver patente de E.U.A No. 5,712,374 y patente de E.U.A No. 5,714,586, incorporada en la presente en su totalidad). Aunque estos procesos resultaron en preparaciones de conjugados con un contenido de agregados substancialmente reducido, se descubrió después que produjo conjugados que contienen niveles indeseablemente altos (45-65% de área CLAR en %) de una fracción conjugada baja (LCF), una fracción que consiste principalmente del anticuerpo no conjugado. La presencia de LCF en el producto se constituye en un uso ineficiente del anticuerpo ya que no contiene al fármaco

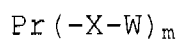
citotóxico. También puede competir con el conjugado portador de caliqueamicina para el objetivo y reducir potencialmente el direccionamiento del último, resultando en una eficacia reducida del fármaco citotóxico. Por lo tanto, es deseable un proceso de conjugación mejorado que resultaría en niveles significativamente inferiores del LCF y que tengan niveles aceptables de agregación sin alterar significativamente las propiedades físicas del conjugado.

### **Breve Descripción de la Invención**

La presente invención se refiere a métodos para la producción de conjugados de portador/derivado de un fármaco citotóxico monomérico (los conjugados) con una carga superior y una fracción de conjugado baja substancialmente reducida (LCF). Particularmente, la invención se refiere a la producción de conjugados de portador con derivado de caliqueamicina monomérico, a los conjugados, a las composiciones a un método de purificación de los conjugados y al uso de los conjugados. Más particularmente, la invención se refiere a métodos para la producción de un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con un derivado de caliqueamicina monomérico (CMC-544).

En una modalidad, la presente invención describe un proceso de conjugación mejorado para la producción de los conjugados, que resulta en niveles significativamente inferiores de LCF debajo del 10% sin alguna alteración importante de las propiedades físicas o químicas. La invención también describe una mejora adicional a los procesos de conjugación la cual resulta no solamente en una reducción importante en los niveles de LCF, sino también resulta en una reducción importante en la agregación a

partir de procesos previamente descritos, y produce una carga de fármaco substancialmente aumentada. Los conjugados de la presente invención tienen la fórmula:



en donde:

Pr es un portador proteínico.

X es enlazador que comprende un producto de cualquier grupo reactivo que puede reaccionar con un portador proteínico.

W es un fármaco citotóxico;

m es la carga promedio para un producto de conjugación purificado tal que el fármaco citotóxico constituye 7-9% del conjugado en peso y

$(-\text{X}-\text{W})_m$  es un derivado de fármacos citotóxico.

Los conjugados de la presente invención, en una modalidad, se generan por el método de la invención que comprende las etapas de (1) agregar el derivado de fármaco citotóxico al portador proteínico en donde el derivado de fármacos citotóxico tiene 4.5-11% en peso del portador proteínico; (2) incubar el derivado de fármaco citotóxico y un portador proteínico en una solución amortiguadora compatible con proteínas, no nucleofílica que tenga un pH en el intervalo del alrededor de 7 hasta 9 para producir un conjugado portador/fármaco citotóxico monomérico, en donde la solución comprende además (a) un cosolvente orgánico y (b) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico  $\text{C}_6\text{-C}_{18}$  o su sal y en donde la incubación se efectúa a una temperatura que va desde alrededor de  $30^\circ\text{C}$  a alrededor de  $35^\circ\text{C}$  por un periodo de tiempo en el intervalo desde alrededor de 15 minutos hasta 24 horas y (3) someter al conjugado producido en la etapa (2) a un proceso de

separación cromatográfica para separar el derivado de fármacos citotóxico monomérico/conjugados del portador proteínico con una carga en el intervalo de 4-10% de peso del fármaco citotóxico y con una fracción baja conjugada (LFC) debajo de 10 por ciento a partir del portador proteínico no conjugado, derivado de fármaco citotóxico y conjugados agregados.

En un aspecto de la invención, el portador proteínico del conjugado se selecciona de un grupo que consiste de hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, imitadores de anticuerpos y sus contrapartes preparadas por ingeniería genéticamente o enzimáticamente.

En una modalidad, el portador proteínico es un anticuerpo. En una modalidad preferida el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab y un fragmento F(ab)2.

En otra modalidad el anticuerpo humanizado se dirige contra el antígeno de superficie celular CD22.

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

En otra modalidad preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que contiene una cadena ligera que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 28.

Todavía en otra modalidad preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 30.

En otra modalidad preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 30.

En otra modalidad el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que es un anticuerpo variante que se obtiene por un protocolo de maduración de afinidad y tiene una especificidad aumentada para el CD22.

En otro aspecto, el fármaco citotóxico usado para generar el conjugado portador/fármaco citotóxico monomérico de la presente invención, es un inhibidor de la polimerización de tubulina, un agente de alquilación que se enlaza y fragmenta el ADN, una síntesis de proteínas inhibidoras o un inhibidor de la tirosina cinasa.

En una modalidad, el fármaco citotóxico se selecciona de caliqueamicina, tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, esperamicinas, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifen, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemiasterlinas, y maitansinoides.

En una modalidad, preferida el fármaco citotóxico es caliqueamicina. En una modalidad particularmente preferida, la caliqueamicina en una caliqueamicina gamma o un derivado de caliqueamicina gamma de N acetilo.

Todavía en otro aspecto el fármaco citotóxico se funcionaliza con 3-mercapto-3-metil butanoil hidrazida y se

conjuga a un portador proteínico por medio de la ligadura hidrolizable que puede liberar el fármaco citotóxico del conjugado después de enlazarse y entrar en las células objetivo.

En una modalidad preferida de este aspecto, la ligadura hidrolizable es ácido 4-(4-acetilfenoxi) butanoico (AcBut).

Todavía en otro aspecto de la invención se usa ácido octanoico o su sal, o ácido decanoico, o su sal como un aditivo durante el proceso de conjugación para disminuir la agregación e incrementar la carga de fármaco.

Todavía en otro aspecto de la invención los conjugados de la invención se purifican por un proceso de separación cromatográfica.

En una modalidad, el proceso de separación cromatográfica usado para separar el conjugado portador derivado de fármaco monomérico es una cromatografía de exclusión de tamaño (SEC).

En otra modalidad, el proceso de separación cromatográfica usado para separar el conjugado de portador derivado fármaco monomérico es cromatografía CLAR, FPLC o Sephacryl S-200.

En una modalidad preferida el proceso de separación cromatográfica usado para separar el conjugado de portador y derivado de fármaco monomérico en una cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). En una modalidad particularmente preferida, HIC se efectúa usando un medio cromatográfico de flujo rápido de fenil sefarosa 6, butil sefarosa 4 en un medio cromatografico de flujo rápido, medio cromatografico de flujo rápido de octil sefarosa 4, medio cromatografico de éter de Toyopearl 650M, medio HIC

Macro-Prep de metilo o un medio HIC Macro-Prep de t-butilo. En una modalidad más particularmente preferida la HIC se efectúa usando un medio de flujo rápido de butil sefarosa 4.

En otro aspecto, la invención se dirige a un conjugado portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico producido por el método de la invención. En una modalidad preferida de este aspecto el fármaco citotóxico usando es caliqueamicina y el portador usado es un anticuerpo.

En otra modalidad preferida el anticuerpo se selecciona de un grupo que consiste de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla o fragmento Fab y un fragmento F(ab)2. En un aspecto más particularmente preferido, se usa un anticuerpo humanizado dirigido contra el antígeno de superficie celular CD22.

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

En otra modalidad, el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR, que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 28.

En una modalidad preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO:30.

En otra modalidad preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia establecida en

SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 30.

Todavía en otra modalidad el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que es un anticuerpo variante obtenido por un protocolo de maduración de afinidad que tiene una especificidad aumentada para el CD22 humano.

En una modalidad preferida la caliqueamicina es una caliqueamicina gamma o N acetil gamma caliqueamicina.

En una modalidad, el derivado de caliqueamicina se funcionaliza con 3-mercapto-3-metil butanoil hidrazida.

En otra modalidad, la ligadura usada para conjugar el fármaco al portador es una ligadura hidrolizable que puede liberar el fármaco citotóxico a partir del conjugado después de enlace y entrada en las células objetivo. En una modalidad, preferida la ligadura hidrolizable es el ácido 4-(4-acetil fenoxi) butanoico (AcBut).

Otro aspecto de la invención se dirige a un conjugado de un derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo anti-CD22 que tiene la fórmula  $\text{Pr}(-\text{X}-\text{S}-\text{S}-\text{W})_m$  en donde Pr es un anticuerpo anti-CD22, X es una ligadura hidrolizable que comprende un producto de cualquier grupo reactivo que puede reaccionar con un anticuerpo; W es un radical de caliqueamicina, m es la carga promedio para un producto de conjugación purificado de manera que la caliqueamicina constituye 4-10% del conjugado en peso y  $(-\text{X}-\text{S}-\text{S}-\text{W})_m$  es un derivado de caliqueamicina generado por el proceso de la invención.

En una modalidad de este aspecto, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un grupo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un

anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab y un fragmento a F(ab)2.

En una modalidad preferida el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD22 que tiene especificidad para CD22 humano, y comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas como H1 en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) para CDR-H1, como H2 en la figura 1 (SEQ ID NO: 2) o H2' (SEQ ID NO: 13) o H2'' (SEQ ID NO: 15) o H2''' (SEQ ID NO: 16) para CDR-H2 o como H3 en la figura 1 (SEQ ID NO: 3) para CDR-H3 y comprende una cadena ligera en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas como L1 en la figura 1 (SEQ ID NO: 4) para CDR-L1 como L2 en la figura 1 (SEQ ID NO: 5) para CDR-L2, o como L3 en la figura 1 (SEQ ID NO: 6) para CDR-L3.

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

Todavía en otra modalidad preferida, el anticuerpo anti-CD22 comprende SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16 para CDR-H2, SEQ ID NO: 3 para CDR-H3, SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

En otra modalidad, el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo anti-CD22 injertado con CDR y comprende un

dominio variable que comprende regiones de estructura del aceptor humano y CDR de donadores no humanos.

En otra modalidad, el anticuerpo humanizado anti-CD22 tiene una estructura aceptor humano en donde las regiones del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se basan en una secuencia del consenso del subgrupo 1 humano y comprende residuos de donador no humano en las posiciones 1, 28, 48, 71 y 93. En otra modalidad, el anticuerpo humanizado comprende además residuos de un donador no humano en las posiciones 67 y 69.

En una modalidad preferida el anticuerpo humanizado injertado con CDR comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una región de estructura del aceptor humano con base en una secuencia de consenso humana del subgrupo 1 y comprende además residuos del donador no humano en las posiciones 2, 4, 37, 38, 45 y 60. En otra modalidad, el anticuerpo injertado con CDR comprende además residuo del donador no humano en la posición 3.

Todavía en otra modalidad el anticuerpo injertado CDR comprende una región variable de cadena ligera 5/44-gL1 / (SEQ ID NO: 19) y una región variable de cadena pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO: 27).

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

Todavía en otra modalidad el anticuerpo injertado con CDR comprende una cadena ligera tiene la secuencia como se establece SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene la secuencia como se establece en SEQ ID NO: 30.

En una modalidad el anticuerpo injertado con CDR anti-CD22 es un anticuerpo variante obtenido por un protocolo de maduración de afinidad y tiene una especificidad aumentada para el CD22 humano.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD22 es un anticuerpo quimérico que comprende las secuencias de los dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal establecido en SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8, respectivamente.

Todavía en otra modalidad el anticuerpo anti-CD22 comprende un CDR híbrido con una secuencia de CDR de donador truncada en donde la porción faltante del CDR del donador se reemplaza por una secuencia diferente y forma un CDR funcional.

En una modalidad particularmente preferida, el derivado del fármaco citotóxico es una caliqueamicina gamma o un derivado de caliqueamicina N acetil gamma.

En otro aspecto, la invención se dirige a una método para la preparación de la composición liofilizada estable de un conjugado de un portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico. En una modalidad, preferida la composición estable liofilizada del conjugado del portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico se prepara al (a) disolver el conjugado del portador derivado de fármacos citotóxico monomérico hasta una concentración final de 0.5 hasta 2 mg/ml en una solución que comprende un crioprotector a una concentración de 1.5%-5% en peso, un agente polimérico de volumen a una concentración de 0.5-1.5% en peso, electrolitos a una concentración de 0.01M a 0.1M, un agente facilitador de la solubilidad a una concentración de 0.005-0.05% en peso, agente amortiguador a

una concentración de 5-50 mM de manera tal que el pH final de la solución es 7.8-8.2, y agua; (b) dosificar la solución anterior en viales a temperatura de +5°C hasta +10°C; (c) congelar la solución a una temperatura de congelación de -35°C hasta -50°C; (d) someter la solución congelada a una etapa inicial de secado por congelación a una presión de secado primaria de 20 hasta 80 micras a una temperatura de anaquel a -10°C hasta -40°C por 24 hasta 78 horas; y (e) someter el producto secado por congelación de la etapa (d) a una etapa de secado secundaria a una presión de secado de 20 a 80 micras a una temperatura de anaquel de +10°C a + 35°C durante 15 a 30 horas.

En una modalidad, el crioprotector utilizado en la liofilización de conjugado de fármaco/portador citotóxico se selecciona del alditol, manitol, sorbitol, inositol, polietilen glicol, ácido aldónico, ácido urónico, ácido aldárico, aldosas, cetosas, amino azúcares, alditoles, inositoles, gliceraldehídos, arabinosa, lixosa, pentosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, hexosa, idosa, manosa, talosa, heptosa, glucosa, fructosa, ácido glucónico, sorbitol, lactosa, manitol, metil  $\alpha$ -glucopiranosida, maltosa, ácido isoascórbico, ácido ascórbico, lactona, sorbosa, ácido glucárico, eritrosa, treosa, arabinosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, eritrulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, tagatosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina, sacarosa, trehalosa, ácido neuramínico, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos, levano, fucoidano, carragenina, galactocarolosa, pectinas, ácidos pécticos, amilosa, pululano, glicógeno,

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

En una modalidad preferida, el crioprotector es sacarosa que está presente a una concentración de 1.5% en peso.

En una modalidad el agente de volumen polimérico utilizado durante el proceso de liofilización se selecciona de Dextrano 40 o almidón de hidroxietil 40, y está a una concentración de 0.9% en peso.

En otra modalidad el electrolito usado en la solución de liofilización es cloruro de sodio que está presente a una concentración de 0.05 M.

En una modalidad preferida un agente facilitador de la solubilidad se usa durante el proceso de liofilización. Preferiblemente este agente facilitador de la solubilidad es un tensoactivo. En una modalidad, particularmente preferida el tensoactivo es polisorbato 80, que está presente a una concentración de 0.01% en peso.

En una modalidad el agente amortiguador usado es trometamina que está presente a una concentración de 0.02 M. Se prefiere para el pH de la solución que sea de 8.0 al comienzo del proceso de liofilización. La solución que contiene el conjugado de portador/fármaco citotóxico se dosifica a los viales a una temperatura de +5°C previo al comienzo del proceso.

En una modalidad preferida, la solución de los viales se congela a una temperatura de -45°C; la solución

congelada se somete a una etapa inicial de secado por congelación a una presión de secado primaria de 60 micras y a una temperatura de anaquel de  $-30^{\circ}\text{C}$  por 60 horas; y el producto secado por congelación se somete a una etapa secundaria de secado, a una presión de secado de 60 micras, a temperatura de anaquel de  $+25^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Otro aspecto de la invención se dirige a una composición que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de un conjugado de un derivado/portador de fármacos citotóxico monomérico preparado por un método de la invención.

En una modalidad, el portador en el conjugado de portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico es un portador proteínico seleccionado de hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos e imitadores de anticuerpos.

En una modalidad preferida, el portador proteínico es un anticuerpo monoclonal humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.

En una modalidad preferida el anticuerpo humanizado se dirige contra el antígeno de superficie celular CD22.

En una modalidad particularmente preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-CD22 tiene especificidad para el CD22 humano y comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprenden un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas como H1 en la figura 1 (SEQ ID NO:1) para CDR-H1, como H2 en la figura 1 (SEQ ID NO:2) o H2' (SEQ ID NO:13) o H2'' (SEQ ID NO:15) o H2''' (SEQ ID NO:16) para CDR-H2, o como H3 en la figura 1 (SEQ ID NO:3) para CDR-H3, y comprende una cadena ligera en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas como L1 en la figura 1

para (SEQ ID NO:4) para CDR-L1, como L2 en la figura 1 (SEQ ID NO:5) para CDR-L2, o como L3 en la figura 1 (SEQ ID NO:6) para CDR-L3.

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

Todavía en otra modalidad preferida, el anticuerpo anti-CD22 comprende SEQ ID NO:1 para CDR-H1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16 para CDR-H2, SEQ ID NO:3 para CDR-H3, SEQ ID NO:4 para CDR-L1, SEQ ID NO:5 para CDR-L2, y SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

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

En otra modalidad particularmente preferida, el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que tiene especificidad para el CD22 humano y comprende una cadena ligera que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO:28 y una cadena pesada que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO:30.

En una modalidad, el anticuerpo injertado con CDR es un anticuerpo variante que tiene una especificidad

aumentada para el CD22 humano y el anticuerpo se obtiene por un protocolo de maduración de afinidad.

En una modalidad, el fármaco citotóxico monomérico es caliqueamicina y se selecciona preferiblemente de la gamma caliqueamicina o la N acetil caliqueamicina.

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

Todavía otro aspecto de la invención se dirige a un método de tratamiento de un sujeto con un trastorno proliferativo, al administrar al sujeto una dosis terapéuticamente efectiva de la composición de la invención. La composición se puede administrar subcutáneamente intraperitonealmente, intravenosamente, intraarterialmente, intramedularmente, intratecalmente, transdermalmente, transcutánea, intranasal, tópica, enteral, intravaginalmente, sublingualmente, o rectalmente. En una modalidad preferida la composición de la invención se administra intravenosamente.

En una modalidad la composición se administra a un sujeto humano que padece de un trastorno proliferativo tal como el cáncer. En una modalidad, preferida el cáncer es una malignidad de células B. La malignidad de células B puede ser una leucemia o linfoma que expresa un antígeno de superficie celular CD22.

Todavía en otra modalidad el cáncer es un carcinoma o un sarcoma.

Otro aspecto de la presente invención se dirige a un método de tratamiento de una malignidad de células B al administrar a un paciente con tal malignidad una

composición terapéuticamente efectiva que comprende un anticuerpo anti-CD22 citotóxico conjugado de la invención. En una modalidad, preferida la malignidad de células B es un linfoma, particularmente linfoma No Hodgkin.

En una modalidad el fármaco citotóxico usado para preparar los conjugados de la presente invención se selecciona del grupo que consiste de caliqueamicinas, tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifeno, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemiasterlinas, maitansinoides, y esperamicinas.

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

En otra modalidad, el tratamiento comprende la administración de un conjugado de fármaco citotóxico de la invención con uno o más agentes bioactivos seleccionados de anticuerpos factores de crecimiento, hormonas, citocinas, antihormonas, xantinas, interleucinas, interferones, y fármacos citotóxicos.

En una modalidad preferida el agente bioactivo es un anticuerpo y se dirige contra un antígeno de superficie celular expresado en malignidades de células B. En una modalidad adicional preferida, el anticuerpo dirigido contra antígenos de superficie celular expresado en las malignidades de células B se selecciona de un grupo que consiste de anticuerpos anti-CD19, anti-CD20 y anti-CD33. Tales anticuerpo incluyen el anticuerpo anti-CD20, rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>).

En otra modalidad los agentes bioactivos son citoxinas o factores de crecimiento e incluyen pero no se limitan a interleucina 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF.

En otra modalidad los agentes bioactivos son hormonas e incluyen estrógenos, andrógenos, progestinas, y corticosteroides.

Todavía en otra modalidad el agente bioactivo es un fármaco citotóxico seleccionado de doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carubicina, nogalamicina, menogarilo, pitarubicina, valrubicina, citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, azacitidina, doxifluridina, pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina, gougierotina, puromicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, procarbazona, metotrexato, fluoruracilos, etopósido, taxol, análogos de taxol, y mitomicina.

En una modalidad preferida, la composición terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-CD22 de fármacos citotóxicos conjugado se administra junto con una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento, en donde la combinación de agentes citotóxicos se selecciona de: CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y procarbazona); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona); COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona); CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazona, bleomicina, vincristina, y prednisona); M-

BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorin); ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, citarabina, bleomicina, y vincristina); MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina, y leucovorin); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, y vinblastina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina), ChIVPP (clorambucil, vinblastina, procarbazona, y prednisona); IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, y etopósido); MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, y etopósido); DHAP (dexametasona, citarabina de alta dosis, y cisplatina); ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina de alta dosis, y cisplatina); CEPP (B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona, y bleomicina); CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina, - y prednisona); y CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona).

En una modalidad preferida, la composición terapéuticamente efectiva del anticuerpo citotóxico anti-CD22 de fármaco conjugado se administra previo a la administración de una o más de las composiciones anteriores de fármacos citotóxicos. En otra modalidad preferida la

composición terapéuticamente efectiva del conjugado citotóxico de anticuerpo anti-CD22 y fármaco se administra posterior a una o más de las combinaciones anteriores de fármacos citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.

Otro aspecto de la invención se dirige a un método de tratamiento de linfomas agresivos que comprende administrar a un paciente que necesita del tratamiento, una composición terapéuticamente efectiva de un conjugado de anticuerpo anti- CD22 derivado de caliqueamicina monomérica junto con uno o más agentes bioactivos.

Todavía otro aspecto de la presente invención se dirige al uso de la composición de la invención, en el tratamiento de un sujeto con un trastorno proliferativo tal como el cáncer. En particular, el cáncer es una malignidad de las células B que expresa el antígeno CD22 en la superficie celular. En particular la malignidad de células B es una leucemia o un linfoma. En una modalidad, el cáncer es carcinoma o una leucemia.

En una modalidad, la dosis terapéuticamente efectiva de la composición se administra subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intraarterialmente, intramedularmente, intratecalmente, transdermalmente, transcutáneamente, intranasalmente, tópicamente, enteralmente, intravaginalmente, sublingualmente o rectalmente.

En una modalidad preferida la dosis terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención se administra intravenosamente.

Otro aspecto de la invención se dirige al uso de un conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado de

caliqueamicina monomérico de la presente invención, para uso en el tratamiento de un sujeto con una malignidad de células B tal como el linfoma No Hodgkin. En una modalidad el conjugado de anticuerpo/anti-CD22 derivado de caliqueamicina monomérica de la presente invención se administra con uno o más agentes bioactivos.

En una modalidad, los agentes bioactivos se seleccionan de un grupo que consiste de anticuerpo, factores de crecimiento, hormonas, citocinas, antihormonas, xantinas, interleucinas, interferones, y fármacos citotóxicos.

En una modalidad, preferida el agente bioactivo es un anticuerpo dirigido contra un antígeno de superficie celular expresado en las malignidades de células B tales como anticuerpos anti-CD19, anti-CD20 y anti-CD33. En una modalidad preferida el anticuerpo anti-CD20 es rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>).

En otra modalidad los agentes bioactivos incluyen citocinas o factores de crecimiento tales como interleucina 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF u hormonas que incluyen estrógenos, andrógenos, progestinas y corticosteroides.

En otra modalidad el agente bioactivo es un fármaco citotóxico seleccionado de doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carubicina, nogalamicina, menogaril, pitarubicina, valrubicina, citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, azacitidina, doxifluridina, pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina, gougierotina, puromicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, dacarbazina,

vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, procarbazona, metotrexato, flurouracilos, etopósido, taxol, análogos de taxol, y mitomicina.

En una modalidad preferida, la dosis terapéuticamente efectiva del conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado monomérico de caliqueamicina se administra junto con una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte del régimen del tratamiento, en donde la combinación de agentes citotóxicos se selecciona de CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y procarbazona); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona); COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona); CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazona, bleomicina, vincristina, y prednisona); M-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorin); ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, citarabina, bleomicina, y vincristina); MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina; prednisona, bleomicina, y leucovorin); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina); MOPP (mecloetamina; vincristina, prednisona y procarbazona) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, y vinblastina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina,

vinblastina, y dacarbazina); CHIVPP (clorambucil, vinblastina, procarbazina, y prednisona); IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, y etopósido); MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, y etopósido); DHAP (dexametasona, citaribina de alta dosis, y cisplatina); ESHAP (etopósido, metilpredisolona, citarabina de alta dosis, y cisplatina); CEPP (B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazina, prednisona, y bleomicina); CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina, y prednisona); CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona), ESHOP (etopósido, metilpredisolona, citarabina de alta dosis, vincristina y cisplatina); EPOCH (etopósido, vincristina, y doxorubicina por 96 horas con dosis de bolo de ciclofosfamida y prednisona oral), ICE (ifosfamida, ciclofosfamida, y etopósido), CEPP (B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazina, prednisona, y bleomicina), CHOP-B. (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y bleomicina, CEPP-B (ciclofosfamida, etopósido, procarbazina, y bleomicina, y P/DOCE (epirubicina o doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida, y prednisona).

En una modalidad preferida, el conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado monomérico de caliqueamicina se administra previo a la administración de una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.

En otra modalidad preferida la dosis terapéuticamente efectiva de un conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado monomérico de caliqueamicina se administra posterior a la administración de una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.

Todavía en otra modalidad preferida, la dosis

terapéuticamente efectiva del conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado monomérico de caliqueamicina se administra junto con un anticuerpo dirigido contra un antígeno de superficie celular en malignidades de células B, y comprende opcionalmente una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.

En otro aspecto, la invención se dirige al uso de un conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado monomérico de caliqueamicina de la presente invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo. Tal medicamento se puede usar para tratar trastornos proliferativos de células B ya sea solos o en combinación con otros agentes bioactivos.

#### **Breve Descripción de Las Figuras**

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de los CDR de anticuerpo monoclonal de ratón 5/44 (SEQ ID NOS:1 a 6).

La figura 2 muestra la secuencia de ADN y de proteínas de la variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que es el dominio del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44.

La figura 3 muestra la secuencia completa del dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44.

La figura 4 muestra la estrategia de separación del sitio de glicosilación y lisina reactiva en CDR-H2.

La figura 5 muestra el diseño de injertos para la secuencia de cadena ligera 5/44. DPK-9 es la secuencia de estructura del aceptor de la línea germinal humana. Las líneas verticales indican las diferencias entre los residuos humanos y de ratón. Las secuencias subrayadas

indican residuos del donador que se han retenido en el injerto. Los CDR se indican en letras *itálicas* en **negritas** (no se muestra para DPK-9). El injerto gL1 tiene 6 residuos de estructura del donador, gL2 tiene 7.

La figura 6 muestra el diseño de injertos para la secuencia de cadena pesada 5/44; DP7 es la secuencia de estructura del aceptor de línea germinal humana. Las líneas verticales indican diferencias dentro de los residuos humanos y de ratón. Las secuencias subrayadas indican los residuos del donador que han sido retenidos en el injerto. Los CDR se indican en *itálicas*, las letras en **negritas** (no se muestran para DP7). Los injertos gH4 y gH6 tienen 6 residuos de estructura del donador. Los injertos gH5 y gH7 tienen 4 residuos de estructura del donador.

La figura 7 muestra el mapa del vector pMRR14.

La figura 8 muestra el mapa del vector pMRR10.1.

La figura 9 muestra los resultados del ensayo Biacore de los mutantes quiméricos 5/44.

La figura 10 muestra los oligonucleótidos para los ensambles de genes 5/44 gH1 y GL1.

La Figura 11 muestra el mapa de plásmidos del vector intermediario pCR2.1 (544gH1).

La figura 12 muestra el mapa de plásmidos del vector intermediario pCR2.1 (544gL1).

La figura 13 muestra los casetes de oligonucleótidos utilizados para hacer injertos adicionales.

La figura 14 es una gráfica que muestra un ensayo de competición entre un anticuerpo 5/44 de ratón etiquetado fluorescentemente y variantes injertadas.

La figura 15 es una gráfica que muestra un ensayo de competición entre un anticuerpo 5/44 de ratón etiquetado

fluorescentemente y variantes injertadas.

La figura 16 muestra el ADN completo y la secuencia de proteínas de las cadenas ligeras y pesadas injertadas.

La figura 17 es una representación esquemática de un conjugado de DMH de caliqueamicina con anticuerpo NAC-gamma.

La figura 18 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544 en el crecimiento de linfoma de células B RAMOS.

La figura 19 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544 en linfomas grandes de células B en un modelo de xenoinjerto in vivo en ratones descubiertos.

La figura 20 es una gráfica que compara los efectos de CMC-544 hecho con el proceso de conjugación CMA-676 y el proceso de conjugación CMC-544 en el crecimiento del linfoma RL.

La figura 21 es una gráfica que muestra el linfoma RL tratado con rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>) que es susceptible a tratamiento con CMC-544.

La figura 22 es una gráfica que muestra el efecto de rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>) en el efecto citotóxico de CMC-544.

La figura 23 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544, rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>), y CMA-676 en la supervivencia de ratones SCID con un linfoma temprano diseminado RAMOS B.

La figura 24 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544, rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>), y CMA-676 en la supervivencia de ratones SCID con un linfoma tardío diseminado RAMOS B.

La figura 25 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544, rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>), y CMA-676 en la supervivencia de ratones SCID con linfoma tardío diseminado RAMOS B.

La figura 26 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544, rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>), y CMA-676 en la

supervivencia de ratones SCID con linfoma tardío diseminado RAMOS B.

La figura 27 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544, rituximab (Rituxant<sup>TM</sup>), y CMA-676 en la supervivencia de ratones SCID con linfoma tardío diseminado RAMOS B.

La figura 28 es una gráfica que muestra la actividad anti-tumor CMC-544 con y sin rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>) sobre un linfoma que no es Hodgkin RL.

La figura 29 es una gráfica que muestra la actividad anti-tumor de CMC-544 y CHOP en un linfoma RL que no es Hodgkin.

#### **Descripción Detallada de la Invención**

Los conjugados de la presente invención comprenden un fármaco citotóxico derivado con una ligadura que incluye cualquier grupo reactivo que reacciona con un portador proteínico para formar un conjugado portador proteínico derivado de un fármaco citotóxico. Específicamente, los conjugados de la presente invención comprenden un fármaco citotóxico derivado con una ligadura que incluye cualquier grupo reactivo que reacciona con un anticuerpo usado como un portador proteínico, para formar un conjugado de anticuerpos de fármacos citotóxico. Específicamente el anticuerpo reacciona contra un antígeno de superficie celular en malignidades de células B. Se describe a continuación un proceso mejorado para la elaboración y purificación de tales conjugados. El uso de cosolventes en particular, aditivos y condiciones de reacción específicas junto con el proceso de separación, resulta en la formación de un conjugado de anticuerpo/derivado de fármaco

citotóxico monomérico con una reducción importante en el LCF. La forma monomérica, opuesto a la forma agregada tiene un valor terapéutico importante y minimiza el LCF y reduce substancialmente los resultados de agregación en la utilización en el material de partida de anticuerpos en una forma terapéuticamente significativa al evitar que el LCF compita con una fracción más altamente conjugada (HCF).

#### I. PORTADORES

Los agentes portadores/objetivo de la presente invención son preferiblemente agentes portadores/objetivo proteínicos. Se incluyen como agentes portadores/proteínicos las hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, imitaciones de anticuerpos y sus contrapartes preparadas por ingeniería genéticamente o enzimáticamente, referidas de aquí en adelante o singularmente como un grupo de portadores. La propiedad esencial de un portador es su capacidad de reconocer o enlazarse a un antígeno o receptor asociado con células indeseables e interiorizarse posteriormente. Los ejemplos de portadores que aplican en la presente invención se describen en la patente de E.U.A No. 5,053, 394, que se incorpora en la presente en su totalidad. Los portadores preferidos para su uso en la presente invención son anticuerpos e imitadores de anticuerpos.

Se han utilizado diversos andamiajes de proteínas que no son de inmunoglobulina, para generar imitaciones de anticuerpo que se enlazan a epítomos antígenicos con la especificidad de un anticuerpo (publicación PCT No. WO 00/34784). Por ejemplo, un andamiaje de "minicuerpo" que se

relaciona con el pliegue de inmunoglobulina se ha diseñado al suprimir tres hebras beta de un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal (Tramontano et al., J. Mol. Recognit. 7:9, 1994). Esta proteína incluye 61 residuos y se puede usar para presentar dos circuitos hipervariables. Estos dos circuitos han sido aleatorizados y seleccionados los productos para enlace de antígenos, pero hasta ahora la estructura parece estar de alguna forma limitada en utilidad debido a los problemas de solubilidad. Otra estructura utilizada para desplegar circuitos es un tendamistat, una proteína que inhibe específicamente las alfa amilasas de mamíferos y es un intercalado de lámina beta de 6 hebras y 74 residuos que se mantienen junto con dos enlaces bisulfuro (McConnell and Hoess, J. Mol. Biol. 250: 460, 1995). Este andamiaje incluye tres circuitos pero hasta la fecha, solamente se han examinado dos de estos circuitos para un potencial de aleatorización.

Se han probado otras proteínas como estructuras y se han utilizado para desplegar residuos aleatorios en superficies de hélice alfa (Nord et al., Nat. Biotechnol. 15: 772, 1997; Nord et al., Protein Eng. 8: 601, 1995), circuitos entre las hélices alfa en los conjuntos de hélices alfa (Ku and Schutz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6552, 1995), y circuitos limitados por puentes de bisulfuro tales como aquellos de los inhibidores de proteasa pequeños (Markland et al., Biochemistry 35: 8045, 1996; Markland et al., Biochemistry 35: 8058, 1996; Rottgen and Collins, Gene 164: 243, 1995; Wang et al., J. Biol. Chem. 270: 12250, 1995).

Ejemplos de los portadores de anticuerpos que se pueden usar en la presente invención incluyen anticuerpos

monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, y fragmentos biológicamente activos de los mismos. Preferiblemente tales anticuerpos se dirigen contra los antígenos de superficie celular expresados en células y/o tejidos objetivo en trastornos proliferativos tales como cáncer. Ejemplos de los anticuerpos específicos dirigidos contra antígenos de superficie celular en células objetivo incluyen sin limitación, anticuerpos contra el antígeno CD22 que se sobreexpresa en la mayoría de los linfomas de células B, G5/44, una forma humanizada de un anticuerpo monoclonal anti-CD22 murino, anticuerpos contra el antígeno de superficie de células CD33, que prevalece en ciertos tumores mieloides humanos especialmente leucemia mieloide aguda hP67.6, una forma humanizada de un anticuerpo murino anti-CD33 (ver patente de E.U. No. 5,773,001); un anticuerpo contra el antígeno PEM que se encuentra en muchos tumores de origen epitelial designado mP67.6 (ver I. D. Bernstein et al., J. Clin. Invest. 79: 1153 (1987) y I. D. Bernstein et al., J. Immunol. 128: 867-881 (1992)); y un anticuerpo humanizado contra el antígeno de carbohidrato de Lewis y sobreexpresado en muchos tumores sólidos designados como hu3S193, (ver patente de E.U. No 6,310, 185 B1). Además existen varios anticuerpos comercialmente disponibles tales como rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>) y trastuzumab (Herceptin<sup>TM</sup>), que también se pueden usar como agentes de direccionamiento/portadores. Rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>) es un anticuerpo quimérico anti-CD20 usado para el tratamiento de diversos linfomas de células B y trastuzumab (Herceptin<sup>TM</sup>) es un anticuerpo humanizado anti-Her2 usado para tratar el cáncer de mama.

Se ejemplifica para su uso en la presente como un portador en la presente invención, una molécula de anticuerpo humanizado injertado con CDR dirigido contra el antígeno de superficie celular CD22, designado como G5/44. Este anticuerpo es una forma humanizada de un anticuerpo monoclonal murino que se dirige contra el antígeno de superficie celular anti-CD22 que es frecuente en ciertos linfomas humanos. El término "una molécula de anticuerpos injertada con CDR" como se usa en la presente se refiere a una molécula de anticuerpo en donde la cadena ligera y/o pesada contiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRS) que incluyen si se desea un CDR modificado (de aquí en adelante CDR) a partir de un anticuerpo donador (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertado en una estructura de región variable de cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Preferiblemente tal anticuerpo injertado con CDR tiene dominio variable que comprende regiones de estructura del aceptor humanas así como uno o más CDR del donador antes referidos.

Cuando se injertan los CDR, se puede usar cualquier región variable del aceptor adecuada en una secuencia de estructura que tenga referencia al tipo/clase del anticuerpo del donador a partir del cual se derivan los CDR incluyendo regiones de estructura humanas de primates y de ratón. Ejemplos de las estructuras humanas que se pueden usar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat et al. Seq. of Proteins of Immunol. Interest, 1: 310-334 (1994)). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden usar para la cadena pesada REI se puede usar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se puede usar para la cadena

ligera y pesada.

En un anticuerpo injertado con CDR con la presente invención se puede usar como un anticuerpo aceptor uno que tengan cadenas que sean homólogas a las cadenas del anticuerpo donador. Las cadenas ligera y pesada del aceptor no necesariamente necesitan derivarse del mismo anticuerpo y pueden si se desea, comprender cadenas compuestas que tengan regiones de estructura derivadas de cadenas diferentes.

También en un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, las regiones de estructura no necesitan tener exactamente la misma secuencia que aquellas del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, se pueden cambiar los residuos no usuales a residuos que se presentan más frecuentemente para esa clase o tipo de cadena del aceptor. Alternativamente, los residuos seleccionados en las regiones de estructura del aceptor se pueden cambiar de manera que correspondan al residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo del donador, o a un residuo que tiene una substitución conservadora para el residuo que se encuentra en la misma posición en el anticuerpo del donador. Tales cambios se deben mantener en un mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donador. Un protocolo para la selección de residuos en las regiones de estructura del aceptor que se puede necesitar cambiar se establece publicación PCT No. WO 91/09967, que se incorpora aquí en su totalidad.

Los residuos del donador son residuos del anticuerpo donador esto es, el anticuerpo a partir del cual se derivaron originalmente los CDR.

El anticuerpo de la presente invención puede

comprender una cadena pesada en donde el dominio variable comprende como CDR-H2 (como se define por Kabat et al., (supra)) un H2' en el cual se ha retirado una secuencia del sitio de glicosilación potencial con objeto de incrementar la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

Alternativa o adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención puede comprender una cadena pesada en donde el dominio variable comprende como CDR-H2 (como se define por Kabat et al., (supra)) un H2' en el cual un residuo de lisina está en la posición 60. Este residuo de lisina que se localiza en una posición expuesta dentro de CDR-H2, y se considera que tiene el potencial para reaccionar con los agentes de conjugación que resulta en una reducción de afinidad de enlace del antígeno, se substituye con un aminoácido alternativo.

Adicionalmente el anticuerpo de la presente invención puede comprender una cadena pesada en donde el dominio variable comprende como CDR-H2 (como se define por Kabat et al., (supra)) un H2'' en el cual tanto en la secuencia del sitio de glicosilación potencial como el residuo de lisina en la posición 60, se substituyen con aminoácido alternativos.

El anticuerpo de la presente invención puede comprender: un anticuerpo completo que tengan cadenas ligeras y pesadas desde longitud completa; un fragmento biológicamente activo del mismo tal como Fab, modificado Fab, fragmento Fab', F(ab')<sub>2</sub> o Fv; un monómero o dímero de cadena pesada o ligera o un anticuerpo de cadena sencilla por ejemplo, un Fv de cadena sencilla en el cual los dominios variables de cadena ligera y pesada se unen por una ligadura de péptidos. Similarmente, las regiones

variables de cadena ligera y pesada se pueden combinar con otros dominios de anticuerpo como sea adecuado.

El anticuerpo de la presente invención también puede incluir un fragmento Fab modificado en donde la modificación es la adición de uno o más aminoácidos para permitir la colocación de una molécula reportera o efectora al extremo de la terminal C de su cadena pesada. Preferiblemente los aminoácidos adicionales forman una región de articulación modificada que contiene uno o dos residuos de cisteína a los cuales la molécula reportera o del efector se pueden colocar.

Los dominios de región constante del anticuerpo de la presente invención si están presentes, se pueden seleccionar haciendo referencia a la función propuesta del anticuerpo, y en particular a las funciones del efector que puedan o no requerirse. Por ejemplo los dominios de región constante pueden ser dominios humanos IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En particular los dominios de región constante IgG humanos se pueden usar especialmente los isotipos IgG1 y IgG3, cuando el anticuerpo se pretende para usos terapéuticos y se requieren las funciones del efector de anticuerpos. Alternativamente, los isotipos IgG2 y IgG4 se pueden usar o se pueden mutar la región con IgG1 Fc para suspender la función del efector cuando se pretenda el anticuerpo para propósitos terapéuticos y las funciones del efector de anticuerpos no se requieran o se deseen.

El anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de enlace de al menos  $5 \times 10^{-8}$  M, preferiblemente al menos  $1 \times 10^{-9}$  M, más preferiblemente al menos  $0.75 \times 10^{-10}$  M, y más preferiblemente al menos  $0.5 \times 10^{-10}$  M.

En una modalidad, la presente invención se refiere a

conjugados de inmunotoxinas y métodos para la elaboración de estos conjugados, usando variantes de anticuerpos o imitaciones de anticuerpos. En una modalidad preferida las variantes del anticuerpo de la presente invención se dirigen contra CD22 y despliegan una afinidad mejorada con CD22. Tales variantes se pueden obtener por diversos protocolos de maduración de afinidad que incluyen la mutación de los CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), mezclado de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutadoras de E.coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), mezclado de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), despliegue de fago (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998).

Se puede usar cualquier sistema de vector/célula hospedadora adecuada para la expresión de secuencias de ADN que codifiquen el portador que incluyen los anticuerpos de la presente invención. Se pueden usar sistemas bacterianos por ejemplo E.coli y otros sistemas microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos Fab y F (ab')<sub>2</sub>, y especialmente fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla, por ejemplo Fvs de cadena sencilla. Se pueden usar sistemas de expresión eucarióticos de células hospedadoras, por ejemplo, de mamíferos para la producción de anticuerpos mayores que incluyen moléculas de anticuerpos completas. Las células hospedadoras de mamíferos adecuadas incluyen CHO, células de mieloma, células de levadura, células de insectos, células de hibridoma, células NSO, VERO o PER C6. Los sistemas de expresión adecuados también incluyen

animales y plantas transgénicas.

## II. AGENTES TERAPÉUTICOS

Los agentes terapéuticos adecuados para su uso en la presente invención, son fármacos citotóxicos que inhiben o fragmentan la polimerización de tubulina, agentes de alquilación que se enlazan y fragmentan el ADN y agentes que inhiben la síntesis de proteínas o proteínas celulares esenciales tales como proteína cinasas, enzimas, y ciclinas. Ejemplos de tales ejemplos citotóxicos incluyen pero no se limitan a tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifen, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemiasterlinas, caliqueamicinas, esperamicinas y maitansinoides. Los fármacos citotóxicos preferidos son las caliqueamicinas que son un ejemplo de los antibióticos antitumor de trisulfuro de metilo. Los ejemplos de las caliqueamicina adecuadas para su uso en la presente invención, se describen por ejemplo, en la patente de E.U. No. 4,671,958; patente de E.U. No. 4,970,198, patente de E.U. No. 5,053,394, patente de E.U. No. 5,037,651; y patente de E.U. No. 5,079,233, que se incorporan aquí en su totalidad. La caliqueamicinas preferidas son los derivados de caliqueamicina gamma o los derivados de N acetil gamma caliqueamicina.

## III. CONJUGADOS DE DERIVADO/PORTADOR DE FÁRMACO CITOTÓXICO.

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

Pr es un portador proteínico,

X es un enlace que comprende un producto de cualquier

grupo reactivo que pueda reaccionar con un portador proteínico

W es el fármaco citotóxico;

m es la carga promedio para un producto de conjugación tal como la caliqueamicina que constituye 4-10% del conjugado en peso y

$(-X-W)_m$  es un fármaco citotóxico

Preferiblemente, X tiene la fórmula

$(CO-Alk^1-SP^1-Ar-SP^2-Alk^2-C(Z^1)=Q-SP)$

en donde

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

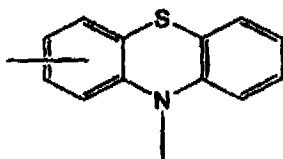
$Sp^1$  es un enlace,  $-S-$ ,  $-O-$ ,  $-CONH-$ ,  $-NHCO-$ ,  $-NR'-$ ,  $-N(CH_2CH_2)_2N-$ , o  $-X-Ar'-Y-(CH_2)_n-Z$  en donde X, Y, y Z es independientemente un enlace,  $-NR'-$ ,  $-S-$ , o  $-O-$ , con la condición de que cuando  $n=0$ , entonces al menos uno de Y y Z debe ser un enlace y  $Ar'$  es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos, tres grupos de  $(C_1-C_5)$  alquilo,  $(C_1-C_4)$  alcoxi,  $(C_1-C_4)$  tialcoxi, halógeno, nitro,  $-COOR'$ ,  $-CONHR'$ ,  $-(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-S(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-O(CH_2)_nCONHR'$ , o  $-S(CH_2)_nCONHR'$ , con la condición de que cuando  $Alk^1$  es un enlace,  $Sp^1$  es un enlace;

n es un entero desde 0 hasta 5;

$R'$  es una cadena ramificada o no ramificada  $(C_1-C_5)$  opcionalmente sustituida por uno o dos grupos de  $-OH$ ,  $(C_1-C_4)$  alcoxi,  $(C_1-C_4)$  tioalcoxi, halógeno, nitro,  $(C_1-C_3)$  dialquilamino, o  $(C_1-C_3)$  trialquilamonio -A donde A- es un anión farmacéuticamente aceptable que completa una sal;

Ar es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos, o tres grupos de  $(C_1-C_6)$  alquilo,  $(C_1-C_5)$  alcoxi,  $(C_1-C_4)$  tioalcoxi, halógeno, nitro,  $-COOR'$ , -

CONHR',  $-O(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-S(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-O(CH_2)_nCONHR'$ , o  $-S(CH_2)_nCONHR'$  en donde n y R' son como se definieron hasta aquí o un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, o 2, 7-naftilideno o



con cada naftilideno o fenotiazina opcionalmente substituido con uno, dos, tres o cuatro grupos de  $(C_1-C_6)$  alquilo,  $(C_1-C_5)$  alcoxi,  $(C_1-C_4)$  tioalcoxi, halógeno, nitro,  $-COOR'$ ,  $-CONHR'$ ,  $-O(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-S(CH_2)_nCOOR'$ , o  $-S(CH_2)_nCONHR'$  en donde n y R' son como se definen arriba, con la condición de que cuando Ar es fenotiazina,  $Sp^1$  es un enlace solo unido a nitrógeno ;

$Sp^2$  es un enlace,  $-S-$ , o  $-O-$ , con la condición de que cuando  $Alk^2$  es un enlace,  $Sp^2$  es un enlace;

$Z^1$  es H,  $(C_1-C_5)$  alquilo, o fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos, o tres grupos de  $(C_1-C_5)$  alquilo,  $(C_1-C_5)$  alcoxi,  $(C_1-C_4)$  tioalcoxi, halógeno, nitro,  $-COOR'$ ,  $-ONHR'$ ,  $-O(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-S(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-O(CH_2)_nCONHR'$ , o  $-S(CH_2)_nCONHR'$  en donde n y R' son como se define arriba;

Sp es un radical divalente o trivalente  $(C_1-C_{18})$  de cadena ramificada, radical aril o heteroarilo divalente o trivalente radical, radical divalente o trivalente  $(C_3-C_{18})$  cicloalquilo o heterocicloalquilo radical divalente o trivalente aril- o heteroaril-arilo  $(C_1-C_{18})$ , radical divalente o trivalente cicloalquil- o heterocicloalquil-alquilo  $(C_1-C_{18})$  o radical divalente o trivalente  $(C_2-C_{18})$  no saturado alquilo, en donde heteroarilo es preferiblemente furilo, tienilo, N-metilpirrolilo, piridinilo, n-metilimidazolilo, oxazolilo, pirimidinilo, quinolilo,

806

isoquinolilo, N-metilcarbazoilo, aminocumarinilo, o fenazinilo y en donde si Sp es un radical trivalente, Sp puede estar adicionalmente substituido por (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) dialquilamino inferior, (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) alcoxi inferior, hidroxilo, o grupos (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) alquiltio inferior; y

Q es =NHNCO-, =NHNCS-, =NHNCONH-, =NHNCSNH-, o =NHO-.

Preferiblemente, Alk<sup>1</sup> es una cadena ramificada o no ramificada (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) alquilenos; Sp' es un enlace, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, o -NR' en donde R' es como se definió hasta aquí, con la condición de que cuando Alk' es un enlace, Sp<sup>1</sup> es un enlace;

Ar es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente substituido con uno, dos o tres grupos de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) alquilo, (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) alcoxi, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) tioalcoxi, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR' -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR' -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR', o -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR' en donde n y R' son como se definió hasta aquí, o Ar es un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, o 2,7-naftilideno cada uno opcionalmente substituido con uno, dos, tres, o cuatro grupos de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) alquilo, (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) alcoxi, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) tioalcoxi, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR' o -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR'.

Z<sup>1</sup> es (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) alquilo, o fenilo opcionalmente substituido con uno, dos o tres grupos de (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) alquilo, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) alcoxi, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) tioalcoxi, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR', o -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR'; Alk<sup>2</sup> y Sp<sup>2</sup> son juntos un enlace; y Sp y Q son como se definió inmediatamente arriba.

La patente de E.U. No. 5,773, 001, que se incorpora aquí en su totalidad, describe enlaces que se pueden usar con derivados nucleofílicos, particularmente hidrazidas y

nucleófilos relacionados preparados a partir de las caliqueamicinas. Estas ligaduras son especialmente útiles en donde una mejor actividad se obtiene cuando la ligadura formada entre en fármaco y el enlace es hidrolizable. Estas ligaduras contienen dos grupos funcionales. Un grupo típicamente es un ácido carboxílico que se utiliza para reaccionar con el portador. El grupo funcional ácido cuando se activa adecuadamente, puede formar una ligadura de amida con un grupo amina libre del portador tal como por ejemplo, la amida en la cadena lateral de una lisina de un anticuerpo u otro portador proteínico. El otro grupo funcional comúnmente es un grupo carbonilo, esto es, un aldehído o una acetona que reaccionará con el agente terapéutico modificado adecuadamente. Los grupos carbonilo pueden reaccionar en un grupo hidrazida en el fármaco para formar una ligadura de hidrazona. Esta ligadura se hidroliza lo que permite la liberación del agente terapéutico del conjugado después de enlazarse a las células objetivo.

Dentro de las ligaduras bifuncionales preferidas dentro de la presente invención se encuentran:

- 1) Ácido 2-(4-formilfenoxi) acético,
- 2) Ácido 4-formilbenzoico,
- 3) Ácido 2-(4-formil-3-metoxifenoxi) acético,
- 4) Ácido 6-formil-2-naftoico,
- 5) Ácido 3-(4-(2-oxoetoxi)fenil)propanoico,
- 6) Ácido 3-(2-oxoetoxi)benzoico,
- 7) Ácido 4-(4-acetilfenoxi) butanoico,
- 8) Ácido 4-(3-formilfenoxi) butanoico,
- 9) Ácido 4-(4-formilfenoxi) butanoico,
- 10) Ácido 4-(4-acetil-2-metilfenoxi) butanoico,

- 11) Ácido 4-(4-acetil-2-metoxifenoxi) butanoico,
- 12) Ácido 3-(4-formilfenil) propanoico,
- 13) Ácido 4-(5-formil-2,3-dimetoxifenoxi) butanoico,
- 14) Ácido 4-(4-acetil-2,6-dimetoxifenoxi) butanoico,
- 15) Ácido 4-(4-acetil-2-metoxifenoxi) butanoico,
- 16) Ácido 4-(4-(3-oxobutil)fenoxi) butanoico,
- 17) Ácido 4-(2-acetil-5-metoxifenoxi) butanoico,
- 18) Ácido 4-(4-(3-oxopropil)fenoxi) butanoico,
- 19) Ácido 4-(4-acetilfenil) butanoico,
- 20) Ácido 4-(2-acetilnaftalen-1-iloxi) butanoico,
- 21) Ácido 4-(4-(4-fluorobenzoil)fenoxi) butanoico,
- 22) Ácido 5-(4-(4-acetilfenil)piperazin-1-il)  
pentanoico,
- 23) Ácido 11-(4-acetilfenoxi) undecanoico,
- 24) Ácido 5-(4-acetilfenilamino)-5-oxopentanoico,
- 25) Ácido 4-(2-cloro-4-formilfenoxi) butanoico,
- 26) Ácido 4-(4-acetil-2-(metoxicarbonil)fenoxi)  
butanoico,
- 27) Ácido 4-(4-formil-2-nitrofenoxi) butanoico,
- 28) Ácido 4-(2-((4-acetilfenilamino)metil)-6-  
metoxifenoxi) butanoico,
- 29) Ácido 4-(4-acetil-2-((3-bromopropoxi)carbonil)  
fenoxi) butanoico,
- 30) Ácido 4-(4-acetil-3-fluorofenoxi) butanoico,
- 31) Ácido 4-(2-acetilfenoxi) butanoico,
- 32) Ácido 6-(2-acetil-10H-fenotiazin-10-il)  
hexanoico,
- 33) Ácido 2-(4-acetilfenil) acético,
- 34) Ácido 4-(4-acetil-2-(2-(dimetilamino)  
etilcarbamoil)fenoxi) butanoico,
- 35) butanoato de 4-(4-acetil-2-(2-(trimetilamonio)

etilcarbamoil) fenoxi), y

36) benzoato de 5-acetil-2-(2-oxo-2-(2-(trimetilamonio) etilamino) etoxi).

Una ligadura bifuncional más preferida para su uso en la presente invención es el ácido 4-(4-acetifenoxi) butanoico (AcBut) que resulta en un producto preferido en donde el conjugado consiste de  $\beta$ -caliqueamicina,  $\gamma$ -caliqueamicina o N-acetil  $\gamma$  caliqueamicina funcionalizada para reaccionar con la 3-mercapto-3metil butanil hidrazida, la ligadura AcBut y un portador del direccionamiento del anticuerpo IgG humano o humanizado.

#### IV. CONJUGACION MONOMÉRICA

La naturaleza natural hidrofóbica de muchos fármacos citotóxicos que incluyen las caliqueamicinas, crea dificultades en la preparación de conjugados monoméricos con buenas cargas de fármaco y rendimientos razonables que son necesarios para aplicaciones terapéuticas. La aplicación hidrofóbica aumentada de la ligadura suministrada por los enlazadores tales como la ligadura AcBut descrita en la patente EUA 5,773,001, así como la distancia covalente aumentada que separa al agente terapéutico del portador (anticuerpo), incrementa este problema.

La agregación de los conjugados del portador/derivados de fármaco citotóxico con mayores cargas de fármaco sucede debido a la naturaleza hidrofóbica de los fármacos. La carga de fármacos tiene a menudo limitaciones para obtener cantidades razonables del producto monomérico. En algunos casos tales como en los conjugados en la patente de EUA 5,877,296 es a menudo difícil hacer conjugados en

rendimientos útiles con cargas útiles para aplicaciones terapéuticas usando las condiciones de reacción descritas en la patente de EUA No. 5,053,394 debido a la agregación excesiva. Estas condiciones de reacción utilizan al DMF como el co-solvente en la reacción de conjugación. Se necesitan por lo tanto métodos que permitan un rendimiento/cargas superiores de fármacos sin agregación sin la pérdida inherente de material.

Las mejoras para reducir la agregación se describen en las patentes de EUA 5,712,374 y 5,714,586 que se incorporan aquí en su totalidad. Se describen en esas patentes los portadores proteínicos que incluyen pero no se limitan a proteínas tales como los anticuerpos humanos o humanizados que se hacen para atacar a los agentes terapéuticos citotóxicos, tales como por ejemplo hP67.6 y los anticuerpos humanizados aquí descritos. En esas patentes, el uso de una solución amortiguada compatible con proteínas no nucleofílicas que contiene (i) propilenglicol como un solvente y (ii) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>, se encuentra que produce generalmente un fármaco citotóxico monomérico con conjugados de portador/derivados con un rendimiento/carga de fármaco superior y una agregación disminuida que tiene una actividad excelente. Los ácidos preferidos aquí descritos fueron los ácidos C<sub>7</sub> a C<sub>12</sub> y el ácido más preferido fue el ácido octanoico y (tal como el ácido caprílico) o sus sales. Las soluciones amortiguadoras preferidas para conjugados hechas a partir de ésteres de N-hidroxisuccinimida (OSu) u otros ésteres comparablemente activados fueron solución salina amortiguada de fosfato (PBS) o el ácido N-2-hidroxietil piperacina-N'-

2etanosulfónico (solución amortiguadora HEPES). La solución amortiguada usada en esas soluciones de conjugación no puede contener aminas libres o nucleófilos. Para otros tipos de conjugados, se pueden determinar fácilmente soluciones amortiguadoras aceptables. Alternativamente el uso de una solución amortiguadora compatible con proteínas no nucleofílicas que contienen t-butanol sin el aditivo adicional, también se encuentra que produce conjugados de portador/derivado monomérico de caliqueamicina con un rendimiento superior de fármacos y una agregación disminuida.

La cantidad de co-solvente necesaria para formar un conjugado monomérico varía de alguna manera de proteína a proteína, y se puede determinar por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica sin experimentación indebida. La cantidad necesaria de aditivo para formar efectivamente un conjugado monomérico también varía de anticuerpo a anticuerpo. Esta cantidad también se puede determinar por alguien con experiencia ordinaria en la técnica sin experimentación indebida. En las patentes de EUA No.5,712,374 y 5,714,586, las adiciones de propilenglicol en cantidades que van desde 10% a 60% preferiblemente 10% a 40% y más preferiblemente alrededor de 30% en volumen de la solución total y un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> o su sal, preferiblemente ácido caprílico o su sal, en cantidades que van desde 20mM a 100mM, preferiblemente de 40mM a 90mM y más preferiblemente alrededor de 60mM a 90mM, se agregaron a reacciones de conjugación para producir conjugados monoméricos de portador/derivados de fármaco citotóxicos con un rendimiento/carga superior de carga y una agregación

disminuida. Otros co-solventes orgánicos compatibles con proteínas diferentes al propilen glicol tales como el etilen glicol, etanol, DMF, DMSO, también se pueden usar. Se puede usar algo o todo el co-solvente orgánico para transferir el fármaco en la mezcla de conjugación.

Alternativamente en esas patentes, la concentración del ácido carboxílico  $C_6-C_{18}$  o su sal se puede incrementar hasta 150-300 mM y el co-solvente hasta 1-10%. En una modalidad el ácido carboxílico fue ácido octanoico o su sal. En una modalidad preferida, el ácido carboxílico fue ácido decanoico o su sal. En otra modalidad preferida el ácido carboxílico fue ácido caprílico o su sal que estuvo presente a una concentración de 200mM de ácido caprílico junto con 5% de propilenglicol o etanol.

En otra modalidad alternativa en esas patentes, se puede agregar t-butanol a concentraciones en el intervalo desde 10% a 25%, preferiblemente 15% en volumen de la solución total, a la reacción total de conjugación para producir conjugados monoméricos de portador/derivados de fármaco citotóxico con una carga/rendimiento superior de fármaco y una agregación disminuida.

Estas condiciones de conjugación establecidas se aplicaron a la formación de CMA-676 (Gemtuzumab Ozogamicin), que se vende ahora comercialmente como Mylotarg<sup>TM</sup>. Desde la introducción de este tratamiento para la leucemia mieloide aguda (AML), se ha aprendido a través del uso de la cromatografía de intercambio de iones que la caliqueamicina no se distribuye en el anticuerpo en una forma uniforme. La mayoría de la caliqueamicina es aproximadamente la mitad del anticuerpo mientras que la otra mitad existe en un LCF que solamente contiene

cantidades pequeñas de caliqueamicina. Consecuentemente, existe una necesidad crítica de mejorar los métodos para configurar fármacos citotóxicos tales como las caliqueamicinas a portadores que minimicen la cantidad de agregación y permitan una carga superior de fármaco uniforme con un rendimiento significativamente mejorado del producto conjugado.

Un ejemplo específico es aquel del conjugado G5/44-NAc- DMH gamma caliqueamicina que se refiere como AcBut y se muestra genéricamente en la figura 17. La reducción de la cantidad de LCF hasta <10% del anticuerpo total se desea para el desarrollo de CMC-544 y se consideraron diversas opciones para la reducción de los niveles de LCF. Otros atributos del inmunoconjugado tales como el enlace de antígenos y la citotoxicidad no se deben afectar por la solución final. Las opciones consideradas incluyen modificación física o genética del anticuerpo, las técnicas de separación cromatográficas o la modificación de las condiciones de reacción.

La reacción del anticuerpo G5/44 con la NAc-gamma-caliqueamicina DMH AcBut OSu usando las condiciones de reacción antiguas (condiciones del proceso CMA-676) resultan en un producto con propiedades físicas similares (carga de fármaco, LCF y agregación) como CMA-676. Sin embargo, el alto nivel (50-60%) de LCF presente después de la conjugación parece indeseable. Se determinaron condiciones óptimas de reacción a través de una metodología de diseño experimental estadístico en la cual las variables de reacción claves tales como temperatura, pH, entrada de un derivado de caliqueamicina y concentración de aditivos se evaluaron. El análisis de estos experimentos demostró

que la entrada de caliqueamicina y la concentración de aditivos tuvo los efectos más importantes al nivel de una fracción conjugada baja de un LCF y la formación de agregados, mientras que la temperatura y el pH tuvieron influencias menores. En experimentos adicionales también se demostró que las concentraciones de portador de proteína (anticuerpo) y co-solvente (etanol) fueron similarmente de importancia menor (en comparación con la entrada de caliqueamicina y la concentración de aditivos) al controlar el LCF y los niveles de agregado. Con objeto de reducir el LCF hasta <10%, se incrementa la entrada de caliqueamicina desde 3% a 8.5% (w/w) con relación a la cantidad de anticuerpo en la reacción. Se cambio en aditivo del ácido octanoico o su sal a una concentración de 200 mM (proceso CMA-676) al ácido decanoico o su sal a una concentración de 37.5 mM. La reacción de conjugación avanzó mejor a una temperatura ligeramente elevada (30-35°C) y a un pH de (8.2-8.7). Las condiciones de reacción que incorporan estos cambios redujeron el LCF hasta debajo del 10% mientras se incrementa la carga de caliqueamicina y se refiere de aquí en adelante como una condición del proceso CMC-544 o condiciones nuevas del proceso. Una comparación de los resultados obtenidos con las condiciones del proceso CMA-676 se muestra en la tabla 1.

TABLA 1 COMPARACION DE LAS CONDICIONES DEL PROCESO CMA-676  
Y CMC-544

| CONDICIONES/RESULTADOS                                        | CONDICIONES DEL PROCESO CMA-676              | CONDICIONES DEL PROCESO CMC-544                     |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Entrada de caliqueamicina                                     | 3.0% (base en peso de polvo p/p)             | 8.5% (p/p)                                          |
| Identidad del aditivo y temperatura de concentración          | Ácido octanoico/sodio octanoico; 200 mM 26°C | Ácido decanoico/decanoato de sodio; 37.5 mM 31-35°C |
| pH                                                            | 7.8                                          | 8.2-8.7                                             |
| Carga de caliqueamicina (por ciento en peso por el ensayo UV) | 2.4-3.5                                      | 7.0-9.0                                             |
| Fracción conjugada baja (LCF) (antes de la purificación)      | 45.65 % área CLAR                            | <10%                                                |
| Agregación (antes de la purificación)                         | -5%                                          | <5%                                                 |
| Agregación (después de la purificación)                       | ≤2%                                          | <2%                                                 |

El incremento de entrada de caliqueamicina aumenta la carga de fármaco por 2.5-3.0 por ciento en peso hasta 7.0-9.0 (más típicamente 7.5-8.5) por ciento en peso, y resulta en ningún incremento en la agregación de proteínas en la reacción. Debido a la reducción de agregado y de LCF, las condiciones del proceso CMC-544 resultan en un producto más homogéneo. El CMC-544 se ha preparado de manera que se reproduce por este nuevo procedimiento de conjugación a una escala de anticuerpos de multigramos.

En las reacciones anteriores, la concentración del anticuerpo puede ir desde 1 a 15 mg/ml y la concentración del derivado del caliqueamicina por ejemplo el ester de N-Acetil gamma-caliqueamicina DMH AcBut OSu (usado para fabricar los conjugados que se muestran en la figura 17) va desde alrededor de 4.5-11% en peso del anticuerpo. El co-

solvente fue el etanol para el cual se han demostrado los resultados a concentraciones que van desde 6 hasta 11.4% (base en volumen). Se efectuaron las reacciones en el ácido PBS, HEPES, N-(2-hidroxietil) piperacino-N'-(4-butansulfónico) (HEPBS) u otra solución amortiguadora compatible con un pH de 8 a 9 o una temperatura que va desde 30°C hasta alrededor de 35°C y para tiempos que van desde 15 minutos a 24 horas. Aquellos que son expertos en la técnica pueden fácilmente determinar intervalos aceptables de pH para otros tipos de conjugados. Para diversos anticuerpos el uso de variaciones ligeras en las combinaciones de los aditivos antes mencionados se ha encontrado que mejora la carga de fármacos y el rendimiento monomérico de conjugados, y se entiende que cualquier portador particular de proteínas puede requerir algunas alteraciones menores en las condiciones exactas o en la elección de aditivos para lograr los resultados óptimos.

#### V. PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE CONJUGADOS.

Después de la conjugación se pueden separar los conjugados monoméricos de los reactivos no conjugados (tal como un portador proteínico y un fármaco citotóxico libre/caliqueamicina) y/o la forma agregada de los conjugados por métodos convencionales por ejemplo cromatografía de exclusión de tamaño (SEC, por sus siglas en inglés), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) cromatografía de intercambio de iones (IEC, por sus siglas en inglés) o cromatofocalización (CF, por sus siglas en inglés). Los conjugados purificados son monoméricos y contienen usualmente de 4 a 10% en peso de un fármaco citotóxico/caliqueamicina. En una modalidad preferida los

conjugados se purifican usando cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). En los procesos previamente usados para la fabricación a escala de la producción de los conjugados anticuerpos de caliqueamicina/fármaco citotóxico (proceso CMA-676) la etapa única de separación posterior a la conjugación empleada fue cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Aunque esta etapa es bastante efectiva tanto para retirar el conjugado agregado como para lograr el intercambio de solución amortiguadora para la formulación es ineficaz al reducir el contenido de LCF. Consecuentemente, el proceso basado en SEC se soporta completamente en la química de la reacción de conjugación para controlar el contenido LCF del producto final. Otra desventaja de SEC es la limitación del volumen de la mezcla de reacción de conjugados aplicada a la columna (que no excede típicamente el 5% del volumen de lecho de la columna de proceso). Esto limita severamente el tamaño del lote (y por lo tanto la capacidad de producción) que se puede soportar en un espacio de producción dado. Finalmente, el proceso de purificación SEC también resulta en una dilución importante de la solución de conjugado lo cual coloca restricciones a la concentración de proteína que se puede lograr confiablemente en la formulación.

Cuando un fármaco citotóxico tiene una naturaleza altamente hidrofóbica tal como un derivado de caliqueamicina y se usa en un conjugado, la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) es un candidato preferido para suministrar una separación efectiva del anticuerpo conjugado y no conjugado. La HIC presenta 3 ventajas claves sobre SEC: (1) tiene la capacidad de reducir eficientemente el contenido LCF así como el agregado; (2) la capacidad de carga de columna para el HIC es mucho mayor y (3) HIC evita la dilución

excesiva del producto.

Diversos medios HIC de alta capacidad adecuados para un uso a escala de producción tales como la butil, fenil y octil sefarosa de flujo rápido 4 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), pueden separar efectivamente componentes y agregados no conjugados del conjugado del componente monomérico conjugados que siguen al proceso de conjugación.

## VI. CONJUGACIONES Y FORMULACIONES

La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de una composición/formulación terapéutica o de diagnóstico que comprende mezclar el conjugado de portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico de la presente invención junto con un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

El conjugado de portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico puede ser el único ingrediente activo en la formulación/composición terapéutica o de diagnóstico se puede acompañar por otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos por ejemplo las células anti-CD19, anti-CD20, anti-CD33, anti-T, anticuerpos anti-IFN $\gamma$  o anti-LPS, o ingredientes que no son de anticuerpos tales como citocinas, factores de crecimiento, hormonas, anti-hormonas, fármacos citotóxicos y xantinas.

Las citocinas y factores de crecimiento que se pueden usar para tratar los trastornos proliferativos como el cáncer y que se pueden usar juntos con los conjugados de portador/derivados de fármacos citotóxicos de la presente invención incluyen interferones, inter leucinas tales como

la ínter leucina 2(IL-2), TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF.

Las hormonas usadas comúnmente para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer y que se pueden usar junto con los conjugados de portador/derivados de fármaco citotóxico de la presente invención incluyen estrógenos tales como el dietilestilbestrol y estradiol, andrógenos tales como la testosterona y halotestina, progestinas tales como Megace and Provera, y corticosteroides tales como la prednisona, dexametasona e hidrocortisona.

Las anti-hormonas tales como los anti-estrogenicas esto es tamoxifen, anti-andrógenos, esto es flutamida y agentes anti-adrenales se usan comúnmente para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer y se pueden usar junto con el conjugado portador/derivado de fármaco citotóxico de la presente invención.

Los agentes quimioterapéuticos/anti-neoplásticos usados comúnmente para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer y que se pueden usar junto con el conjugado de portador/derivado de fármaco citotóxico de la presente invención incluyen pero no se limitan a adriamicina, cisplatina, carboplatina, vinblastina, vincristina, bleomicina, metotrexato, doxorubicina, fluorouracilos, etopósido, taxol y sus diversos análogos y la mitomicina.

Las composiciones deben comprender preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de la invención. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa en la presente se usa como una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o evitar una enfermedad o condición dirigida, o mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier conjugado, la dosis terapéuticamente efectiva se puede

estimar principalmente en ensayos de cultivos celulares o en modelos animales usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. También se puede usar el modelo animal para determinar el rango de concentración adecuado y la vía de administración. Tal información se puede luego usar para determinar dosis útiles y vías de administración en humanos.

La cantidad precisa para un sujeto humano dependerá de la severidad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, peso y género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración combinación de fármacos, sensibilidades a la reacción y respuesta a la tolerancia a la terapia. Esta cantidad se puede determinar por experimentación de rutina y está dentro del juicio del médico. Generalmente una dosis efectiva estará desde 0.1 mg/m<sup>2</sup> a 50 mg/m<sup>2</sup>, preferiblemente 0.4 mg/m<sup>2</sup> a 30 mg/m<sup>2</sup> más preferiblemente 2 mg/m<sup>2</sup> a 9 mg/m<sup>2</sup> cuya dosis se calcula sobre la base del portador proteínico.

Se pueden administrar individualmente composiciones a un paciente o se pueden administrar en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas. La dosis a la cual el derivado de fármaco citotóxico monomérico/conjugado de anticuerpo de la presente invención se administra depende de la naturaleza de la condición a tratarse, el grado del linfoma maligno o leucemia y de si se usa profilácticamente el conjugado para tratar una condición existente.

La frecuencia de dosis dependerá de la vida media del conjugado y la duración de su efecto. Si el conjugado tiene una vida media corta (por ejemplo de 2 a 10 horas) puede ser necesario darle una o más dosis por día. Alternativamente si la molécula de conjugado tiene una vida

media prolongada (por ejemplo de 2 a 15 días) solamente puede ser necesario darle una dosis una vez al día, una vez por semana o una vez cada uno o dos meses.

Una composición también puede contener un portador farmacéuticamente aceptable para la administración del conjugado del anticuerpo. El portador no debe en sí mismo inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no deben de ser tóxicos. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables por ejemplo sales ácidas de minerales como clorohidratos, bromohidratos, fosfatos y sulfatos o sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos y bensoatos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables en estas composiciones pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes o sustancias amortiguadoras del pH pueden estar presentes en tales composiciones. Tales portadores permiten que las composiciones se formen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes espesos o suspensiones para ingestión por el paciente.

Las formas preferidas para la administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral por ejemplo

por inyección o infusión por ejemplo de inyección de bolo o infusión continua. En donde el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso y puede contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, conservadores, estabilizadores y/o dispersantes.

Aunque la estabilidad de la solución de conjugado amortiguada es adecuada para la estabilidad a corto plazo, la estabilidad a largo plazo es pobre. Para mejorar la estabilidad del conjugado y para incrementar su vida de anaquel, el conjugado de fármaco con anticuerpos se puede liofilizar a una forma seca para su reconstitución antes del uso con un líquido estéril adecuado. Los problemas asociados con la liofilización de una solución de proteínas están bien documentados. Puede suceder una pérdida de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria durante los procesos de congelado y de secado. Consecuentemente se pueden incluir crioprotectores para actuar como un estabilizador amorfo del conjugado y mantener la integridad estructural de la proteína durante el proceso de liofilización. En una modalidad el crioprotector útil en la presente invención es un alcohol de azúcar tal como alditol, manitol, sorbitol, inositol, polietileno glicol y combinaciones de los mismos. En otra modalidad, el crioprotector es un ácido de azúcar incluyendo un ácido aldonico, un ácido uronico, un ácido aldarico y combinaciones de los mismos.

El crioprotector de esta invención también puede ser un carbohidrato. Los carbohidratos adecuados son compuestos de aldehído o de cetona que contienen 2 o más grupos de

hidroxilos. Los carbohidratos pueden ser cíclicos o lineales e incluyen por ejemplo aldosa, setosa, amino azúcares alditoles, inositoles, ácidos aldónicos, ácidos urónicos, o ácidos aldáricos o combinaciones de los mismos. El carbohidrato puede ser un mono o di o policarbohidrato tal como por ejemplo un disacárido o un polisacárido. Los carbohidratos adecuados incluyen por ejemplo gliceraldehídos, arabinosa, lixosa, pentosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, hexosa, idosa, manosa, talosa, heptosa, glucosa, fructosa, ácido glucónico, sorbitol, lactosa, manitol, metil  $\alpha$ -glucopiranosida, maltosa, ácido isoascórbico, ácido ascórbico, lactona, sorbosa, ácido glucárico, eritrosa, treosa, arabinosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, eritrulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, tagatosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina, sacarosa, trealosa o ácido neuramínico o derivados del mismo. Los policarbohidratos adecuados incluyen por ejemplo arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos (tal como por ejemplo inulina), levano, fucoidano, carragenina, galactocarolosa, pectinas, ácido péctico, amilosa, pululano, glicógeno, amilopectina, celulosa, dextrano, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma xantana, o almidón. Entre los carbohidratos particularmente útiles están la sacarosa, la glucosa, lactosa, trealosa, y combinaciones de los mismos. La sacarosa es un crioprotector particularmente útil.

Preferiblemente el crioprotector de la presente invención es un carbohidrato o un alcohol de "azúcar" que

puede ser un alcohol polihídrico. Los compuesto polihídricos son compuestos que contienen más de un grupo de hidroxilos. Preferiblemente los compuestos polihídricos son lineales. Los compuestos polihídricos adecuados incluyen por ejemplo glicoles tales como etilenglicol, polietilenglicol, y polipropilenglicol, glicerol, o pentaeritritol o combinaciones de los mismos.

En algunas modalidades preferidas el agente crioprotector es sacarosa, trealosa, manitol o sorbitol.

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

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por cualquier numero de vías incluyen pero no limitado oral, intravenosa, intramuscular, intra arterial, intramedular intratecal, intraventricular, transdermal, transcutánea (ver publicación PCT No. WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal, o por vías rectales. También se pueden usar hiporocios para administrar las composiciones de la invención. Típicamente las composiciones se pueden preparar como inyectables ya sea soluciones o suspensiones liquidas. Las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en vehículos líquidos previo a la inyección pueden también prepararse.

La administración directa de las composiciones se efectuará generalmente por inyección subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente o administrarse al espacio intersticial de un tejido.

También se pueden administrar las composiciones a una lesión. El tratamiento de dosis puede ser un esquema de dosis sencilla o un esquema de dosis múltiple.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será un conjugado portador proteínico/fármaco citotóxico. Como tal será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Así, si se va a administrar la composición por una vía usando el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al conjugado de la degradación pero que liberen al conjugado una vez que se ha absorbido del tracto gastrointestinal.

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

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

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

CMC-544 también se puede usar en cualquier terapia en la que se desee reducir el nivel de células que expresan CD22 que están presentes en el sujeto que se trata con la composición o medicamentos aquí descritos. Específicamente la composición o medicamento se usa para tratar humanos o animales con trastornos proliferativos nominalmente linfomas y leucemias que expresan el antígeno CD22 en la superficie celular. Estas células que expresan CD22 pueden

estar circulando en el cuerpo o estar presentes en un número indeseablemente grande localizado en un sitio particular en el cuerpo.

También se puede usar preferiblemente para el tratamiento el CMC-544, en malignidades de linaje de los linfocitos-B que incluyen linfomas y leucemias, más preferiblemente linfomas que no es Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), mieloma múltiple, leucemia de linfocitos aguda (ALL) y leucemia linfocítica crónica (CLL). CMC-544 se puede usar solo o en combinación con otros agentes bioactivos para tratar sujetos que padecen de las malignidades de células B.

Los agentes bioactivos comúnmente usados incluyen factores de crecimiento, citocinas y fármaco citotóxicos. Los fármacos citotóxicos usados comúnmente para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer y se pueden usar junto con CMC-544 incluye una antraciclina tal como doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carubicina, nogalamicina, menogarilo, pitarubicina, y valrubicina por hasta 3 días, y una pirimidina o un nucleósido de purina tal como citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, floxuridina, fludarabina, gougerotina, puromicina, tegafur, tiasofurina. Otros agentes quimioterapéuticos/anti-neoplásticos que se pueden administrar en combinación con CMC-554 incluyen adriamicina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, procarbicina, metotrexato, fluorouracilos, etopósidos, taxol y sus diversos análogos y mitomicina. Se puede administrar CMC-

544 concurrentemente con algunos o más de estos agentes terapéuticos. Alternativamente se puede administrar secuencialmente CMC-544 con uno o más de estos agentes.

El CMC-544 puede ser utilizado solo en paralelo o secuencialmente con una combinación con otros agentes bioactivos tales como factores de crecimiento, citocinas, esteroides tales como el anticuerpo anti-CD20, rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>) y agentes quimioterapéuticos como parte de un régimen de tratamiento. Los regímenes de tratamiento establecidos para los trastornos linfoproliferativos malignos incluyen CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y procarbazona); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona); COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona); CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina procarbazona, bleomicina, vincristina, y prednisona); m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorin); ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, citarabina, bleomicina, y vincristina); MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina; prednisona de dosis fija, bleomicina, y leucovorin); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina); MOPP alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, y vinblastina); y MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABVD

(adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina); y ChIVPP (clorambucil, vinblastina, procarbazona, y prednisona). La terapia puede comprender una fase de terapia de inducción, una fase de terapia de consolidación y una fase de terapia de mantenimiento. También se puede administrar el CMC-544 solo, en paralelo o secuencialmente con cualquiera de los regímenes de terapia antes identificados como parte de una fase de inducción, una fase de terapia de consolidación y una fase de terapia de mantenimiento.

Los conjugados de la presente invención también se pueden administrar junto con otros agente bioactivos y quimioterapéuticos como parte de un régimen de quimioterapia de combinación para el tratamiento de linfomas regresivos agresivos. Tal régimen de tratamiento incluye IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato y etopósido), MIME (gag de metilo, ifosfamida, metotrexato y etopósido), DHAP (dexametasona, citarabina de alta dosis, y cisplatina), ESHAP (etopósido, metilpredisolona, citarabina de alta dosis y cisplatina) EPOCH (etopósido, vincristina y doxorubicina por 96 horas con dosis de bolo, de ciclofosfamida y prednisona oral), CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona, y bleomicina), CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona), CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), CHOP-B (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona y bleomicina), CEPP-B (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona y bleomicina) y P/DOCE (epirubicina o doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida y prednisona). Los regímenes de tratamiento adicionales para linfomas agresivos pueden incluir en la fase 1 una primera línea de

tratamiento con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona)-rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>)- CMC-544 seguido de la fase 2 y en la fase 3 con CHOP-rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>), CHOP-CMC-544 o CHOP-rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>)-CMC-544. Alternativamente la fase 1 puede tener una primera línea de tratamiento con COP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona)-rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>)-CMC-544 seguido de la fase 2 y la fase 3 con COP-rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>), COP-CMC-544 o COP-rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>)-CMC-544. En una modalidad adicional el tratamiento de linfomas agresivos pueden incluir una primera o segunda línea de tratamiento con un conjugado de fármaco de anticuerpos CMC-544 en la fase 1 seguido en la fase 2 y en la fase 3 con CMC-544 y CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona), CMC-544 y COP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), CMC-544 con rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>) o rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>) solamente. Todavía en otra modalidad, el tratamiento de linfomas agresivos pueden incluir una primera o línea de tratamiento con un conjugado de anticuerpos CMC-544 seguido en la fase 2 y en la fase 3 CMC-544 solamente o en combinación en regímenes con otros tratamientos que incluyen pero no se limitan a ESHOP (etopósido, metilpredisolona, citarabina de alta dosis, vincristina y cisplatina), EPOCH (etopósido, vincristina y doxorubicina por 96 horas con dosis de bolo, ciclofosfamida y prednisona oral), IMVP-16 (fosfamida, metotrexato y etopósido), ASHAP (adriamicina, solumedrol, Ara-C y cisplatina) MIME (gag-metil, ifosfamida, metotrexato y etopósido) y ICE (ifosfamida, ciclofosfamida y etopósido). Los detalles de los diversos fármacos citotóxicos usados en quimioterapia de malignidades incluyendo regímenes quimioterapéuticos de

combinaciones, dosis, etc., se suministran en esta solicitud se pueden encontrar en Cancer Principles and Practice of Oncology, Eds. Vincent T. DeVita, Samuelo Hellman, Steven A. Rosenberg, 6<sup>th</sup> Edition, Publishers: Lippincott, Williams and Wilkins (2001) and Physician's Cancer Chemotherapy Drug Manual, Eds. Edward Chu and Vincent T. DeVita, Publishers: Jones and Bartlett (2002).

La presente invención también proporciona un método de tratamientos de sujetos humanos o animales que padecen o están en riesgo de un trastorno proliferativos caracterizado por células que expresan CD22, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de CMC-544 de la presente invención.

La presente invención se describe además a continuación en ejemplos específicos de trabajo que se pretende que describa además la invención sin limitar su alcance.

#### EJEMPLO 1

##### GENERACIÓN DE ANTICUERPOS CANDIDATO

Se seleccionó un conjunto de anticuerpos contra CD22 a partir de hibridomas utilizando los siguientes criterios de selección: enlace a células Daudi, internalización en células Daudi, enlace a células mono nucleares de sangre periférica (PBMC), internalización sobre PBMC, afinidad (mayor a  $10^{-9}$ M), ratón  $\gamma 1$  y velocidad de producción. Se seleccionó 5/44 como un anticuerpo preferido.

##### I. CLONACIÓN DE GENES Y EXPRESIÓN DE UNA MOLÉCULA DE ANTICUERPO QUIMÉRICO 5/44

a) Preparación de células de hibridomas 5/44 y preparación del ARN para ello

Se generó el hibridoma 5/44 por tecnología convencional del hibridoma después de la inmunización de ratones con proteína humana CD22. Se preparó el ARN a partir de células hibridomas 5/44 usando un kit RNEasy (Qiagen, Crawley, UK; Catalogue No. 74106). El ARN obtenido se transcribió de una manera inversa al ADNc, como se describe a continuación.

b) Distribución de CD22 en los tumores NHL

Se efectuó un estudio de inmunohistoquímica para examinar la incidencia y distribución de la tinción usando los anticuerpos monoclonales 5/44 anti-CD22. Los anticuerpos de control anti-CD20 y anti-CD79a se incluyeron en el estudio para confirmar las áreas B de tumores.

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

- 7 leucemia/linfoma linfoblástico B (alto/I)
- 4 linfocitos de linfoma pequeño B-CLL (bajo/A)
- 3 linfoma plasmacitoide/inmuno citoma (bajo/A)
- 1 célula de manto (Int/F)
- 14 linfomas de centro de folículo (bajo hasta Int/D)
- 13 linfomas de células grandes difusas (Int hasta alto/G,H)
- 6 sin clasificar (K)
- 2 linfomas de células T

Cuarenta linfomas de células B fueron positivos para el antígeno CD22 con el anticuerpo 5/44 a 0.1 µg/ml y 6 adicionales se volvieron positivas cuando se incrementó la concentración hasta 0.4 µg/ml. Para los 2 tumores de

células T restantes que fueron negativos a 0.1 µg/ml fueron un tejido insuficiente que permaneció para probar a una concentración superior. Sin embargo, la prueba en paralelo con otro anticuerpo anti-CD22 designado 6/13 (Celltech, Slough, UK) que dio una tensión más fuerte que 5/44 resulto en todos los 48 linfomas de células B que tiñeron positivo para CD22.

Así, es posible concluir que el antígeno CD22 se expresan ampliamente en los linfomas de células B y suministra por lo tanto un objetivo adecuado para la inmunoterapia en NHL.

c) Clonación de PCR de 5/44 V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>

Se sintetizaron secuencias de ADNc que codifican para los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas 5/44 usando transcriptasa inversa para producir copias de ADNc de hebra sencilla del ARN presente en el ARN total. Luego se probó esto como la plantilla para implicación de secuencias de murina de la región B usando cebadores de oligonucleotidos específicos por una reacción de polimerasa (PCR).

i) Síntesis de ADNc

Se sintetizo el ADNc en un volumen de reacción de 20 µl que contiene los siguientes reactivos: 50mM, Tris-HCL pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM ditiotreitol, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM de dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 20 unidades de ARNsina, 75 ng de cebador de hexanucleotido aleatorio, 2 µg 5/44 ARN, y 200 unidades de la transcriptasa reversa del virus de leucemia murino de Moloney. Después de la incubación a 42°C durante 60 minutos se finalizó la reacción al calentar a 95°C durante 5 minutos.

## ii) PCR

Se sometieron las alícuotas del ADNc a PCR usando combinaciones de cebadores específicos para las cadenas ligeras y pesadas. Los acumulados de cebador degenerado diseñados para combinarse en los pares base con las consecuencias conservadas del péptido de señal se usaron como cebadores delanteros. Estas secuencias contienen todas en orden un sitio de restricción ( $V_L$  Sful;  $V_H$  HindIII) que parte de 7 nucleótidos desde sus extremos 5', la secuencia GCCGCCACC (SEQ ID) NO:50), para permitir una traducción óptima de los ARNm resultantes, un codón de inicio y 20 a 30 nucleótidos basados en las secuencias del péptido líder de anticuerpos conocidos de ratón (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª. Edition, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

Los cebadores 3' se diseñan para cubrir la unión de la estructura 4 J-C del anticuerpo y contienen un sitio de restricción para la encima BsiWI para facilitar la clonación del fragmento  $V_L$  PCR. Los cebadores 3' de cadena pesada son una mezcla diseñada para abarcar la unión J-C del anticuerpo. El cebador 3' incluye un sitio de restricción Apal para facilitar la clonación. La región 3' de los cebadores contiene una secuencia mixta que se basa en aquellas encontradas en los anticuerpos conocidos de ratón (Kabat et al., 1991, supra).

Las combinaciones de los cebadores antes descritos permiten que los productos PCR para  $V_H$  y  $V_L$  se clonen directamente en un vector de expresión adecuado (ver a continuación) para producir cadenas ligera y pesada

quiméricas (de ratón y humano) y para que se expresen esos genes en células mamíferas para producir anticuerpos antiquiméricos del isotipo deseado.

Se fijaron como sigue las incubaciones (100  $\mu$ l) para el PCR. Cada reacción contenía 10mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.01% p/v gelatina, 0.25 mM de dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 10 pmoles de mezcla de cebador 5', 10 pmoles de cebador 3', 1 $\mu$ l de ADNc y 1 unidad de polimerasa Taq. Se incubaron las reacciones a 95°C por 5 minutos y luego se formaron ciclos a través de 94°C por un minuto, 55°C por un minuto y 72°C por un minuto. Después de 30 ciclos, se analizaron las alícuotas de cada reacción por electroforesis en un gel de agarosa.

Para la región V de cadena pesada, un producto amplificado de ADN solamente se obtuvo cuando un acumulado de cebadores que se combinan dentro de los pares bases del comienzo de la estructura 1 reemplazó el acumulado del cebador de péptido de señal. Se clonaron los fragmentos en vectores formadores de secuencia de ADN. Se determinó la secuencia de ADN y se tradujo para dar una secuencia deducida de aminoácidos. Esta secuencia deducida se verificó con referencia de la proteína en la terminal N determinada experimentalmente. La figura 1 muestra la secuencia de los aminoácidos de los CDRs del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44. Las figuras 2 y 3 muestran la secuencia de proteína y ADN de las regiones V de cadena ligera y pesada maduras del ratón monoclonal 5/44 respectivamente.

### iii) Clonación molecular de los fragmentos de PCR.

Las secciones de la región 5 murina luego se clonaron en los vectores de expresión pMRR10.1 y pMRR14 (figuras 7 y

8). Estos son vectores para la expresión de ADN que contienen cadenas ligeras y pesadas que codifican cadenas constantes de la cadena ligera capa humana y la cadena pesada gama-4 humana. La región  $V_L$  se subclono en el vector de expresión por digestión y ligación de restricción a partir del vector que forma secuencias usando ciclos de restricción SfuI y BsiWI creando el plásmido pMRR10(544cL) (figura 8). El ADN de cadena pesada se amplificó por PCR al usar un cebador 5' para introducir un péptido de señal, ya que esto no se obtuvo en la estrategia de clonación-un anticuerpo de cadena pesada de ratón líder de un hibridoma diferente local (determinado 162) se empleo. El cebador 5' tuvo la siguiente secuencia: 5' GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTTCGGATTCTCTCTCGTGTTCTGGCACTC ATTCTCAAGGGAGTGAGGTGTGAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGG3' (SEQ ID NO:51).

El cebador inverso fue idéntico a aquel usado en la clonación del gen  $V_H$ . El producto resultante por PCR se digirió en las enzimas HindIII y Apal, se subclonó y se confirmó su secuencia de ADN creando el plásmido pMRR14(544cH) (figura 7). La co-transfección transitoria de los vectores de expresión en las células CHO generó un anticuerpo quimérico c5/44. Esto se logró usando el reactivo de lipofectamina según los protocolos del fabricante (InVitrogen:Life Technology, Groningen, Países Bajos. Catálogo no. 11668-027).

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

Se observó una secuencia del sitio de glicosilación ligado en N potencial en CDR-H2, que tiene la secuencia de

aminoácidos en N-Y-T (Figura 3). El SDS-PAGE, la inmunotransferencia Western y la tinción de carbohidratos de geles de 5/44 y sus fragmentos (incluyendo Fab) indica que el sitio estaba de hecho glicosilado (no se muestra). Además, se observó un residuo de lisina en una posición opuesta dentro de CDR-H2, que tuvo el potencial para reducir la afinidad de enlace del anticuerpo al suministrar un sitio adicional para conjugación con un agente con el cual se puede conjugar el anticuerpo.

Se usó una estrategia PCR para introducir las substituciones de aminoácido en la secuencia CDR-H2 en un intento por retirar el sitio de glicosilación y/o la lisina reactiva como se muestra en la figura 4. Los cebadores delanteros que codifican la mutaciones N55Q, T57A o T57V se utilizaron para retirar el sitio de glicosilación (figura 4) y un cuarto cebador delantero que contiene la substitución K60R, se generó para retirar el residuo reactivo de lisina (figura 4). Se utilizó un cebador reverso de la estructura 4 en cada una de estas amplificaciones PCR. Los productos PCR se digirieron con las enzimas XbaI y ApaI y se insertaron en pMRR14 (544cH) (también desdoblado con XbaI y ApaI) para generar los plásmidos de expresión que codifican estos mutantes. Las mutaciones N55Q, T57A y T57V hacen ablación del sitio de glicosilación al cambiar la secuencia de aminoácidos fuera del consenso N-X-T/S mientras que la mutación K60R reemplaza la lisina potencialmente reactiva con un residuo de arginina similarmente cargado de forma positiva. Los plásmidos variantes resultantes cH se cotransfectan con el plásmido cL para generar variantes de anticuerpo quiméricos expresados.

### III. EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LOS GENES QUIMÉRICOS

Se evaluaron las actividades de los genes quiméricos siguiendo una transfección transitoria en células CHO y la determinación de las constantes de afinidad por el análisis BiaCore.

Las afinidades del 5/44 quimérico o sus variantes que han tenido su sitio de glicosilación o su lisina reactiva eliminada, se investigaron usando la tecnología BIA para el enlace de los constructos CD22-mFc. Los resultados se muestran en la figura 9. Todas las mediciones de enlace se efectuaron en el instrumento BIAcore™ 2000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). El ensayo se efectuó por captura de CD22mFc por medio del Fc anti-ratón inmovilizado. El anticuerpo estaba en fase soluble. Se inyectaron muestras estándares y controles (50µl) sobre Fc anti-ratón inmovilizado seguido por un anticuerpo en la fase soluble. Después de cada ciclo se regeneró la superficie con 50µl de 40mM de HCl a 30µl/min. Se efectuó el análisis cinético usando el software BIAevaluation 3.1 (Pharmacia).

El retiro del sitio de glicosilación en el constructo T57A resultó en una velocidad activa ligeramente más rápida y una velocidad inactiva ligeramente más lenta en comparación con el quimérico 5/44, dando una mejora de afinidad de aproximadamente 5 veces. La mutación N55Q no tuvo efecto en la afinidad. Este resultado fue inesperado ya que sugiere que la eliminación del carbohidrato mismo no tuvo aparentemente un efecto en el enlace (como con el cambio N55Q). Se observó la afinidad mejorada solamente con el cambio T57A. Una explicación posible es que

independientemente de la presencia del carbohidrato, la treonina en la posición 57 ejerce un efecto negativo en el enlace que se elimina en la conversión de la treonina a la alanina. La hipótesis de que el tamaño pequeño de la alanina es importante y que el efecto negativo de la treonina se relaciona con su tamaño se soporta a partir del resultado obtenido usando la mutación T57V: ese reemplazo con la valina en la posición 57 no es benéfico (no se muestran los resultados).

La eliminación del residuo de lisina por la mutación K60R tuvo un efecto neutro en la afinidad esto es, la introducción del residuo de arginina elimina un sitio reactivo potencial sin comprometer la afinidad.

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

## EJEMPLO 2

### INJERTO POR CDR DE 5/44

La clonación molecular de los genes para las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 5/44 y su uso para producir anticuerpos quiméricos 5/44 (ratón/humano) se ha descrito arriba. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del ratón en los dominios 5/44 V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> se muestran en las figuras 2 y 3 (SEQ ID NOS: 7 y 8), respectivamente. Este ejemplo describe el injerto CDR del anticuerpo 5/44 sobre las estructuras humanas para reducir la inmunogenicidad potencial en humanos según el método de Adair et al., (solicitud PCT No. W091/09967).

#### I. INJERTO CDR DE LA CADENA LIGERA 5/44

La alineación de la secuencia de proteína con las secuencias de consenso a partir de la región V de cadena ligera kappa del subgrupo 1 humano indican una identidad de secuencia del 64%. Consecuentemente para construir la cadena ligera injertada con CDR, las regiones de estructura del aceptor escogidas corresponden a aquellas de la secuencia O12, DPK9 de la línea germinal del subgrupo 1 Vk humano. La secuencia del aceptor de la estructura 4 se deriva de la secuencia de la línea germinal de la región J humana JK1.

Una comparación de las secuencias de aminoácidos de las regiones de estructura de la murina 5/44 y la secuencia del aceptor se da en la figura 5 y muestra que hay 27 diferencias entre las cadenas del aceptor y del donador. En cada posición se hizo un análisis del potencial del residuo de murina para contribuir con el enlace de antígenos ya sea directa o indirectamente a través de los efectos en el empaque o interfaz  $V_H/V_L$ . Si se considera importante un residuo de murina y es suficientemente diferente del residuo humano en términos de tamaño, polaridad o carga, entonces se conserva el residuo de murina. Con base en este análisis dos versiones de la cadena ligera injertada por CDR que tienen las secuencias dadas en SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20 (Figura 5), se construyeron.

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

El injerto CDR de la cadena pesada 5/44 se logró usando la misma estrategia como se describe para la cadena ligera. El dominio V de la cadena pesada 5/44 se encuentra que es homólogo a las cadenas pesadas humanas que pertenecen al subgrupo 1 (70% de identidad de secuencias) y

340

por lo tanto la secuencia de la estructura de la línea germinal del subgrupo 1 humano VH1-3, DP7 se usa como una estructura del aceptor. Las secuencias del aceptor de la estructura 4 se derivan de la secuencias germinal de la región J humano JH4.

Una comparación de la cadena pesada 5/44 con las regiones de estructura se muestran en la figura 6 en donde se puede observar que la cadena pesada 5/44 difiere de la secuencia del aceptor en las posiciones 22. El análisis de la contribución de que cualquiera de estos puede ser al enlace de antígeno conduce a 5 versiones de las cadenas pesadas injertadas por CDR que se construyen, que tiene la secuencia dadas en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:27 (Figura 6).

### III. CONSTRUCCIÓN DE GENES PARA SECUENCIAS INJERTADAS

Se diseñaron genes para codificar las secuencias injertadas gH1 y gL1, y una serie de oligonucleótidos de traslapes se diseñaron y construyeron (figura 10). Se empleó una técnica de ensamble por PCR para construir los genes de la región 5 injertados con CDR. Se prepararon volúmenes de reacción de 100µl que contienen 10 mM Tris-HCl pH8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.001 % gelatina, 0.25 mM de dATP, dTTP, dCTP, y dGTP, 1 pmol cada uno de los cebadores internos (T1, T2, T3, B1, B2, B3), 10 pmoles de cada uno de los cebadores externos (F1, R1), y una unidad de polimerasa Taq (Amplitaq, Applied BioSystems, catálogo no. N808-0171). Los parámetros del ciclo por PCR fueron 94°C para 1 minuto, 55°C para 1 minuto y 72 °C para 1 minuto, por 30 ciclos. Luego se corrieron los productos de reacción en un gel de agarosa al 1.5%, se extirparon y

recuperaron usando las columnas de giro QIAGEN (kit de extracción con gel QIAquick no. de catálogo 28706). Se eluyó el ADN en un volumen de 30  $\mu$ l. Las alícuotas (1  $\mu$ l) del ADN gH1 y gL1 luego se clonaron dentro del vector de clonación InVitrogen pCR2.1 TOPO (catálogo no. K4500-01) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este vector que no es de expresión sirve como un intermediario de clonación para facilitar la formación de secuencia de un gran número de clones. Se usó la formación de secuencias de ADN usando cebadores específicos del vector para identificar los clones correctos que contiene gH1 y gL1, creando plásmidos pCR2.1 (544gH1) y pCR2.1 (544gL1) (Figuras 11 y 12).

Se utilizó un método de reemplazo de un casete de oligonucleótido para crear los injertos humanizados gH4, 5, 6 y 7, y gL2. La figura 13 muestra el diseño de los casetes de los oligonucleótidos. Para construir cada variante el vector pCR2.1 (544gH1) o pCR2.1(544gL1) se corta con las enzimas de restricción mostradas (XmaI/SacII para la cadena pesada, XmaI/BstEII para la cadena ligera). El fragmento del vector grande se purificó con gel a partir de agarosa y se usó en el ligamiento con el casete de oligonucleótido. Estos casetes están compuestos de dos oligonucleótidos complementarios que se muestran en la figura 13, se mezclan a una concentración de 0.5 pmoles/ $\mu$ l en un volumen de 200  $\mu$ l 12.5 M Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> 25 mM NaCl, 0.25 mM ditiotritol. La combinación de los pares base se logra al calentar al 95°C por 3 minutos un baño de agua (volumen 500 ml) luego se deja que la reacción se enfríe lentamente hasta temperatura ambiente. El casete de oligonucleótido combinado en sus pares base luego se diluye 10 veces en

agua antes de la ligación en el vector de corte adecuadamente. Se usó la formación de secuencias de ADN para confirmar la secuencia correcta al crear los plásmidos pCR2.1 (5/44-gH4-7) y pCR2.1 (5/44-gL2). Las secuencias injertadas verificadas luego se subclonaron en los vectores de expresión pMRR14 (cadena pesada) y PMR10.1 (cadena ligera).

#### IV. ACTIVIDAD DE ENLACE DE CD22 DE LAS SECUENCIAS INJERTADAS EN CDR

Los vectores que codifican las variantes injertadas se cotransfectaron en células CHO en una diversidad de combinaciones junto con las cadenas de anticuerpo quimérico original. Se comparó la actividad de enlace en un ensayo de competición, al competir el enlace del anticuerpo 5/44 original de ratón para el enlace a la célula Ramos (obtenida de ATCC, una línea celular de linfoblasto de linfoma de Burkitt que expresa la superficie CD22). Este ensayo se consideró la mejor forma de comparar los injertos en su capacidad para enlazarse a la superficie celular CD22. Los resultados se muestran en las figuras 14 y 15. Como se puede observar hay muy poca diferencia entre algunos de los injertos todos efectuados más efectivamente que el quimérico al competir contra el precursor murino. La introducción de los tres residuos humanos adicionales al final de CDR-H3 (gH5 y gH7) no parece haber afectado el enlace.

La combinación de injerto con el número menor de residuos de murina gL1gH7 se seleccionó. El injerto de cadena ligera gL1 tuvo 6 residuos de donador. Los residuos V2, V4, L37 y Q45 son residuos de empaque potencialmente

importantes El residuo H38 está en la interfaz  $V_H/V_L$ . El residuo D60 es un residuo de superficie cercano a CDR-L2 y puede contribuir directamente al enlace de antígeno. De estos residuos V2, L37, Q45 y D60 se encuentran en la secuencias de la líneas germinal de los genes kappa humanos de otros subgrupos. El injerto de cadena pesada gH7 tiene 4 residuos de estructura del donador (el residuo R28 se considera que es parte de CDR-H1 bajo la definición estructural usada en el injerto de CDR (ver Adair et al. (1991), solicitud PCT No. W091/09967)). Los residuos E1 y A71 son residuos de superficie cercanos a CDR. El residuo 148 es un residuo de empaque potencial. El residuo T93 está presente en la interfaz  $V_H/V_L$ . De estos residuos, E1 y A71 se encuentran en otros genes de línea germinal del subgrupo humano 1. El residuo 148 se encuentra en el subgrupo 4 de la línea germinal humana 4 y T73 se encuentra en el subgrupo 3 de la línea germinal humana.

El ADN completo y la secuencia de proteína de la cadena ligera y de la cadena pesada, incluyen una posición aproximada de intrones dentro de los genes de región constante suministrados por los vectores, se muestran en la figura 16 y se dan en SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:28, respectivamente, para la cadena ligera y SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:30, respectivamente, para la cadena pesada.

El ADN que codifica estos genes de cadena ligera y pesada se extirpó de estos vectores. El ADN de cadena pesada se digirió en el sitio 5' HindIII, luego se trató con el fragmento Klenow de la polimerasa de ADN de E. coli I para crear el extremo con puntas romas 5'. El desdoblamiento del sitio 3' EcoRI resulta en fragmentos de cadena pesada que se purificaron a partir de geles de

agarosa. De la misma manera se produjo un fragmento de cadena ligera, cerrado en puntas romas en el sitio 5'Sful y con el sitio 3'EcoRI. Se clonaron ambos fragmentos en DHFR con base en los vectores de expresión y se usaron para generar líneas celulares estables en células CHO.

### EJEMPLO 3

#### CONJUGACIÓN DE LA Nac-GAMMA CALIQUEAMICINA DMH ACBUT AL ANTICUERPO HUMANIZADO ANTI-CD22 (G5/44)

En una reacción típica de conjugación, el anticuerpo humanizado anti-CD (G5/44) se conjugó a Nac-gamma caliqueamicina DMH AcBut OSu (derivado de caliqueamicina) (ver figura 17), en donde la concentración de la proteína objetivo fue de 7.5 mg/ml y la carga del derivado de caliqueamicina fue de 8.5 por ciento en peso de la proteína. La reacción objetivo en su pH fue  $8.5 \pm 0.2$ , y las concentraciones objetivo de los otros componentes de reacción fueron como siguen: 50 mM del ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(4-butansulfónico) (HEPBS), 37.5 mM de decanoato de sodio, y 9% v/v de etanol total. Se efectuó la reacción a  $33^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Los resultados del análisis de esta reacción típica previo a la purificación fueron como sigue: Proteína: 7.34 mg/ml; carga de caliqueamicina: 82.7  $\mu\text{g/ml}$ ; agregado: 93.25%; y proteína no conjugada (LCF); 1.07% (UV área % por CLAR).

El efecto de diversos tensoactivos aditivos y sus concentraciones en el rendimiento y pureza del producto, se probaron para determinar su efecto en la producción del monómero conjugado (ver tabla 2). Se

importantes El residuo H38 está en la interfaz  $V_H/V_L$ . El residuo D60 es un residuo de superficie cercano a CDR-L2 y puede contribuir directamente al enlace de antígeno. De estos residuos V2, L37, Q45 y D60 se encuentran en la secuencias de la líneas germinal de los genes kappa humanos de otros subgrupos. El injerto de cadena pesada gH7 tiene 4 residuos de estructura del donador (el residuo R28 se considera que es parte de CDR-H1 bajo la definición estructural usada en el injerto de CDR (ver Adair et al. (1991), solicitud PCT No. W091/09967)). Los residuos E1 y A71 son residuos de superficie cercanos a CDR. El residuo 148 es un residuo de empaque potencial. El residuo T93 está presente en la interfaz  $V_H/V_L$ . De estos residuos, E1 y A71 se encuentran en otros genes de línea germinal del subgrupo humano 1. El residuo 148 se encuentra en el subgrupo 4 de la línea germinal humana 4 y T73 se encuentra en el subgrupo 3 de la línea germinal humana.

El ADN completo y la secuencia de proteína de la cadena ligera y de la cadena pesada, incluyen una posición aproximada de intrones dentro de los genes de región constante suministrados por los vectores, se muestran en la figura 16 y se dan en SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:28, respectivamente, para la cadena ligera y SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:30, respectivamente, para la cadena pesada.

El ADN que codifica estos genes de cadena ligera y pesada se extirpó de estos vectores. El ADN de cadena pesada se digirió en el sitio 5' HindIII, luego se trató con el fragmento Klenow de la polimerasa de ADN de E. coli I para crear el extremo con puntas romas 5'. El desdoblamiento del sitio 3' EcoRI resulta en fragmentos de cadena pesada que se purificaron a partir de geles de

corrieron reacciones en donde todo se mantuvo constante excepto para el aditivo y su concentración. Los conjugados producidos a partir de estas reacciones se analizaron para concentración de proteínas, carga de caliqueamicina, contenido de agregados y LCF. Aunque todos los ácidos n-carboxílicos en el rango del C<sub>6</sub> (hexanoato) al C<sub>12</sub> (dodecanoato) dieron resultados aceptables, los mejores resultados globales (bajo LCF, bajo agregado, y alta recuperación del conjugado monomérico se obtuvieron con decanoato en un rango de concentración de 30 mM a 50 mM.

TABLA 2: EFECTO DE LA IDENTIDAD DEL ADITIVO Y LA CONCENTRACIÓN EN LOS RESULTADOS DE CONJUGACIÓN

| Aditivo/concentración | Recuperación<br>de proteína<br>(% de<br>recuperación) | Porcentaje<br>de agregado | Porcentaje<br>de LCF |
|-----------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------|
| Hexanoato-500 mM      | 51.3                                                  | 3.36                      | 38.3                 |
| Heptanoato-400 mM     | 49.9                                                  | 4.7                       | 20.6                 |
| Octanotato-200 mM     | 57.3                                                  | 3.27                      | 10.6                 |
| Nanonoato-100 mM      | 54.7                                                  | 1.41                      | 0.3                  |
| Decanoato-50 mM       | 56.7                                                  | 1.35                      | 0.2                  |
| Undecanoato-20 mM     | 46.9                                                  | 2.95                      | 0.6                  |
| Dodecanoato-5 mM      | 65.6                                                  | 0.78                      | 7.0                  |

EJEMPLO 4

PROCESO DE PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA

I. PROCESO DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Aunque se identificó el flujo rápido 4 de butil sefarosa como los mejores medios HIC, se pueden obtener resultados aceptables con alteraciones ligeras en las

condiciones cromatográficas usando otras resinas tales como el flujo de rápido de octil sefarosa, PPG-600C (Tosoh Biosep), Fractogel EMD Propyl (EM Processing) y Source 15ISO (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

El material de partida para la purificación fue una mezcla de reacción de conjugación que contiene 7.2 mg/ml de proteína a una carga de derivado de caliqueamicina de 83 µg/mg, con un contenido de agregado de 10.1% (por ciento de área por CLAR), y un contenido LCF de 5.6% (por ciento de área por CLAR).

Después de que se finalizó la reacción de conjugación, se diluyó 4 veces la mezcla de reacción por la adición de una solución de fosfato de potasio hasta una concentración de 0.7 M (pH 8.2). Después de mezclar, la solución se filtró a través de filtros de 0.45-micras. La solución diluida se cargó en una columna de flujo rápido de butil sefarosa 4. La cantidad total de proteína cargada a la columna fue 29 mg por ml de volumen de lecho. Después de un lavado con fosfato de potasio 0.7 M, se eluyó la columna usando un gradiente por etapas desde 0.7 M a 4 mM de fosfato de potasio, pH 8.2. se acumularon las fracciones diluidas en el gradiente de etapas para un procesamiento adicional, con un acumulado que consiste de un conjugado monomérico menor de 1% de área de cada agregado y LCF. Este acumulado se cargó en una columna desaladora Sephadex G-25 (Amersahm Biosciences) para intercambio con una solución amortiguadora adecuada para formulación que consiste de 20 mM tris-Cl y cloruro de sodio 100 mM a un pH de 8.0. La preparación, CMC-544 intercambiada con amortiguador purificada tuvo las siguientes propiedades: carga de

caliqueamicina: 81 µg/mg; agregado: 0.4% (área por CLAR)  
LCF: 0.8% (área por CLAR).

EJEMPLO 5

ANÁLISIS DEL ENLACE DEL INMUNOCONJUGADO NAC-GAMMA

CALIQUEAMICINA DMH ACBUT-G5/44 (CMC-544)

El inmunoconjugado del anticuerpo humanizado anti-CD22 (G5/44), con caliqueamicina (CMC-544) generado por el proceso anterior de conjugación se analizó en un estudio de enlace para determinar si el conjugado generado usando el proceso mejorado tuvo algún efecto adverso en el enlace de antígeno. La tabla 3 muestra que el procedimiento de conjugación no tiene ningún impacto en la afinidad de enlace de antígeno del anticuerpo. El inmunoconjugado CMC-544 hecho por el nuevo o anterior procedimiento de conjugación enlazado al antígeno objetivo con afinidades similares, que no difieren de aquella del anticuerpo no conjugado G5/44.

TABLA 3: AFINIDADES DE ENLACE DE CMC-544 HECHAS AL USAR LOS  
PROCEDIMIENTOS DE CONJUGACIÓN CMA-676 Y CMC-544

| Anticuerpo                                          | $K_D$ (M)              | $K_A$ (1/M)        | $K_g$ (1/s)           | $K_a$ (1/Ms)       | Porcentaje |
|-----------------------------------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|------------|
| Anti-CD22                                           |                        |                    |                       |                    | LCF        |
| G5/44<br>humanizado                                 | $1.30 \times 10^{-10}$ | $7.90 \times 10^9$ | $2.80 \times 10^{-5}$ | $2.20 \times 10^5$ | 100        |
| CMC-544 (21<br>µg/ml)<br>(procedimiento<br>CMA-676) | $1.20 \times 10^{-10}$ | $8.10 \times 10^9$ | $6.10 \times 10^{-5}$ | $4.90 \times 10^5$ | 25         |
| CMC-544 (87<br>µg/ml)<br>(procedimiento<br>CMC-544) | $1.50 \times 10^{-10}$ | $6.60 \times 10^9$ | $6.90 \times 10^{-5}$ | $4.60 \times 10^5$ | 3.3        |

El análisis de biosensor se efectuó usando un BIAcore 2000 (BIAcore AB, Uppsala, Suecia). Se inmovilizó de forma covalente el CD22mFc en una microplaqueta biosensora recubierta con carboximetil dextrano activada con N-hidroxisuccinimida (CM5) usando una química de acoplamiento de aminas estándar a una densidad de proteínas de aproximadamente 2000 unidades de resonancia. Se diluyeron las muestras de CMC-544 o G5/44 en la solución amortiguadora HBS (10 mM HEPES, pH 7.4, que contiene 150 mM NaCl, 3 mM EDTA y 0.005% polisorbato 20 (v/v)) y se inyectaron en un rango de concentración de 1 a 100 nM durante la superficie de microplaquetas de biosensor recubiertas con CD22mFc a una relación de flujo de 30  $\mu$ l/min durante 3 minutos para permitir el enlace. Después de la fase de enlace, se observó la disociación del anticuerpo enlazado a la lavar la microplaqueta con disolución amortiguadora HBS durante un periodo de 15 minutos. Se regeneró la superficie antigénica al lavar la microplaqueta sensora con 15  $\mu$ l de la solución amortiguadora de regeneración (10 mM NaOH y 200 mM NaCl) durante 30 segundos, seguido por un tiempo de estabilización de 2 minutos antes del siguiente ciclo. Se calcularon las constantes cinéticas con un análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineales usando un modelo de ajuste de curvas de enlace de 1:1 Langmuir y un programa de BIA evaluación (versión 3.0, BIAcore). El enlace del antígeno de CMC-544 se evaluó por un análisis de resonancia de plasmón de superficie utilizando CD22mFc inmovilizado covalentemente en una microplaqueta biosensora. Los

resultados de los análisis cinéticos de los enlaces de CMC-544 y G5/44 a CD22mFc muestran que después de que se ajustaron globalmente los datos a un modelo de enlace de 1:1 Langmuir con compensación para la transferencia de masa, tanto CMC-544 como el G544 son conjugados enlazados a CD22 con una afinidad similar (CMC-544:CD22  $K_D$  = 200 pM; G5/44: CD22  $K_D$  = 235 pM). La conjugación a la caliqueamicina no impactó la capacidad de G5/44 para enlazarse efectivamente a CD22mFc.

El enlace de CMC-544 y G5/44 a CD22 expresado en la superficie de las células del linfoma B también se examinó por citometría de flujo. El Anti-CD33 mAb gemtuzumab (hP67.6) y su conjugado de caliqueamicina CMA-676 (gemtuzumab ozogamicin) se usaron como controles que coinciden con el isotipo en esta evaluación. El Rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>), un mAb CD20 anti-humano de IgG1 humano quimérico, se usó como un control positivo. Los IgG1 y IgG4 policlonales humanos purificados también se usaron como controles negativos. El enlace de CMC-544 y G5/44 a CD22 en Ramos o RL BCL fue similar y es diferente de aquel del IgG4 policlonal humano. RL BCL desplegó una menor expresión de superficie de CD22 que el Ramos BCL. En contraste, el enlace de CMA-676 o gLlgH7 a BCL fue similar con aquel del IgG4 policlonal humano consistente con su falta de expresión de CD33 (no se muestran los datos). Las mismas células demostraron un fuerte enlace de anti-CD20 rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>). A diferencia de hP67.6 y CMA-676, ni CMC-544 ni G5/44 demostraron ningún enlace a las células de leucemia CD22<sup>-</sup> CD33<sup>+</sup> HL-60 (no se muestran los datos). Estos resultados sugieren que la conjugación de G5/44 con caliqueamicina no afecta su especificidad de antígeno. CMC-

544 específicamente reconoce al CD22 en células B humanas, pero no en células B de murina, rata, canino, porcino, o primate (cinomolgus y resus) (no se muestran los datos).

#### EJEMPLO 6

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

##### I. CITOTOXICIDAD IN VITRO

El efecto de CMC-544 hecho al usar los procesos CMA-676 y CMC-544 en el crecimiento in vitro de las líneas celulares del linfoma de células B CD22<sup>+</sup>, RL, Daudi, Raji y Ramos, se compararon. Un conjugado de caliqueamicina que coincide con el isotipo dirigido al CD33 humano (CMA-676) se usó para reflejar los efectos no específicos del antígeno del conjugado. El uso del DMH de caliqueamicina N-Ac gamma sin conjugar (el fármaco liberado del conjugado con la hidrólisis ácida) en esta evaluación indica que cada una de estas líneas celulares usadas fue sensible a los efectos letales de la caliqueamicina. La tabla 4 muestra los resultados de estas evaluaciones con base en la equivalencia de la caliqueamicina y la tabla 5 muestra estos resultados expresados como las concentraciones de la proteína de anticuerpos conjugados. La administración mediada por CD22 de la caliqueamicina a las células CD22<sup>+</sup> fue al menos 10 veces más eficiente al exterminar las células objetivo que el fármaco sin conjugar mismos. El conjugado de control que coincide con el isotipo (CMA-676) mostró citotoxicidad que fue menor o similar a la del derivado de caliqueamicina sin conjugar. Es evidente de la tabla 4 que el conjugado hecho por el proceso de conjugación CMC-544 puede generar un efecto citotóxico equivalente a concentraciones inferiores de anticuerpos que el conjugado hecho por el proceso de conjugación CMA-676.

852

TABLA: 4 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR CALIQUEAMICINA  
 CONJUGADA (IC<sub>50</sub> Pm de Caliqueamicina)

| Líneas de linfoma de células B | Proceso CMC-544 carga CMC-544 65µG/MG | Proceso CMA-676 carga CMC-544 35µG/MG | Control negativo CMA-676 carga 35µG/MG | N-acetil gamma caliqueamicina DMH |
|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|
| RL #1                          | 6                                     | 30                                    | 600                                    | 226                               |
| #2                             | 12                                    | 40                                    | 400                                    | 270                               |
| Daudi #1                       | 21                                    | 80                                    | 1886                                   | 260                               |
| Raji #1                        | 500                                   | ND*                                   | 2800                                   | 460                               |
| #2                             | 560                                   | 520                                   | 4100                                   | 490                               |
| Ramos #1                       | 200                                   | 130                                   | ND                                     | 700                               |
| #2                             | 260                                   | ND                                    | ND                                     | 1000                              |

\* ND, no determinado

TABLA 5: INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL ANTICUERPO CONJUGADO (IC<sub>50</sub> µg/mL DE ANTICUERPO)

| Líneas de linfoma de células B | Proceso CMC-544 carga CMC-544: 65µG/MG | Proceso CMA-676 carga CMC-544: 35µG/MG | Control negativo CMA-676 carga 35µG/MG | Control de anticuerpo |
|--------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| RL #1                          | 0.09                                   | 0.86                                   | 17.14                                  | >100                  |
| #2                             | 0.18                                   | 1.14                                   | 11.43                                  | >100                  |
| Daudi #1                       | 0.32                                   | 2.29                                   | 53.89                                  | >100                  |
| Raji #1                        | 7.69                                   | ND*                                    | 80.00                                  | >100                  |
| #2                             | 8.62                                   | 14.86                                  | 117.14                                 | >100                  |
| Ramos #1                       | 3.08                                   | 3.71                                   | ND                                     | >100                  |
| #2                             | 4.00                                   | ND                                     | ND                                     | >100                  |

\* ND, no determinado

Citotoxicidad In vivo: CMC-544 hecho por el proceso CMC-544 se evaluó además en xenoinjertos de linfoma de células B. En estos estudios dos tumores de linfoma de células B, RAMOS y RL se utilizaron. El linfoma RL es una línea celular derivada de NHL que no es Burkitt mientras que RAMOS se derivó originalmente de linfoma Burkitt. En un experimento representativo que se muestra en la figura 18, CMC-544 y su contra parte del anticuerpo de murina se mostró que fueron eficaces al inhibir en una forma dependiente de la dosis el crecimiento de linfoma de células B RAMOS.

El conjugado del anticuerpo humanizado se mostró que era más potente que su contraparte murina. En este

estudio la dosis menor de conjugado de caliqueamicina capas de provocar una inhibición importante en el crecimiento de linfoma fue de 10µg/kg del Nac-gamma caliqueamicina DMH conjugado. En contraste en anticuerpo no conjugado G5/44, a 10 mg/Kg administrado de forma intraperitoneal en un programa similar como conjugado no tuvo efecto en el crecimiento del tumor.

Se efectuaron estudios similares utilizando el modelo de linfoma RL. La tabla 6 muestra en análisis combinado de tres experimentos diferentes en los cuales los efectos antitumor de CMC-544 se evaluaron en los tumores RL NHL con etapas de 300-400mg en tamaño en ratones desnudos. El CMC-544 en una forma dependiente de la dosis provocó que los tumores regresaran en un periodo de tiempo de tres semanas. La dosis mínimamente efectiva de CMC-544 en el modelo de linfoma RL se estableció de análisis estadístico de estos estudios para hacer 20µg/kg con base en el contenido de caliqueamicina. No hubo muertes en ninguno de estos tres estudios. La dosis superiores (60-320 µg/kg) de CMC-544 provocaron una regresión casi completa de linfoma RL. Al tomarse juntos los resultados obtenidos con los dos modelos de linfoma de células B de muestran claramente la capacidad de CMC-544 para provocar una regresión de tumor.

TABLA 6: EFECTO ANTITUMOR DE CMC-544 CONTRA LOS  
XENOINJERTOS RL NHL EN RATONES DESNUDOS

| Dosis de caliqueamicina<br>μG/KG | Crecimiento de tumor medio relativo | % T/C <sup>2</sup> | Valor P contra vehículo |
|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Vehículo                         | 6.74                                | -                  | -                       |
| 20                               | 2.87                                | 43                 | 0.011                   |
| 40                               | 1.34                                | 20                 | <0.001                  |
| 60                               | 0.58                                | 9                  | <0.001                  |
| 80                               | 0.54                                | 8                  | <0.001                  |
| 160                              | 0.21                                | 3                  | <0.001                  |
| 320                              | 0.10                                | 1                  | <0.001                  |

<sup>1</sup> crecimiento de tumor relativo (RTG) calculado como (masa de tumor en la semana 3/masa de tumor al día 1) para cada animal  
<sup>2</sup> 100\* (RTG media para una dosis de CMC-544 / RTG media para el grupo de vehículo)  
<sup>3</sup> valor p a partir de una comparación de prueba T de un lado de CMC-544 contra vehículo usando un RTG transformado en jerarquía como la variable de respuestas. El término de error para todas las pruebas T se basa en la variante acumulada S<sup>2</sup> a través de todos los grupos de tratamiento (s<sup>2</sup>=154.54).

La capacidad de CMC-544 hecha por el nuevo procedimiento para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de linfoma de células B grandes establecidos usando los modelos de linfoma RAMOS y RL también se investigó. Se dejaron crecer los tumores y dejaron etapas hasta 1.5 o 2g de la masa de tumor después de lo cual se administró CMC-544 o un control negativo en conjugado que coincide con el isotipo (CMA-676) intraperitonealmente a una dosis de 160μg/kg de caliqueamicina conjugada manteniendo el

programa original de dosificación los días 1, 5 y 9. El mismo programa de dosificación se mostró previo para provocar una regresión de larga duración en los tumores en pequeñas etapas (ver tabla 6). Como se muestra en la figura 19, la administración de CMC-544 a los ratones que soportan linfomas RAMOS grandes provocaron una regresión gradual de la masa de linfoma persistente y para el día 20 tres de los cuatro ratones que tenían tumores estaban libres de tumores. Al observar estos ratones liberados de los tumores hasta el día 50, no indicó ningún nuevo crecimiento de linfoma RAMOS regresivo. En contraste, el control coincidente de isotipo CMA-676 no tuvo efecto en el crecimiento de tumor. Cuatro de cinco ratones que soportan tumores grandes tratados con CMA-676 se tuvieron que sacrificar antes del día 15 debido a que su carga de tumores estaba cercana al 15% de su peso corporal.

Se usó un experimento similar usando CMC-544 en el modelo de linfoma RL. La administración intraperitoneal de 160µg/kg a una dosis de >90% en un programa similar como se describe antes provocó una regresión de CMC-544 de la masa persistente de linfoma RL dentro de 30 días. Sin embargo para el día 45, dos ratones en este grupo con linfoma encogido mostraron un nuevo crecimiento de los tumores. Estos resultados indican que el CMC-544 puede provocar regresión de linfomas pequeños establecidos así como grandes. En un número pequeño de estudios que no se muestran aquí, los linfomas RL que volvieron a crecer esporádicamente después de la regresión inicial inducida por CMC-544 se volvieron a tratar nuevamente con CMC-544. Estos estudios mostraron que los tumores RL todavía eran responsables en un segundo curso de tratamiento con CMC-544

y regresaron nuevamente. Así el tratamiento con CMC-544 puede ser efectivo contra masas pequeñas y grandes de los linfomas de células B con el potencial de una terapia de repetición.

## II. COMPARACIÓN IN VIVO DEL CONJUGADO HECHO CON LOS PROCESOS DE CONJUGACIÓN CMA-676 Y CMC-544

La figura 20 muestra los resultados de un experimento representativo en el cual ratones que soportan linfoma RL en etapas recibieron dos dosis diferentes (80 y 320µg/kg de caliqueamicina conjugada) de CMC-544 hecha usando el proceso de conjugación CMA-676 y el proceso de conjugación CMC-544 utilizando el programa de dosificación estándar. La eficacia antitumor observada fue dependiente de la dosis como se espera y no hubo diferencia en la eficacias de las otras dos preparaciones CMC-544. En contraste la N-acetil-gamma caliqueamicina de DMH sin conjugar administrada intraperitonealmente a 160µg/kg fue inactiva. Sin embargo, se debe enfatizar que para cada dosis de caliqueamicina conjugada, la cantidad de proteína de anticuerpo administrada en forma de un conjugado fue cuatro veces mayor para CMC-544 hecha por el proceso CMA-676 contra aquella que se hizo por el proceso CMC-544. Ya que el contenido de caliqueamicina de conjugado objetivo es responsable principalmente de provocar el efecto antitumor, es posible administrar la cantidad requerida de caliqueamicina por medio del conjugado hecho por el nuevo procedimiento usando cantidades mucho mas pequeña del anticuerpo de direccionamiento. La carga aumentada por el conjugado hecho por el proceso CMC-544 se debe en efecto a la falta de cantidades importantes de la fracción baja

conjugada (LCF).

### III. TRATAMIENTO DE TUMORES RESISTENTES A RITUXIMAB (RITUXAN®)

La siguiente pregunta a explorarse fue si los linfomas de célula B que crecen después de la discontinuación del tratamiento con rituximab anti-CD20, comercialmente disponible (Rituxan®) todavía responden al tratamiento con CMC-544. En este punto, los linfomas RL (no en etapa) desarrollados se tratan con rituximab (Rituxan®) durante tres semanas. Conforme la terapia de rituximab (Rituxan®) continúa, se inhibe el crecimiento del linfoma RL. Una vez que cesa la terapia de rituximab (Rituxan®), los linfomas RL crecen rápidamente hasta el tamaño de ~1 g de masa, tiempo al cual se tratan con CMC-544 a la dosis intraperitoneal de 160µg/Kg. Como se muestra en las Figuras 21 y 22, estos linfomas RL todavía responden a CMC-544 con 80% de los ratones que están libres de tumor por el día 60. De esta manera, el CMC-544 es capaz de causar el regreso de linfomas de célula B con tres dosis que podrían solo inhibir por la dosificación continua de rituximab (Rituxan®).

#### EJEMPLO 8

##### EFEECTO IN VIVO E IN VITRO DE CMC-544

###### I. ESTUDIOS DE ENLACE Y TOXICIDAD

El CMC-544 se evaluó para su enlace a CD22 y también para su actividad en modelos in vivo e in vitro. El CMC-544 también se compara al CMA-676, un conjugado de control agrupado de isotipo de hP67.6(IgG4) con caliqueamicina enlazada a AcBut, y a

850

rituximab (Rituxan®), un IgG1 anti-CD 20 mAb quimérico, (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA.), que está comercialmente disponible y se adquiere de Medworld Pharmacy (Chestnut Ridge, NY). Se usan los siguientes anticuerpos en los estudios de domino enlazados a G5/44: BU12 (Celltech, Slough, RU); BLCAM, HD239 (Santa Cruz Biotech, san Cruz, CA); RFB-4 (Ansell Corp, Bayport, MN); SHCL-1, Leu 14 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ); 4KB128 y To 15 (Dako Corp, Carpinteria, CA); M6/13 y M5/44 (Celltech, Slough, RU). Los anticuerpos adicionales usados en los estudios de bloqueo fueron SJ10 (Immunotech, Fullerton, CA) y M17.1.1, M19.1.1, M38.1.1 (Celltech, Slough, RU). Las líneas celulares para los estudios incluyen línea de célula de linfoma Burkitt que incluyen Ramos (CRL-1923) y la línea de célula de linfoma no de Hodgkin (NHL) RL (CRL-2261) se obtienen todas de la American Type Culture Collection. Las líneas de célula se determinan para estar libres de micoplasma por el ensayo de detección de micoplasma de reacción de cadena de polimerasa (ATCC, Manassas, VA). Las líneas celulares se mantienen como cultivos de suspensión en un medio RPMI más FBS al 10%, HEPES 10mM, piruvato de sodio 1 mM, glucosa al 0.2%, penicilina G sodio 100 U/ml, y sulfato de estreptomicina 100 µg/ml.

Se evalúa si el G5/44 puede o no inhibir el enlace de mAbs de murino de especificidad conocida al CD22 por análisis BIAcore usando Fc-CD22 inmovilizado a la microplaqueta BIAcore CM5. Las unidades de resonancia de plasmón de superficie (RU) obtenidas con y sin saturación previa del Fc-CD22 inmovilizado con G5/44 se

comparan. Se realiza un análisis de interacción biomolecular usando BIACORE 2000. Los anticuerpos se pasan sobre una superficie de control en blanco (flujo celular 1, sirve como un control, no se acopló proteína) y la superficie de prueba de Fc-CD22 (flujo celular 2) inmovilizado en una microplaqueta sensora CM5, por medio de una química de acoplamiento de amina al nivel de 9,042 RU. El sensograma resultante fue la respuesta (RU) en el flujo celular 2 menos la respuesta (RU) en el flujo celular 1. se obtiene un segundo sensograma al saturar primero los flujos celulares con G5/44 (100 µg/ml) antes de la introducción de mAbs murino contra CD22 que se ha caracterizado previamente para su enlace. Inmediatamente durante la medición de la respuesta G5/44, los mAbs anti-CD22 de murino se tratan por perfusión individualmente sin remover el G544. La segunda respuesta combinada generada debido al enlace del mAb anti-CD22 murino al CD22 recubierto con G5/44, también se registra. Si el anticuerpo murino se enlaza al CD22 en sitios no relacionados a aquellos ocupados por G5/44, entonces las respuestas combinadas serán aditivas. Si el enlace de G5/44 a CD22 interfiere con o evita el enlace del segundo anticuerpo, entonces las respuestas combinadas no serán aditivas. Cada una de las segundas mediciones combinadas se corrigen para "fuera de relación" de la interacción G5/44:CD22.

El G5/44 bloquea el enlace de sólo aquellos anticuerpos que enlazan al epítipo A/dominio 1 tipo Ig de CD22 (SHCL1 Leu 14 y HD239), lo que indica que G5/44 también se enlaza en este dominio de CD22. los anticuerpos que se enlazan al epítipo B/dominio tipo Ig

3 de CD22 (RFB-4), epítipo C (dominio tipo Ig 4 de CD22 (To 15) y dominio 2 tipo Ig de CD22 (4KB128), no se bloquean por G5/44. Estos resultados indican que el sitio enlazado a G5/44 en CD22 se localiza en el primer dominio tipo Ig debido a que previene el enlace de aquellos mAbs anti CD22 que reconocen el primer dominio tipo Ig de CD22 (epítipo A). Otro anticuerpo anti CD22, M6/13 (Celltech, Slough, RU), de una subespecie desconocida también se bloquea por G5/44 (Celltech, Slough, RU), de esta manera se mapea el sitio de enlace de M6/13 para el epítipo A/dominio tipo Ig de CD22. el anticuerpo M5/44, que tiene la misma especificidad como G5/44, inhibe el enlace de G5/44, y sirve como un control positivo. El anticuerpo BU12 anti CD19 sirve como un control negativo en estas evaluaciones. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

TABLA 7: ENLACE DE M/AB ANTI-CD22 DE MURINO CON  
 ESPECIFICIDADES DEFINIDAS PARA FC-CD22 PREVIAMENTE TRATADO  
 CON G544. RESPUESTA DE ENLACE EXPRESADA COMO UNIDADES DE  
 RESONANCIA DE PLASMON DE SUPERFICIE (RU).

| Anticuerpo                     | Dominio<br>Ig de<br>Epitopo<br>de CD22 | Respuesta<br>1 con<br>G544 | Respuesta<br>1 después<br>del 2do<br>mAb anti-<br>CD22 | Respuesta<br>3<br>(Respuesta<br>2-1) | Respuesta<br>3<br>ajustada<br>para<br>relación<br>"APAGADA"<br>de G544 | Enlace<br>del 2do<br>mAb sin<br>G544<br>ajustado<br>para<br>respaldo | Inhibición<br>por G544<br>(%) |
|--------------------------------|----------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Anti CD22,<br>SHCL-1<br>Leu 14 | A<br>1,2                               | 654.3                      | 579.8                                                  | -74.5                                | 9                                                                      | 29.3                                                                 | 69                            |
| Anti CD22<br>HD239             | A<br>1                                 | 710.5                      | 628.7                                                  | -81.8                                | 1.7                                                                    | 19.3                                                                 | 91                            |
| Anti CD22<br>M 6/13            | ?<br>?                                 | 710.0                      | 652.7                                                  | -57.3                                | 26.2                                                                   | 152.4                                                                | 83                            |
| Anti CD22<br>RFB-4             | B<br>3                                 | 703.5                      | 1108.5                                                 | 405                                  | 488.5                                                                  | 534                                                                  | 9                             |
| Anti CD22<br>4KB128            | ?<br>2                                 | 691.0                      | 1343.5                                                 | 652.5                                | 736.0                                                                  | 738.8                                                                | 0                             |
| Anti CD22<br>To 15             | C<br>4                                 | 676.9                      | 1163.6                                                 | 486.7                                | 570.2                                                                  | 614.6                                                                | 7                             |
| Anti CD22<br>M 5/44            | Control<br>positivo                    | 725.1                      | 679.3                                                  | -45.8                                | 37.7                                                                   | 613.9                                                                | 94                            |
| Anti CD19<br>BU12              | Control<br>negativo                    | 686.2                      | 602.7                                                  | -83.5                                | 0                                                                      | 0                                                                    | 0                             |

Al usar mAbs de murino de especificidad conocida para dominios individuales para CD22, la capacidad de G5/44 para bloquear el enlace de estos anticuerpos a células B se investiga. Adicionalmente, la capacidad de los mAbs para bloquear el enlace de G5/44 a células B se investiga también. En estos estudios, se exponen primero  $1 \times 10^5$

células Ramos al anticuerpo anti-CD22 murino (10 µg/ml de G5/44 humanizado o anti-CD22 monoclonal de ratón) durante 1 hora a 4°C antes de la exposición de las células al G5/44 (10µg/ml). Las células se incuban durante 1 hora adicional a 4°C. Después de los tratamiento del anticuerpo, las células B se peletizan y se lavan con PBS-BSA al 1% y se agrega el anticuerpo secundario apropiado (ya sea anti-humano de cabra-FIT (cadena pesada y ligera) o anti-ratón de cabra-FITC (cadena pesada y ligera)) a 100l de una dilución 1:100 en PBS-BSA al 1% durante 30 minutos a 4°C. Las células se peletizan nuevamente, se lavan, y se vuelven a suspender en PBS-BSA al 1% y se agregan a un tubo que contiene 250 µl de PBS-formaldehído al 1%. Se mide la intensidad de fluorescencia asociada con las células por citometría de flujo usando el citómetro de flujo BD FACSort.

Los resultados muestran que la exposición previa de G5/44 a células CD22+B resulta en la inhibición importante del posterior enlace de mAbs anti-CD22 M5/44 y M6/13. En contraste, el enlace de mAbs RFB4 anti-CD22, To15, HD239, y 4KB a células B no se inhibe por G5/44. La carencia de inhibición importante de HD239 enlazado a las células B por G5/44 como se detecta por citometría de flujo fue inesperada, especialmente desde que el análisis BIAcore indica que G5/44 puede bloquear el enlace de HD239 a CD22. La carencia de inhibición fuerte de HD239 enlazado por G5/44 puede explicarse con base en las diferencias en sus afinidades relativas para CD22. Cuando los mAbs anti-CD22 de murino anteriores se examinan para su capacidad para inhibir el enlace de G5/44 a células B CD22+, SHCL1 y M6/13, pero no los otros mAbs anti-CD22, se inhibe el

enlace de G5/44. los epítomos de enlace de HD239 y SHCL1 se han mapeado para el primer dominio tipo Ig de CD22. Sin embargo, los epítomos reconocidos por M6/13 o M5/44 no se han mapeado. Los estudios de bloqueo detallado arriba indican que los anticuerpos anteriores reconocen epítomos localizados en el primer dominio tipo Ig de CD22, colectivamente conocido como epítomo A.

Se incubaron veinte mil células Ramos con varias dosis de CMC-544 con y sin rituximab (Rituxan®) durante 96 horas. Después de 96 horas, se mide la viabilidad celular por exclusión de yoduro de propidio analizado por citometría de flujo. La viabilidad media de 3 hasta 6 pozos se calcula y la inhibición de respuesta a dosis de viabilidad celular se calcula para los diversos tratamientos. La inhibición de respuesta de respaldo de viabilidad celular se calcula desde una concentración cero de CMC-544. La regresión logística se usa para probar si CMC-544 causa una inhibición dependiente de la dosis estadísticamente importante del crecimiento de células Ramos sobre el rango de dosis de 0.01 hasta 3 ng de caliqueamicina DMH/ml. La regresión logística también se usó para determinar si la interacción de CMC-544 con rituximab (Rituxan®) fue estadísticamente importante. También se computarizaron concentraciones inhibidoras medianas ( $IC_{50}$ ) y la efectividad de cada tratamiento con relación al tratamiento solo con CMC-544 se registró. El análisis estadístico se condujo usando el procedimiento PROBIT en la versión SAS 8.2.

Los resultados del estudio muestran que CMC-544 causa una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de células Ramos sobre el rango de dosis de 0.01 hasta 3 ng de

DMH caliqueamicina/ml. La concentración inhibidora media ( $IC_{50}$ ) de solo CMC-544 fue 0.029 ng/ml. Las concentraciones de 2, 20, y 200  $\mu$ g/ml de rituximab (Rituxan®) se agregaron a células tratadas con CMC-544 para determinar su la interacción del rituximab (Rituxan®) con la actividad citotóxica de CMC-544 es estadísticamente importante. El rituximab (Rituxan®), agregado a 20 y 200  $\mu$ g/ml sin CMC-544, no tiene un efecto importante en el crecimiento celular por sí mismo (111.7% y 94.0% de crecimiento del vehículo, respectivamente). En combinación con CMC-544, las tres concentraciones de (Rituxan®) producen cambios estadísticamente importantes ( $p < 0.05$ ) a la izquierda en la pendiente e intercepción de la curva de respuesta a la dosis de CMC-544. La combinación con 2 y 200  $\mu$ g/ml de rituximab produce los cambios más grandes en las curvas de respuesta a la dosis. Estas 2 curvas no son estadísticamente diferente una de la otra, pero son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) de la combinación de dosis de 20  $\mu$ g/ml. Un segundo estudio (resultados no reportados) confirma los resultados observados en el primer estudio. Las concentraciones inhibidoras medias para las combinaciones de 2, 20, y 200  $\mu$ g/ml de rituximab (Rituxan®) más CMC-544 son 0.0072, 0.081, y 0.0072 ng/ml, respectivamente. Las concentraciones inhibidoras medias de CMC-544 más rituximab (Rituxan®) son aproximadamente cuatro veces más potentes que la  $IC_{50}$  solo de CMC-544.

## II ACTIVIDAD ANTI-TUMOR IN VIVO, XENOINJERTOS SUBCUTÁNEOS Y LINFOMAS DE CELULA B SISTEMÁTICAMENTE DISEMINADOS EN RATONES SCID

Ratonas atímicas desnudas, hembras, 18-22 g, se les da una irradiación corporal total (400 rads). La irradiación suprime además el sistema inmune de los ratones para aumentar la toma de tumor. Tres días después de la irradiación, los ratones se inyectan subcutáneamente con células 107 RL en Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Belford, MA, diluidos 1:1 en un medio RPMI) en el dorso, flanco derecho. Cuando los tumores alcanzan el tamaño apropiado, (0.3g, típicamente 21 días después), el CMC-544, rituximab (Rituxan®) o terapia CHOP (ver abajo) se administran en solución salina estéril, 0.2 ml/ratón ip. El día inicial de la administración de fármaco se considera el día 1. se dan dos dosis adicionales los días 5 y 9 (tratamiento = q4Dx3). La terapia CHOP consiste de ciclofosfamida (C), (Cytoxan®, Bristol-Meyers Squibb Co., Princeton, NJ) 40 mg/kg ip; doxorubicina HCl (H), (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO) 3.3 mg/kg ip; vincristina (O), (GensiaSicor Pharmaceuticals, Irvine, CA) 0.5 mg/kg ip; y prednisona (P), (Roxane Labs., Columbia, OH) 0.2 mg/kg po. El CHO se administra de conformidad con el mismo horario de dosificación como tanto para CMC-544 y rituximab (Rituxan®) (q4Dx3) mientras que la prednisona se administra oralmente cada otro día por 5 dosis (q2Dx5). Los tumores se miden al menos una vez a la semana y se calcula como masa de tumor (g) =  $0.5 \text{ (ancho de tumor/2) (longitud de tumor)}$ . Los SEM medios del grupo se calculan y comparan para el grupo tratado con el vehículo para un significado estadístico usando múltiples pruebas T. Los grupos medios se registran

hasta 50 días o hasta ya sea que el ratón muera (cuando se rompe el grupo medio) o el tumor crece muy grande ( $<3.5g$ ) y al ratón se le hace la eutanasia. Después de este tiempo, la masa de tumor se reporta sólo para cada ratón individual en todos los grupos de tratamiento. El número de ratones libres de tumor al final de cada estudio para cada grupo de tratamiento, también se registra.

Para determinar el efecto de CMC-544 solo o en combinación con otros agentes bioactivos en los linfomas diseminados, se usa el modelo de ratón SCID. Se inyectan ratones SCID (CB17 SCID), machos, 20-25g, con células 106 Ramos a través de la vena de la cola (0.2 ml). Ya sea 3 ó 9 días después de la inyección celular, los ratones se les administra el vehículo, conjugados (CMC-544 o CMC-676), o rituximab (Rituxan®), ip, durante un total de 3 dosis. Para el programa de tratamiento de día 3, los ratones se dosifican en los días 3, 7, y 11. Para el programa de tratamiento de día 9, los ratones se dosifican los días 9, 13 y 17. En el programa de tratamiento de día 9, las combinaciones de CMC-544 y rituximab (Rituxan®) se dan también como se describe abajo. Los ratones se monitorean diariamente para la presencia de parálisis de los miembros anteriores en cuyo momento se sacrifican. Siete de 10 ratones por grupo de tratamiento se usan. El tiempo de supervivencia promedio del grupo ( $\pm SD$ ), tiempos de supervivencia medio, mínimo y máximo, todos se calculan. La diferencia en la distribución de supervivencia entre los grupos se determina al usar una prueba de rango Log no paramétrica con importancia reportada en el nivel 0.05. las curvas de supervivencia se construyen usando el método Kaplan-Meier.

El estudio inicial examina el efecto de dos diferentes programas de dosificación en tiempos de supervivencia de los ratones SCID con el linfoma diseminado. El primer estudio se aprecia a una dosificación de fármaco inicial 3 días después de que las células de tumor se inyectaron intravenosamente (modelo de desarrollo), mientras que el segundo estudio retarda la dosificación del fármaco hasta 9 días después de la inyección de células de tumor (modelo de establecimiento). En cada estudio, el CMC-544 (160 µg/kg), CMA-676 (160 µg/kg), o rituximab (Rituxan®) (20 mg/kg) se administran en 3 dosis ip, con 4 días de separación (Q4Dx3). En el modelo de desarrollo, los ratones tratados con vehículo tienen un tiempo de supervivencia promedio de 27 días (Figura 23, Tabla 8). El CMA-676, el control agrupado isotipo para CMC-544, no incrementa el tiempo de supervivencia de manera importante ( $p > 0.05$ ). El CMC-544 incrementa de manera importante el tiempo de supervivencia hasta 41 días mientras que el rituximab tiene un efecto previamente encontrado, que incrementa el tiempo de supervivencia hasta  $> 125$  días (significativamente mayor que CMC-544,  $p < 0.05$ ). la dosificación se retarda hasta que las células de tumor tiene la oportunidad de circular (guiadas) y depositarse en los tejidos objetivo (modelo de establecimiento) cambiando los resultados para CMC-544 y rituximab (Rituxan®). El CMA-676 nuevamente no tiene un efecto importante en los tiempos de supervivencia (Figura 24, Tabla 8). El rituximab (Rituxan®) incrementa el tiempo de supervivencia promedio hasta 62.6 días, mientras que el CMC-544 mejora el tiempo de supervivencia promedio hasta 83.5 días. No hay una diferencia importante entre los efectos de CMC-544 y rituximab (Rituxan®) en el modelo

establecido.

TABLA 8: MEDICIONES DESCRIPTIVAS DE TIEMPOS DE SUPERVIVENCIA

| Estudio                   | Compuesto | Tiempo de super-<br>vivencia<br>promedio | Tiempo de super-<br>vivencia<br>medio | Desviación<br>estándar | Tiempo de super-<br>vivencia<br>mínimo | Tiempo de super-<br>vivencia<br>máximo | Número<br>de<br>animales |
|---------------------------|-----------|------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| Modelo de desarrollo      | CMA-676   | 32.9                                     | 34.0                                  | 3.9                    | 28.0                                   | 36.0                                   | 7                        |
|                           | CMC-544   | 41.0                                     | 38.0                                  | 10.1                   | 32.0                                   | 60.0                                   | 7                        |
|                           | Rituximab | 128.4                                    | >130.0                                | 4.7                    | 119.0                                  | >130.0                                 | 7                        |
|                           | Vehículo  | 27.2                                     | 28.0                                  | 1.4                    | 25.0                                   | 28.0                                   | 8                        |
| Modelo de establecimiento | CMA-676   | 33.7                                     | 31.0                                  | 4.6                    | 30.0                                   | 42.0                                   | 7                        |
|                           | CMC-544   | 83.5                                     | 76.5                                  | 41.6                   | 34.0                                   | >130.0                                 | 8                        |
|                           | Rituximab | 62.6                                     | 37.0                                  | 46.2                   | 31.0                                   | >130.0                                 | 7                        |
|                           | Vehículo  | 30.5                                     | 29.0                                  | 3.6                    | 27.0                                   | 36.0                                   | 8                        |

Se conduce un estudio preliminar para determinar si el rituximab (Rituxan®) tiene cualquier efecto, ya sea positivo o negativo, en la respuesta de supervivencia de CMC-544. El CMC-544 (160 µg/kg) se administra con y sin rituximab (Rituxan®) (20 mg/kg, que etiqueta la combinación de fármaco de dosis alta (HD)). Además. Se co-administran dosis inferiores de CMC-544 (80 µg/kg) con dosis inferiores de rituximab (Rituxan®) (10 mg/kg). Los compuestos no se dan separadamente a las respectivas dosis de 80 µg/kg o 10 mg/kg debido al número limitado de ratones en el estudio. Esta combinación, CMC-544 (80 µg/kg) con rituximab (Rituxan®) (10 mg/kg), se etiquetó la combinación de dosis del medio (MD) y se corrió para determinar la posibilidad de combinaciones de dosis inferior de fármacos en la supervivencia del ratón

SCID. El CMC-544 (160 µg/kg) y rituximab (Rituxan®) (20 mg/kg), administrados solos, se realiza como se reporta en el modelo establecido de arriba. Cada tiempos de supervivencia promedio se prolongó hasta 58.5 y 50.5 días, respectivamente (Figura 25, Tabla 9). En combinación, el tiempo de supervivencia promedio fue ligeramente (aunque no fue estadísticamente importante,  $p>0.05$ ) mejorado hasta 64.4 días para la combinación de alta dosis. La combinación de dosis media de 80 µg/kg CMC-544 y 10 mg/kg de rituximab (Rituxan®) mejora de manera importante ( $p<0.05$  contra el tratado con vehículo) el tiempo de supervivencia hasta un promedio de 92.4 días. Estos resultados sugieren que combinaciones de dosis inferior de CMC-544 y rituximab (Rituxan®) se garantiza.

TABLA 9: MEDICIONES DESCRIPTIVAS DE TIEMPOS DE SUPERVIVENCIA PARA ESTUDIO DE COMBINACIÓN INICIAL

| Compuesto         | Tiempo de super-vivencia promedio | Tiempo de super-vivencia medio | Desviación estándar | Tiempo de super-vivencia mínimo | Tiempo de super-vivencia máximo | Número de animales |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| CMC MD + Ritux MD | 92.4                              | >100.0                         | 16.0                | 62.0                            | >100.0                          | 10                 |
| CMC HD + Ritux HD | 64.4                              | 58.5                           | 26.7                | 29.0                            | >100.0                          | 10                 |
| CMC-544           | 58.5                              | 34.5                           | 35.8                | 27.0                            | >100.0                          | 10                 |
| Rituximab         | 50.5                              | 41.0                           | 26.4                | 30.0                            | >100.0                          | 10                 |
| Vehículo          | 31.0                              | 27.0                           | 9.7                 | 27.0                            | 56.0                            | 9                  |

CMC MD = Dosis media de CMC544, 80 µg/kg

CMC HD = Dosis alta de CMC544, 160 µg/kg

inicialmente causa una inhibición importante del crecimiento de linfoma RL B (Figura 29). Sin embargo, 3 semanas más tarde, los tumores vuelven a crecer con relaciones similares de crecimiento como el grupo tratado con el vehículo. En contraste, el efecto anti-tumor de CMC-544 se completó y permaneció a través del periodo experimental. Estos resultados sugieren que CMC-544, a una dosis significativamente inferior que la dosis no letal máxima en ratones desnudos, fue más eficaz que la terapia de combinación CHOP.

Estos estudios muestran que rituximab (Rituxan®), agregado a CMC-544 causa un incremento importante en la actividad citotóxica de CMC-544 observada con células de linfoma B Ramos. Una interacción sinérgica en células Ramos de rituximab (Rituxan®) y glucocorticoides también se reporta recientemente. Adicionalmente, la inhibición de crecimiento sinérgico en 4 de 8 líneas de célula adicional se observó con rituximab (Rituxan®) cuando se dan en combinación con dexametasona 10  $\mu\text{m}$ .

El rituximab (Rituxan®) por sí mismo, 0.4 hasta 10  $\mu\text{g/ml}$ , se reporta que causa una inhibición aunque pequeña (18% máximo), importante, del crecimiento de células Ramos. Adicionalmente, se activa en 6 de 8 líneas de célula de linfoma no de Hodgkin de célula B cuando se incuban a 10  $\mu\text{g/ml}$  (48 horas de incubación). Ghetie et al, muestra que el rituximab (Rituxan®), 10  $\mu\text{g/ml}$ , causa un incremento del 6.2% en la apoptosis (contra el 3.5% en células tratadas con vehículo) después de 24 horas de incubación con células Ramos. En estudios actuales, el rituximab (Rituxan®), a dosis de 20 y 200  $\mu\text{g/ml}$  no tiene efecto en el crecimiento

probadas (ver arriba). Si el CMC-544, co-administrado con rituximab (Rituxan®), resulta en ya sea el aumento o inhibición de la actividad anti-tumor, también se evalúa usando el modelo de xenoinjerto de linfoma RL B subcutáneo en ratones desnudos Balb/c. En el modelo de linfoma B subcutáneo, los tumores están en la etapa hasta una masa de tumor promedio de 300 mg después de lo cual los dos terapéuticos bajo estudio se administran IP. El CMC-544 se usa a 20 u 80 µg/kg Q4Dx3 con o sin rituximab (Rituxan®) (20 mg/kg Q4Dx3). La co-administración de rituximab (Rituxan®) ni aumenta ni inhibe de manera importante ( $p > 0.05$ ) la eficacia terapéutica de CMC-544 (Figura 28). El rituximab (Rituxan®), administrado solo, inhibe el crecimiento del linfoma RL B (57% de inhibición del crecimiento del tumor el día 20,  $p < 0.05$  contra tratado con vehículo) en este estudio, similar a lo observado con la dosis inferior de CMC-544.

La combinación CHOP del régimen quimioterapéutico (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona) es la modalidad de tratamiento más comúnmente usada para pacientes con linfoma no de Hodgkin. El efecto anti-tumor de CHOP se compara con el de CMC-544 en xenoinjertos de linfoma RL B establecidos. Los componentes individuales del régimen CHOP se usan en sus respectivas dosis máxima tolerada evaluadas en ratones desnudos (datos no reportados) y son como sigue: Ciclofosfamida (C) 40 mg/kg IP, doxorubicina (H) 3.3 mg/kg IP, vincristina (O) 0.5 mg/kg IP, y prednisona (P) 0.2 mg/kg PO. Los CHO se administraron Q4Dx3 y P se administró PO, Q2Dx5. El CMC-544 se administró IP, Q4Dx3 a una dosis de 160 µg/kg equivalentes de caliqueamicina. El tratamiento CHOP

inicialmente causa una inhibición importante del crecimiento de linfoma RL B (Figura 29). Sin embargo, 3 semanas más tarde, los tumores vuelven a crecer con relaciones similares de crecimiento como el grupo tratado con el vehículo. En contraste, el efecto anti-tumor de CMC-544 se completó y permaneció a través del periodo experimental. Estos resultados sugieren que CMC-544, a una dosis significativamente inferior que la dosis no letal máxima en ratones desnudos, fue más eficaz que la terapia de combinación CHOP.

Estos estudios muestran que rituximab (Rituxan®), agregado a CMC-544 causa un incremento importante en la actividad citotóxica de CMC-544 observada con células de linfoma B Ramos. Una interacción sinérgica en células Ramos de rituximab (Rituxan®) y glucocorticoides también se reporta recientemente. Adicionalmente, la inhibición de crecimiento sinérgico en 4 de 8 líneas de célula adicional se observó con rituximab (Rituxan®) cuando se dan en combinación con dexametasona 10  $\mu\text{m}$ .

El rituximab (Rituxan®) por sí mismo, 0.4 hasta 10  $\mu\text{g/ml}$ , se reporta que causa una inhibición aunque pequeña (18% máximo), importante, del crecimiento de células Ramos. Adicionalmente, se activa en 6 de 8 líneas de célula de linfoma no de Hodgkin de célula B cuando se incuban a 10  $\mu\text{g/ml}$  (48 horas de incubación). Ghetie et al, muestra que el rituximab (Rituxan®), 10  $\mu\text{g/ml}$ , causa un incremento del 6.2% en la apoptosis (contra el 3.5% en células tratadas con vehículo) después de 24 horas de incubación con células Ramos. En estudios actuales, el rituximab (Rituxan®), a dosis de 20 y 200  $\mu\text{g/ml}$  no tiene efecto en el crecimiento

de células Ramos cuando se administra solo. En ratones, donde no hay evidencia de ninguna interacción entre CMC-544 y rituximab (Rituxan®) en ya sea el modelo diseminado o el modelo de xenoinjerto subcutáneo. Las combinaciones de fármaco probado no interfieren con cada uno de los otros efectos no los aumenta. Si se reduce las dosis de cada fármaco en el modelo diseminado, cambiará esta observación necesaria para determinarse.

El modelo de linfoma de célula B diseminado con células Ramos se ha descrito por Flavell et al. Los tiempos de supervivencia medios para ratones tratados con el vehículo se reportan para ser 34-36 días. Los ratones desarrollan parálisis de los miembros traseros y avanzan hasta estar moribundos, muriendo pronto. Los análisis histológicos de los orgánicos revela que los órganos más comúnmente involucrados fueron la glándula adrenal, bazo y espacio subaracnoide. El espacio sub-aracnoide se infiltra frecuentemente extendiéndose en el cerebro. El rituximab (Rituxan®) se desempeña bien cuando se administra en la fase temprana del proceso de la enfermedad para los ratones SCID diseminados (Figura 23), pero fue menos impresionante cuando se administra al día 9 en la fase establecida del modelo (Figura 24). El rituximab (Rituxan®), siendo del isotipo IgG1, trabaja más posiblemente a través de los mecanismos efectores hospedadores del ratón. Estos mecanismos incluyen la citotoxicidad mediada por el complemento y/o la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo a través de la renovación de células eliminadoras naturales que están presentes en los ratones SCID. Las células de tumor Ramos inyectadas probablemente son más susceptibles previamente en los mecanismos inmunes

hospedadoras que se activan pro rituximab (Rituxan®), antes de que las células tengan la oportunidad de infiltrarse en los órganos afectados. El anticuerpo G5/44 no conjugado (la molécula objetivo en CMC-544) no se ha probado aún en el modelo de tumor diseminado en ratones SCID, pero no tiene efecto cuando se administra en xenoinjertos subcutáneos. El G5/44, siendo del isotipo IgG4, no se esperará que active los mecanismos efectores hospedadores y, por lo tanto, no producirán actividad anti-tumor.

El G5/44 conjugado en caliqueamicina (CMC-544) que se porta de la forma opuesta al rituximab (Rituxan®), produce mejores resultados cuando se administra en la fase establecida de la enfermedad. La razón por la que el CMC-544 se desempeña mejor en la fase establecida no es clara, pero la fase establecida más cercanamente representa la situación clínica. El CMA-676, el conjugado de control no enlazado, agrupado isotipo, no tiene ningún efecto importante en los tiempos de supervivencia promedio. Los resultados en el modelo SCID diseminado sugieren claramente que las dosis de CMC-544 necesitan reducirse para determinar la dosis eficaz máxima (MED). La dosis de 160  $\mu\text{g/kg}$  fue menos activa que la dosis inferior de 80 y 40  $\mu\text{g/kg}$ . No es claro porqué pasa esto, pero la dosis de 160  $\mu\text{g/kg}$  puede estar bastante arriba de MED. Se planean estudios adicionales para atender esta cuestión.

Mohammad et al., usa la terapia CHOP (Ciclofosfamida (C) 40 mg/kg IV, doxorubicina (H) 3.3 mg/kg IV, vincristina (O) 0.5 mg/kg IV, y prednisona (P) 0.2 mg/kg PO) en un modelo de xenoinjertos subcutáneos con una línea de célula de linfoma de célula grande difuso, DLCL. Las dosis usadas para la terapia CHOP se determinan para ser la dosis máxima

tolerada. La terapia, CHO dada una vez IP y P, dada diariamente durante 5 días, se colocó "activa", produciendo un T/C de 25.8%. No se registraron curas de tumor. El resultado en el modelo descrito por Mohammad et al., parece ser similar a aquellos observados con la terapia CHOP (administrada IP, Q4Dx3) en el modelo RL descrito en la presente. En ningún estudio CHOP produce curas de larga duración, salvo CMC-544.

TABLA 10: MEDICIONES DESCRIPTIVAS DE TIEMPO DE SUPERVIVENCIA PARA ESTUDIOS DE COMBINACIÓN

| Tratamiento        | Tiempo de super-vivencia promedio | Tiempo de super-vivencia medio | Desviación estándar | Tiempo de super-vivencia mínimo | Tiempo de super-vivencia máximo | Número de animales |
|--------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| CMC-544 40 µg/kg   | 118.90                            | 125.00                         | 19.29               | 64.00                           | 125.00                          | 10                 |
| CMC LD + Ritux LD  | 125.00                            | 125.00                         | 0.00                | 125.00                          | 125.00                          | 10                 |
| CMC-544 80 µg/kg   | 118.22                            | 125.00                         | 17.86               | 71.00                           | 125.00                          | 9                  |
| CMC MD + Ritux MD  | 125.00                            | 125.00                         | 0.00                | 125.00                          | 125.00                          | 10                 |
| CMC-544 160 µg/kg  | 85.22                             | 82.00                          | 40.37               | 35.00                           | 125.00                          | 9                  |
| CMC HD + Ritux HD  | 91.30                             | 100.00                         | 36.31               | 44.00                           | 125.00                          | 10                 |
| Rituximab 5 mg/kg  | 40.70                             | 36.50                          | 9.57                | 34.00                           | 64.00                           | 10                 |
| Rituximab 10 mg/kg | 33.80                             | 34.00                          | 3.26                | 29.00                           | 41.00                           | 10                 |
| Rituximab 20 mg/kg | 40.50                             | 34.00                          | 15.45               | 31.00                           | 82.00                           | 10                 |
| Vehículo           | 25.80                             | 25.00                          | 3.12                | 22.00                           | 34.00                           | 10                 |

CMC LD = CMC-544 dosis baja, 40  $\mu\text{g/kg}$

CMC MD = CMC-544 dosis media, 80  $\mu\text{g/kg}$

CMC HD = CMC-544 dosis alta, 160  $\mu\text{g/kg}$

Ritux LD = Rituximab dosis baja, 5  $\text{mg/kg}$

Ritux MD = Rituximab dosis media, 10  $\text{mg/kg}$

Ritux HD = Rituximab dosis alta, 20  $\text{mg/kg}$

#### EJEMPLO 9

##### FORMULACIONES ESTABLES DE CMC-544

Las formulaciones estables de CMC-544 para administración in vivo se preparan al agregar diluyentes, excipientes, portadores y estabilizantes. Después de la cromatografía HIC, las fracciones cromatográficas se evalúan por SEC-CLAR y análisis de luz UV de longitud de onda. Se seleccionan las fracciones apropiadas para agruparse en base del análisis anterior, que proporciona información en el contenido agregado, concentración de proteína, y carga de caliqueamicina. Los excipientes, estabilizadores, agentes de volumen y agentes amortiguantes se agregan para estabilizar la solución. Ya que CMC-544 puede experimentar una degradación pro medio de un número de trayectorias de degradación, inestabilidades físicas necesarias para considerarse en el desarrollo de las formulaciones. Una de las consideraciones principales en el desarrollo de las formulaciones es que la relación de hidrólisis de caliqueamicina del anticuerpo deberá minimizarse mientras que la integridad física y química del anticuerpo anti-CD22 deberá mantenerse. Además, la precipitación del conjugado caliqueamicina-anticuerpo, que puede presentarse bajo ciertas condiciones de pH y concentración, necesitan

minimizarse.

En el desarrollo de la formulación de un conjugado derivado de caliqueamicina monomérico-anticuerpo, el pH de la formulación es crítico, como esto minimiza la degradación e inestabilidad física. El pH de 8.0 se selecciona para minimizar la hidrólisis de caliqueamicina y mantener la solubilidad adecuada del conjugado. Los datos adicionales, obtenidos usando SDS-PAGE y ELISA de enlace al antígeno, indican que la integridad estructural importante y especificidad del anticuerpo se mantienen a un pH de 8.0. En consecuencia, la trometamina se elige como un agente de amortiguamiento para mantener un pH de 8.0. Un amortiguador alternativo podrá incluir fosfato de sodio o potasio dibásico. El rango de concentración de amortiguador puede ser de 5 hasta 50 mM. Un rango preferido de pH de 7.5 hasta 8.5 se sugiere para una estabilidad/solubilidad óptima. La especificación de pH actual para el producto terminado es 7.0-9.0.

No obstante que la estabilidad de las soluciones de conjugado amortiguadas es adecuada para el corto plazo, la estabilidad prolongada es pobre. La liofilización se usa para mejorar la vida de anaquel de los conjugados. Los problemas asociados con la liofilización de la solución de proteína están bien documentados, y la pérdida de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria puede presentarse durante los procesos de congelado y secado. Se incluye la sacarosa en la formulación para actuar como un estabilizador amorfo del conjugado y mantiene la integridad estructural del anticuerpo durante el congelado y

secado. Las concentraciones de 1.5-5.0% p/v de sacarosa se usan. Además, un agente de volumen polimérico, tal como dextrano 40 o almidón de hidroxietilo, puede incorporarse para mejorar la apariencia y la rigidez física de las tortas liofilizadas a una concentración de 0.5-1.5% en peso. Estos materiales forman tortas liofilizadas a concentraciones relativamente bajas y puede usarse para minimizar el contenido de sólidos general de la fórmula liofilizada, lo que permite de esta manera un secado por congelación más rápido. Los estudios de formulación usan una concentración de Dextrano 40 de 0.9% en peso.

El polisorbato 80 se incluye en la formación para aumentar la solubilidad del conjugado. Una concentración preferida de 0.01% se usa con un rango potencial de 0.005%-0.05%. También se agrega Tween a la formación a una concentración de 0.01-0.05% en volumen.

Un electrolito también puede estar presente en la fórmula y puede usarse para mejorar la eficacia del proceso de purificación final. El cloruro de sodio se usa típicamente a una concentración de 0.01M hasta 0.1M. Los electrolitos adicionales tales como sulfato de sodio también pueden usarse como un reemplazo para el cloruro de sodio, ya que puede liofilizarse más fácilmente. De manera óptima, la solución de CMC-544 final comprende 1.5% de sacarosa (en peso), 0.9% de Dextrano 40 (en peso), 0.01% de Tween 80, cloruro de sodio 50 mM, 0.01% de polisorbato (en peso) y trometamina 20 mM.

Una fórmula representativa para la solución antes de la liofilización se presenta abajo: CMC-544 0.5

mg/mL, sacarosa 1.5% en peso, Dextrano 40 0.9% en peso, cloruro de sodio 0.0M, Tween 0.01-0.05% en volumen, polisorbato 80 0.01% en peso, trometamina 0.02M, pH 8.0, y agua. La solución se dispensa en viales ámbar a una temperatura de +5°C hasta 10°C, (de manera óptima a +5°C); la solución se congela a la temperatura de congelación de -35°C hasta -50°C, (de manera óptima a -45°C); la solución congelada se someta una etapa de secado por congelado inicial a una presión de secado primaria de 20 hasta 80 micrones, (de manera óptima a 60 micrones); el producto secado por congelado se mantiene a una temperatura de anaquel a -10°C hasta -40°C, (de manera óptima a -30°C), durante 24 hasta 72 horas, (de manera óptima por 60 horas); y finalmente el producto secado por congelado se someta a una etapa de secado secundaria a una presión de secado de 20-80 micrones, (de manera óptima a 60 micrones) a una temperatura de anaquel de +10°C hasta +35°C, (de manera óptima +25°C), durante 15 hasta 30 horas (de manera óptima durante 24 horas). Se usa la prueba de elevación de presión para determinar el final del secado primario. En la conclusión del ciclo de liofilización, los viales se rellenan nuevamente con nitrógeno y se tapan.

La Tabla 11 establece las diferencias en la formulación usada para CMC-544 y la formulación usada para CMC-676. Las diferencias importantes entre la formulación CMA-676 y la formulación usada para CMC-544 incluye la concentración de proteína reducida en la formulación nueva (0.5 mg/mL), el uso de trometamina como el amortiguante y la presencia de Tween 80 al

0.01%. Esto resulta en el CMC-reconstituido en la formulación nueva siendo claro, contrario a la turbiedad vista en la formulación de CMA-676 reconstituido (ver Tablas 12 y 13).

TABLA 11: COMPARACIÓN DE LA FORMULACIÓN CMA-676 Y FORMULACIÓN CMC-544 PARA CMC-544

|                              | Formulación CMA-676                                                                              | Formulación CMC-544                                                                                             |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Concentración de la proteína | 1.0 mg/mL                                                                                        | 0.5 mg/mL                                                                                                       |
| Formulación                  | 1.5% sacarosa, 0.9% Dextrano 40, cloruro de sodio 100 mM, solución amortiguadora de fosfato 5 mM | Sacarosa 1.5%, dextrano 49 0.9%, Tween 80 0.01%, polisorbato 80 .01%, cloruro de sodio 50mM, trometamina 20 mM. |

TABLA 12: ESTABILIDAD Y OBSERVACIONES FISICO-QUIMICAS DE LAS FORMULACIONES CMA-676 Y CMC-544 PARA CMC-544 A 5°C.

|                                                 | Formulación CMA-676 |                    | Formulación CMC-544 |           |
|-------------------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-----------|
| Tiempo                                          | Inicial             | 2 semanas          | Inicial             | 2 semanas |
| Observación física                              | Ligeramente turbio  | Ligeramente turbio | Claro               | Claro     |
| pH                                              | 7.5                 | 7.5                | 7.8                 | 7.8       |
| Proteína total (mg/mL)                          | 1.07                | 1.07               | 0.52                | 0.52      |
| Caliqueamicina total (µg/ml de proteína)        | 67                  | 67                 | 57                  | 57        |
| Caliqueamicina no conjugada (µg/mg de proteína) | 1.21                | 2.82               | 0.97                | 1.13      |
| % de agregados                                  | 3.03                | 2.81               | 1.59                | 1.70      |

TABLA 13:ESTABILIDAD Y OBSERVACIONES FISICO-QUIMICAS DE LA FORMULACION CMA-676 Y CMC-544 LIOFILIZADA Y ALMACENADA A °C

|                                                 | Formulación CMA-676 |                    | Formulación CMC-544 |           |
|-------------------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-----------|
| Tiempo                                          | Inicial             | 4 semanas          | Inicial             | 4 semanas |
| Observación física de conjugados reconstituidos | Ligeramente turbio  | Ligeramente turbio | Claro               | Claro     |
| pH                                              | 7.5                 | 7.5                | 7.8                 | 7.8       |
| Proteína total (mg/mL)                          | 1.03                | 1.03               | 0.51                | 0.51      |
| Caliqueamicina total (µg/ml de proteína)        | 67                  | 67                 | 57                  | 57        |
| Caliqueamicina no conjugada (µg/mg de proteína) | 1.13                | 1.03               | 1.03                | 0.94      |
| % de agregados                                  | 2.63                | 2.96               | 1.49                | 2.09      |

Todas las referencias y patentes citadas arriba se incorporan en la presente para referencia. Se incluyen numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención en la especificación arriba identificada y se espera que sean obvias por alguien de experiencia en el arte. Tales modificaciones y alteraciones al proceso de conjugación, los conjugados hechos por el proceso, y las composiciones/formulaciones que comprenden los conjugados se considera que se abarcan dentro del alcance de las reivindicaciones.

Bibliografía

1. G. Kohler and Milstein, C., Nature, 256:495 (1975).
2. T.G. Hose and Blair, A.H. CRC Critical Rev. Drug Carrier Systems 3:263 (1987).
3. Patente E.U.A. No. 5,877,296