CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y FÁRMACO DIRIGIDOS CONTRA GCC

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense Nro. 62/292,087, presentada el 5 de febrero de 2016, cuyo contenido se incorpora en la presente en su totalidad.

Esta invención se relaciona con conjugados de anticuerpo y fármaco capaces de administrar compuestos citotóxicos a cánceres que expresan el receptor de superficie celular transmembrana guanilil ciclasa C (GCC).

La GCC funciona en el mantenimiento del fluido intestinal, la homeostasis de electrolitos, y la proliferación celular. Arshad y Visweswariah, *FEBS Letters* 586:2835-2840 (2012). En los mamíferos adultos normales, la GCC funcional es expresada por las células de la mucosa que recubren el intestino delgado, el intestino grueso y el recto. Estas células están sometidas a ciclos homeostáticos de proliferación, migración, diferenciación y apoptosis, y un desbalance entre la proliferación y la apoptosis puede conducir a la formación de tumores dentro del tracto gastrointestinal. Arshad y Visweswariah (2012).

La GCC es una proteína de superficie con una expresión anatómicamente compartimentalizada que permite un direccionamiento selectivo a tumores que expresan antígenos. La expresión de GCC se mantiene ante la transformación neoplásica de las células epiteliales del intestino, con expresión en todos los tumores colorrectales primarios y metastásicos. Carrithers y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(25):14827-14832 (1996). Los agentes direccionados contra GCC no son capaces de penetrar la pared intestinal y alcanzar el sitio en donde normalmente se halla la GCC, pero sí alcanzan las células cancerosas que continúan expresando la GCC en la superficie celular.

Se ha descrito a la enterotoxina estable al calor de *E. coli*, un ligando de la GCC, como potencial vehículo de direccionamiento para la administración de agentes proteicos terapéuticos anticancerosos a las células de cáncer colorrectal. Buc y col., *Eur. J. Cáncer* 41(11):1618-1627 (2005). Además, previamente se ha demostrado que conjugados de anticuerpo y fármaco anti-GCC tienen actividad contra la GCC en cáncer pancreático. Veiby, Resumen PR12/B19 presentado en la International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Octubre 19-23, 2013, Boston. Sin embargo, no todos los conjugados de anticuerpo y fármaco cumplirán con el perfil biológico necesario para ser usados en la clínica.

No es posible predecir de antemano, simplemente en base a un perfil de anticuerpo, o un perfil de carga farmacológica, qué conjugados de anticuerpo y fármaco serán suficientemente seguros y eficaces para las aplicaciones clínicas. Por ejemplo, una carga farmacológica particular puede funcionar perfectamente bien cuando se conjuga a un anticuerpo dirigido contra un blanco, pero la

misma puede no funcionar tan bien cuando se conjuga a un anticuerpo dirigido contra un blanco diferente, o incluso a un anticuerpo diferente dirigido contra el mismo blanco. No se comprende suficientemente porqué los diferentes conjugados de anticuerpo y fármaco muestran diferentes actividades anti-tumorales *in vivo* como para permitir predicciones precisas en el diseño de nuevos conjugados de anticuerpo y fármaco. Se especula que puede haber muchos factores que interactúan en forma impredecible. Estos factores pueden incluir, por ejemplo, la afinidad de unión de un conjugado de anticuerpo y fármaco a un antígeno blanco, la capacidad del conjugado para penetrar tumores sólidos, así como también la vida media en circulación para una exposición apropiada a los tumores sin causar toxicidad.

La complejidad e impredictibilidad están bien demostradas por la afinidad del anticuerpo solo. Los anticuerpos o conjugados de anticuerpo y fármaco con alta afinidad trabajan con una mejor captación celular, lo que conduce a un mayor nivel de cargas citotóxicas liberadas dentro de las células. También se sabe que una mayor afinidad aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Todos estos atributos favorecen la propiedad de muerte celular de los conjugados de anticuerpo y fármaco. Sin embargo, también se sabe que la alta afinidad de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo y fármaco puede impedir una suficiente penetración del tumor a través de un “efecto de barrera antigénica”, lo que sugiere que con el objetivo de conseguir una fuerte actividad antitumoral *in vivo*, la afinidad del conjugado de anticuerpo y fármaco tiene que ser justo la correcta: no demasiado alta o no demasiado baja. Hasta la fecha, no se sabe cómo predecir cuál será el nivel de afinidad más eficiente o eficaz para un conjugado de anticuerpo y fármaco.

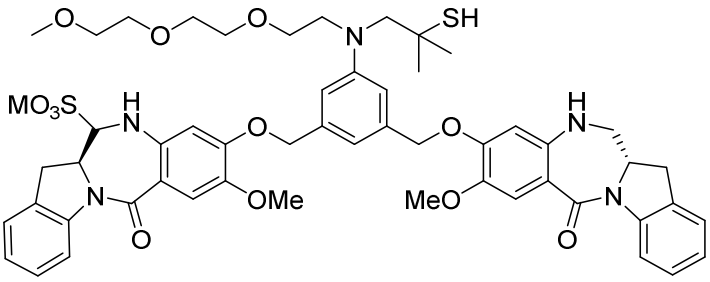
Además, la actividad antitumoral *in vivo* no se puede predecir solamente mediante el mecanismo de conectores y cargas útiles. Por ejemplo, O. Ab y col, *Mol. Cáncer Ther*. 14(&):1605-1613 (2015) demostraron que, cuando se prueba en modelos de cáncer preclínicos, el mismo conjugado de anticuerpo con la misma toxina anti-tubulina a través de diferentes conectores exhibió una actividad antitumoral muy diferente. Este ejemplo es particularmente sorprendente debido a que las estructuras químicas de los dos conectores son muy similares. Más aún, el conector presente en el conjugado superior contenía una unidad hidrofílica. Los metabolitos hidrofílicos en general son menos permeable a la membrana, y se cree que son más lentos en el eflujo desde los lisosomas (el sitio de degradación de los conjugados), lo que conduce a un retraso de la actividad antitubulina de la carga útil liberada. Este hallazgo está en contra de una cinética “ideal” de administración de carga útil, pero hasta la fecha, no se sabe cómo está constituida dicha cinética. Además de esta complejidad, está la pregunta abierta de si la cinética ideal de administración de la carga útil, incluso si se la define para un tipo celular particular, se podría aplicar a todos los tipos celulares. Por lo tanto, no es posible predecir la

actividad antitumoral *in vivo* más eficaz solamente a partir de la composición química del conector o de la carga útil.

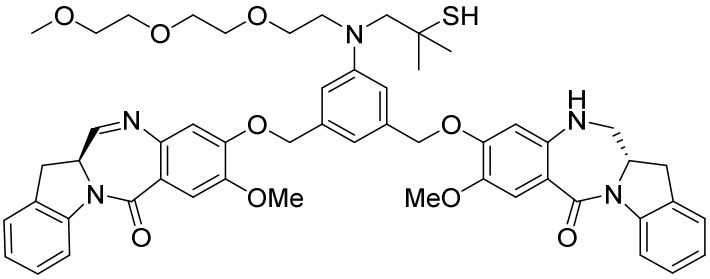
Otra cosa que apoya la impredictibilidad de la actividad de los conjugados de anticuerpo y fármaco *in vivo* son dos conjugados de anticuerpo y fármaco (ambos contra tumores líquidos), que comparten el mismo conector-carga útil (SPDB-DM4) conjugado a diferentes anticuerpos. Se halló que el primero, un conjugado de anti-CD33-SPDB-DM4, es ineficaz *in vivo*. S. Lapusan y col., *Invest. New Drugs* 30:1121-1131 (2012). Por el contrario, se ha demostrado que un conjugado de anti-CD19-SPDB-DM4 es eficaz contra linfoma en ensayos clínicos. V. Ribrag, y col., *Clin. Cáncer Res.* 20(1):213-220 (2014).

Como consecuencia, no es sorprendente que, hasta la fecha, no se han aprobado productos farmacológicos que contengan un anticuerpo anti-GCC para el tratamiento de cáncer, dejando solo a un conjugado de anticuerpo y fármaco que puede administrar selectivamente agentes citotóxicos a células de cáncer que expresan el antígeno GCC. Por lo tanto, existe una necesidad no resuelta por conjugados de anticuerpo y fármaco para tratar cánceres que expresan GCC.

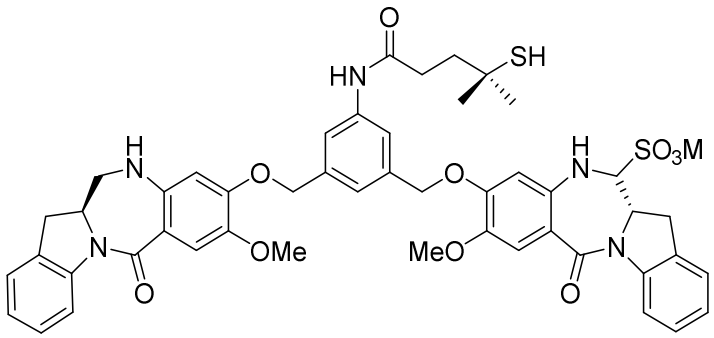
La invención provee, en parte, conjugados de anticuerpo y fármaco que comprenden una molécula de anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementaridad (CDR) de SEQ ID NO:1 (VHCDR1), SEQ ID NO:2 (VHCDR2), y SEQ ID NO:3 (VHCDR3) y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO:4 (VLCDR1), SEQ ID NO:5 (VLCDR2), y SEQ ID NO:6 (VLCDR3), conjugadas a un agente farmacológico citotóxico (CDA) que se elige de



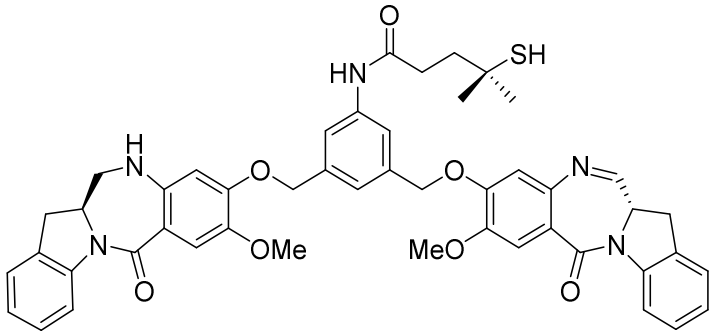
CDA-1A



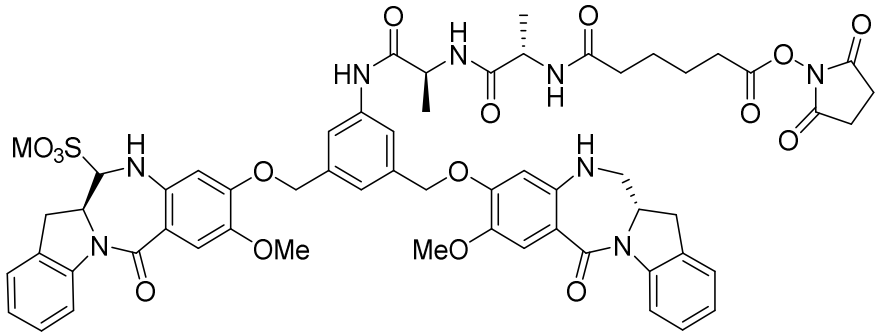
CDA-1B



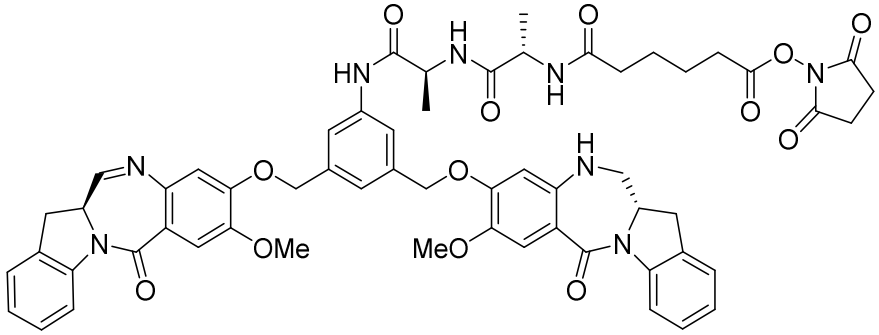
CDA-2A



CDA-2B



CDA-3A



CDA-3B.

La molécula de anticuerpo puede estar conectada a una CDA a través de cualquier conector adecuado, tal como, por ejemplo, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) o N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB).

En algunas formas de realización, la VH de la molécula de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, o una secuencia que es por lo menos 85% idéntica a la SEQ ID NO:7, y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO:8. En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO:9 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO:10.

Otros aspectos de la invención incluyen métodos para direccionar la terapia anticancerosa a células tumorales que expresan antígeno de GCC, métodos para inhibir el crecimiento de un tumor mediante la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención, métodos para reducir el tamaño de un tumor mediante la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención, y métodos para tratar un cáncer que se caracteriza por la expresión de GCC mediante la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. En algunas formas de realización, el tumor/cáncer a tratar es un cáncer del sistema gastrointestinal (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, o cáncer de estómago). En algunas formas de realización, el tumor/cáncer a tratar es cáncer pancreático.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figura 1A – Figura 1D muestran datos de unión celular a células que expresan GCC. La Figura 1A refleja los valores de afinidad para el anticuerpo 5F9 no conjugado. La Figura 1B, Figura 1C, y Figura 1D reflejan los valores de afinidad para los conjugados de anticuerpo y fármaco 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente.

La Figura 2A – Figura 2C muestran la potencia relativa de los conjugados de 5F9-CDA en células HEK293-GCC#2.

La Figura 3A – Figura 3C demuestran la eficacia *in vivo* de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente, en ratones que portan tumores HEK293-GCC#2.

La Figura 4A – Figura 4C demuestran la eficacia *in vivo* de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente, en un modelo de xenoinjerto tumoral humano primario de cáncer colorrectal, ratones que portan tumores PHTX(a) después de una dosis individual. La Figura 4D - Figura 4F demuestran la

eficacia *in vivo* de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente, en un modelo de xenoinjerto tumoral humano primario de cáncer colorrectal, ratones que portan tumores PHTX(a) después de dosis fraccionadas.

La Figura 5A – Figura 5C demuestran la eficacia *in vivo* de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente, en un modelo de xenoinjerto tumoral humano primario de cáncer colorrectal, ratones que portan tumores PHTX(b).

La Figura 6A – Figura 6B demuestran la eficacia *in vivo* de 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente, en un modelo de xenoinjerto tumoral humano primario de cáncer colorrectal, ratones que portan tumores PHTX(c).

La Figura 7A – Figura 7C muestran los perfiles farmacocinéticos (PK) de ratones que portan tumores HEK293-GCC después de la administración de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, o 5F9-CDA-3 como se describe en el Ejemplo 8.

Las Figuras 8A y 8B muestran los perfiles farmacodinámicos (PD) de ratones que portan tumores HEK293-GCC después de la administración de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, o 5F9-CDA-3 como se describe en el Ejemplo 8.

La Figura 9A muestra el cromatograma líquido de la reacción de sulfonación. La Figura 9 B muestra el perfil de picos de espectrometría de masa que corresponde a CDA-3B.

DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN

A menos que se defina de otra manera en la presente, los términos científicos y técnicos que se usan en conexión con la presente invención tienen los significados comúnmente aceptados por las personas con experiencia en el arte. En general, la nomenclatura que se utiliza en conexión con, y las técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular, y química de proteínas y oligo o polinucleótidos e hibridización que se describen en la presente son aquellas conocidas en el arte.

Moléculas de Anticuerpo

El término "molécula de anticuerpo”, tal como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las SEQ ID NOs 1-6. Las moléculas de anticuerpo incluyen moléculas de anticuerpo de cadena individual (véase, por ejemplo, scFv, véase por ejemplo, Bird y col. *Science* 242:423-426 (1988) y Huston y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)), y moléculas de anticuerpo de dominio individual (véase, por ejemplo, W09404678). “Molécula de anticuerpo” también se puede referir a proteínas y glicoproteínas de dos cadenas o de múltiples cadenas. Tal como se usa en la presente, el término "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere, por ejemplo, a fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, y Fv,

anticuerpos de cadena individual, anticuerpos de cadena pesada individual (nanobodies), así como también a cualquier porción de un anticuerpo que tenga especificidad por la GCC. Los fragmentos de unión a antígeno se pueden producir por técnicas recombinantes, o por escisión enzimática o química de un anticuerpo intacto. El término, fragmento de unión a antígeno, cuando se usa con una cadena individual, por ejemplo, una cadena pesada de un anticuerpo que tiene una cadena liviana y pesada, significa que el fragmento de la cadena es suficiente de forma tal que cuando se aparea con una región variable completa de la otra cadena, por ejemplo, la cadena liviana, permitirá la unión de por lo menos 25%, 50%, 75%, 85%, o 90% de los que se observa con la región variable completa de cadena pesada y liviana.

El término "molécula de anticuerpo" también incluye a las variantes sintéticas y genéticamente modificadas. En algunas formas de realización, las variantes comprenden secuencias de CDR de SEQ ID NOs 1-6 y secuencias de VH y VL que son por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8, respectivamente. En algunas formas de realización, las variantes comprenden secuencias de CDR de SEQ ID NOs 1-6 y secuencias de cadena pesada y liviana que son por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, respectivamente. En algunas formas de realización, las moléculas de anticuerpo comprenden las secuencias de CDR de SEQ ID NOs 1-6, en donde se han hecho 1, 2, 3, 4, o 5 sustituciones conservativas de aminoácidos en una o más de las secuencias de CDR. En algunas formas de realización, las moléculas de anticuerpo comprenden las secuencias de CDR de SEQ ID Nos 1-6, en donde se han hecho 1, 2, 3, 4, o 5 sustituciones no conservativas de aminoácidos en una o más de las secuencias de CDR. Estas sustituciones de aminoácido pueden estar acompañadas por un incremento o bien una disminución de la afinidad, avidez, tasa de asociación (K_{on}), o tasa de disociación (K_{off}) del anticuerpo, las que proveen propiedades beneficiosas para el anticuerpo, tales como, por ejemplo, mejor penetración tumoral, mayor acumulación en el tumor, un cambio de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), mejor eficacia, mejores perfiles de toxicidad, o una ventana terapéutica más amplia. Véase, por ejemplo, el efecto de afinidad sobre la captación y penetración de un anticuerpo en tumores sólidos que se describe en Rudnick y col. *Cáncer Res.* 71(6): 2250-2259 (2011). En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo comprende la SEQ ID NO:9 y la SEQ ID NO:10, en donde una o ambas secuencias se han modificado en el dominio constante para mejorar la estabilidad, reducir la inmunogenicidad, o proveer otras propiedades beneficiosas al anticuerpo, tales como, por ejemplo, funciones efectoras alteradas. Véase, por ejemplo, las modificaciones a las secuencias de dominio constante que se describen en Kubota y col. *Cancer Sci.* 100(9):1566-1572 (2009), US 2006/0275282, y en la Patente de los EE.UU. 9.085.625. En ciertas formas de realización, las moléculas de anticuerpo que se emplean en los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención comprenden regiones constantes humanas. Las secuencias de

los genes de región constante humana se pueden hallar en Kabat y col. *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* N.I.H. Publicación No. 91-3242 (1991). Los genes de región constante humana también están fácilmente disponibles a partir de clones conocidos. La elección del isotipo estará determinada por las funciones efectoras deseadas, tales como la fijación del complemento, o la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los isotipos pueden ser IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En formas de realización particulares, las moléculas de anticuerpo de la invención son IgG1 e IgG2. Se puede usar cualquiera de las regiones constantes de cadena liviana humana, kappa o lambda. Luego, se expresa el anticuerpo quimérico humanizado mediante métodos convencionales.

En algunas formas de realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención puede disparar la ADCC contra una célula que expresa GCC, por ejemplo, una célula tumoral. Los anticuerpos con los isotipos IgG1 e IgG3 son útiles para producir la función efectora con una capacidad citotóxica dependiente de anticuerpos, debido a su capacidad para unirse al receptor Fc. Los anticuerpos con los isotipos IgG2 e IgG4 son útiles para minimizar la respuesta de ADCC debido a su baja capacidad para unirse al receptor Fc. En formas de realización relacionadas se pueden hacer sustituciones en la región Fc o cambios en la composición de glicosilación de un anticuerpo, por ejemplo, por crecimiento en una línea celular eucariota modificada, para aumentar la capacidad de los receptores Fc para reconocer, unirse, y/o mediar la citotoxicidad de las células a las que se unen los anticuerpos anti-GCC. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. 7.317,091; 5.624,821; y las publicaciones que incluyen a WO 00/42072, Shields, y col. *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001), Lazary col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005-4010 (2006), Satoh y col. *Expert Opin. Biol. Ther.* 6:1161-1173 (2006). En ciertas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo de origen humano, anticuerpo humano) puede incluir sustituciones de aminoácido o reemplazos que alteran o ajustan la función (por ejemplo, función efectora). Por ejemplo, se puede diseñar una región constante de origen humano (por ejemplo, región constante γ1, región constante γ2) para reducir la activación del complemento y/o la unión al receptor Fc (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. 5.648.260; 5.624,821; y 5,834.597, los contenidos completos de las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia). Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de una región constante de origen humano que contiene dichas sustituciones o reemplazos de aminoácido es por lo menos aproximadamente 95% idéntica a lo largo de toda la longitud, a la secuencia de aminoácidos de la región constante de origen humano no alterada, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 99% idéntica a lo largo de toda la longitud a la secuencia de aminoácidos de la región constante de origen humano no alterada.

En aún otra forma de realización, también se pueden alterar las funciones efectoras mediante la modulación del patrón de glicosilación del anticuerpo. En el término alteración se incluye a la

eliminación de una o más unidades de carbohidrato halladas en el anticuerpo, y/o el agregado de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos con actividades de ADCC aumentadas con una estructura de carbohidratos madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en US 2003/0157108. Véase también US 2004/0093621.

Además o como alternativa, se puede elaborar un anticuerpo que tiene un tipo de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNac de mayor bisección. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados incrementan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidratos pueden llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula huésped con una maquinaria de glicosilación alterada. Las células con una maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en el arte y se pueden usar como células huéspedes en donde se modifican para que expresen los anticuerpos recombinantes de la invención para producir de esa forma un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, la EP 1.176.195 describe una línea celular con un gen *FUT8* funcionalmente alterado, que codifica para una fucosil transferasa, de forma que los anticuerpos que se expresan en dicha línea celular exhiben hipofucosilación. WO 03/035835 describe una variante de línea celular CHO, las células Lec13, con menor capacidad para unir fucosa a los hidratos de carbono conectados a Asn(297), lo que también resulta en una hipofucosilación de los anticuerpos que se expresan en esa línea celular. Véase también Shields, R. L. y col., *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 (2002). WO 99/54342 describe líneas celulares que se han modificado para que expresen glicosil transferasas modificantes de glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N acetilglucosaminil-transferasa III (GnTIII)) de forma que los anticuerpos que se expresan en las líneas celulares modificadas exhiben estructuras de GlcNac con mayor bisección que resultan en una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos. Véase también Umana y col., *Nat. Biotech.* 17:176-180 (1999).

En ciertas formas de realización, la molécula de anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, biparatópico, o bifuncional, en donde por lo menos un par de secuencias de unión comprenden las secuencias de CDR de SEQ ID NOs 1-6. En algunas formas de realización, ambos sitios de unión de un anticuerpo biespecífico o bifuncional comprenden las secuencias de CDR de SEQ ID NOs 1-6. En algunas formas de realización, el anticuerpo biespecífico o bifuncional comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs 7 y 8 o una variante de las mismas que comprende secuencias que son por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID NO:7 y/o SEQ ID NO:8.

Las moléculas de anticuerpo preferidas para usar en los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención son las moléculas de anticuerpo completamente humanas que se describen en WO

2011/050242, que se incorpora a la presente a modo de referencia por su divulgación de la molécula de anticuerpo 5F9 y las variantes de la misma así como también métodos recombinantes para elaborar dichas moléculas de anticuerpo. El mAb5F9 humano (IgG2, kappa) se puede producir mediante el hibridoma 46.5F9,8.2, depositado el 10 de enero 2007 en la American Type Culture Collection (ATCC) bajo el número de Acceso PTA-8132. Sin embargo, hay otros métodos para elaborar anticuerpos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, las moléculas de anticuerpo se pueden producir en ratones transgénicos generados por la tecnología XENOMOUSE™ que se describe en las Patentes de los EE.UU. 6.162,963; 6.150.584; 6.114.598; y 6.075.181. Se pueden hacer otros ratones transgénicos que producen anticuerpos usando una estrategia de minilocus, tal como la que se describe en las Patentes de los EE.UU. 5.545,807; 5.545,806; y 5.625,825. Otros ratones que producen anticuerpos incluyen al HUMAB-MOUSE™, al KIRIN TC MOUSE™, y el KM-MOUSE®.

Como alternativa, se pueden expresar las moléculas de anticuerpo en células en cultivo. Más específicamente, se pueden clonar secuencias que codifican para anticuerpos particulares a partir de células que producen los anticuerpos, y usarse para la transformación de una célula huésped adecuada de mamífero. En algunas formas de realización, se aíslan linfocitos de bazo y/o nódulo linfático a partir de ratones inmunizados y se plaquean en ensayos en placa como se describió previamente en Babcook y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848 (1996). Brevemente, se plaquean las células en agar con células rojas sanguíneas de oveja, se recubren con antígeno GCC, y las células que secretan mAb contra el antígeno GCC fijarán complemento y lisarán a las células rojas sanguíneas que rodean inmediatamente a las células que producen los mAb. Las células de las placas con lisis se recolectan para la secuenciación de las secuencias de inmunoglobulina y el subclonado en vectores de expresión. Subsiguientemente se criban las células transfectadas transitoriamente que contiene mAb específicos contra GCC por ELISA y por unión a células por citometría de flujo. Las secuencias variables, o una porción de las mismas de los anticuerpos humanos producidos que comprenden CDR que se unen a epitopes particulares se pueden usar para la producción de anticuerpos modificados. Por ejemplo, las regiones variables de los anticuerpos producidos pueden colocarse en un casete de expresión para facilitar la transferencia de las construcciones, incrementar la expresión de las construcciones, y/o la incorporación de las construcciones en vectores capaces de expresar los anticuerpos de longitud completa o fragmentos de los mismos como se describe, por ejemplo, en US 20060147445. También se pueden generar anticuerpos humanos usando células B activadas *in vitro* como se describe en las Patentes de los EE.UU. 5.567.601 y 5.229.275.

En algunas formas de realización, el casete de expresión comprende la región constante de cadena pesada de un isotipo IgG. Las secuencias de los genes de región constante humana se pueden hallar en Kabat y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* N.I.H. Publicación No. 91-

3242. Los genes de región constante humana están se pueden hallar fácilmente a partir de clones conocidos. La elección del isotipo estará determinada por las funciones efectoras deseadas, tales como fijación del complemento, o actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los isotipos pueden ser IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En formas de realización particulares, las moléculas de anticuerpo de la invención son IgG1 e IgG2. En formas de realización más particulares, el isotipo es IgG1. Se puede usar cualquiera de las regiones constantes de cadena liviana humana, kappa o lambda.

Las moléculas de anticuerpo que se emplean en los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención se direccionan y se unen específicamente al dominio extracelular de la GCC. Tal como se usa en la presente, "unión específica", "se une(n) específicamente" o "especificidad de unión" significan, para una molécula de anticuerpo anti-GCC, que la molécula de anticuerpo se une a GCC, por ejemplo, la proteína GCC humana, con mayor afinidad que lo que lo hace a una proteína distinta a GCC, por ejemplo, BSA. Típicamente una molécula anti-GCC tendrá una K_d para la proteína no GCC, por ejemplo, BSA, que es mayor que 2 veces, mayor que 10 veces, mayor que 100 veces, mayor que 1.000 veces, mayor que 10^4 veces, mayor que 10^5 veces, o mayor que 10^6 veces su K_d para la GCC, por ejemplo, la proteína GCC humana. La determinación de la K_d para GCC y para la proteína no GCC, por ejemplo, BSA, se debe llevar a cabo bajo las mismas condiciones.

Los cálculos de "homología" entre dos secuencias se pueden llevar a cabo como sigue. Se alinean las secuencias para propósitos de comparación optima (por ejemplo, se puede introducir brechas en una o en ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para un alineamiento óptimo, y las secuencias no homólogas pueden no tenerse en cuenta para los propósitos de comparación). La longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es de por lo menos 30%, 40%, o 50%, por lo menos 60%, o por lo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Luego se comparan los residuos de aminoácido o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que en la correspondiente posición en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se usa en la presente, “identidad” de aminoácido o de ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de brechas, y la longitud de cada brecha, que se necesitan introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias se puede llevar a cabo usando un algoritmo matemático. El porcentaje de homología entre

dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, el algoritmo que se describe en Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970), que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de programas GCG, usando una matriz Blossum 62 o bien una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de brecha de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. El porcentaje de homología entre dos secuencias nucleotídicas también se puede determinar usando el programa GAP en el paquete de programas GCG (Accelerys, Inc. San Diego, Calif.), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de brecha de brecha de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de longitud de brecha de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Un grupo ejemplificativo de parámetros para la determinación de la homología son una matriz de puntuación Blossum 62 y una penalidad por brecha de 12, una penalidad por extensión de brecha de 4, y una penalidad por brecha de desplazamiento de marco de 5.

Ha de comprenderse que los anticuerpos y fragmento de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden tener otras sustituciones de aminoácido conservativas o no esenciales, que no tienen un efecto sustancial sobre las funciones del polipéptido. Ha de comprenderse también que los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden tener otras sustituciones de aminoácido no conservativas, que no tienen un efecto sustancial sobre las funciones del polipéptido. La posibilidad de que una sustitución particular sea tolerada, es decir, que no afecte adversamente las propiedades biológicas deseadas, tales como la actividad de unión, se puede determinar como se describe en Bowie y col., *Science* 247:1306-1310 (1990) o Padlan y col., *FASEB J.* 9:133-139 (1995). Una "sustitución conservativa de aminoácido" es una en donde el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En el arte se han definido familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen a los aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Una “sustitución no conservativa de aminoácido” es una en donde el residuo de aminoácido se reemplaza por cualquier otro aminoácido.

Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar a partir de la secuencia de tipo salvaje del agente de unión, por ejemplo, el anticuerpo, sin impedir o, sin alterar sustancialmente una actividad biológica.

La molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención conduce al CDA a la célula cancerosa que expresa la GCC. Las secuencias de aminoácido y ácido nucleico ejemplificativas de moléculas de anticuerpo de la invención se establecen en la Tabla 1.

Tabla 1

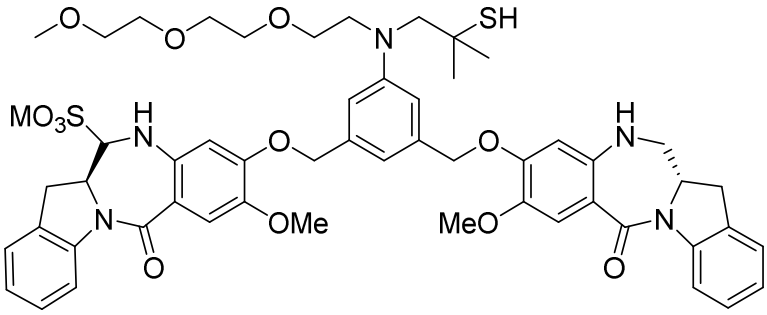
VHCDR1	SEQ ID NO:1	GYYWS
VHCDR2	SEQ ID NO:2	EINHRGNTNDNPSLKS
VHCDR3	SEQ ID NO:3	ERGYTYGNFDH
VLCDR1	SEQ ID NO:4	RASQSVSRNLA
VLCDR2	SEQ ID NO:5	GASTRAT
VLCDR3	SEQ ID NO:6	QQYKTWPRT
5F9 VH	SEQ ID NO:7	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFS**GYYWS**WIR QPPGKGLEWIG**EINHRGNTNDNPSLKS**RVTISVDTSKNQF ALKLSSVTAADTAVYYCAR**ERGYTYGNFDH**WGQGTLV TVSS
5F9 VL	SEQ ID NO:8	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC**RASQSVSRNLA**WYQQK PGQAPRLLIY**GASTRAT**GIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQS EDFAVYYC**QQYKTWPRT**FGQGTNVEIK
5F9/cadena pesada de hIgG1	SEQ ID NO:9	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AVFGGSFS**GYYWS**WIRQPPGKGLEWIG**EINHRGNTNDNPS LKS**RVTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCAR**ERGYTYG NFDH**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5F9/cadena liviana kappa humana	SEQ ID NO:10	MGWSCIILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSC **RASQSVSRNLA**WYQQKPGQAPRLLIY**GASTRAT**GIPARFSG SGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYC**QQYKTWPRT**FGQGTNVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Ácido nucleico de 5F9/cadena pesada de hIgG1	SEQ ID NO:11	GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCT TGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTGCAGC TACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGA CCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTTCAG TGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAA GGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAAA CACCAACGACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCAT ATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCT GAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTG TGCGAGAGAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCAC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT CTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT

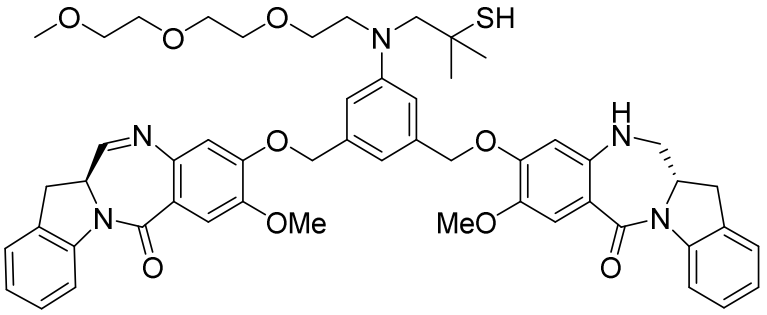
		ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAATAGGGATAACA GGGTAATACTAGAG
Ácido nucleico de 5F9/cadena liviana de hKappa	SEQ ID NO:12	GCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTT CTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGAAATAGTG ATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGG AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG CAGAAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTG GAATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA GTTCACTCTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTG CAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACG TTCGGCCAAGGGACCAACGTGGAAATCAAACGTACGGTGG CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG TTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGA GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAGTCTAGA

<u>Agentes Farmacológicos Citotóxicos (CDA)</u>

Se han descrito a los derivados de indolinobenzodiazepina que se emplean en los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención como compuestos que tienen alta potencia y/o alto índice terapéutico (proporción de dosis máxima tolerada a mínima dosis eficaz) *in vivo*. El derivado de benzodiazepina CDA-1 se describe en la Patente de los EE.UU. 8.765.740, que se incorpora a la presente a modo de referencia por su divulgación relacionada a CDA-1. La CDA-1 existe en formas sulfonada (CDA-1A) y no sulfonada (CDA-1B):



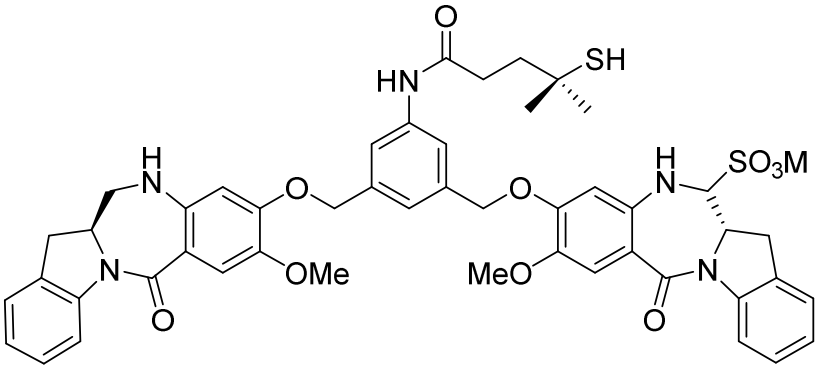
(CDA-1A)



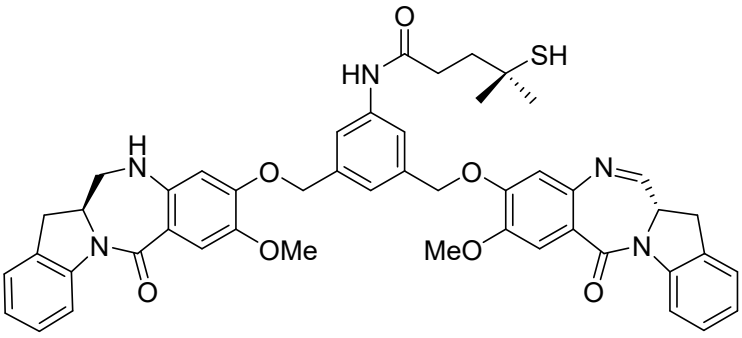
(CDA-1B)

en donde M es –H o un catión farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo Na^+ o K^+. La CDA-1A o la CDA-1B pueden estar en la forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable.

La CDA-2 se describe en PCT/US2015/048064, que se incorpora a la presente a modo de referencia por divulgación relacionada a la CDA-2. Como la CDA-1, la CDA-2 existe en formas sulfonada (CDA-2A) y no sulfonada (CDA-2B):



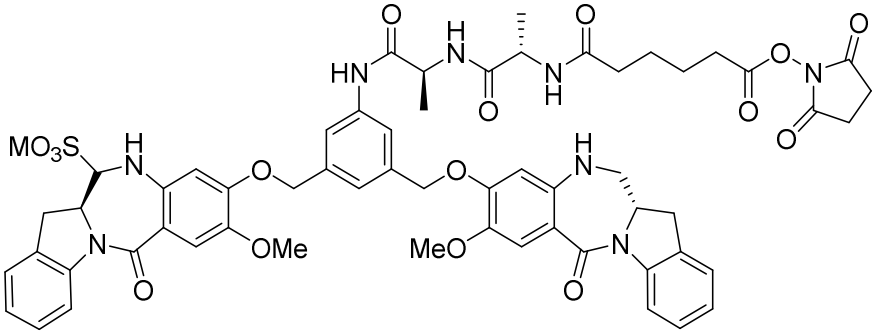
(CDA-2A)



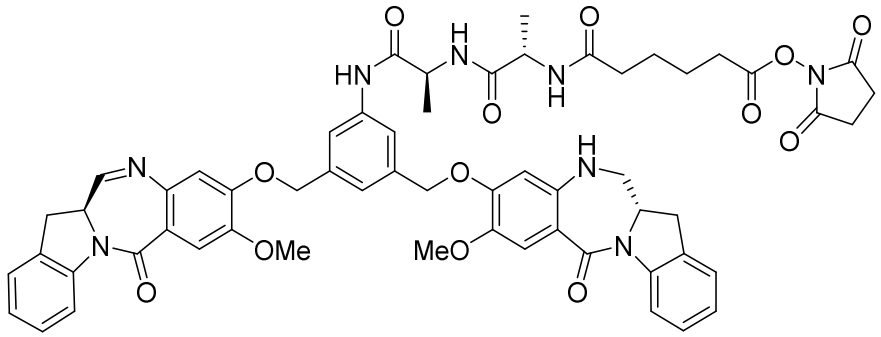
(CDA-2B)

en donde M es –H o un catión farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo Na^+ o K^+. La CDA-2A o la CDA-2B pueden estar en la forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable.

La CDA-3 se describe en PCT/US2015/048059, que se incorpora a la presente a modo de referencia por divulgación relacionada a la CDA-3. La CDA-3 existe en formas sulfonada (CDA-3A) y no sulfonada (CDA-3B):



(CDA-3A)



(CDA-3B)

en donde M es –H o un catión farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo Na^+ o K^+. La CDA-3A o la CDA-3B pueden estar en la forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en la presente, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Los ejemplos de saltes incluyen a, a título enunciativo no taxativo, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, ioduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, “mesilato”, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, pamoato (es decir, 1,1’-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)), sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio y potasio), sales de metales alcalino térreos (por ejemplo, magnesio), y sales de amonio. Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion de acetato, un ion de succinato, u otro contra ion. El contra ion puede ser cualquier porción orgánica o inorgánica que estabilice la carga sobre el compuesto parental. Más aún, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Cuando hay múltiples átomos cargados que son parte de la sal farmacéuticamente aceptable, pueden haber múltiples contra iones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contra iones.

Si el compuesto de la invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier método adecuado disponible en el arte, por ejemplo, el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y otros similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido de piranosidilo, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa hidroxi ácido, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o

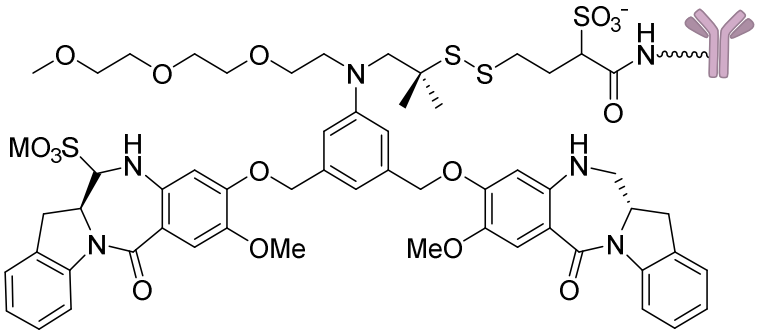
ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido *p*-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, u otros similares.

Si el compuesto de la invención es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, el tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalino térreo, u otros similares. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, a título enunciativo no taxativo a, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoniaco, aminas primarias, secundarias o terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, aluminio, y litio.

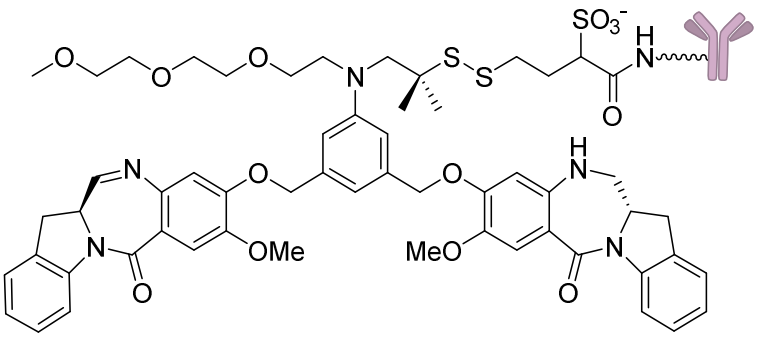
Conjugados de Anticuerpo y Fármaco

Los conjugados de anticuerpo y fármaco son moléculas complejas que combinan al anticuerpo como porción de direccionamiento al antígeno y el fármaco o carga útil como agente de muerte celular o citotóxico a ser administrado selectivamente a las células que expresan antígeno (por ejemplo, células tumorales que expresan antígeno). Las propiedades (por ejemplo, eficacia o seguridad) de este tipo de moléculas con frecuencia no se pueden predecir simplemente por la conjugación del anticuerpo que tiene afinidad a para un blanco antigénico seleccionado con un agente citotóxico. Los criterios para un conjugado de anticuerpo y fármaco exitoso incluyen propiedades de unión al antígeno blanco e internalización, actividades citotóxicas, eficacia *in vivo*, perfiles PK/PD, así como también temas de seguridad y toxicidad asociados con el uso de dichos conjugados de anticuerpo y fármaco. Como se muestra más adelante en los ejemplos de trabajo, los conjugados de anticuerpo y fármaco de esta invención exhibieron cada uno propiedades deseables.

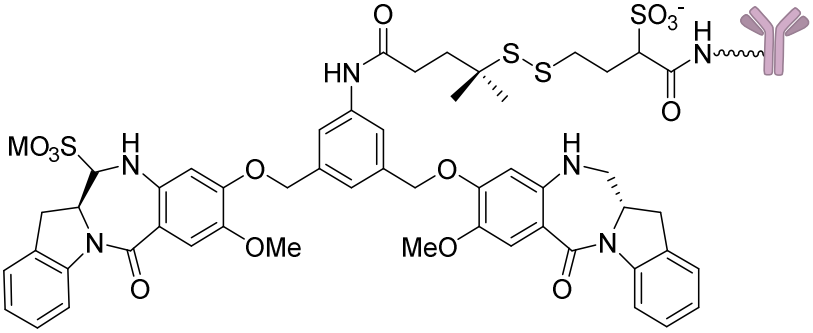
Las moléculas de anticuerpo que se emplean en los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención se pueden conjugar al agente farmacológico citotóxico (CDA-1, CDA-2, o CDA-3) mediante cualquier método adecuado, o como se divulga en el Ejemplo 5 en la presente, para producir los siguientes conjugados de anticuerpo y fármaco:



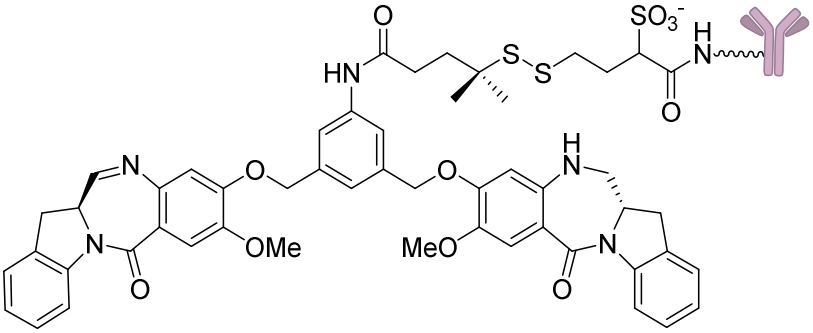
Ab-CDA-1A



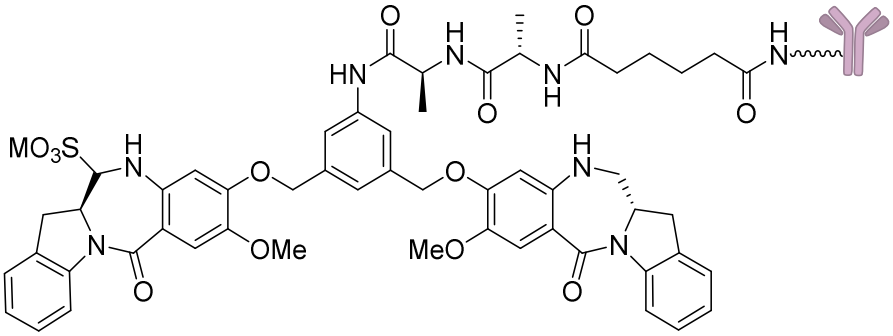
Ab-CDA-1B



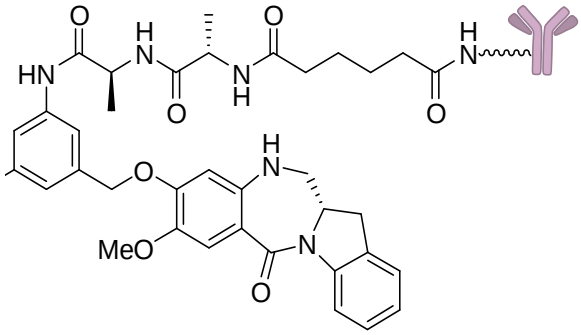
Ab-CDA-2A



Ab-CDA-2B



Ab-CDA-3A



Ab-CDA-3B

una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde M es –H o un catión farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo Na^+ o K^+ y en donde HN es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:9 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de SEQ ID NO:10. El grupo NH unido al anticuerpo se refiere al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de lisina de dicho anticuerpo.

Los términos “conjugado de anticuerpo y fármaco”, “conjugado de anticuerpo”, "inmunoconjugado”, “conjugado”, y "ADC" se usan como sinónimos y se refieren a un anticuerpo que se conjuga a una porción distinta a anticuerpo, por ejemplo, un agente farmacológico citotóxico. Los términos “conector”, “unidad conectora”, o “grupo de conexión”, como se definen en la presente, se refieren a una porción que conecta juntos a dos grupos, tal como un anticuerpo y un compuesto citotóxico. En algunas formas de realización, los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención comprenden un agente farmacológico citotóxico (CDA-1, CDA-2, o CDA-3) y un anticuerpo, en donde el agente farmacológico citotóxico está conectado en forma covalente al anticuerpo. En ciertas formas de realización, los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención comprenden un agente farmacológico citotóxico (CDA-1 o CDA-2) y un anticuerpo, en donde el agente farmacológico citotóxico está conectado en forma covalente al anticuerpo a través de un conector (por ejemplo, sulfo-SPDB). En otras formas de realización, el agente farmacológico citotóxico (CDA-3) tiene un grupo reactivo (por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida) que puede formar directamente un enlace covalente con el anticuerpo.

En el arte se conocen una variedad de conectores adecuados (por ejemplo, reactivos heterobifuncionales para conectar una molécula de anticuerpo a un agente farmacológico citotóxico). El conector puede ser escindible, por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas, por ejemplo, bajo condiciones intracelulares, de forma que la escisión del conector libera el fármaco en el entorno intracelular. En otras formas de realización, el conector no es escindible, y el fármaco se libera, por ejemplo, por degradación del anticuerpo.

El conector puede enlazarse a un grupo químicamente reactivo de la porción de anticuerpo, por ejemplo, a un grupo amino, imino, hidroxilo, tiol, o carboxilo libre (por ejemplo, al extremo N o C-terminal, al grupo épsilon amino de uno o más residuos de lisina, al grupo ácido carboxílico libre de uno o más residuos de ácido glutámico o ácido aspártico, al grupo sulfhidrilo de uno o más residuos de cisteinilo, o al grupo hidroxilo de uno o más residuos de serina o treonina). El sitio al que se une el conector puede ser un residuo natural de la secuencia de aminoácidos de la porción de anticuerpo, o el mismo se puede introducir en la porción de anticuerpo, por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, mediante la introducción de una cisteína o un sitio de escisión de proteasa en la secuencia de aminoácidos) o por bioquímica de proteínas (por ejemplo, reducción, ajuste de pH, o proteólisis).

Típicamente, el conector es sustancialmente inerte bajo condiciones en las cuales se conectan los dos grupos que el mismo está conectando. El término “agente de entrecruzamiento bifuncional”, “conector bifuncional” o “agente de entrecruzamiento” se refieren a un agente modificador que posee dos grupos reactivos en cada extremo del conector, de forma que un grupo reactivo se puede hacer reaccionar primero con el compuesto citotóxico para proveer un compuesto que porta la unidad conectora y un segundo grupo reactivo, que luego puede reaccionar con el anticuerpo. Como alternativa, se puede hacer reaccionar primero un extremo del agente de entrecruzamiento bifuncional con el anticuerpo para proveer un anticuerpo que porta una unidad conectora y un segundo grupo reactivo, que luego se puede hacer reaccionar con el compuesto citotóxico. La unidad de conexión puede contener un enlace químico que permite la liberación de la unidad citotóxica en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son bien conocidos en el arte e incluyen enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces ácidos lábiles, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles de proteasa/peptidasa, y enlaces lábiles de esterasa. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716,821; 6,913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 y 7.414.073. En algunas formas de realización, los enlaces son enlaces disulfuro, tioéter, y/o enlaces lábiles de proteasa/peptidasa. Otros conectores que se pueden usar en la presente invención incluyen conectores no escindibles, tales como los que se describen en detalle en US 20050169933, conectores cargados, o conectores hidrofílicos, tales como los que se describen en US 2009/0274713, US 2010/0129314, y WO 2009/134976, cada una de las cuales se incorpora expresamente a la presente a modo de referencia.

En algunas formas de realización, el conector es escindible mediante un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o cavéola). El conector puede ser, por ejemplo, un conector peptídico que es escindido por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, una proteasa lisosomal o endosomal. En algunas formas de realización, el conector peptídico comprende por lo menos dos, por lo menos

tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco aminoácidos de longitud. En ciertas formas de realización, el conector peptídico se selecciona de Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-tosil-Arg, Phe-N^9-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, B-Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, y Met-Ala. En algunas formas de realización, el conector peptídico se selecciona de Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, y D-Ala-D-Ala. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales se sabe que hidrolizan a los derivados farmacológicos dipeptídicos lo que resulta en la liberación del fármaco activo dentro de las células blanco (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente farmacológico citotóxico es que el agente típicamente está atenuado cuando está conjugado, y las estabilidades en suero de los conjugados son típicamente altas.

En otras formas de realización, el conector escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. En algunas formas de realización, el conector sensible al pH se puede hidrolizar bajo condiciones ácidas. Por ejemplo, puede usarse un conector lábil a ácidos que se puede hidrolizar en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida de cis-aconítico, ortoéster, acetal, cetal, u otros similares) (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville y col, 1989, *Biol. Chem.* 264: 14653-14661). Dichos conectores son relativamente estables bajo condiciones de pH neutro, tales como la de la sangre, pero son inestables a pH menor que 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas formas de realización, el conector hidrolizable es un conector de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico a través de un enlace acilhidrazona (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 5.622,929).

En otras formas de realización, el conector es escindible bajo condiciones reductoras (por ejemplo, un conector de disulfuro). Los agentes de entrecruzamiento bifuncionales que permite la unión de un anticuerpo con compuestos citotóxicos a través de enlaces disulfuro incluyen, a título enunciativo no taxativo a, N-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB). El sulfo-SPDB se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. 8.236.319, que se incorpora a la presente a modo de referencia. Como alternativa, se pueden usar agentes de entrecruzamiento que introducen grupos tiol tales como 2-iminotiolano, homocisteína tiolactona, o anhídrido S-acetilsuccínico. En otras formas de realización,

el conector puede contener una combinación de uno o más de los conectores peptídicos, sensibles a pH, o de disulfuro descritos previamente.

Los “agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales” son agentes de entrecruzamiento bifuncionales que tienen dos grupos reactivos diferentes. Los agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales que contienen tanto un grupo N-hidroxisuccinimida reactivo a amina (grupo NHS) como un grupo hidrazina reactivo a carbonilo también se pueden usar para conectar los compuestos citotóxicos con un anticuerpo. Los ejemplos de dichos agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales comercialmente disponibles incluyen a succinimidil 6-hidrazinonicotinamida acetona hidrazona (SANH), clorhidrato de succinimidil 4-hidrazidotereftalato (SHTH) y clorhidrato de succinimidil hidrazinio nicotinato (SHNH). Los conjugados que portan una conexión lábil a ácidos también se pueden preparar usando un derivado de benzodiazepina que porta hidrazina de la presente invención. Los ejemplos de agentes de entrecruzamiento bifuncionales que se pueden usar incluyen a succinimidil-p-formil benzoato (SFB) y succinimidil-p-formilfenoxiacetato (SFPA).

La presente invención provee conjugados de anticuerpo y fármaco que comprenden uno o más agentes farmacológicos citotóxicos conectados a un anticuerpo individual. La proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) representa el número de agentes farmacológicos citotóxicos conectados por molécula de anticuerpo. En diversas formas de realización, la DAR está en el rango entre 1 y 15, entre 1 y 10, entre 1 y 9, entre 1 y 8, entre 1 y 7, entre 1 y 6, entre 1 y 5, entre 1 y 4, entre 1 y 3, entre o entre 1 y 2. En algunas formas de realización, la DAR está en el rango entre 2 y 10, entre 2 y 9, entre 2 y 8, entre 2 y 7, entre 2 y 6, entre 2 y 5, entre 2 y 4 o entre 2 y 3. En otras formas de realización, la DAR es aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, o aproximadamente 6. En algunas formas de realización, la DAR varía en un rango entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4. La DAR se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectrometría de masa, espectrometría UV/Vis, ensayo de ELISA, y/o HPLC.

La presente invención incluye el método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco. En algunas formas de realización, los conjugados de la presente invención se preparan por conecta del anticuerpo con un agente de entrecruzamiento (conector) y un agente citotóxico de una forma secuencial, de forma que el anticuerpo se conecta en forma covalente a un primer conector, y luego el intermediario de anticuerpo-conector preformado reacciona con un agente citotóxico. El intermediario de anticuerpo-conector puede o no someterse a un paso de purificación antes de ponerse en contacto con un agente citotóxico. En algunas formas de realización, los conjugados de la invención se pueden preparar por contacto del anticuerpo con un compuesto agente citotóxico-conector preformado mediante la reacción del conector y el agente citotóxico. El conector-agente citotóxico preformado

puede o no someterse a un paso de purificación antes de ponerse en contacto con el anticuerpo. En otras formas de realización, el anticuerpo se pone en contacto con un conector y un agente citotóxico en una mezcla de reacción, lo que permite la formación simultanea de los enlaces covalentes entre el anticuerpo y el conector, y entre el conector y el agente citotóxico. Este método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco puede incluir una reacción, en donde el anticuerpo se pone en contacto con un agente citotóxico antes del agregado de un conector a la mezcla de reacción, y vice versa. En ciertas formas de realización, el conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención se puede preparar por contacto del anticuerpo con un agente citotóxico que tiene un conector construido tal como, por ejemplo, CDA-3.

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco incluye soluciones amortiguadoras que tienen un pH entre 3 y 9. En algunas formas de realización, la solución amortiguadora tiene un pH entre 4 y 9. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora es entre 7 y 9. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora es entre 8 y 9. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora es 8,0. En otras formas de realización, el pH de la solución amortiguadora es 8,7.

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco incluye soluciones amortiguadoras con diversas fuerzas iónicas. En algunas formas de realización, la fuerza iónica de la solución amortiguadora es entre 10 mM y 300 mM. En algunas formas de realización, la fuerza iónica de la solución amortiguadora es entre 15 mM y 200 mM. En algunas formas de realización, la fuerza iónica de la solución amortiguadora es entre 60 mM y 150 mM. En algunas formas de realización, la fuerza iónica de la solución amortiguadora es 75 mM. En otras formas de realización, la fuerza iónica de la solución amortiguadora es 130 mM.

En ciertas formas de realización, el método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco incluye soluciones amortiguadoras de diversas concentraciones. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora es entre 10 mM y 300 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora es entre 15 mM y 200 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora es entre 60 mM y 150 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora es 75 mM. En otras formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora es 130 mM.

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco utiliza cualquier solución amortiguadora conocida en el arte, o cualquier combinación de las mismas. Los ejemplos de soluciones amortiguadoras se enumeran en el sitio de internet de Sigma Aldrich en http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreactives/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html. Los ejemplos de soluciones amortiguadoras también incluyen, a título

enunciativo no taxativo, a solución amortiguadora de fosfato, solución amortiguadora de citrato, solución amortiguadora de succinato, y solución amortiguadora de acetato. En algunas formas de realización, la solución amortiguadora es HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico). En otras formas de realización, la solución amortiguadora es EPPS (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinpropanosulfónico).

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco incluye solventes orgánicos, por ejemplo, a título enunciativo no taxativo, DMA (dimetilacetamida), y DMSO (dimetilsulfóxido). En algunas formas de realización, el solvente orgánico está presente en la reacción de conjugación en la cantidad de entre 1 y 40% en volumen del volumen total de la solución amortiguadora y el solvente orgánico. En algunas formas de realización, el solvente orgánico es DMA, y está presente en la cantidad de entre 5 y 20%. En algunas formas de realización, el solvente orgánico es DMA, y está presente en la cantidad de 10%. En otras formas de realización, el solvente orgánico es DMA, y está presente en la cantidad de 13,5%. En otras formas de realización, el solvente orgánico es DMA, y está presente en la cantidad de 15%.

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco se lleva a cabo a una temperatura entre 2°C y 37°C. En algunas formas de realización, la temperatura es entre 10°C y 30°C. En algunas formas de realización, la temperatura es entre 15°C y 25°C. En algunas formas de realización, la temperatura es 25°C. En otras formas de realización, la temperatura es 22°C.

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco permite que la reacción de conjugación proceda entre 2 minutos y 2 días. En algunas formas de realización, la reacción procede entre 0,5 hora y 24 horas. En algunas formas de realización, la reacción procede entre 1 hora y 8 horas. En algunas formas de realización, la reacción procede durante 6 horas. En algunas formas de realización, la reacción procede durante 4 horas. En otras formas de realización, la reacción procede durante 1 hora.

En algunas formas de realización, el método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención además comprende el paso de agregar una solución de extinción con alta fuerza iónica después de la formación del conjugado. En una forma de realización, la solución de extinción comprende EPPS 750 mM y 150 mM de clorhidrato de histidina. En otra forma de realización, la solución de extinción comprende EPPS 750 mM. En algunas formas de realización, el pH de la solución de extinción es entre 5 y 6. En algunas formas de realización, el pH de la solución de extinción es 5,5.

En algunas formas de realización, la solución de extinción comprende EPPS y clorhidrato de histidina y subsiguientemente al agregado de la solución de extinción a la mezcla de reacción de conjugación, la mezcla resultante comprende entre 200 mM y 400 mM de EPPS y entre 40 y 60 mM de clorhidrato de histidina. En una forma de realización, la mezcla resultante comprende entre 250 mM y 350 mM de

EPPS y entre 40 y 60 mM de clorhidrato de histidina. En otra forma de realización, la mezcla resultante comprende entre 300 mM y 350 mM de EPPS y entre 45 mM y 55 mM de clorhidrato de histidina.

Los conjugados de anticuerpo y fármaco preparados de acuerdo con los métodos que se describieron previamente se pueden someter a un paso de purificación. El paso de purificación implica cualquier método bioquímico conocido en el arte para purificar proteínas, o cualquier combinación de dichos métodos. Estos incluyen, a título enunciativo no taxativo, filtración en flujo tangencial (TFF), cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cualquier cromatografía basada en carga o punto isoeléctrico, cromatografía de modo mixto, por ejemplo, CHT (hidroxiapatita cerámica), cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de exclusión molecular, diálisis, filtración, precipitación selectiva, o cualquier combinación de los mismos.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la invención presenta composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticamente aceptables, que incluyen un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención, como se describe en la presente, formulado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en la presente, "vehículo farmacéuticamente aceptable " incluye a cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y otros similares que son fisiológicamente compatibles. El vehículo puede ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, rectal, espinal o epidérmica *(*por ejemplo, por inyección o infusión). La composición farmacéutica puede incluir uno o más excipientes adicionales, por ejemplo, sales, soluciones amortiguadoras, modificadores de tonicidad, lioprotectores, detergentes no iónicos, tensioactivos, y conservantes. En algunas formas de realización, la solución amortiguadora de formulación comprende un rango de entre 5 mM y 300 mM de solución amortiguadora farmacéuticamente aceptable que incluye, a título enunciativo no taxativo, histidina, succinato, tris, o acetato en un rango de pH entre 2,5 y 9,0. En otras formas de realización, la solución amortiguadora de formulación comprende excipientes tales como L-Prolina, L-Arginina, ciclodextrinas, por ejemplo, ciclodextrina gamma, por ejemplo, Captisol® y otros similares, polietilenglicol, sacarosa, trehalosa, bisulfito de sodio, o cualquier otro excipiente que sea conocido en el arte para estabilizar proteínas o inmunoconjugados, y para minimizar la formación de especies de alto peso molecular o la desconjugación de los fármacos del ADC, ya sea durante la producción o el almacenamiento.

Las composiciones pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, soluciones líquidas, formas de dosificación semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones para inyección o infusión), dispersiones o suspensiones, liposomas y supositorios. La forma preferida depende la ruta administración deseada y de la aplicación terapéutica. Algunas composiciones típicas están en la forma de soluciones para inyección o infusión, pensadas para

administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En algunas formas de realización, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otras formas de realización, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las expresiones "administración parenteral " y "administrado por vía parenteral" tal como se usan en la presente designan a modos de administración distintos a la administración entérica o tópica, usualmente por inyección, e incluyen, a título enunciativo no taxativo, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraestemal.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica es estéril y estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, microesfera, u otra estructura ordenada adecuada para altas concentraciones de anticuerpo. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar por incorporación del compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados precedentemente, según se requiera, seguido por esterilización, por ejemplo, por filtración. En general, las dispersiones se preparan por incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes que se requieren a partir de los que se enumeraron precedentemente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación provistos son secado en vacío y secado por congelación, los que rinden un polvo del ingrediente activo más algún ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración. La fluidez apropiada de la solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables se puede lograr mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en el arte, a pesar de que para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración es la inyección o infusión intravenosa. Como lo apreciarán las personas con experiencia en el arte, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas formas de realización, el compuesto activo se puede preparar con un vehículo que protegerá al compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración

microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenvinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o en general son conocidos para las personas con experiencia en el arte. *Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,* J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En ciertas formas de realización, los conjugados de anticuerpo y fármaco descritos en la presente se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible. El compuesto (y otros ingredientes si se desea) también pueden estar dentro de una cápsula de cubierta de gelatina dura o blanda, en comprimidos, comprimidos bucales, grageas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y otros similares. Para administrar un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención por administración distinta a la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden colocar las preparaciones farmacéuticas dentro de un dispositivo, por ejemplo, un recipiente hermético a aire o a líquidos, que contiene una o más dosificaciones. Los ejemplos de dispositivos de administración incluyen, a título enunciativo no taxativo, viales, cánulas, agujas, bolsas de goteo, y tuberías. La invención también provee métodos para colocar un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención dentro de dicho dispositivo.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proveer la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo individual, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. La formulación de composiciones parenterales en una forma unitaria de dosificación para la facilidad de la administración y uniformidad de la dosificación es especialmente ventajoso. El término "forma unitaria de dosificación”, como se usa en la presente, se refiere a unidades discretas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para que produzca el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está determinada por y es directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a obtener, y (b) las limitaciones inherentes en el arte de la elaboración de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un rango ejemplificativo, no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de la invención es entre 20 µg y 20 mg/kg, o 30 µg y 10 mg/kg. Se debe hacer notar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y severidad de

la condición a aliviar. Además se debe comprender que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación descritos en la presente son ejemplificativos solamente y no tienen como intención limitar el alcance o práctica de la composición que se reivindica.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una cantidad "terapéuticamente eficaz" de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. Una cantidad "terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el género, y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción del anticuerpo para ejercer una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del conjugado de anticuerpo y fármaco es compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "dosificación terapéuticamente eficaz" preferiblemente inhibe un parámetro que puede medirse (por ejemplo, tasa de crecimiento del tumor) en sujetos tratados en por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 60%, y en algunas formas de realización por lo menos aproximadamente 80%, en relación a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir un parámetro que puede medirse, por ejemplo, cáncer, puede evaluarse, por ejemplo, en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse en ensayos *in vitro* tales como, por ejemplo, aquellos descritos en el Ejemplo 7.

También dentro del alcance de la invención hay conjuntos de componentes que comprenden un conjugado de anticuerpo y fármaco como se describe en la presente. El conjunto de componentes puede incluir uno o más elementos adicionales que incluyen: instrucciones para su uso; otros reactivos, por ejemplo, una etiqueta, un agente terapéutico adicional; dispositivos u otros materiales para la preparación del conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención para la administración; vehículos farmacéuticamente aceptables; y dispositivos u otros materiales para la administración a un sujeto. Las instrucciones para su uso pueden incluir las guías para la aplicación terapéutica que incluyen dosificaciones y/o modos de administración sugeridos, por ejemplo, en un paciente con un cáncer (por ejemplo, un cáncer de origen gastrointestinal, tal como, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer esofágico).

El conjunto de componentes además puede contener por lo menos un reactivo adicional, tal como un agente terapéutico adicional, y/o uno o más conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención adicionales, formulados como apropiados, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

Usos terapéuticos

Como se usa en la presente, "tratamiento" o "tratar" se refiere a un alivio de un cáncer o tumor, o por lo menos un síntoma discernible del mismo. En ciertas formas de realización, "tratamiento" o "tratar" se refiere a un alivio de por lo menos un parámetro físico que puede medirse, no necesariamente discernible por el paciente. En aún otra forma de realización, "tratamiento" o "tratar" se refiere a inhibir la progresión de un cáncer, físicamente, por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente, por ejemplo, estabilización de un parámetro físico, o ambos. “Tratamiento” o “tratar” como se usa en la presente se refiere a la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención a un sujeto, por ejemplo, un paciente, o administración, por ejemplo, por aplicación, a un tejido aislado o célula de un sujeto que se reincorpora al sujeto. El conjugado de anticuerpo y fármaco puede administrarse solo o combinación con un agente terapéutico adicional. El tratamiento puede ser para curar, sanar, atenuar, aliviar, alterar, remediar, atenuar, paliar, mejorar o afectar el trastorno, los síntomas del trastorno o la predisposición al trastorno, por ejemplo, un cáncer. Si bien no se desea estar ligado a la teoría, se cree que el tratamiento provoca la inhibición, ablación, o muerte de una célula *in vitro* o *in vivo*, o reduce de otra manera la capacidad de una célula, por ejemplo, una célula aberrante, para mediar un trastorno, por ejemplo, un trastorno como se describe en la presente (por ejemplo, un cáncer).

Como se usa en la presente, el término "sujeto" se pretende que incluya mamíferos, primates, humanos y animales no humanos. Por ejemplo, un sujeto puede ser un paciente (por ejemplo, un paciente humano o un paciente veterinario), que tiene un cáncer, por ejemplo, de origen gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de colon), un paciente que tiene un síntoma de un cáncer, por ejemplo, de origen gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de colon), en el cual por lo menos algunas de las células expresan GCC, o un paciente que tiene una predisposición por un cáncer, por ejemplo, de origen gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de colon), en el cual por lo menos algunas de las células expresan GCC. El término "animales no humanos" de la invención incluye todos los vertebrados no humanos, por ejemplo, mamíferos no humanos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, gallinas, anfibios, reptiles, etc., a menos que se indique de otra manera. En una forma de realización, un sujeto excluye uno o más de todos entre un ratón, rata, conejo o cabra.

Como se usa en la presente, una cantidad de un conjugado de anticuerpo y fármaco "eficaz" o "suficiente" para tratar un trastorno, o una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente suficiente" se refiere a una cantidad del conjugado de anticuerpo y fármaco que es

eficaz, cuando se administra en dosis de manera individual o múltiple a un sujeto que padece de un trastorno descrito en la presente, para tratar a una célula, por ejemplo, célula cancerígena (por ejemplo, una célula tumoral que expresa GCC), para reducir el tamaño del tumor o para inhibir el crecimiento de un tumor o cáncer en un sujeto, para prolongar la supervivencia de un sujeto, o para atenuar, aliviar o mejorar uno o más de los síntomas de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento. Tal como se usa en la presente, "inhibir el crecimiento" del tumor o cáncer se refiere a enlentecer, interrumpir, detener o frenar su crecimiento y/o metástasis y no necesariamente indica una eliminación total del crecimiento del tumor.

En un aspecto, la invención describe un método para matar, inhibir o modular el crecimiento de, o interferir con el metabolismo de, una célula que expresa GCC mediante la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. En una forma de realización, la invención provee un método para inhibir la señalización celular mediada por GCC o un método para matar una célula. El método puede usarse con cualquier célula o tejido que exprese GCC, tal como una célula cancerosa o una lesión metastásica. Los ejemplos no limitantes de cánceres que expresan GCC incluyen cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón y cáncer de recto. Los ejemplos no limitantes de células que expresan GCC incluyen células de adenocarcinoma colónico de humano T84, células de tumor de colon frescas o congeladas, y células que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica para GCC o una porción de la misma.

Los métodos de la invención incluyen los pasos de poner en contacto la célula con un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención, como se describe en la presente, en una cantidad eficaz, es decir, cantidad suficiente para matar la célula. El método puede usarse sobre células en cultivo, por ejemplo *in vitro, in vivo, ex vivo,* o *in situ.* Por ejemplo, las células que expresan GCC (por ejemplo, células recolectadas por biopsia de un tumor o lesión metastásica; células de una línea establecida de células cancerígenas; o células recombinantes), pueden cultivarse *in vitro* en medio de cultivo y el paso de poner en contacto puede realizarse por agregado del conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención al medio de cultivo. El método provocará la muerte de las células que expresan GCC, incluyendo en particular células tumorales que expresan GCC (por ejemplo, células de tumor de colon).

La porción anticuerpo de los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención se une al dominio extracelular de GCC o porciones de la misma en células que expresan el antígeno. Como resultado, cuando se ponen en práctica los métodos de la presente invención para matar, suprimir, o detectar células cancerosas, la porción anticuerpo del conjugado de anticuerpo y fármaco se une a todas dichas células, no solo a células que están fijas o células cuyos dominios antigénicos intracelulares se

exponen de otra manera al ambiente extracelular. Consecuentemente, la unión se concentra en áreas en donde hay células que expresan GCC, independientemente que estas células están fijas o no fijas, viables, o necróticas.

El método también puede aplicarse en células presentes en un sujeto, como parte de un protocolo *in vivo*. En una forma de realización, el sujeto es un humano sujeto. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa un antígeno GCC con el cual reacciona cruzado un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. Un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención también puede administrarse a un mamífero no humano que expresa el antígeno similar a GCC con el cual reacciona cruzado el anticuerpo (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) con propósitos veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Los modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayar las dosificaciones y cursos de tiempo de la administración). Para las formas de realización *in vivo*, el paso de poner en contacto se realiza en un sujeto e incluye la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención al sujeto en condiciones eficaces para permitir la unión de la molécula de anticuerpo al dominio extracelular de GCC expresada en la célula, y el tratamiento de la célula.

En una forma de realización, la invención provee un método para tratar el cáncer mediante la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención a un paciente que requiere dicho tratamiento. El método puede usarse para el tratamiento de cualquier trastorno canceroso que incluye por lo menos algunas células que expresan el antígeno GCC. Tal como se usa en la presente, el término "cáncer" se refiere a que incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células transformadas a malignas, tejidos, u órganos, independientemente del tipo histopatológico o del estadio de invasividad. El términos "cáncer" y "tumor" pueden usarse como sinónimos (por ejemplo, cuando se usa en el contexto de métodos de tratamiento, "tratamiento de un cáncer" y "tratamiento de un tumor" tienen el mismo significado).

En algunas formas de realización, el tratamiento es suficiente para reducir o inhibir el crecimiento del tumor del sujeto, reducir el número o tamaño de las lesiones metastásicas, reducir la carga del tumor, reducir la carga del tumor primario, reducir la invasividad, prolongar el tiempo de supervivencia, y/o mantener o mejorar la calidad de vida.

Los ejemplos de trastornos cancerosos incluyen, a título enunciativo no taxativo a, tumores sólidos, tumores de tejidos blandos, y lesiones metastásicas. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen malignidades, por ejemplo, sarcomas, adenocarcinomas, y carcinomas, de los diferentes sistemas de órganos, tales como aquellos que afectan el colon, vejiga, cuello uterino, esófago, cabeza y cuello, hígado, pulmón, recto, estómago y páncreas. Los carcinomas incluyen, por ejemplo, carcinoma urotelial de vejiga, carcinoma de células escamosas cervical, carcinoma de esófago, carcinoma de

células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular de hígado y carcinoma de células de pulmón. Los adenocarcinomas incluyen, por ejemplo, malignidades tales como carcinoma de pulmón a células no pequeñas, adenocarcinoma endocervical, adenocarcinoma colon, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de recto y adenocarcinoma gástrico. Las lesiones metastásicas de los cánceres mencionados precedentemente también pueden tratarse o prevenirse con el uso de los métodos y composiciones de la invención. En algunas formas de realización, el cáncer a tratar es un cáncer del sistema gastrointestinal (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer esofágico, cáncer gastroesofágico o cáncer de estómago). En algunas formas de realización, el cáncer a tratar es cáncer pancreático.

En una forma de realización, el cáncer es un cáncer colorrectal, por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal, leiomiosarcoma colorrectal, linfoma colorrectal, melanoma colorrectal, o un tumor neuroendócrino colorrectal. En una forma de realización particular, el cáncer es cáncer metastásico de colon. En otra forma de realización, el cáncer es un cáncer de estómago (por ejemplo, adenocarcinoma gástrico, linfoma, o sarcoma), o metástasis del mismo. En otra forma de realización, el cáncer es un cáncer esofágico (por ejemplo, un carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma del esófago).

El método puede ser útil para tratar un trastorno importante en cualquier estadio o subclasificación. Por ejemplo, el método puede usarse para tratar cáncer de colon en estadio temprano o tardío, o cáncer de colon de cualquiera de los estadios 0, I, IIA, lIB, IlIA, IIIB, IIIC, y IV.

En algunas formas de realización, un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención se administra en ciclos de tratamiento. Un "ciclo de tratamiento" consiste en un periodo de tratamiento, durante el cual se administra el conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención como se describió precedentemente, seguido por un periodo de descanso, durante el cual no se administra conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. El ciclo de tratamiento puede repetirse según sea necesario para alcanzar el efecto deseado.

Los conjugados de anticuerpo y fármaco descritos en la presente pueden usarse en combinación con otras terapias. Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir una composición de la presente invención coformulada con, y/o coadministrada con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más agentes anticancerígenos, por ejemplo, agentes citotóxicos o citostáticos adicionales, tratamiento con hormonas, vacunas, y/u otras inmunoterapias. En otras formas de realización, los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención se administran en combinación con otras modalidades de tratamiento terapéutico, que incluyen cirugía, radiación, criocirugía, y/o termoterapia. Dichas terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente dosificaciones menores de

los agentes terapéuticos administrados, evitando de esta manera las posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diferentes monoterapias.

Administrado "en combinación", tal como se usa en la presente, se refiere a que se administran dos (o más) tratamientos diferentes al sujeto durante el curso de la afección del sujeto con el trastorno, por ejemplo, los dos o más tratamientos se administran después que el sujeto ha sido diagnosticado con el trastorno y antes que el trastorno se haya curado o eliminado. En algunas formas de realización, la administración de un tratamiento se realiza aun cuando comienza la administración del segundo, tal que existe una superposición. Esto algunas veces es referido en la presente como administración "simultánea" o "concurrente". En otras formas de realización, la administración de un tratamiento termina antes que comience la administración del otro tratamiento. En algunas formas de realización de cualquiera de los casos, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más eficaz, por ejemplo, se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en mayor medida, que lo que se hubiese observado si el segundo tratamiento se hubiese administrado en ausencia del primer tratamiento o se observa la situación análoga con el primer tratamiento. En algunas formas de realización, la administración es tal que la reducción en un síntoma, u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor que lo que se hubiese observado con la administración de un tratamiento en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, completamente aditivo, o más que aditivo. La administración puede ser tal que aún puede observarse un efecto del primer tratamiento administrado cuando se administra el segundo.

En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención se usa en combinación con un agente quimioterapéutico. Los Ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos de daño al ADN incluyen inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo, irinotecan, topotecan, camptotecina y análogos o metabolitos de los mismos, y doxorubicina); inhibidores de topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido, tenipósido, y daunorubicina); agentes alquilantes (por ejemplo, melfalán, clorambucilo, busulfán, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, decarbazina, metotrexato, mitomicina C, y ciclofosfamida); intercaladores del ADN (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, y carboplatino); intercaladores del ADN y generadores de radicales libres tales como bleomicina; y miméticos de nucleósidos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina, e hidroxiurea).

Las terapias combinadas pueden incluir agentes quimioterapéuticos que alteran la replicación de la célula, tales como: paclitaxel, docetaxel, y análogos relacionados; vincristina, vinblastina, y análogos relacionados; talidomida, lenalidomida, y análogos relacionados (por ejemplo, CC-5013 y CC-4047); inhibidores de proteína tirosina quinasa (por ejemplo, imatinib mesilato y gefitinib); inhibidores del

proteasoma (por ejemplo, bortezomib, ixazomib, carfilzomib); inhibidores de NF-κB, que incluye inhibidores de IκB quinasa; anticuerpos que se unen a proteínas sobreexpresadas en cánceres y que por ello reducen la replicación celular (por ejemplo, trastuzumab, rituximab, cetuximab, y bevacizumab); y otros inhibidores de proteínas o enzimas que se conoce que tienen expresión aumentada, se sobreexpresan o están activadas en cánceres, cuya inhibición disminuye la replicación celular.

La selección de uno o más agentes terapéuticos o modalidad del tratamiento a combinar con un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención dependerá del trastorno a tratar. El uno o más agentes adicionales o modalidad de tratamiento puede incluir, por ejemplo, terapias aprobadas estándares para la indicación a ser tratada. Por ejemplo, cuando el conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención se usa para tratar cáncer de colon, puede usarse en combinación con, por ejemplo, cirugía; terapia con radiación; 5-fluorouracilo (5-FU), capecitibina, leucovorina, irinotecan, oxaliplatino, bevacizumab, cetuximab, panitumum, o combinaciones de los mismos (por ejemplo, oxaliplatino / capecitibina (XELOX), 5-fluorouracilo / leucovorinl-oxaliplatino (FOLFOX), 5-fluorouracilo / leucovorin / irinotecan (FOLFIRI), FOLFOX más bevacizumab, o FOLFIRI plus bevacizumab).

En otro aspecto, la invención describe el uso de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención en la elaboración de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de cáncer, por ejemplo, un cáncer gastrointestinal, por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, o cáncer de estómago. En algunas formas de realización, el cáncer es cáncer pancreático. En una forma de realización, el medicamento se usa para tratar un cáncer colorrectal, por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal, leiomiosarcoma colorrectal, linfoma colorrectal, melanoma colorrectal, o un tumor neuroendócrino colorrectal. En una forma de realización particular, el medicamento se usa para tratar cáncer metastásico de colon. En otra forma de realización, el medicamento se usa para tratar cáncer de estómago (por ejemplo, adenocarcinoma gástrico, linfoma, o sarcoma), o metástasis del mismo. En otra forma de realización, el medicamento se usa para tratar un cáncer esofágico (por ejemplo, un carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma del esófago).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos proveen formas de realización ilustrativas de la divulgación. Una persona con experiencia ordinaria en el arte reconocerá las numerosas modificaciones y variaciones que pueden realizarse sin alterar el espíritu o alcance de la divulgación. Dichas modificaciones y variaciones están abarcadas dentro del alcance de la divulgación. Los Ejemplos no limitan la divulgación en ningún sentido.

<u>Ejemplo 1</u>: Generación de una línea celular de producción de anticuerpos

Para generar un clon de línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que expresa 5F9 con una productividad mayor a 600 mg/L, se generaron vectores de expresión para 5F9 por subclonado de la región variable de la cadena liviana (SEQ ID NO:8) y de la región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO:7) en el vector de expresión pLKTOK58, conteniendo el Fc de IgG1 humano WT y el gen de resistencia a neomicina. La expresión del producto de fusión región variable-IgG1 de 5F9 está bajo el control del promotor EF-1α.

Clonado y secuenciación de las regiones variables del anticuerpo monoclonal humano 5F9 anti-GCC

Se aisló ARN total (conjunto de componentes RNeasy de Qiagen) del subclon 8.2 del hibridoma de humano 46.5F9. Este hibridoma porta la región constante Kappa "estándar" publicada de la cadena liviana (Nos. de acceso al GenBank AW383625 o BM918539) y la región constante de la cadena pesada de IgG2 "estándar" publicada (Nos. de acceso al GenBank BX640623 o AJ294731). Se sintetizó ADNc con cola de poli-G con 5' race-ready, por métodos tradicionales (*Nature Methods*, 2:629-630 (2005)). La región variable de la cadena liviana se amplificó por PCR a partir de ADNc por 5' race usando un oligo de anclaje poli-C en combinación con un cebador reverso para la región constante Kappa. La región variable de la cadena pesada se amplificó con un cebador reverso específico por la región constante de IgG2 en combinaciones múltiples con cebadores directos específicos por las secuencias líderes de la cadena pesada conocidas. Los productos de la PCR se clonaron con TOPO® (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.) y se secuenciaron con los cebadores M13F y M13R.

Construcción de los vectores de expresión de mamífero que portan el anticuerpos monoclonal humano anti-GCC 5F9

Se construyeron los vectores de expresión de mamífero que portan las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de 5F9 para generar líneas celulares CHO de producción. Para la construcción nativa, se subclonaron las regiones variables de las cadenas liviana y pesada de 5F9 en pLKTOK58D (Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 20040033561). Este vector porta dos marcadores de selección de mamífero, que incluye la resistencia a neomicina y DHFR/metotrexato (para la amplificación). El vector permite la coexpresión de ambas cadenas liviana y pesada a partir de promotores de EF-1α en tándem, cada uno localizado corriente arriba de las regiones constantes de líder-constante Kappa y líder-IgG1 del vector (Fc de tipo salvaje). Para el subclonado, se amplificaron por PCR las regiones variables de las cadenas liviana y pesada a partir de los clones TOPO de secuencia confirmada con cebadores específicos de gen que contienen sitios de restricción únicos

para el clonado direccional en las uniones de las respectivas regiones líder-Kappa y líder-IgG1 del vector. Las secuencias de los cebadores son las siguientes (las secuencias específicas de la región variable de 5F9 están con fuente en negrita):

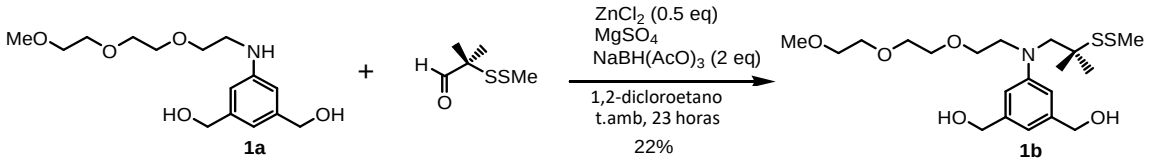
Cebadores líder-variable de la cadena liviana de 5F9 nativo:
Directo NotI
5'
*ataagaatGCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAAC AGCTACAGGTGTCCACTCC***GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTG-**3'
(SEQ ID NO:13)
Reverso BsiWI
5'- *GCCACCGTACG***TTTGATTTCCACGTTGGTCCCTTGGCCGAACGTC**-3'
(SEQ ID NO:14)
Cebadores líder-variable de la cadena pesada de 5F9 nativo:
Directo EcoRI
5' –
ccgGAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCT ACAGGTGTCCACTCC**CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGAC**-3'
(SEQ ID NO:15)
Reverso BlpI
5 '-GGAGGCTGAGC**TGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCCCCAGTGGTC**-3'
(SEQ ID NO:16)
Los clones se confirmaron por secuenciación de ADN de hebra doble de las cadenas liviana y pesada.
Se usaron dos métodos de transfección para introducir las construcciones en células CHO: el proceso MPI tradicional y el proceso Crucell. Las transfecciones de células CHO se iniciaron con la construcción de 5F9 nativo usando el proceso MPI tradicional. Se usaron ADN linealizados y no linealizados, con transfección por electroporación o Lipopfectamina 2000 CD. Se generaron aproximadamente 30 conjuntos estables mediante selección en medio sin nucleósidos G418, y metotrexato 5 nM. En base al análisis FMAT de los niveles de producción de anticuerpo, se seleccionaron tres conjuntos estables para el clonado. El conjunto con la mayor producción secretó anticuerpo a 12,2 µg/ml. Estos tres conjuntos se congelaron.
Los elementos Crucell STAR pueden evaluarse para realizar vectores de expresión de 5F9 conteniendo un elemento STAR.

Las secuencias de ácido nucleico de las cadenas pesada y liviana de 5F9 detalladas a continuación se insertaron en el vector pTOK58D.

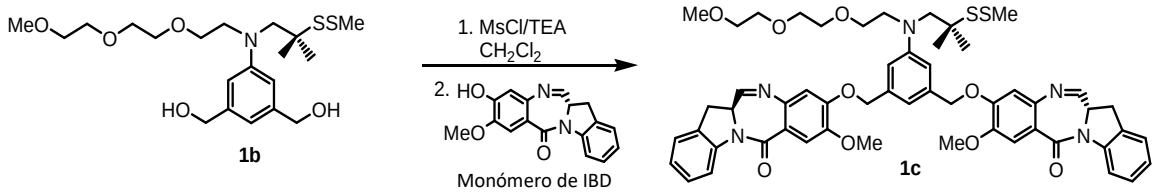
Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada de 5F9 en el vector pTOK58D:
atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactcccaggtgcagctacagcagtggggcgcaggactgttgaa
gccttcggagaccctgtccctcacctgcgctgtctttggtgggtctttcagtggttactactggagctggatccgccagcccccagggaaggggctg
gagtggattggggaaatcaatcatcgtggaaacaccaacgacaacccgtccctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacacgtccaagaa
ccagttcgccctgaagctgagttctgtgaccgccgcggacacggctgtttattactgtgcgagagaacgtggatacacctatggtaactttgaccac
tggggccagggaaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
ggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgca
caccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctg
caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccca
gcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgt
ggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgg
gaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggt
ctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccc
atcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagca
atgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaaga
gcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccggg
taaataa (SEQ ID NO:17)

Secuencia de ácido nucleico de la cadena liviana de 5F9 en el vector pTOK58D:
atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgaaatagtgatgacgcagtctccagccaccctgtctgtctc
caggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagaaacttagcctggtatcagcagaaacctggccaggctcccagg
ctcctcatctatggtgcatccaccagggccactggaatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggacagagttcactctcaccatcggcag
cctgcagtctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtataaaacctggcctcggacgttcggccaagggaccaacgtggaaatcaaacgtac
ggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccaga
gaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcac
ctacagcctcagcagcaccctgaccctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagc
t cgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEQ ID NO:18)

Ejemplo 2: Preparación de Agente Farmacológico Citotóxico CDA-1

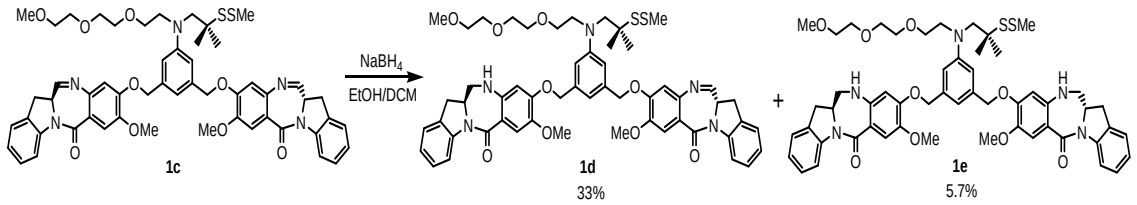


Se agregaron triacetoxiborohidruro de sodio (1,1 g, 5,18 mmol) y cloruro de zinc en polvo (353 mg, 2,59 mmol) a una solución agitada de anilina 1a (1,55 g, 5,18 mmol) y 2-(metilditio)-isobutiraldehído (0,7 mL, 5,18 mmol) en 1,2-diclorometano anhidro (20 mL), seguido por agregado de sulfato de magnesio anhidro (800 mg). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 6 horas, y luego se agregó una segunda porción de 2-(metilditio)-isobutiraldehído (0,7 mL, 5,18 mmol) y triacetoxiborohidruro de sodio (1,1 g, 5,18 mmol). Se continuó agitando a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se filtró mediante celite y se lavó con diclorometano. Se concentró el filtrado y se purificó el resto por cromatografía en gel de sílice (Combiflash, columna de 40 g, diclorometano/MeOH) para dar el compuesto **1b** (487 mg y = 22%) como aceite incoloro. También se recuperó el material inicial sin reaccionar de anilina **1a** (1,02 g) con 65% de rendimiento. ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ6,76 (s, 2H), 6,63 (s, 1H), 4,55 (s, 4H), 3,65-3,51 (m, 14H), 3,35 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,33 (s, 6H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ149,0, 142,35, 114,0, 111,1, 71,98, 70,7, 70,6, 70,5, 67,6, 65,5, 59,75, 59,1, 53,9, 51,9, 26,6, 25,7, 20,75; MS (m/z) hallada 456,2 $(M + Na)^+$.

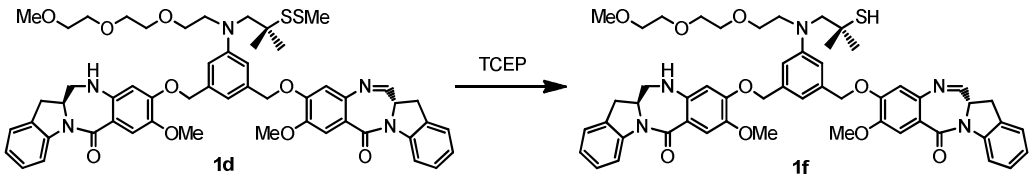


Se agregó trimetilamina (234 µL, 1,68 mmol) a una solución agitada de compuesto **1b** (243 mg, 0,56 mmol) en diclorometano anhidro (3,5 mL). Se enfrió la mezcla a -10 ºC y se agregó cloruro de metanosulfonilo (113 µL, 1,46 mmol) lentamente en 15 min a través de una jeringa. La solución se siguió agitando durante 60 min a entre -10 y -7 °C y se extinguió mediante el agregado de hielo/agua. Luego se diluyó la misma con acetato de etilo y se lavó con agua fría. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, se concentró, y se sometió a alto vacío para dar los mesilatos como aceite amarillento claro (340 mg). Se transfirieron los mesilatos a una botella de 10 mL de fondo redondo con acetato de etilo/diclorometano, se concentraron, y se sometieron a alto vacío. Se agregó monómero de IBD (412 mg, 1,4 mmol) seguido por agregado de dimetilformamida anhidra (3 mL) y carbonato de potasio anhidro (232 mg, 1,68 mmol). La mezcla amarillenta obtenida se agitó a temperatura ambiente durante una noche, luego se diluyó con diclorometano y se lavó con solución salina. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. Se disolvió el

residuo en diclorometano, se sembró en una columna de gel de sílice, y se eluyó con diclorometano/ metanol (15:1 luego 10:1). Las fracciones que contenían el compuesto **1c** se combinaron y se concentraron para dar 705 mg de producto crudo que se purificó adicionalmente por HPLC de fase reversa preparativa (columna C-18, fluida con acetonitrilo/agua) para dar el compuesto **1c** como sólido esponjoso amarillento (181 mg, y = 33%). 1H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ8,28 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,86 (d, J = 3,6 Hz, 2H), 7,59 (s, 2H), 7,31-7,26 (m, 4H), 7,12 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 6,87-6,80 (m, 5H), 5,18 (dd, J_1 = 20,8 Hz, J_2 =12,4 Hz, 4H), 4,50-4,47 (m, 2H), 3,99 (s, 6H), 3,75-3,48 (m, 18H), 3,37 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,32 (s, 6H); MS (m/z) hallada1025,9 $(M + H_2O + Na)^+$, 1043,9 $(M + 2H_2O + Na)^+$, 983,8 $(M - H)^-$, 1055,8 $(M + 4\ H_2O - H)^-$.



Se agregó borohidruro de sodio (0,9 mg, 0,023 mmol) a una solución agitada de compuesto **1c** (112 mg, 0,114 mmol) en diclorometano anhidro (0,3 mL) y etanol absoluto (0,6 mL) a 0 ºC. Se sacó el baño de hielo después de 5 min. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas y se enfrió a 0 ºC. Se extinguió la mezcla con cloruro de amonio saturado, se diluyó con diclorometano, y se separó. Se lavó la fase orgánica con solución salina, se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Na_2S0_4), se filtró mediante celite, y se concentró. Se purificó el residuo por HPLC de fase reversa (columna C-18, acetonitrilo/agua). Se extrajeron las fracciones correspondientes con diclorometano y se concentraron para obtener los productos **1d**, **1e**, y el material inicial sin reaccionar **1c**. Compuesto **1d**: 37,1 mg (y = 33%), MS (m/z): hallada 1010,4 $(M + Na)^+$, 1028,4 $(M + H_2O + Na)^+$, 1040,3 $(M + 3H_2O - H)^-$; compuesto **1e**: 6,4 mg (y = 5,7%), MS (m/z): hallada 1012,4 $(M + Na)^+$; compuesto **1c**: 44,1 mg (y = 39%).



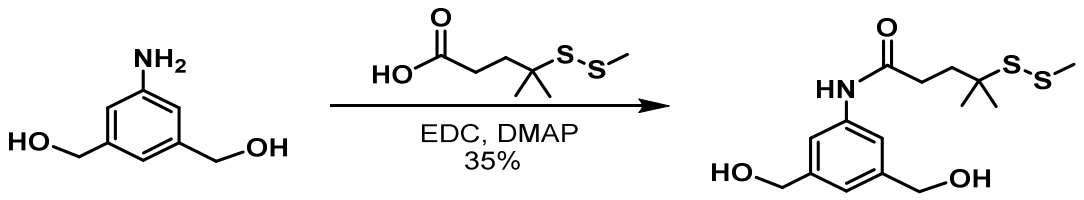
(CDA-1B)

Se agregó solución de TCEP recién preparada (17 mg de sal de HCl de TCEP neutralizada con bicarbonato de sodio saturado a pH entre 6 y 6,5, luego se diluyó con 0,5 mL de solución amortiguadora de fosfato a pH 6,5) a una solución agitada de compuesto **1d** (23,6 mg, 0,024 mmol) en acetonitrilo (3 mL) y metanol (3 mL) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a temperatura

ambiente durante 3 horas, y luego se diluyó con diclorometano y agua desionizada y se separó. Se lavó la fase orgánica con solución salina, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se filtró. Se concentró el filtrado y se sometió a alto vacío para dar 22 mg de compuesto **1f** (CDA-1B) como espuma amarillenta clara.

CDA-1A, la forma sulfonada de CDA-1B se puede preparar por tratamiento de CDA-1B con $NaHSO_3$. Véanse las condiciones de reacción ejemplificativas para convertir CDA-2B a CDA-2A en el Ejemplo 3 más adelante.

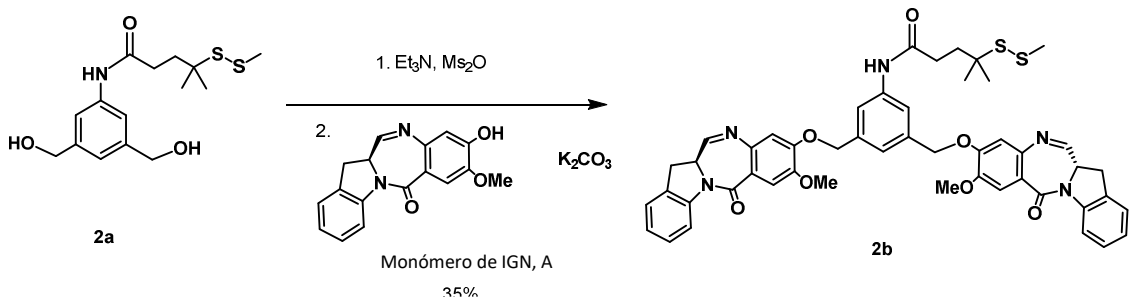
<u>Ejemplo 3</u>: Preparación de Agente Farmacológico Citotóxico CDA-2



2a

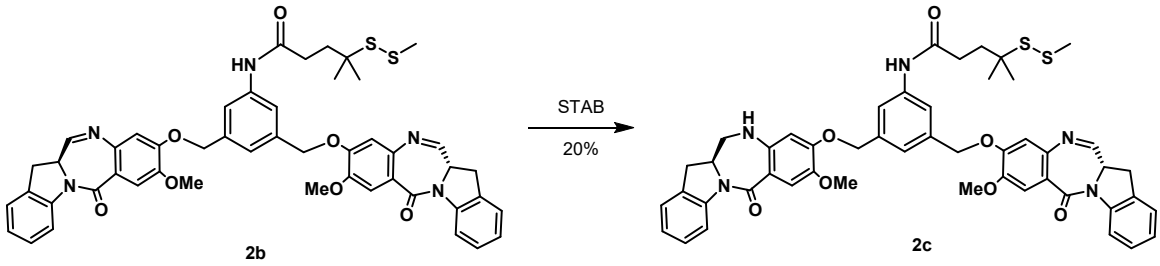
El compuesto ácido (12S,12aS)-9-((3-(4-mercapto-4-metilpentanamido)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)bencil)oxi)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-12-sulfónico (CDA-2A) se preparó como sigue:

Se agregó ácido 4-metil-4-(metildisulfanil)pentanoico (1,281 g, 6,59 mmol), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (2,53 g, 13,19 mmol), y 4-dimetilaminopiridina (0,081 g, 0,659 mmol) a una solución agitada de (5-amino-1,3-fenileno)dimetanol (1,01 g, 6,59 mmol) en dimetilformamida anhidra (16,48 mL) y tetrahidrofurano anhidro (16,48 ml). La mezcla resultante se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Se extinguió la reacción con cloruro de amonio saturado solución y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL). Se lavaron los extractos orgánicos con agua y solución salina, luego se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. La solución se filtró y concentró en vacuo y el residuo resultante se purificó por cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo/hexanos) para obtener el compuesto **2a** como un sólido blanco (0,70 g, 32% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, DMSO-*d6*: δ9,90 (s, 1H) 7,43 (s, 2H), 6,93 (s, 1H), 5,16 (t, 2H, J = 5,7 Hz), 4,44 (d, 4H, J = 5,7 Hz), 2,43 (s, 3H), 2,41-2.38 (m, 2H), 1,92-1,88 (m, 2H), 1,29 (s, 6H). MS (m/z): hallada 330,0 (M = 1)[1].



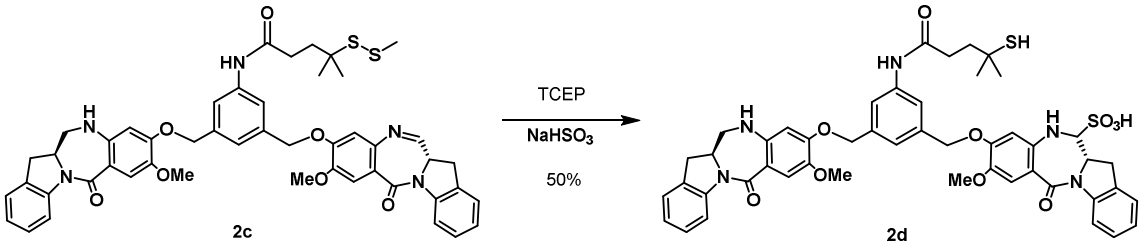
Se agregó trimetilamina (463 µl, 3,32 mmol) a solución de compuesto **2a** (219 mg, 0,665 mmol) enfriada (-10 ºC) en diclorometano anhidro (6,65 mL), seguido por agregado en forma de goteo de anhídrido metanosulfónico (298 mg, 1,662 mmol). Se agitó la mezcla a -10 ºC durante 2 horas, luego se extinguió la mezcla con hielo/agua y se extrajo con acetato de etilo frío (2 x 30 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con hielo/agua, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para obtener el dimesilato crudo.

El dimesilato crudo (227 mg, 0,467 mmol) y monómero de IGN A (303 mg, 1,028 mmol) se disolvieron en DMF anhidro (3,11 mL). Se agregó carbonato de potasio (161 mg, 1,169 mmol) y se agitó la mezcla durante 18 horas a temperatura ambiente. Se agregó agua desionizada y el precipitado resultante se filtró y lavó con agua. Se redisolvió el sólido en diclorometano y se lavó con agua. Se secó la fase orgánica con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo crudo por cromatografía en gel de sílice (metanol/diclorometano) para dar el compuesto **2b** (227 mg, 36% de rendimiento). MS (m/z): hallada 882,5 $(M + 1)^+$.



Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (37,3 mg, 0,167 mmol) a una suspensión de compuesto **2b** (227 mg, 0,167 mmol) en 1,2-dicloroetano anhidro (3,346 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora, después de lo cual se extinguió con solución saturada de cloruro de amonio. Se extrajo la mezcla con diclorometano y se lavó con solución salina. Se secó la fase orgánica con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo crudo por RP-HPLC (C-18, agua/acetonitrilo). Se extrajeron las fracciones conteniendo el producto deseado con diclorometano, se

secaron con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto **2c** (35 mg, 19% de rendimiento). MS (m/z), hallada 884,3 $(M + 1)^+$.

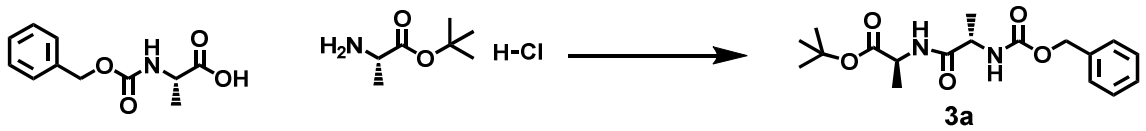


Se agregó clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (17,51 mg, 0,060 mmol), neutralizado con solución saturada de bicarbonato de sodio (0,2 mL) en solución amortiguadora de fosfato de sodio (132 µL, 0,75 M, pH 6,5), a una solución de compuesto **2c** (18 mg, 0,017 mmol) en acetonitrilo (921 µL) y metanol (658 µL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3,5 horas, luego se diluyó con diclorometano y agua desionizada. Se separó la fase orgánica, se lavó con solución salina, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para obtener el tiol crudo (CDA-2B). MS (m/z), hallada 838,3 $(M + 1)^+$.

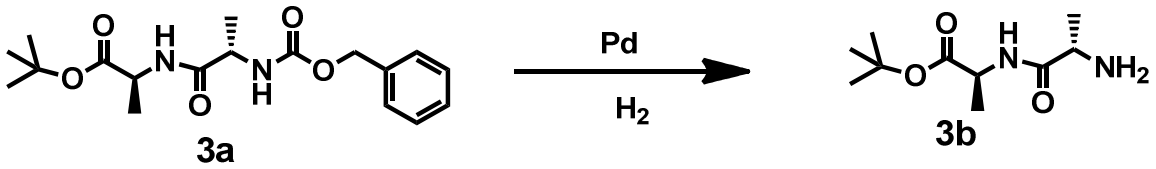
El tiol crudo (CDA-2B) (15,5 mg, 0,018 mmol) se disolvió en 2-propanol (1,23 mL). Luego se agregaron agua desionizada (617 µL) y bisulfito de sodio (5,77 mg, 0,055 mmol), y la mezcla se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. Se congeló la reacción en un baño de acetona/hielo seco, se liofilizó, y se purificó por RP-HPLC (C-18, agua desionizada/acetonitrilo). Las fracciones conteniendo el producto deseado se congelaron y liofilizaron para dar el compuesto ácido (12S,12aS)-9-((3-(4-mercapto-4-metilpentanamida)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)bencil)oxi)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-12-sulfónico (compuesto 2d o CDA-2A) (6,6 mg, 39% de rendimiento). MS (m/z), hallada 918,2 $(M - 1)^-$.

<u>Ejemplo 4</u>: Preparación del Agente Farmacológico Citotóxico CDA-3

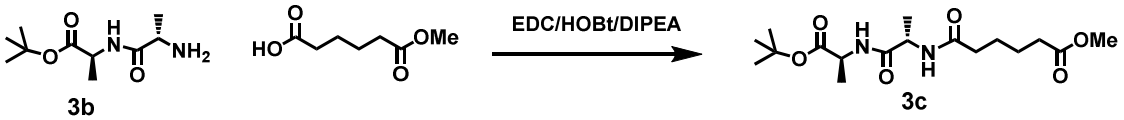
La síntesis de 2,5-dioxopirrolidin-1-il 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato (CDA-3B) se llevó a cabo como sigue:



Se disolvieron ácido (S)-2-(((benciloxi)carbonil)amino)propanoico (5 g, 22,40 mmol) y clorhidrato de (S)-tert-butil 2-aminopropanoato (4,48 g, 24,64 mmol) en DMF anhidro (44,8 mL), y se agregaron EDC·HCl (4,72 g, 24,64 mmol), HOBt (3,43 g, 22,40 mmol), y DIPEA (9,75 mL, 56,0 mmol). La reacción se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y luego se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado, agua, y solución salina. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se concentró. Se purificó el aceite crudo a través de cromatografía en gel de sílice (hexanos/acetato de etilo) para dar el compuesto **3a** (6,7 g, 85% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,38-7,31 (m, 5H), 6,53-6,42 (m, 1H), 5,42-5,33 (m, 1H), 5,14 (s, 2H), 4,48-4,41 (m, 1H), 4,32-4,20 (m, 1H), 1,49 (s, 9H), 1,42 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 1,38 (d, 3H, J = 7,2 Hz).

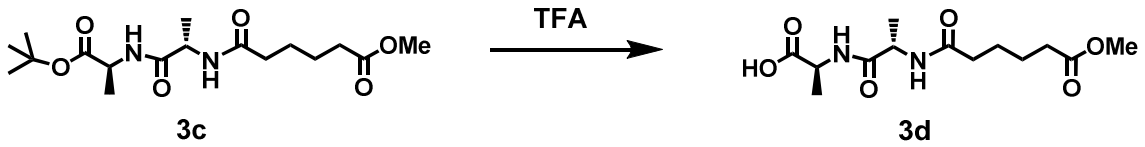


El compuesto **3a** (6,7 g, 19,12 mmol) se disolvió en metanol (60,7 mL) y agua (3,03 mL). Se purgó la solución con argón durante 5 min. Se agregó lentamente paladio sobre carbono (húmero, 10%) (1,017 g, 0,956 mmol). La reacción se agitó durante una noche bajo una atmósfera de hidrógeno. La solución se filtró mediante celite, se lavó con metanol, y se concentró. Luego se azeotropó con metanol y acetonitrilo, y el aceite resultante se colocó directamente en alto vacío para dar el compuesto **3b** (4,02 g, 97% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,78-7,63 (m, 1H), 4,49-4,42 (m, 1H), 3,55-3,50 (m, 1H), 1,73 (s, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,39 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,36 (d, 3H, J = 6,8 Hz).

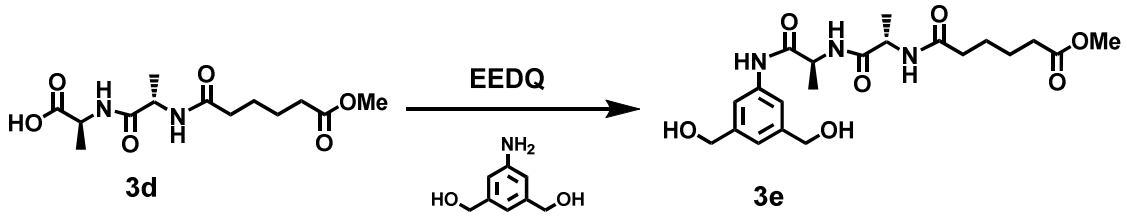


El compuesto **3b** (4,02 g, 18,59 mmol) y mono metiladipato (3,03 mL, 20,45 mmol) se disolvieron en DMF anhidro (62,0 mL). Se agregaron EDC·HCl (3,92 g, 20,45 mmol), HOBt (2,85 g, 18,59 mmol) y DIPEA (6,49 mL, 37,2 mmol). Se agitó la mezcla durante una noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano/metanol (150 mL, 5:1), y se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado, y solución salina. Se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y limpió. El

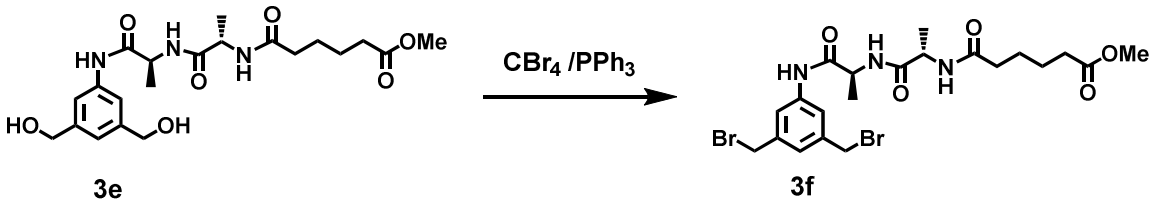
compuesto se azeotropó con acetonitrilo (5X), luego se sometió a alto vacío a 35 °C para dar el compuesto **3c** (6,66 g, 100% de rendimiento). Se usó el material crudo al siguiente paso sin purificación. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6,75 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 6,44 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 4,52-4,44 (m, 1H), 4,43-4,36 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 2,35-2,29 (m, 2H), 2,25-2,18 (m, 2H), 1,71-1,60 (m, 4H), 1,45 (s, 9H), 1,36 (t, 6H, J = 6,0 Hz).



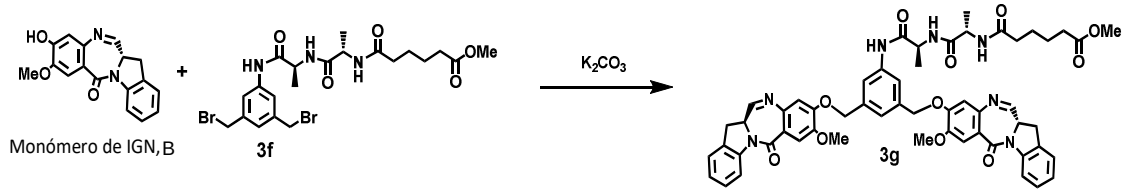
El Compuesto **3c** (5,91 g, 16,5 mmol) se agitó en TFA (28,6 mL, 372 mmol) y agua desionizada (1,5 mL) a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró con acetonitrilo y se colocó bajo alto vacío para dar el compuesto crudo **3d** como sólido pegajoso (5,88 g, 100% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,21 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 6,81 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 4,69-4,60 (m, 1H), 4,59-4,51 (m, 1H), 3,69 (s, 3H), 2,40-2,33 (m, 2H), 2,31-2,24 (m, 2H), 1,72-1,63 (m, 4H), 1,51-1,45 (m, 3H), 1,42-1,37 (m, 3H).



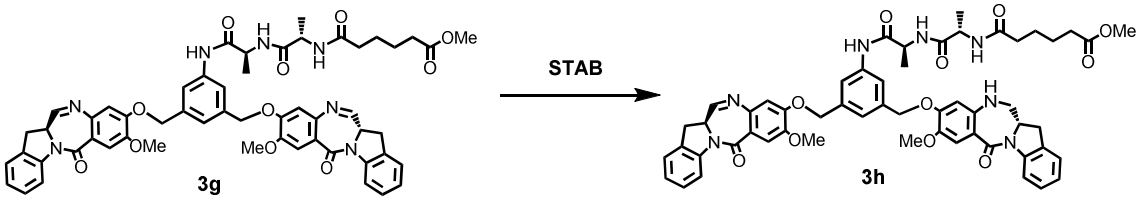
El Compuesto **3d** (5,6 g, 18,52 mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (118 mL) y metanol anhidro (58,8 mL). Luego se agregaron (5-amino-1,3-fenileno)dimetanol (2,70 g, 17,64 mmol) y EEDQ (8,72 g, 35,3 mmol), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se limpió el solvente y se agregó acetato de etilo. La lechada resultante se filtró, se lavó con acetato de etilo, y se secó bajo vacío/N_2 para dar el compuesto **3e** (2,79 g, 36% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6): δ 9,82 (s, 1H), 8,05, (d, 1H, J = 9,2 Hz), 8,01 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 7,46 (s, 2H), 6,95 (3, 1H), 5,21-5,12 (m, 2H), 4,47-4,42 (m, 4H), 4,40-4,33 (m, 1H), 4,33-4,24 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 2,33-2,26 (m, 2H), 2,16-2,09 (m, 2H), 1,54-1,46 (m, 4H), 1,30 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,22 (d, 3H, J = 4,4 Hz).



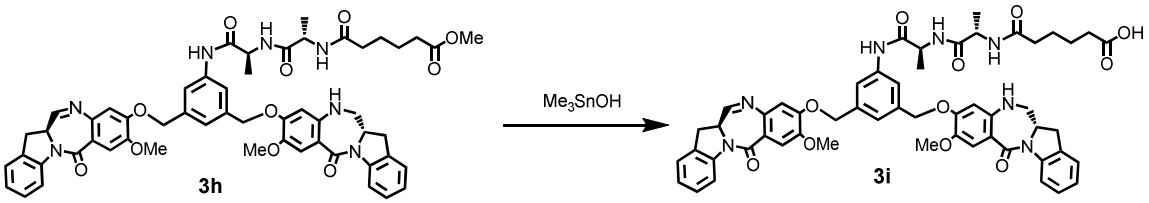
El Compuesto **3e** (0,52 g, 1,189 mmol) y tetrabromuro de carbono (1,183 g, 3,57 mmol) se disolvieron en DMF anhidro (11,89 mL). Luego se agregó trifenilfosfina (0,935 g, 3,57 mmol), y la reacción se agitó bajo argón durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (10:1) y se lavó con agua y solución salina, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El material crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para dar el compuesto **3f** (262 mg, 39% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6): δ10,01 (s, 1H), 8,11 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 8,03 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 7,67 (s, 2H), 7,21 (s, 1H), 4,70-4,64 (m, 4H), 4,40-4,32 (m, 1H), 4,31-4,23 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 2,34-2,26 (m, 2H), 2,18-2,10 (m, 2H), 1,55-1,45 (m, 4H), 1,31 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,21 (d, 3H, J = 7,2 Hz).



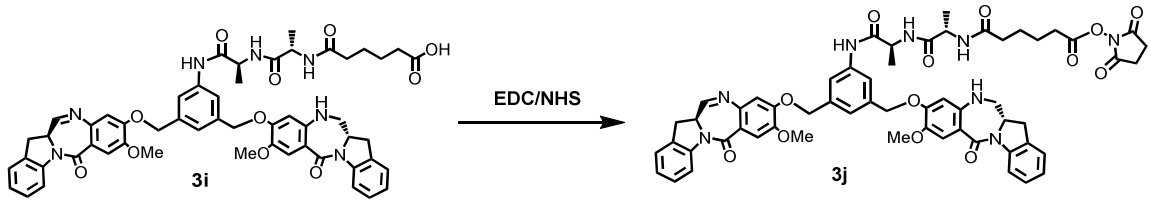
Se disolvieron el dibromuro de compuesto **3f** y monómero de IGN B en DMF. Se agregó carbonato de potasio y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se agregó agua a la mezcla de reacción para precipitar el producto. La lechada se agitó a temperatura ambiente y luego se filtró y se secó bajo vacío/N_2. El material crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice (diclorometano/ metanol) para dar el compuesto 3g (336 mg, 74% de rendimiento). LCMS = 5,91 min (método de 15 min). MS (m/z): 990,6 $(M + 1)^+$.



Se disolvió compuesto diimina **3g** en 1,2-dicloroetano. Se agregó $NaBH(OAc)_3$ (STAB) a la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se extinguió con solución saturada de NH_4Cl. Se separaron las capas y se lavaron con solución salina, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El material crudo se purificó a través de RPHPLC (columna de C-18, acetonitrilo/agua) para dar el compuesto **3h** (85,5 mg, 25% de rendimiento). LCMS =6,64 min (método de 15 min). MS (m/z): 992,6 $(M + 1)^+$.



El Compuesto **3h** se disolvió en 1,2-dicloroetano. Se agregó trimetilestananol a la mezcla de reacción y se calentó a 80 ºC durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió luego a temperatura ambiente y se diluyó con agua. Se acidificó la fase acuosa a pH ~ 4 con HCl 1 M. Se extrajo la mezcla con CH_2Cl_2/MeOH. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con solución salina, se secaron sobre Na_2SO_4, y se concentraron. Se pasó el material crudo por un tapón de sílice para dar el compuesto **3i** (48,8 mg, 80% de rendimiento). LCMS = 5,89 min (método de 15 min). MS (m/z): 978,6 $(M + 1)^+$.



Se agregó EDC·HCl a una solución agitada de compuesto ácido **3i** y N-hidroxisuccinamida en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con agua y solución salina. Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El material crudo se purificó mediante RPHPLC (columna de C-18, acetonitrilo/agua) para dar 2,5-dioxopirrolidin-1-il 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino [1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6] [1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil) fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato, compuesto **3j** o CDA-3B (8,2 mg, 30% de rendimiento). LCMS = 6,64 min (método de 15 min). MS (m/z): 1075,4 $(M + 1)^+$.

CDA-3A, la forma sulfonada de CDA-3B, se puede preparar por tratamiento de CDA-3B con $NaHSO_3$. Véanse las condiciones de reacción ejemplificativas para convertir CDA-2B a CDA-2A en el Ejemplo 3 precedentemente.

<u>Ejemplo 5</u>: Preparación de Conjugados de Anticuerpo y Fármaco

A. Preparación de hu5F9-CDA-1

i. Conjugación

Se intercambió el anticuerpo 5F9 humano en solución amortiguadora de HEPES 15 mM a pH 8,5 antes de la conjugación. Luego se hicieron los conjugados siguiendo un protocolo de reacción de 2 pasos.

En el paso 1, se tituló el conector sulfo-SPDB (véase, por ejemplo, el párrafo [042], Patente de los EE.UU. 8.236.319) con anticuerpo 5F9 (exceso molar representativo descrito en la Tabla 2) en una proporción 97/3 acuosa:orgánica de HEPES 15 mM, pH 8,5 y dimetilacetamida (DMA) a una concentración final de anticuerpo de 4 mg/mL. Esta mezcla de reacción se incubó durante 2 horas en un baño de agua a 25 °C, y luego se purificó como se describe más adelante.

En el paso 2, se agregaron 1,5 equivalentes molares de CDA-1 sobre el sulfo-SPDB a la mezcla de anticuerpo-conector en una proporción 85/15 acuosa:orgánica de HEPES 15 mM, pH 8,5 y DMA. Esta mezcla de reacción se incubó durante 4 horas en un baño de agua a 25 °C antes de su purificación en solución amortiguadora de formulación (histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, 8,5% de sacarosa, 0,01% de Tween-20, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2).

Tabla 2

Conjugado	**Exceso molar de sulfo-SPDB**	**Escala de conjugación (mg)**	**Rendimiento de conjugación**
5F9-CDA-1	7,0	50	35%

ii. Purificación

La mezcla de reacción 5F9-sulfo-SPDB se purificó usando columnas de Sephadex G-25 NAP equilibradas en fosfato de potasio 10 mM, pH 7,9. La mezcla de reacción purificada se filtró usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm antes del análisis de la proporción de conector a anticuerpo (LAR).

La mezcla de reacción de conjugación de 5F9-sulfo-SPDB-CDA-1 (5F9-CDA-1) se filtró a través de columnas de filtración en gel de Sephadex G-25 equilibradas con histidina 20 mM, cloruro de sodio 50 mM, 8,5% de sacarosa, 0,01% de Tween-20, y bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2. El conjugado purificado se filtró usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm y se almacenó durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, se filtró nuevamente el conjugado sulfonado usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm antes de su análisis.

B. Preparación de hu5F9-CDA-2

i. Conjugación

Se intercambió el anticuerpo 5F9 humano en solución amortiguadora de HEPES 15 mM a pH 8,5 antes de la conjugación. Luego se elaboraron los conjugados usando un protocolo de reacción de dos pasos. En el paso 1, se tituló el conector de sulfo-SPDB con anticuerpo 5F9 (exceso molar representativo

descrito en la Tabla 3) en una proporción 97/3 acuosa:orgánica de HEPES 15 mM a pH 8,5 y DMA a una concentración final de anticuerpo de 4 mg/mL. Esta mezcla de reacción se incubó durante 2 horas en un baño de agua a 25 °C, y luego se purificó como se describe más adelante.

En el paso 2, se agregaron 1,5 molar de CDA-2 sobre sulfo-SPDB a la mezcla de anticuerpo-conector en una proporción 85/15 acuosa:orgánica de HEPES 15 mM a pH 8,5 y DMA. Esta mezcla de reacción se incubó durante 4 horas en un baño de agua a 25 °C antes de su purificación en solución amortiguadora de formulación (histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, 8,5% de sacarosa, 0,01% de Tween-20, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2).

Tabla 3

Conjugado	**Exceso molar de sulfo-SPDB**	**Escala de conjugación (mg)**	**Rendimiento de conjugación**
5F9-CDA-2	8,0	20	23%

ii. Purificación

Se purificó la mezcla de reacción de 5F9-sulfo-SPDB usando columnas de Sephadex G-25 NAP equilibradas en fosfato de potasio 10 mM, pH 7,9. La mezcla de reacción purificada se filtró usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm antes del análisis de la LAR.

La mezcla de reacción de conjugación 5F9-sulfo-SPDB-CDA-2 (5F9-CDA-2) se filtró a través de columnas de filtración de gel Sephadex G-25 equilibradas con histidina 20 mM, cloruro de sodio 50 mM, 8,5% de sacarosa, 0,01% de Tween-20, y bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2. El conjugado purificado se filtró usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm y se almacenó durante una noche a 4 °C. Al día siguiente se filtró nuevamente el conjugado sulfonado usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm antes de su análisis.

C. Preparación de hu5F9-CDA-3

i. Conjugación y purificación: Protocolo de plataforma

El anticuerpo 5F9 de humano se intercambió con solución amortiguadora en HEPES 15 mM, pH 8,5 antes de la conjugación. Luego se prepararon los conjugados 5F9-CDA-3 usando la forma sulfonatada de CDA-3, CDA-3A. El CDA-3A inicialmente se sulfonató mediante la incubación de CDA-3B con un exceso molar de 5 veces de bisulfito y succinato de sodio 50 mM (pH 5,0) en una solución orgánica:acuosa 90/10 a temperatura ambiente durante 3 horas seguido por incubación durante la noche a 4 °C. La reacción de conjugación luego se realizó usando 2,0 mg/ml de anticuerpo 5F9 en

HEPES 15 mM, pH 8,5 y con agregado de CDA-3A en un exceso molar específico en base al anticuerpo (véase la Tabla 4 para la conjugación representativa). La reacción de conjugación tuvo una composición acuosa:orgánica 90/10 final de HEPES 15 mM, pH 8,5 y DMA, y se incubó en un baño de agua a 25 °C durante 4 horas antes de la purificación en solución amortiguadora de formulación (histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2).

La mezcla de reacción de conjugación de 5F9-CDA-3 se purificó usando columnas de Sephadex G-25 NAP equilibradas con histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, y bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2. El conjugado purificado se filtró usando un filtro de PVDF de jeringa de 0,22 µm y se dializó durante la noche contra solución amortiguadora de formulación fresca a 4 °C, seguido por diálisis a temperatura ambiente durante 4 horas usando solución amortiguadora de formulación fresca. El conjugado se volvió a filtrar usando un filtro de PVDF de jeringa de 0,22 µm antes del análisis.

Tabla 4

Conjugado	**Exceso molar de CDA-3 sulfonado**	**Escala de conjugación (mg)**	**Rendimiento de conjugación**
5F9-CDA-3	5,4	220	24%

ii. Conjugación y purificación: Protocolo optimizado I

Se exploraron diferentes parámetros que incluyen fuerza isotónica, conductividad, pH, concentración de la reacción, y equivalentes molares de CDA-3 para optimizar el rendimiento del conjugado 5F9-CDA-3 deseado. De estos resultados surgió un protocolo optimizado utilizando solución amortiguadora EPPS 75 mM, pH 8,0. Similar al protocolo de plataforma estándar, se hicieron conjugados 5F9-CDA-3 usando CDA-3A sulfonado (preparado como se describe en la sección previa). La reacción de conjugación optimizada se realizó usando 2,0 mg/ml de anticuerpo 5F9 en EPPS 75 mM, pH 8,0 y con el agregado de CDA-3A en un exceso molar específico en base al anticuerpo (véase la Tabla 5 para la conjugación representativa). La reacción de conjugación tuvo una composición acuosa:orgánica 90/10 final de EPPS 75 mM, pH 8,0 y DMA, y se incubó en un baño de agua a 25 °C durante 4 horas antes de la purificación en solución amortiguadora de formulación (histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2).

La mezcla de la reacción de conjugación de 5F9-CDA-3 se purificó usando columnas de Sephadex G-25 NAP equilibradas con histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, y bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2. El conjugado se filtró usando un filtro de PVDF de jeringa de 0,22 µm

y se dializó durante la noche contra solución amortiguadora de formulación fresca a 4 °C, seguido por diálisis a temperatura ambiente durante 4 horas usando solución amortiguadora de formulación fresca. El conjugado se volvió a filtrar usando un filtro de PVDF de jeringa de 0,22 µm antes del análisis.

Tabla 5

Conjugado	**Exceso molar de CDA-3 sulfonado**	**Escala de conjugación (mg)**	**Rendimiento de conjugación**
5F9-CDA-3	4,0	60	64%

iii Conjugación y Purificación: Protocolo optimizado II

Sulfonación optimizada

El CDA-3B se sulfonató como a continuación para generar CDA-3A. A 3,75 ml de succinato de sodio 50 mM, pH 3,3, se agregó DMA en la cantidad de 6,11 ml. Después de mezclar y equilibrar a 10 ºC en un baño de agua, se agregaron y mezclaron 1,39 ml de una solución madre de CDA-3B 21,5 mM en DMA (30,0 µmol de CDA-3). Luego de este agregado, se introdujeron 3,75 ml de una solución acuosa de bisulfito de sodio 20 mM (2,5 equivalentes, 75 µmol) a la reacción. Después de mezclar, la reacción se dejó proceder a 10 ºC durante 15,5 horas y se usó inmediatamente en el próximo paso sin purificación. El análisis por cromatografía líquida (fase reversa) de la mezcla de reacción indicó un 92,4% de conversión a CDA-3A con un 2,4% remanente de CDA-3B sin reaccionar que se muestra en la Figura 9A. La identidad del pico de CDA-3A se confirmó por LC/MS como se muestra en la Figura 9B.

Detención posterior a la conjugación

Con el objetivo de determinar una condición en donde un aumento en la fuerza iónica posterior a la conjugación produce una disminución en la formación de las especies de alto peso molecular (HMW), se llevó a cabo la siguiente optimización. El anticuerpo 5F9 (2 mg/ml) se conjugó a 3,8 equivalentes molares de CDA-3A a 22°C durante entre 80 y 90 minutos. La composición final de la reacción de conjugación comprendió EPPS 130 mM, pH 8,7 con DMA 15% en volumen. Inmediatamente al completarse la reacción de conjugación, se diluyeron las alícuotas con el volumen indicado de la solución de detención como se describe en la Tabla 6. Los cambios en el porcentaje de las especies de HMW se monitoreó durante el tiempo indicado mantenido a 22°C. En base a este hallazgo, se seleccionaron las diluciones entre 1,4 y 1,6 veces usando EPPS 750 mM, y diluciones entre 1,4 y 1,6 veces usando EPPS 750 mM /clorhidrato de histidina 150 mM. En el siguiente ejemplo de conjugación, se usó una dilución de 1,5 veces usando EPPS 750 mM/clorhidrato de histidina 150 mM. En la Tabla 6

se describen los efectos de las soluciones de detención sobre la estabilidad del conjugado 5F9-CDA-3 en crudo. El conjugado 5f9-CDA-3 en crudo se incubó con diferentes soluciones de detención durante la cantidad específica de tiempo y se determinaron los cambios en el porcentaje de especies de peso molecular por cromatografía de exclusión molecular.

Tabla 6

Experimento	Solución de detención	Veces de dilución	Reacción en crudo (ml)	Volumen de solución de detención (ml)	Tiempo luego del mezclado (min)	Δ %HMW (inicial-final)*	Precipitación visible
1	Ninguna (control para los experimentos 2-6)	NA	0,5	NA	720	2,0	No
2	6,7% de peso en volumen de sacarosa, bisulfito de sodio 50 µM	2,0	0,5	0,5	760	NA	Sí
3	13,4% de peso en volumen de sacarosa, bisulfito de sodio 50 µM	2,0	0,5	0,5	800	NA	sí

4	20% de peso en volumen de sacarosa, bisulfito de sodio 100 µM	1,5	0,5	0,25	840	NA	sí
5	histidina 50 mM, 6,7 % de peso en volumen de sacarosa, bisulfito de sodio 50 µM, pH 5,5	2,0	0,5	0,5	880	NA	sí
6	EPPS 130 mM, bisulfito de sodio 50 µM, pH 8,7	2,0	0,5	0,5	920	NA	sí
7	Ninguna (control para los experimentos 8-13)	NA	0,5	NA	850	2,4	no
8	Ácido succínico 400 mM, bisulfito de sodio 50 µM	1,2	0,5	0,075	890	4,2	No
9	Ácido succínico 60 mM, bisulfito de sodio 50 µM	2,0	0,5	0,5	930	2,3	no

10	Ácido succínico 60 mM, sacarosa 13,4%, bisulfito de sodio 50 µM	2,0	0,5	0,5	970	4,2	no
11	EPPS 300 mM, bisulfito de sodio 50 µM, pH 8,7	2,0	0,5	0,5	1010	1,0	no
12	EPPS 500 mM, bisulfito de sodio 50 µM, pH 8,7	2,0	0,5	0,5	1050	0,8	no
13	EPPS 700 mM, bisulfito de sodio 50 µM, pH 8,7	2,0	0,5	0,5	1090	0,6	no
14	Ninguna (control para los experimentos 15-20)	NA	1,0	NA	880	2,9	no
15	Clorhidrato de histidina 600 mM	1,4	1,0	0,4	600	2,8	No
16	Clorhidrato de histidina 600 mM	1,5	1,0	0,5	640	3,2	no
17	Clorhidrato de histidina 600 mM	1,6	1,0	0,6	680	3,6	no
18	Clorhidrato de histidina 600 mM, 20% de peso en volumen de sacarosa	1,4	1,0	0,4	720	2,7	no
19	Clorhidrato de histidina 600 mM, 20% de peso en volumen de sacarosa	1,5	1,0	0,5	760	2,9	no

20	clorhidrato de histidina 600 nM, 20% de peso en volumen de sacarosa	1,6	1,0	0,6	800	2,9	no
21	Ninguna (control de los experimentos 22-27)	NA	1,0	NA	840	2,2	no
22	EPPS 750 mM	1,4	1,0	0,4	600	0,4	no
23	EPPS 750 mM	1,5	1,0	0,5	640	0,5	No
24	EPPS 750 mM	1,6	1,0	0,6	680	0,4	no
25	EPPS 750 mM, clorhidrato de histidina 150 mM	1,4	1,0	0,4	720	0,5	no
26	EPPS 751 mM, clorhidrato de histidina 150 mM	1,5	1,0	0,5	760	0,5	no
27	EPPS 752 mM, clorhidrato de histidina 150 mM	1,6	1,0	0,6	800	0,5	no

* Calculado por sustracción del % de HMW del control apropiado a t=0 min del experimento %HMW al tiempo indicado en la tabla.

Conjugación y Purificación optimizados

En un reactor de vidrio con camisa de 1 L equipado con un agitador superior conteniendo 325 ml de EPPS 130 mM, pH 8,7, 68,6 ml de DMA. Luego del mezclado y equilibrado de la solución a 22 ºC, se introdujeron 100 ml de una solución 10,0 mg/ml de anticuerpo 5F9 en EPPS 130 mM, pH 8,7 al reactor y se dejó mezclar durante 15 minutos. Posteriormente se introdujeron 12,8 ml de la solución 2 mM de CDA-3A (25,5 µmol, 3,7 equivalentes de anticuerpo 5F9; preparado usando el protocolo de sulfonación optimizado descrito previamente) a la solución de reacción. Después de agitar durante 60 min a 22 ºC, se transfirieron 250 ml de una solución acuosa conteniendo clorhidrato de histidina 150 mM y EPPS 750 mM al recipiente de reacción. Después de mezclar vigorosamente, este material se filtró a través de un filtro Millipore Optiscale 47 Express SHC 0,5/0,2 µM. La mezcla de reacción en crudo luego se concentró por ultrafiltración con un casete TangenX 0,02 m^2 HyStream 30 kD Sius LSN TFF a una concentración de proteína en bruto calculada de 2,5 mg/ml. Luego del paso de concentración, la solución se diafiltró contra 4,8 L de una solución amortiguadora de histidina 50 mM, 6,7 % de peso en volumen (peso/volumen) de sacarosa, 0,1% de volumen en volumen (volumen/volumen) de polisorbato-80, bisulfito de sodio 50 µM, pH 5,5. Después de la diafiltración, la solución de retentato se filtró con un filtro Millipore Optiscale 47 Express SHC 0,5/0,2 µM. Luego del almacenamiento a entre 2 y 8 ºC durante 2 d, la solución se diluyó a 1,0 mg/ml de conjugado por agregado del volumen necesario de solución amortiguadora adicional de histidina 50 mM, sacarosa 6,7% de peso en volumen sacarosa, polisorbato-80 0,1% de volumen en volumen, bisulfito de sodio 50 µM, pH 5,5. Esta solución luego se filtró mediante un filtro Millipore Optiscale 47 Durapore 0,22 µM dando 818 ml de conjugado 1,0 mg/ml. La DAR medida del conjugado final es 2,6 por UV/vis con 97,4% de monómero y 2,5% de HMW por SEC. El rendimiento final del producto fue 82%.

D. Preparación de 5F9-PVAdG-CDA-3

Se usó el protocolo descrito en la sección previa utilizando solución amortiguadora EPPS 75 mM, pH 8,0 para preparar el conjugado 5F9-PVAdG-CDA-3. El anticuerpo 5F9-PVAdG contiene sustituciones de aminoácido que reemplazan a ELLG en la cadena pesada de IgG1 (SEQ ID NO:9), que son importantes para la unión de FcɣRIIIb, con PVA, los aminoácidos altamente conservados en IgG2 en el lugar análogo (Vidarsson y col., IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, Frontiers in Immunology, 5(520): 1-17(2014)).

La reacción de conjugación se llevó a cabo usando anticuerpo 5F9 PVAdG a 2,0 mg/ml en EPPS 75 mM, pH 8,0 con el agregado de CDA-3A sulfonado con un exceso molar específico en base al anticuerpo (véase la Tabla 6 para la conjugación representativa). La reacción de conjugación tuvo una

composición acuosa:orgánica 90/10 final de EPPS 75 mM, pH 8,0 y DMA, y se incubó en un baño de agua a 25 °C durante 4 horas antes de la purificación en solución amortiguadora de formulación (histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2).

La mezcla de reacción de conjugación de 5F9-PVAdG-CDA-3 se purificó usando columnas de Sephadex G-25 HiPrep equilibradas con histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2. El conjugado purificado se filtró usando un filtro de PVDF de jeringa de 0,22 µm antes del análisis.

Tabla 7

Conjugado	**Exceso molar de CDA-3 sulfonado**	**Escala de conjugación (mg)**	**Rendimiento de conjugación**	**Relación de CDA-3 / anticuerpo**	**Conjugado monomérico**
5F9-PVAdG-CDA-3	3,9	98	78%	2.85	99%

<u>Ejemplo 6</u>: Análisis de los conjugados de anticuerpo y fármaco

A. Determinación de la relación Conector a Anticuerpo (LAR)

La concentración del anticuerpo en 5F9-sulfo-SPDB purificado se determinó por espectroscopia en el rango ultravioleta/visible (UV/Vis) usando valores de absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción para el anticuerpo 5F9 (ε= 224.000 M^{-1}; Tabla 8). La concentración del conector sulfo-SPDB se midió asumiendo una relación 1:1 de molécula unida por tiopiridina liberada por el tratamiento con ditiotreitol (DTT) en solución amortiguadora pH 7,5, seguido por un ensayo en UV/Vis a 343 nm (ε= 8.080 M^{-1}). La relación de concentraciones molares de conector a anticuerpo se informa como el valor LAR.

B. Determinación de la relación de fármaco a anticuerpo (DAR)

La concentración de anticuerpo 5F9 y CDA en muestras de conjugado purificado se determinó por UV/Vis usando valores de absorbancia a 280 nm y 330 nm. Debido a que el anticuerpo y los CDA absorben a 280 nm, se requirió una ecuación binomial para considerar la porción de señal total atribuible a cada unidad. Los CDA solos absorben a 330 nm, por lo tanto la concentración a esa longitud de onda puede atribuirse solamente a la molécula efectora. Los valores de coeficiente de extinción de la unidad conjugada se describen en la Tabla 7.

Los componentes anticuerpo y CDA se cuantificaron usando las siguientes expresiones algebraicas, que tienen en cuenta la contribución de cada constituyente a cada longitud de onda:

$C_{CDA} = A_{330} / \varepsilon_{330\ nm\ IGN}$

$C_{Ab} = (A_{280} - (\varepsilon_{280\ nm\ IGN}/\varepsilon_{330\ nm\ IGN}) \times A_{330}) / \varepsilon_{280\ nm\ Ab}$

A_x es el valor de absorbancia a la longitud de onda X nm, mientras que C_{Ab} es la concentración molar del anticuerpo (es decir, 5F9) y C_{CDA} es la concentración molar de CDA. La relación de CDA:Ab (DAR) se calculó como la relación de las concentraciones molares anteriores. Las concentraciones en mg/ml (g/L) de 5F9 y CDA se calcularon usando los pesos moleculares que se describen en la Tabla 8.

Tabla 8

Porción	**MW de unidad conjugada* (g/mol)**	**ε_{280} ($M^{-1}cm^{-1}$)**	**ε_{330} ($M^{-1}cm^{-1}$)**
5F9 anticuerpo	144.898	224.000	n/a
CDA-1	942	30.115	15.484
CDA-2	838	30.115	15.484
CDA-3	961	30.115	15.484
CDA-3*	961	34.150	16.270

*Recalculado usando protocolo alternativo para usar en Conjugación y Purificación: Protocolo optimizado II.

C. Determinación del porcentaje de conjugado monomérico

El porcentaje de conjugado monomérico en muestras de 5F9-CDA purificado se determinó mediante análisis por HPLC usando cromatografía de exclusión molecular (SEC). Se inyectaron aproximadamente entre 10 y 100 µg de conjugado 5F9-CDA en un instrumento de HPLC con una columna SEC unida (TSK GEL G3000SWxl 5 µm, 7,8 mm x 30 cm, No. de Parte 08541; columna de protección recomendada TSK GEL, 4 cm, No. de Parte 08543, TOSOH Biosciences, King of Prussia, PA), y se corrió a 0,5 ml por minuto con una fase móvil isocrática de perclorato de sodio 400 mM, fosfato de sodio 50 mM, isopropanol 5%. Se recolectó la señal de absorbancia durante 30 minutos a longitud de ondas de 280 nm y 330 nm.

El monómero del anticuerpo 5F9 típicamente eluyó a aproximadamente 17 minutos, mientras que el monómero conjugado de 5F9-CDA con frecuencia eluyó como un doblete con picos a aproximadamente 17 y aproximadamente 19 minutos. Las especies de alto peso molecular (HMW, por

ejemplo, dímero, agregado) y las especies de bajo peso molecular (LMW, por ejemplo, fragmento) típicamente eluyeron a aproximadamente 12 y aproximadamente 24 minutos, respectivamente.

El % de anticuerpo monomérico (o conjugado) se calculó a partir del área del pico a 280 nm del pico de los 17 minutos (o el doblete 17/19), y se comparó con el área de todos los picos de proteínas combinados. La DAR para el pico del monómero también se determinó por sustitución de las áreas de pico de las señales a 280 nm y 330 nm en los espacios A_{280} y A_{330} en las ecuaciones C_{CDA} y C_{Ab} que se muestran en la sección anterior, y luego dividiendo C_{CDA}/C_{Ab}.

D. Determinación del porcentaje de CDA no conjugado

La cantidad de CDA no conjugado ("fármaco libre") presente en las muestras de 5F9-CDA purificado se determinó mediante el análisis por UPLC usando SEC en tándem y columnas en fase reversa C-18 ("columna dual"). Se conectaron dos columnas Waters Acquity UPLC Protein BEH SEC (1,7 µm, 4,6 x 30 mm, No. de Parte 186005793, Waters Corporation, Milford, MA) en serie para separar el conjugado de 5F9-CDA intacto del fármaco libre, que luego se canalizó a una columna Waters Cortecs UPLC C-18 (2,1 x 50 mm, No. de Parte 186007093) para separar y cuantificar las especies de CDA libre. El conjugado 5F9-CDA se preparó por dilución con acetonitrilo (ACN) a 20% (volumen en volumen) de ACN, se inyectó en la serie de columnas (25 µL), y se corrió de acuerdo con el gradiente que se describe en la Tabla 9:

Tabla 9

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
0,0	0,35	70	30
1,0	0,35	70	30
8,0	0,35	20	80
9,0	0,35	5	95
10,0	0,35	5	95
10,1	0,35	70	30
11,0	0,35	70	30
12,0	0,35	70	30
13,5	0,35	70	30
14,0	0,35	95	5
20,0	0,35	95	5
21,0	0,0	95	5

Tabla 9: Tasa de flujo = 0,35 ml/min; tiempo de corrida = 12,5 minutos; temperatura de columna C-18 = 30 °C; fases móviles = A: 0,1% (volumen en volumen) de TFA en agua, B: 0,1% (volumen en volumen) de TFA en ACN

La columna se desvió de la SEC en línea a C-18 a los 2,2 minutos y se regresó a SEC en línea a los 14,0 minutos. La señal se recogió a 265 nm. Usando una curva estándar derivada de CDA-1 o CDA-3, se calculó la cantidad de fármaco libre presente en la muestra a partir de los picos encontrados en la ventana entre 2,2 y 14,0 minutos, usando las siguientes fórmulas:

$ng_{libre\ CDA\text{-}1} = (AUC_{265\ nm} + 353) / 5406$

$ng_{libre\ CDA\text{-}3} = (AUC_{265\ nm} + 11805) / 4888$

% libre de CDA = $ng_{libre\ CDA} / ng_{inyectado}$

<u>Ejemplo 7</u>: caracterización de los conjugados de anticuerpo y fármaco

Líneas celulares

Las líneas celulares usadas para los ensayos funcionales fueron pares de células de células transfectadas con GCC y 293 de riñón embriónico humano (HEK) control de vector. Las células HEK293 se transfectaron con GCC de longitud completa marcado con myc bajo el control del promotor de CMV, o con un vector vacío (pN8mycSV40), y se seleccionaron en blasticidina. Los clones HEK293-GCC#2 demostraron la mayor expresión de GCC. La expresión de GCC en las células HEK293-GCC#2 se analizó adicionalmente usando ensayos de unión a célula entera con ligando radiomarcado (ST-toxina), y la cuantificación de los niveles de receptor de GCC sugirieron que las células HEK293-GCC#2 expresan más GCC que otras líneas celulares que expresan GCC (por ejemplo, células HT-29 de adenocarcinoma colorrectal humano transfectadas con GCC y células de adenocarcinoma de colon humano T84)

A. Ensayos de unión/afinidad a células

Para determinar la capacidad de cada conjugado de anticuerpo y fármaco para unirse a células que expresan GCC, se evaluaron conjugados de 5F9-CDA mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecto usando citometría de flujo. Las células HEK293-GCC#2 y las control de vector se hicieron crecer en medio de cultivo de células estándar suplementado con suero fetal bovino 10% (FBS). Las células se removieron no enzimáticamente de la superficie de la placa usando Versene (ThermoFisher Scientific, Washington, DC; No. de catálogo 15040-066), se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm en un tubo estéril conteniendo FBS, y se lavaron en 3% FBS/solución salina amortiguada con fosfato (PBS) sin Ca^{2+} o Mg^{2+}. Este paso de centrifugación-lavado se repitió una vez más antes que las células se resuspendieran a una concentración de 5 x 10^6 células/ml en 3% FBS/PBS, y se agregaron

a los pocillos experimentales de una placa de 96 pocillos con fondo en V en alícuotas de 100 µL (aproximadamente 500.000 células). La placa se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm.

Luego de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante de cada pocillo y se reemplazó por 50 µL de solución de conjugado de anticuerpo y fármaco primario. Las soluciones de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3 se prepararon cada una a una concentración final de 1 µg/ml. La placa de 96 pocillos se cubrió y se incubó a 4°C (sobre hielo) durante 1 hora antes de eliminar las soluciones de los pocillos y las células se lavaron dos veces en 100 µL de 3% FBS/PBS (sin Ca^{2+} o Mg^{2+}).

Se diluyó el anticuerpo secundario de cabra F(ab')2 anti-IgG humana, conjugado a ads-PE de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL; No. de catálogo 2043-09) 1:200, de acuerdo a la sugerencia del fabricante. Después de completar el segundo lavado, se agregaron 50 µL de la solución de anticuerpo secundario a cada pocillo experimental, y la placa de 96 pocillos cubierta se colocó a 4°C (sobre hielo) durante 1 hora. Luego se centrifugó la placa, y el sobrenadante se reemplazó por 100 µL de 3% FBS/PBS (sin Ca^{2+} o Mg^{2+}). Este paso de centrifugación-lavado se repitió durante un total de dos ciclos. Las células finalmente se reconstituyeron en 200 µL de PBS (sin Ca^{2+} o Mg^{2+}) y se cargaron en el citómetro de flujo BD FACS Canto (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Los datos se analizaron usando el programa de computación del sistema FACS II Canto y la configuración de filtros apropiada.

La conjugación de un CDA con una molécula de anticuerpo podría alterar la afinidad de dicho anticuerpo por su antígeno blanco, o alterar la unión a células del mencionado anticuerpo a su antígeno. En la **Figura 1** se demuestra que la conjugación de CDA no afecta o reduce la unión del anticuerpo 5F9 a GCC. Los valores de afinidad son comparables entre 5F9 no conjugado (**Figura 1A**), y los conjugados de 5F9-CDA de la invención (Figuras **1B-1D**). En la Tabla 9 se demuestra que la conjugación de CDA a 5F9 en los conjugados de 5F9-CDA no afecta o reduce la unión de la molécula de anticuerpo a GCC.

Tabla 10

Anticuerpo o conjugados de anticuerpo y fármaco	**Afinidad (ng/ml)**
5F9	35
5F9-CDA-1	28
5F9-CDA-2	31
5F9-CDA-3	28

B. Ensayos de citotoxicidad/potencia

Para medir cada capacidad del conjugado 5F9-CDA para matar células que expresan GCC, se realizaron ensayos de citotoxicidad. En este ensayo, las células HEK293-GCC#2 que expresan GCC y las células control del vector se sembraron a una densidad de 2 x 10^3 por pocillo en una placa de 96 pocillos bien profundos por triplicado. Inmediatamente se agregaron diluciones en serie de los 5F9-CDA a los pocillos sembrados, y la placa se incubó a 37 °C durante 96 horas. Luego de la incubación, se evaluó la viabilidad celular usando el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI), de acuerdo a lo recomendado por el fabricante. Se normalizó la viabilidad a las células control no tratadas, y se calculó el error como el error estándar de la media (SEM).

La potencia relativa de los conjugados de 5F9-CDA en células HEK293-GCC#2 se muestra en la Figura **2**. 5F9-CDA-2 (**Figura 2B**) y 5F9-CDA-3 (**Figura 2C**) son conjugados de anticuerpo y fármaco más potentes que 5F9-CDA-1 (**Figura 2A**). Véase la Tabla 11. Estos ensayos también demuestran que los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención hacen blanco específicamente y matan las células que expresan GCC, y tienen citotoxicidad significativamente reducida en células que no expresan el antígeno GCC.

Tabla 11

Anticuerpo o Conjugados de anticuerpo y fármaco	**IC_{50} (pM)**
5F9-CDA-1	49,7
5F9-CDA-2	7,47
5F9-CDA-3	3,07

C. Ensayos de internalización

Se evaluó la internalización de la molécula de anticuerpo anti-GCC en células HEK293-GCC#2 que expresan GCC y en células control del vector usando microscopía de inmunofluorescencia. Las células se hicieron crecer sobre cubreobjetos y se colocaron sobre hielo durante 10 minutos antes de la incubación con el anticuerpo 5F9 (10 µg/ml) en medio de cultivo frío durante 20 minutos sobre hielo. El medio que contiene anticuerpo luego se reemplazó por medio de cultivo fresco, y las células se incubaron a 37 °C durante entre 2 y 3 horas o se mantuvieron a 4 °C (sobre hielo). Después de un lavado en PBS y una fijación breve en paraformaldehído 4% a temperatura ambiente, las células se permeabilizaron durante 15 minutos en TRITON X-100 5%. La localización del anticuerpo 5F9 se determinó con un anticuerpo anti-IgG marcado de manera fluorescente usando microscopía confocal de barrido láser. El anticuerpo 5F9 se localizó en la superficie celular de las células que expresan GCC

al estar sobre hielo, mientras que las células incubadas a 37 °C mostraron una tinción moteada dentro de la membrana celular, indicativo de internalización. No se detectó internalización en las células control de vector.

<u>Ejemplo 8</u>: Evaluación i*n vivo*

A. Eficacia de ADC en modelos de tumor

Se evaluó la eficacia in vivo de los conjugados de 5F9-CDA en modelos de xenoinjerto de ratón.

Para todos los estudios de eficacia, se inocularon de manera subcutánea ratones CB-17 SCID hembra (entre 6 y 7 semanas de edad) en el flanco con 5 x 10^6 células HEK293-GCC#2, o se inocularon ratones atímicos entre 6 y 7 semana de edad con fragmentos de tumor de 2 mm x 3 mm de tumores primarios humanos (PHTX) de pacientes (a), (b), y (c), en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) sin FBS 10% trasplantados serialmente en el flanco. Los animales se randomizaron a grupos de tratamiento cuando el volumen del tumor promedio alcanzó aproximadamente los 200 mm^3. Los grupos de tratamiento (*n* = 5 por grupo) incluyeron un grupo control dosificado con el vehículo apropiado, un grupo control dosificado con chKTI-CDA, o los grupos experimentales dosificados con los conjugados de 5F9-CDA de la invención.

El anticuerpo KTI quimérico (chKTI) es un anticuerpo quimérico murino/humano derivado del hibridoma HB-9515 de ATCC, descrito en la Patente de los EE.UU. 4.959.310; Brandon y col., *J. Food Sci.* 53:97-101 (1988); Brandon y col., *J. Agric. Food Chem.* 36:1336-1341 (1988); Brandon y col., *J. Agric. Food Chem*. 39:327-335 (1991); y Brandon y col., *Crop Sci*. 32:1502-1505 (1992). El anticuerpo chKTI se une al inhibidor de tripsina de soja Kunitz (KTI). El anticuerpo chKTI no está dirigido contra GCC, y se usó como un control del conjugado Ab-CDA.

Los ratones se administraron con una inyección intravenosa individual de solución que contiene diferentes dosis de conjugado 5F9-CDA o tratamiento control una vez por semana durante tres semanas (es decir, un régimen fraccionado de dosificación a los Días 0, 7, y 14), o una dosis aguda individual del mismo (es decir, dosificación solo en el día 0). El crecimiento del tumor se monitoreó una vez por semana durante 11 semanas usando un calibre vernier. El volumen promedio del tumor se calculó usando la fórmula ($V = [W^2 \times L]/2$). Se determinó la eficacia antitumoral de los agentes experimentales por comparación del volumen promedio del tumor de la rama del control con vehículo respecto a cada agente experimental.

En ratones que portaban los tumores HEK293-GCC, los conjugados de 5F9-CDA lograron una actividad antitumoral duradera (Figura **3**). Específicamente, no se produjo el recrecimiento hasta entre 5 y 6 semanas luego del tratamiento con 5F9-CDA-1 y 5F9-CDA-2 (**Figuras 3A** y **3B**). La actividad antitumoral fue más pronunciada en los estudios con 5F9-CDA-3, en donde el recrecimiento

típicamente no ser observó hasta entre 8 y 9 semanas posteriores al tratamiento (**Figura 3C**). Notar que el grupo tratado con 5F9-CDA-1 se dosificó a 60 µg/kg mientras que los grupos tratados con 5F9-CDA-2 y 5F9-CDA-3 se dosificaron a 10 µg/kg, haciendo a la actividad antitumoral observada con 5F9-CDA-3 incluso más importante.

En los modelos colorrectales de xenoinjerto de tumor primario humano (PHTX), el tratamiento con 5F9-CDA-1 (entre 60 y 180 µg/kg) retrasó el inicio del recrecimiento hasta 5 semanas en PHTX(a) (**Figura 4A** y **4D**), y PHTX(b) (**Figura 5A**), el cual es un modelo que es refractario a tratamiento con MLN0264 (5F9-vcMMAE, véase la US 8.785.600) (**Figura 4A** y **4D)**. La inhibición del crecimiento se observó incluso durante periodos más largos de tiempo en tumores PHTX(a), PHTX(b), y PHTX(c) tratados con 5F9-CDA-2 (**Figuras 4B**, **4E, 5B**, y **6A**) o 5F9-CDA-3 (**Figuras 4C**, **4F, 5C**, y **6B**) a dosis menores (entre 20 y 60 µg/kg). De manera similar a las observaciones en los ratones que portaban tumores HEK293-GCC, la administración intravenosa de 5F9-CDA-3 produjo el mayor retraso del recrecimiento del tumor, variando en un rango de al menos entre 8 y 14 semanas posteriores al tratamiento.

Los valores de tumor/control (T/C) se muestran en la Tabla 12 para los estudios de eficacia *in vivo* realizados en cada modelo de tumor primario. T/C es una medida que informa el tamaño del tumor para una dada rama de tratamiento (T) en relación a la rama control (C). Una actividad antitumoral fuerte en general se define como un T/C ≤ 0,40. Para cada estudio, se calculó el T/C en el último día que se midió la rama control. El 5F9-CDA-1 alcanzó un valor T/C ≤ 0,40 a dosis mayores (90 y 120 µg/kg), mientras que 5F9-CDA-2 y 5F9-CDA-3 alcanzaron valores de T/C ≤ 0,40 a dosis menores (entre 20 y 45 µg/kg) en cada uno de los modelos.

Tabla 12

	HEK293-GCC Día 14	PHTX(a) Día 37	PHTX(b) Día 47	PHTX(c) Día 43
5F9-CDA-1 120 µg/kg QW3			0,40	
5F9-CDA-1 180 µg/kg individual		0,34		
5F9-CDA-1 60 µg/kg QW3	0,03	0,32		
5F9-CDA-2 10 µg/kg QW3	0,04	0,22		
5F9-CDA-2 30 µg/kg QW3			0,15	

5F9-CDA-2 30 µg/kg individual		0,16		
5F9-CDA-2 60 µg/kg individual				0,15
5F9-CDA-3 10 µg/kg QW3	0,03	0,12		
5F9-CDA-3 20 µg/kg QW3			0,09	
5F9-CDA-3 30 µg/kg individual		0,14		
5F9-CDA-3 60 µg/kg individual				0,11

B. Estudios de farmacocinética/farmacodinámica

Se realizaron estudios para determinar la farmacocinética (PK) de los conjugados de 5F9-CDA en ratones que portaban tumores HEK293-GCC. Los estudios PK siguieron el mismo protocolo de inoculación subcutánea que los estudios de eficacia descritos precedentemente. Cuando el volumen promedio del tumor alcanzó aproximadamente los 500 mm^3, se randomizaron los animales a los grupos de tratamiento.

Se administraron los ratones con una dosis intravenosa individual de los conjugados de 5F9-CDA o vehículo a 30 µg/kg. Se sacrificaron tres animales a cada punto de tiempo definido (1, 24, 48, 96, 168, 336, y 504 horas) posterior a la inyección, y se recolectaron muestras de tumor y sangre entera. Las muestras de sangre se transfirieron a tubos separadores de suero (BD Biosciences; No. de catálogo 365956). Los tejidos tumorales se fijaron en formalina y se embebieron en parafina para el análisis de los cambios de biomarcadores farmacodinámicos, como se describió precedentemente.

C. Evaluación PK del anticuerpo total y ADC total en plasma

Se realizó la evaluación de la cantidad de anticuerpo total y conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) total en las muestras de sangre murina luego del tratamiento con 5F9-CDA usando un inmunoensayo tipo sandwich. Se recubrió una placa de 96 pocillos con proteína que comprenden el dominio extracelular de GCC, fusionada a una región Fc de ratón. Esta porción del antígeno GCC tiene la capacidad de capturar el conjugado 5F9-CDA presente en las muestras. Se usó un anticuerpo de burro rutenilado anti-Fc-γ humano para detectar el 5F9-CDA capturado para el ensayo de anticuerpo total, mientras que se usó un anticuerpo anti-CDA rutenilado para medir el ADC total. En presencia de solución amortiguadora de lectura que contenía tripropilamina, la marca de rutenio produce una señal

quimioluminiscente que es disparada por voltaje. La quimioluminiscencia se midió en un instrumento MESO QuickPlex SQ 120 (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD).

Los niveles de anticuerpo total y ADC total fueron apreciablemente diferentes entre sí luego del tratamiento con 5F9-CDA-1, particularmente en los puntos de tiempo de 168 y 336 horas (**Figura 7A**). Esta diferencia sugiere algún grado de inestabilidad del ADC en circulación. Por el contrario, los niveles de anticuerpo total y ADC total fueron comparables para todos los puntos de tiempo para 5F9-CDA-2 y 5F9-CDA-3 (**Figuras 7B** y **7C**), indicando que estos conjugados eran estable *in vivo*.

En la Tabla 13 a continuación se informan los parámetros PK calculados usando análisis no compartimental. Notablemente, el 5F9-CDA-3 demostró una depuración más lenta (CL) que 5F9-CDA-1 o 5F9-CDA-2. Esta diferencia dio como resultado una exposición mayor del conjugado 5F9-CDA-3 en el tiempo, tal como lo reflejan los valores del área bajo la curva (AUC).

Tabla 13

Analito	Tratamiento	$t_{1/2}$	C_0	AUC_{final}	AUC_{INF}	CL	Vss
		(hr)	(µg/ml)	(hr*µg/ml)	(hr*µg/ml)	(ml/hr/kg)	(ml/kg)
Ab total	5F9-CDA-1	101,0	52,3	1,740	1,880	0,9	93,9
ADC total		30,6	45,7	1,510	1,540	1,1	43,0
Ab total	5F9-CDA-2	150,3	33,2	2,300	2,526	0,81	149,46
ADC total		64,4	34,37	1,650	1,890	1,08	87,35
Ab total	5F9-CDA-3	262,5	36,98	2,744	3,551	0,55	175,8
ADC total		190,2	38,32	3,261	3,763	0,52	116,22

D. Actividad de biomarcador PD luego de la administración individual de ADC 5F9

Se detectaron los biomarcadores farmacodinámicos (PD) por tinción inmunohistoquímica de secciones embebidas en parafina de tumores HEK293-GCC#2. La secciones se montaron sobre portaobjetos de vidrio, se incubaron con una solución en base a EDTA (pH 9,0) para la recuperación de epitope durante 20 minutos a 100 °C, y se bloquearon en bloqueo con proteínas libre de suero (Dako, Carpinteria, CA; No. de catálogo X0909) para prevenir la unión no específica de anticuerpo. Luego se prepararon las soluciones de anticuerpo primario con anticuerpos que reconocen fosfo-CHK1 (1:200; AbCam, Cambridge, MA; No. de catálogo MIL2.091411.fzh) y fosfo-γ-H2AX (1:1500; Cell Signaling Technologies, Beverly, MA; No. de catálogo 9178), y se incubaron con las secciones en una cámara

humidificada durante hora. La quinasa punto de control 1 (CHK1) es una proteína quinasa específica de serina/treonina cuya activación es indicativa de la detención del ciclo celular y determinadas formas de estrés genotóxico, mientras que γ-H2AX es un miembro de la familia de histonas que se vuelve fosforilado durante el reclutamiento y localización de las proteínas de reparación de ADN. Se usó el reactivo de detección polímero DAB (3,3'-diaminobenzidina) para la detección y visualización de las tinciones, y se usaron algoritmos de análisis de imágenes habituales para determinar la cantidad de tinción en relación a la tinción de fondo. Los resultados se informaron como el porcentaje de células positivas para el antígeno/células viables totales en secciones de tejido.

En la Figura 8 se muestra que una administración individual de cada conjugado 5F9-CDA dio como resultado un aumento marcado en fosfo-CHK1 (**Figura 8A**) y fosfo-γ-H2AX (**Figura 8B**), y que este aumento fue más pronunciado luego del tratamiento con 5F9-CDA-2 y 5F9-CDA-3. Por lo tanto, los biomarcadores de respuesta de daño al ADN pueden usarse para detectar la actividad de los conjugados de 5F9-CDA *in vivo*.

En resumen, 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3 han sido todos ensayados *in vitro* e *in vivo* para el impacto en el crecimiento celular/tumoral en modelos positivos para GCC. En conjunto, los datos generados con cada uno de estos ADC sugieren que 5F9-CDA-3 posee mayor actividad dependiente de GCC en un amplio rango de modelos. Mientras que el margen de actividad para 5F9-CDA-2 y 5F9-CDA-3 fue comparable *in vitro*, los ADC comienzan a separarse cuando se ensayan *in vivo*. La tolerabilidad de cada ADC luego de una administración individual o dosificación repetida es comparable en modelos de cáncer murinos preclínicos, aún la actividad antitumoral es más pronunciada en comparación al correspondiente ADC control de isotipo. Más aún, la actividad antitumoral de 5F9-CDA-3 es consistentemente más duradera que la observada para 5F9-CDA-2. Esto se ilustra en las Figuras 3 a 6 usando dosificación fraccionada y/o siguiendo una administración individual. Los datos PK que se muestran en la Figura 8 se calcularon usando análisis no compartimental. Notablemente, el 5F9-CDA-3 demostró una depuración más lenta (CL) que 5F9-CDA-1 o 5F9-CDA-2. Esta diferencia dio como resultado una exposición mayor del conjugado 5F9-CDA-3 en el tiempo, tal como lo reflejan los valores del área bajo la curva (AUC). Consistente con esta observación, los autores también han observado una activación más robusta de los biomarcadores PD pCHK-1 y pg-H2AX luego de una administración individual de 5F9-CDA-3.

CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y FÁRMACO DIRIGIDOS CONTRA GCC

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense Nro. 62/292,087, presentada el 5 de febrero de 2016, cuyo contenido se incorpora en la presente en su totalidad.

Esta invención se relaciona con conjugados de anticuerpo y fármaco capaces de administrar compuestos citotóxicos a cánceres que expresan el receptor de superficie celular transmembrana guanilil ciclasa C (GCC).

La GCC funciona en el mantenimiento del fluido intestinal, la homeostasis de electrolitos, y la proliferación celular. Arshad y Visweswariah, *FEBS Letters* 586:2835-2840 (2012). En los mamíferos adultos normales, la GCC funcional es expresada por las células de la mucosa que recubren el intestino delgado, el intestino grueso y el recto. Estas células están sometidas a ciclos homeostáticos de proliferación, migración, diferenciación y apoptosis, y un desbalance entre la proliferación y la apoptosis puede conducir a la formación de tumores dentro del tracto gastrointestinal. Arshad y Visweswariah (2012).

La GCC es una proteína de superficie con una expresión anatómicamente compartimentalizada que permite un direccionamiento selectivo a tumores que expresan antígenos. La expresión de GCC se mantiene ante la transformación neoplásica de las células epiteliales del intestino, con expresión en todos los tumores colorrectales primarios y metastásicos. Carrithers y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(25):14827-14832 (1996). Los agentes direccionados contra GCC no son capaces de penetrar la pared intestinal y alcanzar el sitio en donde normalmente se halla la GCC, pero sí alcanzan las células cancerosas que continúan expresando la GCC en la superficie celular.

Se ha descrito a la enterotoxina estable al calor de *E. coli*, un ligando de la GCC, como potencial vehículo de direccionamiento para la administración de agentes proteicos terapéuticos anticancerosos a las células de cáncer colorrectal. Buc y col., *Eur. J. Cáncer* 41(11):1618-1627 (2005). Además, previamente se ha demostrado que conjugados de anticuerpo y fármaco anti-GCC tienen actividad contra la GCC en cáncer pancreático. Veiby, Resumen PR12/B19 presentado en la International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Octubre 19-23, 2013, Boston. Sin embargo, no todos los conjugados de anticuerpo y fármaco cumplirán con el perfil biológico necesario para ser usados en la clínica.

No es posible predecir de antemano, simplemente en base a un perfil de anticuerpo, o un perfil de carga farmacológica, qué conjugados de anticuerpo y fármaco serán suficientemente seguros y eficaces para las aplicaciones clínicas. Por ejemplo, una carga farmacológica particular puede funcionar perfectamente bien cuando se conjuga a un anticuerpo dirigido contra un blanco, pero la

misma puede no funcionar tan bien cuando se conjuga a un anticuerpo dirigido contra un blanco diferente, o incluso a un anticuerpo diferente dirigido contra el mismo blanco. No se comprende suficientemente porqué los diferentes conjugados de anticuerpo y fármaco muestran diferentes actividades anti-tumorales *in vivo* como para permitir predicciones precisas en el diseño de nuevos conjugados de anticuerpo y fármaco. Se especula que puede haber muchos factores que interactúan en forma impredecible. Estos factores pueden incluir, por ejemplo, la afinidad de unión de un conjugado de anticuerpo y fármaco a un antígeno blanco, la capacidad del conjugado para penetrar tumores sólidos, así como también la vida media en circulación para una exposición apropiada a los tumores sin causar toxicidad.

La complejidad e impredictibilidad están bien demostradas por la afinidad del anticuerpo solo. Los anticuerpos o conjugados de anticuerpo y fármaco con alta afinidad trabajan con una mejor captación celular, lo que conduce a un mayor nivel de cargas citotóxicas liberadas dentro de las células. También se sabe que una mayor afinidad aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Todos estos atributos favorecen la propiedad de muerte celular de los conjugados de anticuerpo y fármaco. Sin embargo, también se sabe que la alta afinidad de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo y fármaco puede impedir una suficiente penetración del tumor a través de un “efecto de barrera antigénica”, lo que sugiere que con el objetivo de conseguir una fuerte actividad antitumoral *in vivo*, la afinidad del conjugado de anticuerpo y fármaco tiene que ser justo la correcta: no demasiado alta o no demasiado baja. Hasta la fecha, no se sabe cómo predecir cuál será el nivel de afinidad más eficiente o eficaz para un conjugado de anticuerpo y fármaco.

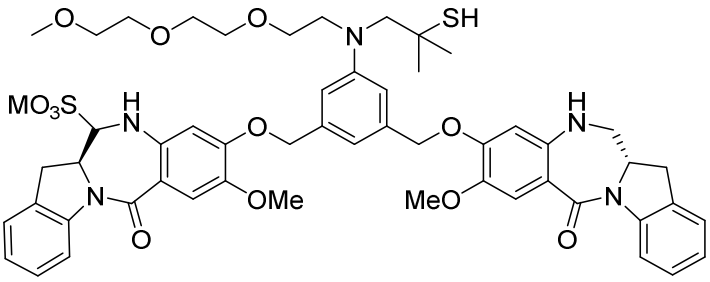
Además, la actividad antitumoral *in vivo* no se puede predecir solamente mediante el mecanismo de conectores y cargas útiles. Por ejemplo, O. Ab y col, *Mol. Cáncer Ther*. 14(&):1605-1613 (2015) demostraron que, cuando se prueba en modelos de cáncer preclínicos, el mismo conjugado de anticuerpo con la misma toxina anti-tubulina a través de diferentes conectores exhibió una actividad antitumoral muy diferente. Este ejemplo es particularmente sorprendente debido a que las estructuras químicas de los dos conectores son muy similares. Más aún, el conector presente en el conjugado superior contenía una unidad hidrofílica. Los metabolitos hidrofílicos en general son menos permeable a la membrana, y se cree que son más lentos en el eflujo desde los lisosomas (el sitio de degradación de los conjugados), lo que conduce a un retraso de la actividad antitubulina de la carga útil liberada. Este hallazgo está en contra de una cinética “ideal” de administración de carga útil, pero hasta la fecha, no se sabe cómo está constituida dicha cinética. Además de esta complejidad, está la pregunta abierta de si la cinética ideal de administración de la carga útil, incluso si se la define para un tipo celular particular, se podría aplicar a todos los tipos celulares. Por lo tanto, no es posible predecir la

actividad antitumoral *in vivo* más eficaz solamente a partir de la composición química del conector o de la carga útil.

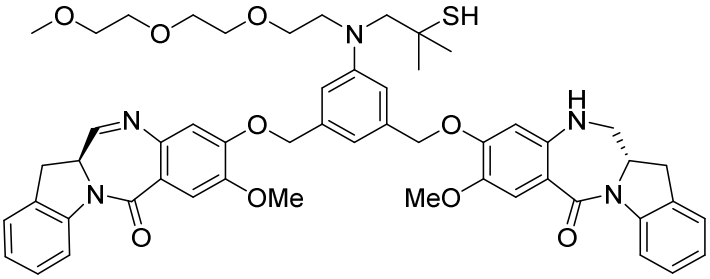
Otra cosa que apoya la impredictibilidad de la actividad de los conjugados de anticuerpo y fármaco *in vivo* son dos conjugados de anticuerpo y fármaco (ambos contra tumores líquidos), que comparten el mismo conector-carga útil (SPDB-DM4) conjugado a diferentes anticuerpos. Se halló que el primero, un conjugado de anti-CD33-SPDB-DM4, es ineficaz *in vivo*. S. Lapusan y col., *Invest. New Drugs* 30:1121-1131 (2012). Por el contrario, se ha demostrado que un conjugado de anti-CD19-SPDB-DM4 es eficaz contra linfoma en ensayos clínicos. V. Ribrag, y col., *Clin. Cáncer Res.* 20(1):213-220 (2014).

Como consecuencia, no es sorprendente que, hasta la fecha, no se han aprobado productos farmacológicos que contengan un anticuerpo anti-GCC para el tratamiento de cáncer, dejando solo a un conjugado de anticuerpo y fármaco que puede administrar selectivamente agentes citotóxicos a células de cáncer que expresan el antígeno GCC. Por lo tanto, existe una necesidad no resuelta por conjugados de anticuerpo y fármaco para tratar cánceres que expresan GCC.

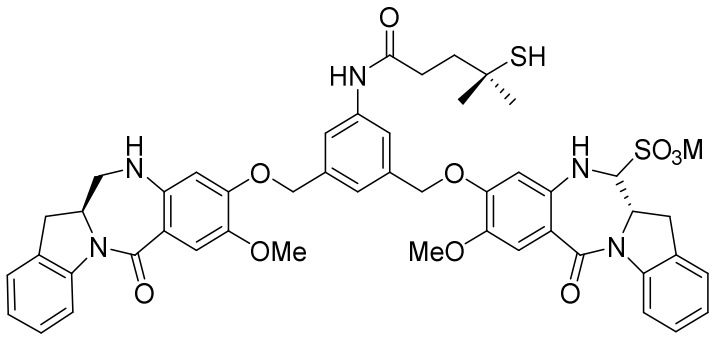
La invención provee, en parte, conjugados de anticuerpo y fármaco que comprenden una molécula de anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementaridad (CDR) de SEQ ID NO:1 (VHCDR1), SEQ ID NO:2 (VHCDR2), y SEQ ID NO:3 (VHCDR3) y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO:4 (VLCDR1), SEQ ID NO:5 (VLCDR2), y SEQ ID NO:6 (VLCDR3), conjugadas a un agente farmacológico citotóxico (CDA) que se elige de



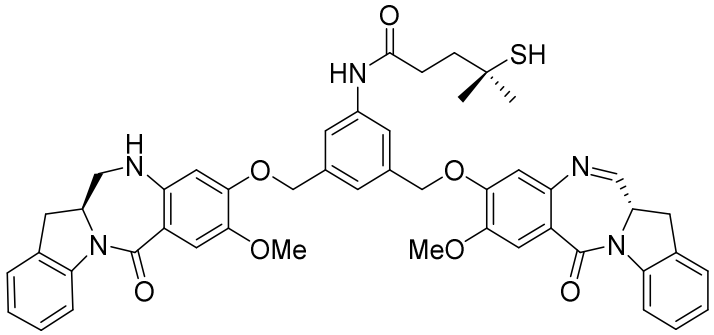
CDA-1A



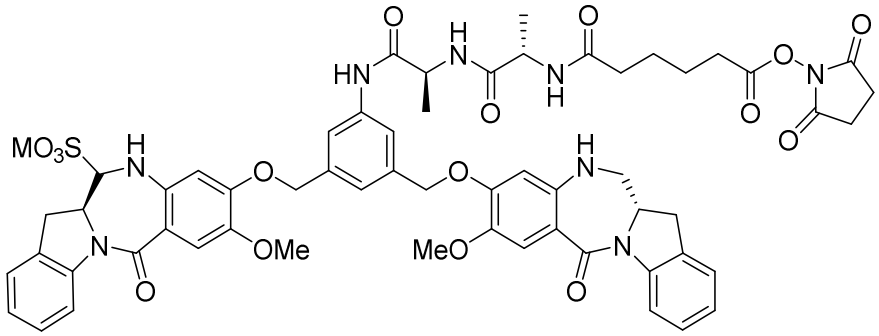
CDA-1B



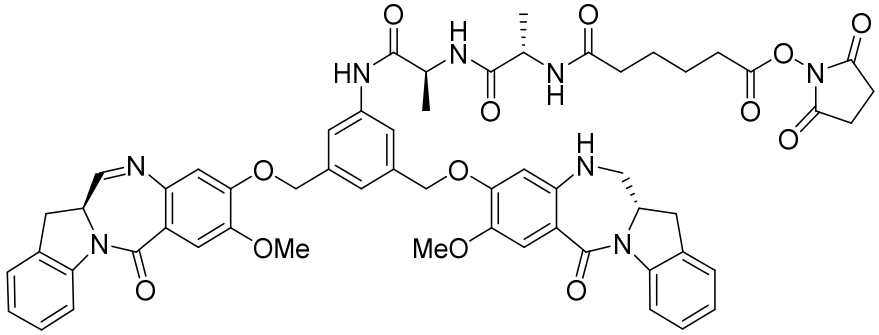
CDA-2A



CDA-2B



CDA-3A



CDA-3B.

La molécula de anticuerpo puede estar conectada a una CDA a través de cualquier conector adecuado, tal como, por ejemplo, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) o N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB).

En algunas formas de realización, la VH de la molécula de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, o una secuencia que es por lo menos 85% idéntica a la SEQ ID NO:7, y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO:8. En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO:9 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO:10.

Otros aspectos de la invención incluyen métodos para direccionar la terapia anticancerosa a células tumorales que expresan antígeno de GCC, métodos para inhibir el crecimiento de un tumor mediante la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención, métodos para reducir el tamaño de un tumor mediante la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención, y métodos para tratar un cáncer que se caracteriza por la expresión de GCC mediante la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. En algunas formas de realización, el tumor/cáncer a tratar es un cáncer del sistema gastrointestinal (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, o cáncer de estómago). En algunas formas de realización, el tumor/cáncer a tratar es cáncer pancreático.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figura 1A – Figura 1D muestran datos de unión celular a células que expresan GCC. La Figura 1A refleja los valores de afinidad para el anticuerpo 5F9 no conjugado. La Figura 1B, Figura 1C, y Figura 1D reflejan los valores de afinidad para los conjugados de anticuerpo y fármaco 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente.

La Figura 2A – Figura 2C muestran la potencia relativa de los conjugados de 5F9-CDA en células HEK293-GCC#2.

La Figura 3A – Figura 3C demuestran la eficacia *in vivo* de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente, en ratones que portan tumores HEK293-GCC#2.

La Figura 4A – Figura 4C demuestran la eficacia *in vivo* de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente, en un modelo de xenoinjerto tumoral humano primario de cáncer colorrectal, ratones que portan tumores PHTX(a) después de una dosis individual. La Figura 4D - Figura 4F demuestran la

eficacia *in vivo* de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente, en un modelo de xenoinjerto tumoral humano primario de cáncer colorrectal, ratones que portan tumores PHTX(a) después de dosis fraccionadas.

La Figura 5A – Figura 5C demuestran la eficacia *in vivo* de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente, en un modelo de xenoinjerto tumoral humano primario de cáncer colorrectal, ratones que portan tumores PHTX(b).

La Figura 6A – Figura 6B demuestran la eficacia *in vivo* de 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3, respectivamente, en un modelo de xenoinjerto tumoral humano primario de cáncer colorrectal, ratones que portan tumores PHTX(c).

La Figura 7A – Figura 7C muestran los perfiles farmacocinéticos (PK) de ratones que portan tumores HEK293-GCC después de la administración de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, o 5F9-CDA-3 como se describe en el Ejemplo 8.

Las Figuras 8A y 8B muestran los perfiles farmacodinámicos (PD) de ratones que portan tumores HEK293-GCC después de la administración de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, o 5F9-CDA-3 como se describe en el Ejemplo 8.

La Figura 9A muestra el cromatograma líquido de la reacción de sulfonación. La Figura 9 B muestra el perfil de picos de espectrometría de masa que corresponde a CDA-3B.

DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN

A menos que se defina de otra manera en la presente, los términos científicos y técnicos que se usan en conexión con la presente invención tienen los significados comúnmente aceptados por las personas con experiencia en el arte. En general, la nomenclatura que se utiliza en conexión con, y las técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular, y química de proteínas y oligo o polinucleótidos e hibridización que se describen en la presente son aquellas conocidas en el arte.

Moléculas de Anticuerpo

El término "molécula de anticuerpo”, tal como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las SEQ ID NOs 1-6. Las moléculas de anticuerpo incluyen moléculas de anticuerpo de cadena individual (véase, por ejemplo, scFv, véase por ejemplo, Bird y col. *Science* 242:423-426 (1988) y Huston y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)), y moléculas de anticuerpo de dominio individual (véase, por ejemplo, W09404678). “Molécula de anticuerpo” también se puede referir a proteínas y glicoproteínas de dos cadenas o de múltiples cadenas. Tal como se usa en la presente, el término "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere, por ejemplo, a fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, y Fv,

anticuerpos de cadena individual, anticuerpos de cadena pesada individual (nanobodies), así como también a cualquier porción de un anticuerpo que tenga especificidad por la GCC. Los fragmentos de unión a antígeno se pueden producir por técnicas recombinantes, o por escisión enzimática o química de un anticuerpo intacto. El término, fragmento de unión a antígeno, cuando se usa con una cadena individual, por ejemplo, una cadena pesada de un anticuerpo que tiene una cadena liviana y pesada, significa que el fragmento de la cadena es suficiente de forma tal que cuando se aparea con una región variable completa de la otra cadena, por ejemplo, la cadena liviana, permitirá la unión de por lo menos 25%, 50%, 75%, 85%, o 90% de los que se observa con la región variable completa de cadena pesada y liviana.

El término "molécula de anticuerpo" también incluye a las variantes sintéticas y genéticamente modificadas. En algunas formas de realización, las variantes comprenden secuencias de CDR de SEQ ID NOs 1-6 y secuencias de VH y VL que son por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8, respectivamente. En algunas formas de realización, las variantes comprenden secuencias de CDR de SEQ ID NOs 1-6 y secuencias de cadena pesada y liviana que son por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, respectivamente. En algunas formas de realización, las moléculas de anticuerpo comprenden las secuencias de CDR de SEQ ID NOs 1-6, en donde se han hecho 1, 2, 3, 4, o 5 sustituciones conservativas de aminoácidos en una o más de las secuencias de CDR. En algunas formas de realización, las moléculas de anticuerpo comprenden las secuencias de CDR de SEQ ID Nos 1-6, en donde se han hecho 1, 2, 3, 4, o 5 sustituciones no conservativas de aminoácidos en una o más de las secuencias de CDR. Estas sustituciones de aminoácido pueden estar acompañadas por un incremento o bien una disminución de la afinidad, avidez, tasa de asociación (K_{on}), o tasa de disociación (K_{off}) del anticuerpo, las que proveen propiedades beneficiosas para el anticuerpo, tales como, por ejemplo, mejor penetración tumoral, mayor acumulación en el tumor, un cambio de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), mejor eficacia, mejores perfiles de toxicidad, o una ventana terapéutica más amplia. Véase, por ejemplo, el efecto de afinidad sobre la captación y penetración de un anticuerpo en tumores sólidos que se describe en Rudnick y col. *Cáncer Res.* 71(6): 2250-2259 (2011). En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo comprende la SEQ ID NO:9 y la SEQ ID NO:10, en donde una o ambas secuencias se han modificado en el dominio constante para mejorar la estabilidad, reducir la inmunogenicidad, o proveer otras propiedades beneficiosas al anticuerpo, tales como, por ejemplo, funciones efectoras alteradas. Véase, por ejemplo, las modificaciones a las secuencias de dominio constante que se describen en Kubota y col. *Cancer Sci.* 100(9):1566-1572 (2009), US 2006/0275282, y en la Patente de los EE.UU. 9.085.625. En ciertas formas de realización, las moléculas de anticuerpo que se emplean en los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención comprenden regiones constantes humanas. Las secuencias de

los genes de región constante humana se pueden hallar en Kabat y col. *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* N.I.H. Publicación No. 91-3242 (1991). Los genes de región constante humana también están fácilmente disponibles a partir de clones conocidos. La elección del isotipo estará determinada por las funciones efectoras deseadas, tales como la fijación del complemento, o la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los isotipos pueden ser IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En formas de realización particulares, las moléculas de anticuerpo de la invención son IgG1 e IgG2. Se puede usar cualquiera de las regiones constantes de cadena liviana humana, kappa o lambda. Luego, se expresa el anticuerpo quimérico humanizado mediante métodos convencionales.

En algunas formas de realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención puede disparar la ADCC contra una célula que expresa GCC, por ejemplo, una célula tumoral. Los anticuerpos con los isotipos IgG1 e IgG3 son útiles para producir la función efectora con una capacidad citotóxica dependiente de anticuerpos, debido a su capacidad para unirse al receptor Fc. Los anticuerpos con los isotipos IgG2 e IgG4 son útiles para minimizar la respuesta de ADCC debido a su baja capacidad para unirse al receptor Fc. En formas de realización relacionadas se pueden hacer sustituciones en la región Fc o cambios en la composición de glicosilación de un anticuerpo, por ejemplo, por crecimiento en una línea celular eucariota modificada, para aumentar la capacidad de los receptores Fc para reconocer, unirse, y/o mediar la citotoxicidad de las células a las que se unen los anticuerpos anti-GCC. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. 7.317,091; 5.624,821; y las publicaciones que incluyen a WO 00/42072, Shields, y col. *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001), Lazary col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005-4010 (2006), Satoh y col. *Expert Opin. Biol. Ther.* 6:1161-1173 (2006). En ciertas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo de origen humano, anticuerpo humano) puede incluir sustituciones de aminoácido o reemplazos que alteran o ajustan la función (por ejemplo, función efectora). Por ejemplo, se puede diseñar una región constante de origen humano (por ejemplo, región constante γ1, región constante γ2) para reducir la activación del complemento y/o la unión al receptor Fc (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. 5.648.260; 5.624,821; y 5,834.597, los contenidos completos de las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia). Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de una región constante de origen humano que contiene dichas sustituciones o reemplazos de aminoácido es por lo menos aproximadamente 95% idéntica a lo largo de toda la longitud, a la secuencia de aminoácidos de la región constante de origen humano no alterada, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 99% idéntica a lo largo de toda la longitud a la secuencia de aminoácidos de la región constante de origen humano no alterada.

En aún otra forma de realización, también se pueden alterar las funciones efectoras mediante la modulación del patrón de glicosilación del anticuerpo. En el término alteración se incluye a la

eliminación de una o más unidades de carbohidrato halladas en el anticuerpo, y/o el agregado de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos con actividades de ADCC aumentadas con una estructura de carbohidratos madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en US 2003/0157108. Véase también US 2004/0093621.

Además o como alternativa, se puede elaborar un anticuerpo que tiene un tipo de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNac de mayor bisección. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados incrementan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidratos pueden llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula huésped con una maquinaria de glicosilación alterada. Las células con una maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en el arte y se pueden usar como células huéspedes en donde se modifican para que expresen los anticuerpos recombinantes de la invención para producir de esa forma un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, la EP 1.176.195 describe una línea celular con un gen *FUT8* funcionalmente alterado, que codifica para una fucosil transferasa, de forma que los anticuerpos que se expresan en dicha línea celular exhiben hipofucosilación. WO 03/035835 describe una variante de línea celular CHO, las células Lec13, con menor capacidad para unir fucosa a los hidratos de carbono conectados a Asn(297), lo que también resulta en una hipofucosilación de los anticuerpos que se expresan en esa línea celular. Véase también Shields, R. L. y col., *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 (2002). WO 99/54342 describe líneas celulares que se han modificado para que expresen glicosil transferasas modificantes de glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N acetilglucosaminil-transferasa III (GnTIII)) de forma que los anticuerpos que se expresan en las líneas celulares modificadas exhiben estructuras de GlcNac con mayor bisección que resultan en una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos. Véase también Umana y col., *Nat. Biotech.* 17:176-180 (1999).

En ciertas formas de realización, la molécula de anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, biparatópico, o bifuncional, en donde por lo menos un par de secuencias de unión comprenden las secuencias de CDR de SEQ ID NOs 1-6. En algunas formas de realización, ambos sitios de unión de un anticuerpo biespecífico o bifuncional comprenden las secuencias de CDR de SEQ ID NOs 1-6. En algunas formas de realización, el anticuerpo biespecífico o bifuncional comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs 7 y 8 o una variante de las mismas que comprende secuencias que son por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID NO:7 y/o SEQ ID NO:8.

Las moléculas de anticuerpo preferidas para usar en los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención son las moléculas de anticuerpo completamente humanas que se describen en WO

2011/050242, que se incorpora a la presente a modo de referencia por su divulgación de la molécula de anticuerpo 5F9 y las variantes de la misma así como también métodos recombinantes para elaborar dichas moléculas de anticuerpo. El mAb5F9 humano (IgG2, kappa) se puede producir mediante el hibridoma 46.5F9,8.2, depositado el 10 de enero 2007 en la American Type Culture Collection (ATCC) bajo el número de Acceso PTA-8132. Sin embargo, hay otros métodos para elaborar anticuerpos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, las moléculas de anticuerpo se pueden producir en ratones transgénicos generados por la tecnología XENOMOUSE™ que se describe en las Patentes de los EE.UU. 6.162,963; 6.150.584; 6.114.598; y 6.075.181. Se pueden hacer otros ratones transgénicos que producen anticuerpos usando una estrategia de minilocus, tal como la que se describe en las Patentes de los EE.UU. 5.545,807; 5.545,806; y 5.625,825. Otros ratones que producen anticuerpos incluyen al HUMAB-MOUSE™, al KIRIN TC MOUSE™, y el KM-MOUSE®.

Como alternativa, se pueden expresar las moléculas de anticuerpo en células en cultivo. Más específicamente, se pueden clonar secuencias que codifican para anticuerpos particulares a partir de células que producen los anticuerpos, y usarse para la transformación de una célula huésped adecuada de mamífero. En algunas formas de realización, se aíslan linfocitos de bazo y/o nódulo linfático a partir de ratones inmunizados y se plaquean en ensayos en placa como se describió previamente en Babcook y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848 (1996). Brevemente, se plaquean las células en agar con células rojas sanguíneas de oveja, se recubren con antígeno GCC, y las células que secretan mAb contra el antígeno GCC fijarán complemento y lisarán a las células rojas sanguíneas que rodean inmediatamente a las células que producen los mAb. Las células de las placas con lisis se recolectan para la secuenciación de las secuencias de inmunoglobulina y el subclonado en vectores de expresión. Subsiguientemente se criban las células transfectadas transitoriamente que contiene mAb específicos contra GCC por ELISA y por unión a células por citometría de flujo. Las secuencias variables, o una porción de las mismas de los anticuerpos humanos producidos que comprenden CDR que se unen a epitopes particulares se pueden usar para la producción de anticuerpos modificados. Por ejemplo, las regiones variables de los anticuerpos producidos pueden colocarse en un casete de expresión para facilitar la transferencia de las construcciones, incrementar la expresión de las construcciones, y/o la incorporación de las construcciones en vectores capaces de expresar los anticuerpos de longitud completa o fragmentos de los mismos como se describe, por ejemplo, en US 20060147445. También se pueden generar anticuerpos humanos usando células B activadas *in vitro* como se describe en las Patentes de los EE.UU. 5.567.601 y 5.229.275.

En algunas formas de realización, el casete de expresión comprende la región constante de cadena pesada de un isotipo IgG. Las secuencias de los genes de región constante humana se pueden hallar en Kabat y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* N.I.H. Publicación No. 91-

3242. Los genes de región constante humana están se pueden hallar fácilmente a partir de clones conocidos. La elección del isotipo estará determinada por las funciones efectoras deseadas, tales como fijación del complemento, o actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los isotipos pueden ser IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En formas de realización particulares, las moléculas de anticuerpo de la invención son IgG1 e IgG2. En formas de realización más particulares, el isotipo es IgG1. Se puede usar cualquiera de las regiones constantes de cadena liviana humana, kappa o lambda.

Las moléculas de anticuerpo que se emplean en los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención se direccionan y se unen específicamente al dominio extracelular de la GCC. Tal como se usa en la presente, "unión específica", "se une(n) específicamente" o "especificidad de unión" significan, para una molécula de anticuerpo anti-GCC, que la molécula de anticuerpo se une a GCC, por ejemplo, la proteína GCC humana, con mayor afinidad que lo que lo hace a una proteína distinta a GCC, por ejemplo, BSA. Típicamente una molécula anti-GCC tendrá una K_d para la proteína no GCC, por ejemplo, BSA, que es mayor que 2 veces, mayor que 10 veces, mayor que 100 veces, mayor que 1.000 veces, mayor que 10^4 veces, mayor que 10^5 veces, o mayor que 10^6 veces su K_d para la GCC, por ejemplo, la proteína GCC humana. La determinación de la K_d para GCC y para la proteína no GCC, por ejemplo, BSA, se debe llevar a cabo bajo las mismas condiciones.

Los cálculos de "homología" entre dos secuencias se pueden llevar a cabo como sigue. Se alinean las secuencias para propósitos de comparación optima (por ejemplo, se puede introducir brechas en una o en ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para un alineamiento óptimo, y las secuencias no homólogas pueden no tenerse en cuenta para los propósitos de comparación). La longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es de por lo menos 30%, 40%, o 50%, por lo menos 60%, o por lo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Luego se comparan los residuos de aminoácido o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que en la correspondiente posición en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se usa en la presente, “identidad” de aminoácido o de ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de brechas, y la longitud de cada brecha, que se necesitan introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias se puede llevar a cabo usando un algoritmo matemático. El porcentaje de homología entre

dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, el algoritmo que se describe en Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970), que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de programas GCG, usando una matriz Blossum 62 o bien una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de brecha de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. El porcentaje de homología entre dos secuencias nucleotídicas también se puede determinar usando el programa GAP en el paquete de programas GCG (Accelerys, Inc. San Diego, Calif.), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de brecha de brecha de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de longitud de brecha de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Un grupo ejemplificativo de parámetros para la determinación de la homología son una matriz de puntuación Blossum 62 y una penalidad por brecha de 12, una penalidad por extensión de brecha de 4, y una penalidad por brecha de desplazamiento de marco de 5.

Ha de comprenderse que los anticuerpos y fragmento de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden tener otras sustituciones de aminoácido conservativas o no esenciales, que no tienen un efecto sustancial sobre las funciones del polipéptido. Ha de comprenderse también que los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden tener otras sustituciones de aminoácido no conservativas, que no tienen un efecto sustancial sobre las funciones del polipéptido. La posibilidad de que una sustitución particular sea tolerada, es decir, que no afecte adversamente las propiedades biológicas deseadas, tales como la actividad de unión, se puede determinar como se describe en Bowie y col., *Science* 247:1306-1310 (1990) o Padlan y col., *FASEB J.* 9:133-139 (1995). Una "sustitución conservativa de aminoácido" es una en donde el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En el arte se han definido familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen a los aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Una “sustitución no conservativa de aminoácido” es una en donde el residuo de aminoácido se reemplaza por cualquier otro aminoácido.

Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar a partir de la secuencia de tipo salvaje del agente de unión, por ejemplo, el anticuerpo, sin impedir o, sin alterar sustancialmente una actividad biológica.

La molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención conduce al CDA a la célula cancerosa que expresa la GCC. Las secuencias de aminoácido y ácido nucleico ejemplificativas de moléculas de anticuerpo de la invención se establecen en la Tabla 1.

Tabla 1

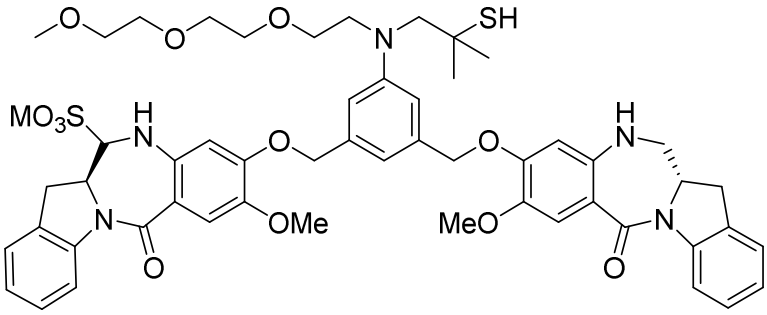
VHCDR1	SEQ ID NO:1	GYYWS
VHCDR2	SEQ ID NO:2	EINHRGNTNDNPSLKS
VHCDR3	SEQ ID NO:3	ERGYTYGNFDH
VLCDR1	SEQ ID NO:4	RASQSVSRNLA
VLCDR2	SEQ ID NO:5	GASTRAT
VLCDR3	SEQ ID NO:6	QQYKTWPRT
5F9 VH	SEQ ID NO:7	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFS**GYYWS**WIR QPPGKGLEWIG**EINHRGNTNDNPSLKS**RVTISVDTSKNQF ALKLSSVTAADTAVYYCAR**ERGYTYGNFDH**WGQGTLV TVSS
5F9 VL	SEQ ID NO:8	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC**RASQSVSRNLA**WYQQK PGQAPRLLIY**GASTRAT**GIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQS EDFAVYYC**QQYKTWPRT**FGQGTNVEIK
5F9/cadena pesada de hIgG1	SEQ ID NO:9	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AVFGGSFS**GYYWS**WIRQPPGKGLEWIG**EINHRGNTNDNPS LKS**RVTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCAR**ERGYTYG NFDH**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5F9/cadena liviana kappa humana	SEQ ID NO:10	MGWSCIILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSC **RASQSVSRNLA**WYQQKPGQAPRLLIY**GASTRAT**GIPARFSG SGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYC**QQYKTWPRT**FGQGTNVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Ácido nucleico de 5F9/cadena pesada de hIgG1	SEQ ID NO:11	GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCT TGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTGCAGC TACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGA CCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTTCAG TGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAA GGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAAA CACCAACGACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCAT ATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCT GAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTG TGCGAGAGAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCAC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT CTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT

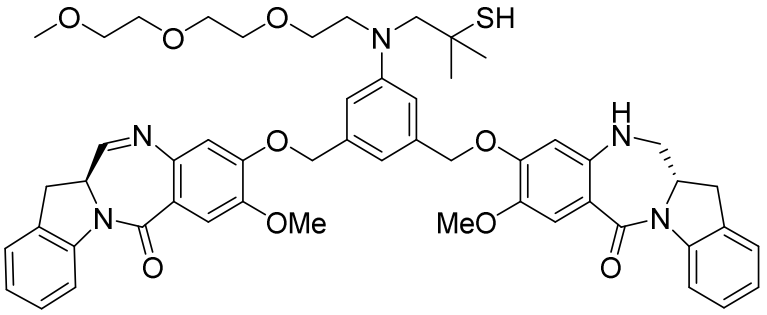
		ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAATAGGGATAACA GGGTAATACTAGAG
Ácido nucleico de 5F9/cadena liviana de hKappa	SEQ ID NO:12	GCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTT CTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGAAATAGTG ATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGG AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG CAGAAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTG GAATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA GTTCACTCTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTG CAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACG TTCGGCCAAGGGACCAACGTGGAAATCAAACGTACGGTGG CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG TTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGA GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAGTCTAGA

<u>Agentes Farmacológicos Citotóxicos (CDA)</u>

Se han descrito a los derivados de indolinobenzodiazepina que se emplean en los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención como compuestos que tienen alta potencia y/o alto índice terapéutico (proporción de dosis máxima tolerada a mínima dosis eficaz) *in vivo*. El derivado de benzodiazepina CDA-1 se describe en la Patente de los EE.UU. 8.765.740, que se incorpora a la presente a modo de referencia por su divulgación relacionada a CDA-1. La CDA-1 existe en formas sulfonada (CDA-1A) y no sulfonada (CDA-1B):



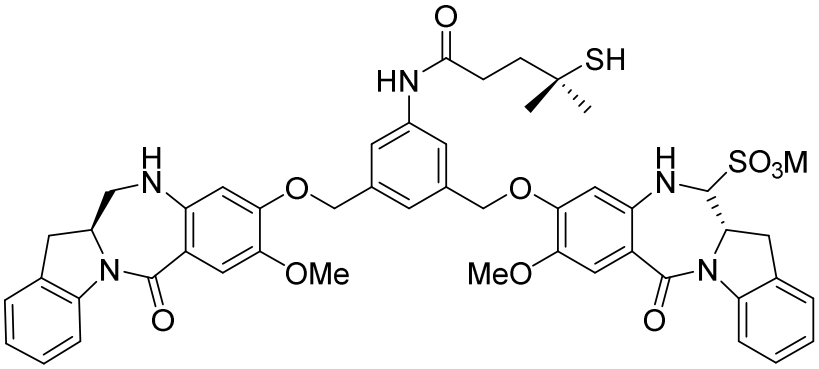
(CDA-1A)



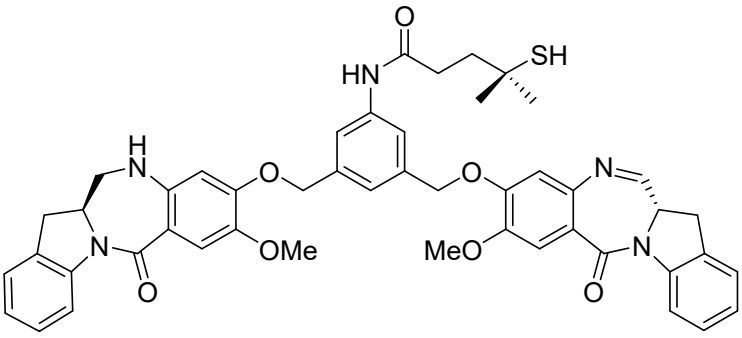
(CDA-1B)

en donde M es –H o un catión farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo Na^+ o K^+. La CDA-1A o la CDA-1B pueden estar en la forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable.

La CDA-2 se describe en PCT/US2015/048064, que se incorpora a la presente a modo de referencia por divulgación relacionada a la CDA-2. Como la CDA-1, la CDA-2 existe en formas sulfonada (CDA-2A) y no sulfonada (CDA-2B):



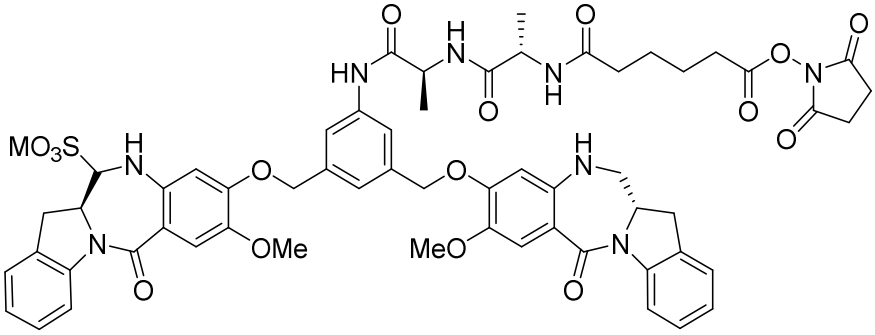
(CDA-2A)



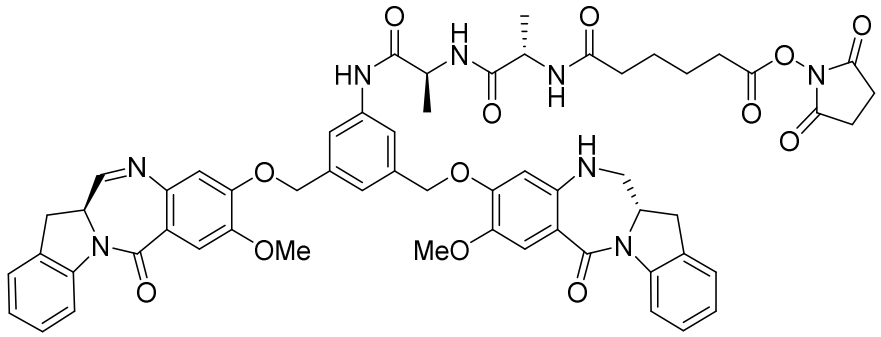
(CDA-2B)

en donde M es –H o un catión farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo Na^+ o K^+. La CDA-2A o la CDA-2B pueden estar en la forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable.

La CDA-3 se describe en PCT/US2015/048059, que se incorpora a la presente a modo de referencia por divulgación relacionada a la CDA-3. La CDA-3 existe en formas sulfonada (CDA-3A) y no sulfonada (CDA-3B):



(CDA-3A)



(CDA-3B)

en donde M es –H o un catión farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo Na^+ o K^+. La CDA-3A o la CDA-3B pueden estar en la forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en la presente, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Los ejemplos de saltes incluyen a, a título enunciativo no taxativo, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, ioduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, “mesilato”, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, pamoato (es decir, 1,1’-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)), sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio y potasio), sales de metales alcalino térreos (por ejemplo, magnesio), y sales de amonio. Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion de acetato, un ion de succinato, u otro contra ion. El contra ion puede ser cualquier porción orgánica o inorgánica que estabilice la carga sobre el compuesto parental. Más aún, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Cuando hay múltiples átomos cargados que son parte de la sal farmacéuticamente aceptable, pueden haber múltiples contra iones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contra iones.

Si el compuesto de la invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier método adecuado disponible en el arte, por ejemplo, el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y otros similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido de piranosidilo, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa hidroxi ácido, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o

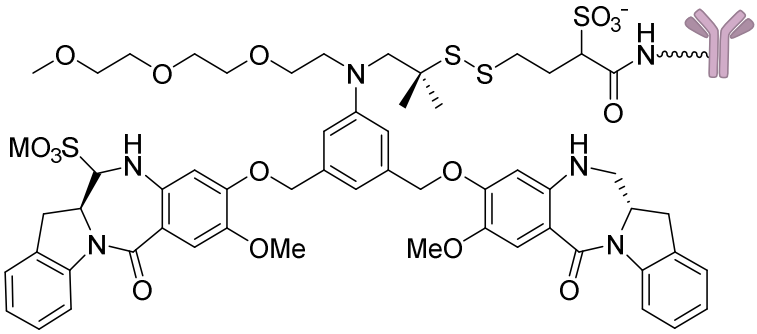
ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido *p*-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, u otros similares.

Si el compuesto de la invención es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, el tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalino térreo, u otros similares. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, a título enunciativo no taxativo a, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoniaco, aminas primarias, secundarias o terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, aluminio, y litio.

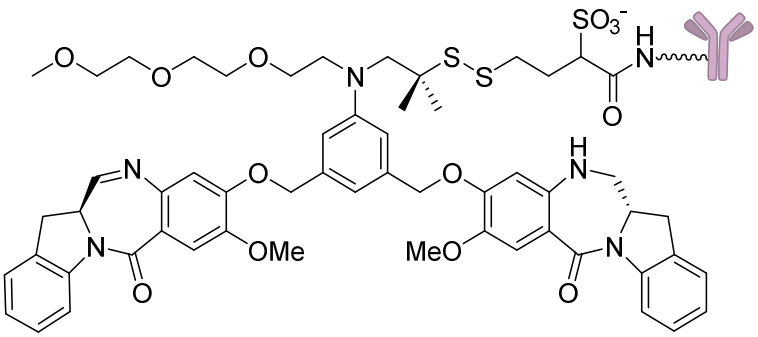
Conjugados de Anticuerpo y Fármaco

Los conjugados de anticuerpo y fármaco son moléculas complejas que combinan al anticuerpo como porción de direccionamiento al antígeno y el fármaco o carga útil como agente de muerte celular o citotóxico a ser administrado selectivamente a las células que expresan antígeno (por ejemplo, células tumorales que expresan antígeno). Las propiedades (por ejemplo, eficacia o seguridad) de este tipo de moléculas con frecuencia no se pueden predecir simplemente por la conjugación del anticuerpo que tiene afinidad a para un blanco antigénico seleccionado con un agente citotóxico. Los criterios para un conjugado de anticuerpo y fármaco exitoso incluyen propiedades de unión al antígeno blanco e internalización, actividades citotóxicas, eficacia *in vivo*, perfiles PK/PD, así como también temas de seguridad y toxicidad asociados con el uso de dichos conjugados de anticuerpo y fármaco. Como se muestra más adelante en los ejemplos de trabajo, los conjugados de anticuerpo y fármaco de esta invención exhibieron cada uno propiedades deseables.

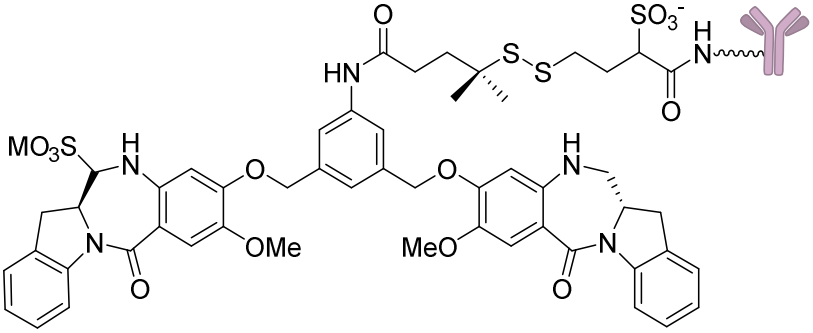
Las moléculas de anticuerpo que se emplean en los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención se pueden conjugar al agente farmacológico citotóxico (CDA-1, CDA-2, o CDA-3) mediante cualquier método adecuado, o como se divulga en el Ejemplo 5 en la presente, para producir los siguientes conjugados de anticuerpo y fármaco:



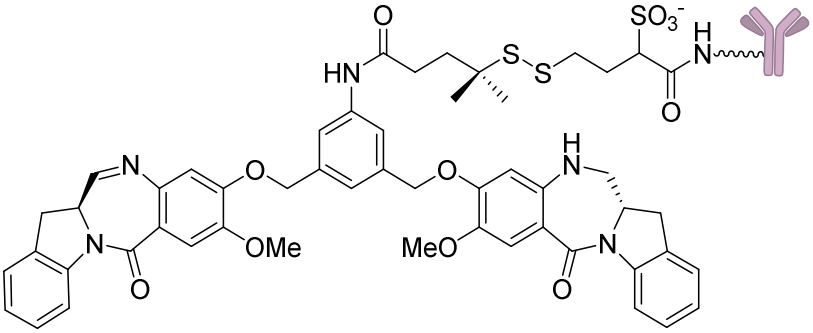
Ab-CDA-1A



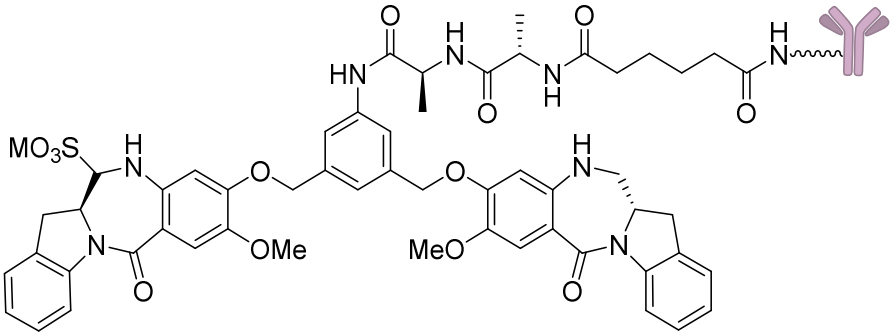
Ab-CDA-1B



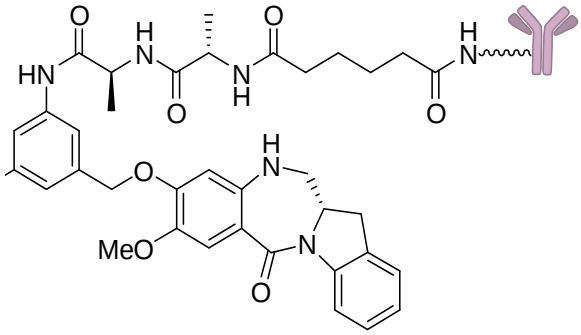
Ab-CDA-2A



Ab-CDA-2B



Ab-CDA-3A



Ab-CDA-3B

una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde M es –H o un catión farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo Na^+ o K^+ y en donde HN es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:9 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de SEQ ID NO:10. El grupo NH unido al anticuerpo se refiere al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de lisina de dicho anticuerpo.

Los términos “conjugado de anticuerpo y fármaco”, “conjugado de anticuerpo”, "inmunoconjugado”, “conjugado”, y "ADC" se usan como sinónimos y se refieren a un anticuerpo que se conjuga a una porción distinta a anticuerpo, por ejemplo, un agente farmacológico citotóxico. Los términos “conector”, “unidad conectora”, o “grupo de conexión”, como se definen en la presente, se refieren a una porción que conecta juntos a dos grupos, tal como un anticuerpo y un compuesto citotóxico. En algunas formas de realización, los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención comprenden un agente farmacológico citotóxico (CDA-1, CDA-2, o CDA-3) y un anticuerpo, en donde el agente farmacológico citotóxico está conectado en forma covalente al anticuerpo. En ciertas formas de realización, los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención comprenden un agente farmacológico citotóxico (CDA-1 o CDA-2) y un anticuerpo, en donde el agente farmacológico citotóxico está conectado en forma covalente al anticuerpo a través de un conector (por ejemplo, sulfo-SPDB). En otras formas de realización, el agente farmacológico citotóxico (CDA-3) tiene un grupo reactivo (por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida) que puede formar directamente un enlace covalente con el anticuerpo.

En el arte se conocen una variedad de conectores adecuados (por ejemplo, reactivos heterobifuncionales para conectar una molécula de anticuerpo a un agente farmacológico citotóxico). El conector puede ser escindible, por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas, por ejemplo, bajo condiciones intracelulares, de forma que la escisión del conector libera el fármaco en el entorno intracelular. En otras formas de realización, el conector no es escindible, y el fármaco se libera, por ejemplo, por degradación del anticuerpo.

El conector puede enlazarse a un grupo químicamente reactivo de la porción de anticuerpo, por ejemplo, a un grupo amino, imino, hidroxilo, tiol, o carboxilo libre (por ejemplo, al extremo N o C-terminal, al grupo épsilon amino de uno o más residuos de lisina, al grupo ácido carboxílico libre de uno o más residuos de ácido glutámico o ácido aspártico, al grupo sulfhidrilo de uno o más residuos de cisteinilo, o al grupo hidroxilo de uno o más residuos de serina o treonina). El sitio al que se une el conector puede ser un residuo natural de la secuencia de aminoácidos de la porción de anticuerpo, o el mismo se puede introducir en la porción de anticuerpo, por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, mediante la introducción de una cisteína o un sitio de escisión de proteasa en la secuencia de aminoácidos) o por bioquímica de proteínas (por ejemplo, reducción, ajuste de pH, o proteólisis).

Típicamente, el conector es sustancialmente inerte bajo condiciones en las cuales se conectan los dos grupos que el mismo está conectando. El término “agente de entrecruzamiento bifuncional”, “conector bifuncional” o “agente de entrecruzamiento” se refieren a un agente modificador que posee dos grupos reactivos en cada extremo del conector, de forma que un grupo reactivo se puede hacer reaccionar primero con el compuesto citotóxico para proveer un compuesto que porta la unidad conectora y un segundo grupo reactivo, que luego puede reaccionar con el anticuerpo. Como alternativa, se puede hacer reaccionar primero un extremo del agente de entrecruzamiento bifuncional con el anticuerpo para proveer un anticuerpo que porta una unidad conectora y un segundo grupo reactivo, que luego se puede hacer reaccionar con el compuesto citotóxico. La unidad de conexión puede contener un enlace químico que permite la liberación de la unidad citotóxica en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son bien conocidos en el arte e incluyen enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces ácidos lábiles, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles de proteasa/peptidasa, y enlaces lábiles de esterasa. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716,821; 6,913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 y 7.414.073. En algunas formas de realización, los enlaces son enlaces disulfuro, tioéter, y/o enlaces lábiles de proteasa/peptidasa. Otros conectores que se pueden usar en la presente invención incluyen conectores no escindibles, tales como los que se describen en detalle en US 20050169933, conectores cargados, o conectores hidrofílicos, tales como los que se describen en US 2009/0274713, US 2010/0129314, y WO 2009/134976, cada una de las cuales se incorpora expresamente a la presente a modo de referencia.

En algunas formas de realización, el conector es escindible mediante un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o cavéola). El conector puede ser, por ejemplo, un conector peptídico que es escindido por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, una proteasa lisosomal o endosomal. En algunas formas de realización, el conector peptídico comprende por lo menos dos, por lo menos

tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco aminoácidos de longitud. En ciertas formas de realización, el conector peptídico se selecciona de Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-tosil-Arg, Phe-N^9-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, B-Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, y Met-Ala. En algunas formas de realización, el conector peptídico se selecciona de Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, y D-Ala-D-Ala. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales se sabe que hidrolizan a los derivados farmacológicos dipeptídicos lo que resulta en la liberación del fármaco activo dentro de las células blanco (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente farmacológico citotóxico es que el agente típicamente está atenuado cuando está conjugado, y las estabilidades en suero de los conjugados son típicamente altas.

En otras formas de realización, el conector escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. En algunas formas de realización, el conector sensible al pH se puede hidrolizar bajo condiciones ácidas. Por ejemplo, puede usarse un conector lábil a ácidos que se puede hidrolizar en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida de cis-aconítico, ortoéster, acetal, cetal, u otros similares) (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville y col, 1989, *Biol. Chem.* 264: 14653-14661). Dichos conectores son relativamente estables bajo condiciones de pH neutro, tales como la de la sangre, pero son inestables a pH menor que 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas formas de realización, el conector hidrolizable es un conector de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico a través de un enlace acilhidrazona (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 5.622,929).

En otras formas de realización, el conector es escindible bajo condiciones reductoras (por ejemplo, un conector de disulfuro). Los agentes de entrecruzamiento bifuncionales que permite la unión de un anticuerpo con compuestos citotóxicos a través de enlaces disulfuro incluyen, a título enunciativo no taxativo a, N-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB). El sulfo-SPDB se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. 8.236.319, que se incorpora a la presente a modo de referencia. Como alternativa, se pueden usar agentes de entrecruzamiento que introducen grupos tiol tales como 2-iminotiolano, homocisteína tiolactona, o anhídrido S-acetilsuccínico. En otras formas de realización,

el conector puede contener una combinación de uno o más de los conectores peptídicos, sensibles a pH, o de disulfuro descritos previamente.

Los “agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales” son agentes de entrecruzamiento bifuncionales que tienen dos grupos reactivos diferentes. Los agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales que contienen tanto un grupo N-hidroxisuccinimida reactivo a amina (grupo NHS) como un grupo hidrazina reactivo a carbonilo también se pueden usar para conectar los compuestos citotóxicos con un anticuerpo. Los ejemplos de dichos agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales comercialmente disponibles incluyen a succinimidil 6-hidrazinonicotinamida acetona hidrazona (SANH), clorhidrato de succinimidil 4-hidrazidotereftalato (SHTH) y clorhidrato de succinimidil hidrazinio nicotinato (SHNH). Los conjugados que portan una conexión lábil a ácidos también se pueden preparar usando un derivado de benzodiazepina que porta hidrazina de la presente invención. Los ejemplos de agentes de entrecruzamiento bifuncionales que se pueden usar incluyen a succinimidil-p-formil benzoato (SFB) y succinimidil-p-formilfenoxiacetato (SFPA).

La presente invención provee conjugados de anticuerpo y fármaco que comprenden uno o más agentes farmacológicos citotóxicos conectados a un anticuerpo individual. La proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) representa el número de agentes farmacológicos citotóxicos conectados por molécula de anticuerpo. En diversas formas de realización, la DAR está en el rango entre 1 y 15, entre 1 y 10, entre 1 y 9, entre 1 y 8, entre 1 y 7, entre 1 y 6, entre 1 y 5, entre 1 y 4, entre 1 y 3, entre o entre 1 y 2. En algunas formas de realización, la DAR está en el rango entre 2 y 10, entre 2 y 9, entre 2 y 8, entre 2 y 7, entre 2 y 6, entre 2 y 5, entre 2 y 4 o entre 2 y 3. En otras formas de realización, la DAR es aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, o aproximadamente 6. En algunas formas de realización, la DAR varía en un rango entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4. La DAR se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectrometría de masa, espectrometría UV/Vis, ensayo de ELISA, y/o HPLC.

La presente invención incluye el método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco. En algunas formas de realización, los conjugados de la presente invención se preparan por conecta del anticuerpo con un agente de entrecruzamiento (conector) y un agente citotóxico de una forma secuencial, de forma que el anticuerpo se conecta en forma covalente a un primer conector, y luego el intermediario de anticuerpo-conector preformado reacciona con un agente citotóxico. El intermediario de anticuerpo-conector puede o no someterse a un paso de purificación antes de ponerse en contacto con un agente citotóxico. En algunas formas de realización, los conjugados de la invención se pueden preparar por contacto del anticuerpo con un compuesto agente citotóxico-conector preformado mediante la reacción del conector y el agente citotóxico. El conector-agente citotóxico preformado

puede o no someterse a un paso de purificación antes de ponerse en contacto con el anticuerpo. En otras formas de realización, el anticuerpo se pone en contacto con un conector y un agente citotóxico en una mezcla de reacción, lo que permite la formación simultanea de los enlaces covalentes entre el anticuerpo y el conector, y entre el conector y el agente citotóxico. Este método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco puede incluir una reacción, en donde el anticuerpo se pone en contacto con un agente citotóxico antes del agregado de un conector a la mezcla de reacción, y vice versa. En ciertas formas de realización, el conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención se puede preparar por contacto del anticuerpo con un agente citotóxico que tiene un conector construido tal como, por ejemplo, CDA-3.

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco incluye soluciones amortiguadoras que tienen un pH entre 3 y 9. En algunas formas de realización, la solución amortiguadora tiene un pH entre 4 y 9. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora es entre 7 y 9. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora es entre 8 y 9. En algunas formas de realización, el pH de la solución amortiguadora es 8,0. En otras formas de realización, el pH de la solución amortiguadora es 8,7.

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco incluye soluciones amortiguadoras con diversas fuerzas iónicas. En algunas formas de realización, la fuerza iónica de la solución amortiguadora es entre 10 mM y 300 mM. En algunas formas de realización, la fuerza iónica de la solución amortiguadora es entre 15 mM y 200 mM. En algunas formas de realización, la fuerza iónica de la solución amortiguadora es entre 60 mM y 150 mM. En algunas formas de realización, la fuerza iónica de la solución amortiguadora es 75 mM. En otras formas de realización, la fuerza iónica de la solución amortiguadora es 130 mM.

En ciertas formas de realización, el método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco incluye soluciones amortiguadoras de diversas concentraciones. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora es entre 10 mM y 300 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora es entre 15 mM y 200 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora es entre 60 mM y 150 mM. En algunas formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora es 75 mM. En otras formas de realización, la concentración de la solución amortiguadora es 130 mM.

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco utiliza cualquier solución amortiguadora conocida en el arte, o cualquier combinación de las mismas. Los ejemplos de soluciones amortiguadoras se enumeran en el sitio de internet de Sigma Aldrich en http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreactives/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html. Los ejemplos de soluciones amortiguadoras también incluyen, a título

enunciativo no taxativo, a solución amortiguadora de fosfato, solución amortiguadora de citrato, solución amortiguadora de succinato, y solución amortiguadora de acetato. En algunas formas de realización, la solución amortiguadora es HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico). En otras formas de realización, la solución amortiguadora es EPPS (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinpropanosulfónico).

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco incluye solventes orgánicos, por ejemplo, a título enunciativo no taxativo, DMA (dimetilacetamida), y DMSO (dimetilsulfóxido). En algunas formas de realización, el solvente orgánico está presente en la reacción de conjugación en la cantidad de entre 1 y 40% en volumen del volumen total de la solución amortiguadora y el solvente orgánico. En algunas formas de realización, el solvente orgánico es DMA, y está presente en la cantidad de entre 5 y 20%. En algunas formas de realización, el solvente orgánico es DMA, y está presente en la cantidad de 10%. En otras formas de realización, el solvente orgánico es DMA, y está presente en la cantidad de 13,5%. En otras formas de realización, el solvente orgánico es DMA, y está presente en la cantidad de 15%.

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco se lleva a cabo a una temperatura entre 2°C y 37°C. En algunas formas de realización, la temperatura es entre 10°C y 30°C. En algunas formas de realización, la temperatura es entre 15°C y 25°C. En algunas formas de realización, la temperatura es 25°C. En otras formas de realización, la temperatura es 22°C.

El método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco permite que la reacción de conjugación proceda entre 2 minutos y 2 días. En algunas formas de realización, la reacción procede entre 0,5 hora y 24 horas. En algunas formas de realización, la reacción procede entre 1 hora y 8 horas. En algunas formas de realización, la reacción procede durante 6 horas. En algunas formas de realización, la reacción procede durante 4 horas. En otras formas de realización, la reacción procede durante 1 hora.

En algunas formas de realización, el método para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención además comprende el paso de agregar una solución de extinción con alta fuerza iónica después de la formación del conjugado. En una forma de realización, la solución de extinción comprende EPPS 750 mM y 150 mM de clorhidrato de histidina. En otra forma de realización, la solución de extinción comprende EPPS 750 mM. En algunas formas de realización, el pH de la solución de extinción es entre 5 y 6. En algunas formas de realización, el pH de la solución de extinción es 5,5.

En algunas formas de realización, la solución de extinción comprende EPPS y clorhidrato de histidina y subsiguientemente al agregado de la solución de extinción a la mezcla de reacción de conjugación, la mezcla resultante comprende entre 200 mM y 400 mM de EPPS y entre 40 y 60 mM de clorhidrato de histidina. En una forma de realización, la mezcla resultante comprende entre 250 mM y 350 mM de

EPPS y entre 40 y 60 mM de clorhidrato de histidina. En otra forma de realización, la mezcla resultante comprende entre 300 mM y 350 mM de EPPS y entre 45 mM y 55 mM de clorhidrato de histidina.

Los conjugados de anticuerpo y fármaco preparados de acuerdo con los métodos que se describieron previamente se pueden someter a un paso de purificación. El paso de purificación implica cualquier método bioquímico conocido en el arte para purificar proteínas, o cualquier combinación de dichos métodos. Estos incluyen, a título enunciativo no taxativo, filtración en flujo tangencial (TFF), cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cualquier cromatografía basada en carga o punto isoeléctrico, cromatografía de modo mixto, por ejemplo, CHT (hidroxiapatita cerámica), cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de exclusión molecular, diálisis, filtración, precipitación selectiva, o cualquier combinación de los mismos.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la invención presenta composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticamente aceptables, que incluyen un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención, como se describe en la presente, formulado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en la presente, "vehículo farmacéuticamente aceptable " incluye a cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y otros similares que son fisiológicamente compatibles. El vehículo puede ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, rectal, espinal o epidérmica *(*por ejemplo, por inyección o infusión). La composición farmacéutica puede incluir uno o más excipientes adicionales, por ejemplo, sales, soluciones amortiguadoras, modificadores de tonicidad, lioprotectores, detergentes no iónicos, tensioactivos, y conservantes. En algunas formas de realización, la solución amortiguadora de formulación comprende un rango de entre 5 mM y 300 mM de solución amortiguadora farmacéuticamente aceptable que incluye, a título enunciativo no taxativo, histidina, succinato, tris, o acetato en un rango de pH entre 2,5 y 9,0. En otras formas de realización, la solución amortiguadora de formulación comprende excipientes tales como L-Prolina, L-Arginina, ciclodextrinas, por ejemplo, ciclodextrina gamma, por ejemplo, Captisol® y otros similares, polietilenglicol, sacarosa, trehalosa, bisulfito de sodio, o cualquier otro excipiente que sea conocido en el arte para estabilizar proteínas o inmunoconjugados, y para minimizar la formación de especies de alto peso molecular o la desconjugación de los fármacos del ADC, ya sea durante la producción o el almacenamiento.

Las composiciones pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, soluciones líquidas, formas de dosificación semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones para inyección o infusión), dispersiones o suspensiones, liposomas y supositorios. La forma preferida depende la ruta administración deseada y de la aplicación terapéutica. Algunas composiciones típicas están en la forma de soluciones para inyección o infusión, pensadas para

administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En algunas formas de realización, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otras formas de realización, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las expresiones "administración parenteral " y "administrado por vía parenteral" tal como se usan en la presente designan a modos de administración distintos a la administración entérica o tópica, usualmente por inyección, e incluyen, a título enunciativo no taxativo, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraestemal.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica es estéril y estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, microesfera, u otra estructura ordenada adecuada para altas concentraciones de anticuerpo. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar por incorporación del compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados precedentemente, según se requiera, seguido por esterilización, por ejemplo, por filtración. En general, las dispersiones se preparan por incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes que se requieren a partir de los que se enumeraron precedentemente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación provistos son secado en vacío y secado por congelación, los que rinden un polvo del ingrediente activo más algún ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración. La fluidez apropiada de la solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables se puede lograr mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en el arte, a pesar de que para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración es la inyección o infusión intravenosa. Como lo apreciarán las personas con experiencia en el arte, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas formas de realización, el compuesto activo se puede preparar con un vehículo que protegerá al compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración

microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenvinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o en general son conocidos para las personas con experiencia en el arte. *Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,* J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En ciertas formas de realización, los conjugados de anticuerpo y fármaco descritos en la presente se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible. El compuesto (y otros ingredientes si se desea) también pueden estar dentro de una cápsula de cubierta de gelatina dura o blanda, en comprimidos, comprimidos bucales, grageas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y otros similares. Para administrar un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención por administración distinta a la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden colocar las preparaciones farmacéuticas dentro de un dispositivo, por ejemplo, un recipiente hermético a aire o a líquidos, que contiene una o más dosificaciones. Los ejemplos de dispositivos de administración incluyen, a título enunciativo no taxativo, viales, cánulas, agujas, bolsas de goteo, y tuberías. La invención también provee métodos para colocar un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención dentro de dicho dispositivo.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proveer la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo individual, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. La formulación de composiciones parenterales en una forma unitaria de dosificación para la facilidad de la administración y uniformidad de la dosificación es especialmente ventajoso. El término "forma unitaria de dosificación”, como se usa en la presente, se refiere a unidades discretas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para que produzca el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está determinada por y es directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a obtener, y (b) las limitaciones inherentes en el arte de la elaboración de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un rango ejemplificativo, no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de la invención es entre 20 µg y 20 mg/kg, o 30 µg y 10 mg/kg. Se debe hacer notar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y severidad de

la condición a aliviar. Además se debe comprender que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación descritos en la presente son ejemplificativos solamente y no tienen como intención limitar el alcance o práctica de la composición que se reivindica.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una cantidad "terapéuticamente eficaz" de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. Una cantidad "terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el género, y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción del anticuerpo para ejercer una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del conjugado de anticuerpo y fármaco es compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "dosificación terapéuticamente eficaz" preferiblemente inhibe un parámetro que puede medirse (por ejemplo, tasa de crecimiento del tumor) en sujetos tratados en por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 60%, y en algunas formas de realización por lo menos aproximadamente 80%, en relación a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir un parámetro que puede medirse, por ejemplo, cáncer, puede evaluarse, por ejemplo, en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse en ensayos *in vitro* tales como, por ejemplo, aquellos descritos en el Ejemplo 7.

También dentro del alcance de la invención hay conjuntos de componentes que comprenden un conjugado de anticuerpo y fármaco como se describe en la presente. El conjunto de componentes puede incluir uno o más elementos adicionales que incluyen: instrucciones para su uso; otros reactivos, por ejemplo, una etiqueta, un agente terapéutico adicional; dispositivos u otros materiales para la preparación del conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención para la administración; vehículos farmacéuticamente aceptables; y dispositivos u otros materiales para la administración a un sujeto. Las instrucciones para su uso pueden incluir las guías para la aplicación terapéutica que incluyen dosificaciones y/o modos de administración sugeridos, por ejemplo, en un paciente con un cáncer (por ejemplo, un cáncer de origen gastrointestinal, tal como, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer esofágico).

El conjunto de componentes además puede contener por lo menos un reactivo adicional, tal como un agente terapéutico adicional, y/o uno o más conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención adicionales, formulados como apropiados, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

Usos terapéuticos

Como se usa en la presente, "tratamiento" o "tratar" se refiere a un alivio de un cáncer o tumor, o por lo menos un síntoma discernible del mismo. En ciertas formas de realización, "tratamiento" o "tratar" se refiere a un alivio de por lo menos un parámetro físico que puede medirse, no necesariamente discernible por el paciente. En aún otra forma de realización, "tratamiento" o "tratar" se refiere a inhibir la progresión de un cáncer, físicamente, por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente, por ejemplo, estabilización de un parámetro físico, o ambos. “Tratamiento” o “tratar” como se usa en la presente se refiere a la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención a un sujeto, por ejemplo, un paciente, o administración, por ejemplo, por aplicación, a un tejido aislado o célula de un sujeto que se reincorpora al sujeto. El conjugado de anticuerpo y fármaco puede administrarse solo o combinación con un agente terapéutico adicional. El tratamiento puede ser para curar, sanar, atenuar, aliviar, alterar, remediar, atenuar, paliar, mejorar o afectar el trastorno, los síntomas del trastorno o la predisposición al trastorno, por ejemplo, un cáncer. Si bien no se desea estar ligado a la teoría, se cree que el tratamiento provoca la inhibición, ablación, o muerte de una célula *in vitro* o *in vivo*, o reduce de otra manera la capacidad de una célula, por ejemplo, una célula aberrante, para mediar un trastorno, por ejemplo, un trastorno como se describe en la presente (por ejemplo, un cáncer).

Como se usa en la presente, el término "sujeto" se pretende que incluya mamíferos, primates, humanos y animales no humanos. Por ejemplo, un sujeto puede ser un paciente (por ejemplo, un paciente humano o un paciente veterinario), que tiene un cáncer, por ejemplo, de origen gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de colon), un paciente que tiene un síntoma de un cáncer, por ejemplo, de origen gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de colon), en el cual por lo menos algunas de las células expresan GCC, o un paciente que tiene una predisposición por un cáncer, por ejemplo, de origen gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de colon), en el cual por lo menos algunas de las células expresan GCC. El término "animales no humanos" de la invención incluye todos los vertebrados no humanos, por ejemplo, mamíferos no humanos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, gallinas, anfibios, reptiles, etc., a menos que se indique de otra manera. En una forma de realización, un sujeto excluye uno o más de todos entre un ratón, rata, conejo o cabra.

Como se usa en la presente, una cantidad de un conjugado de anticuerpo y fármaco "eficaz" o "suficiente" para tratar un trastorno, o una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente suficiente" se refiere a una cantidad del conjugado de anticuerpo y fármaco que es

eficaz, cuando se administra en dosis de manera individual o múltiple a un sujeto que padece de un trastorno descrito en la presente, para tratar a una célula, por ejemplo, célula cancerígena (por ejemplo, una célula tumoral que expresa GCC), para reducir el tamaño del tumor o para inhibir el crecimiento de un tumor o cáncer en un sujeto, para prolongar la supervivencia de un sujeto, o para atenuar, aliviar o mejorar uno o más de los síntomas de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento. Tal como se usa en la presente, "inhibir el crecimiento" del tumor o cáncer se refiere a enlentecer, interrumpir, detener o frenar su crecimiento y/o metástasis y no necesariamente indica una eliminación total del crecimiento del tumor.

En un aspecto, la invención describe un método para matar, inhibir o modular el crecimiento de, o interferir con el metabolismo de, una célula que expresa GCC mediante la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. En una forma de realización, la invención provee un método para inhibir la señalización celular mediada por GCC o un método para matar una célula. El método puede usarse con cualquier célula o tejido que exprese GCC, tal como una célula cancerosa o una lesión metastásica. Los ejemplos no limitantes de cánceres que expresan GCC incluyen cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón y cáncer de recto. Los ejemplos no limitantes de células que expresan GCC incluyen células de adenocarcinoma colónico de humano T84, células de tumor de colon frescas o congeladas, y células que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica para GCC o una porción de la misma.

Los métodos de la invención incluyen los pasos de poner en contacto la célula con un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención, como se describe en la presente, en una cantidad eficaz, es decir, cantidad suficiente para matar la célula. El método puede usarse sobre células en cultivo, por ejemplo *in vitro, in vivo, ex vivo,* o *in situ.* Por ejemplo, las células que expresan GCC (por ejemplo, células recolectadas por biopsia de un tumor o lesión metastásica; células de una línea establecida de células cancerígenas; o células recombinantes), pueden cultivarse *in vitro* en medio de cultivo y el paso de poner en contacto puede realizarse por agregado del conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención al medio de cultivo. El método provocará la muerte de las células que expresan GCC, incluyendo en particular células tumorales que expresan GCC (por ejemplo, células de tumor de colon).

La porción anticuerpo de los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención se une al dominio extracelular de GCC o porciones de la misma en células que expresan el antígeno. Como resultado, cuando se ponen en práctica los métodos de la presente invención para matar, suprimir, o detectar células cancerosas, la porción anticuerpo del conjugado de anticuerpo y fármaco se une a todas dichas células, no solo a células que están fijas o células cuyos dominios antigénicos intracelulares se

exponen de otra manera al ambiente extracelular. Consecuentemente, la unión se concentra en áreas en donde hay células que expresan GCC, independientemente que estas células están fijas o no fijas, viables, o necróticas.

El método también puede aplicarse en células presentes en un sujeto, como parte de un protocolo *in vivo*. En una forma de realización, el sujeto es un humano sujeto. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa un antígeno GCC con el cual reacciona cruzado un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. Un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención también puede administrarse a un mamífero no humano que expresa el antígeno similar a GCC con el cual reacciona cruzado el anticuerpo (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) con propósitos veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Los modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayar las dosificaciones y cursos de tiempo de la administración). Para las formas de realización *in vivo*, el paso de poner en contacto se realiza en un sujeto e incluye la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención al sujeto en condiciones eficaces para permitir la unión de la molécula de anticuerpo al dominio extracelular de GCC expresada en la célula, y el tratamiento de la célula.

En una forma de realización, la invención provee un método para tratar el cáncer mediante la administración de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención a un paciente que requiere dicho tratamiento. El método puede usarse para el tratamiento de cualquier trastorno canceroso que incluye por lo menos algunas células que expresan el antígeno GCC. Tal como se usa en la presente, el término "cáncer" se refiere a que incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células transformadas a malignas, tejidos, u órganos, independientemente del tipo histopatológico o del estadio de invasividad. El términos "cáncer" y "tumor" pueden usarse como sinónimos (por ejemplo, cuando se usa en el contexto de métodos de tratamiento, "tratamiento de un cáncer" y "tratamiento de un tumor" tienen el mismo significado).

En algunas formas de realización, el tratamiento es suficiente para reducir o inhibir el crecimiento del tumor del sujeto, reducir el número o tamaño de las lesiones metastásicas, reducir la carga del tumor, reducir la carga del tumor primario, reducir la invasividad, prolongar el tiempo de supervivencia, y/o mantener o mejorar la calidad de vida.

Los ejemplos de trastornos cancerosos incluyen, a título enunciativo no taxativo a, tumores sólidos, tumores de tejidos blandos, y lesiones metastásicas. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen malignidades, por ejemplo, sarcomas, adenocarcinomas, y carcinomas, de los diferentes sistemas de órganos, tales como aquellos que afectan el colon, vejiga, cuello uterino, esófago, cabeza y cuello, hígado, pulmón, recto, estómago y páncreas. Los carcinomas incluyen, por ejemplo, carcinoma urotelial de vejiga, carcinoma de células escamosas cervical, carcinoma de esófago, carcinoma de

células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular de hígado y carcinoma de células de pulmón. Los adenocarcinomas incluyen, por ejemplo, malignidades tales como carcinoma de pulmón a células no pequeñas, adenocarcinoma endocervical, adenocarcinoma colon, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de recto y adenocarcinoma gástrico. Las lesiones metastásicas de los cánceres mencionados precedentemente también pueden tratarse o prevenirse con el uso de los métodos y composiciones de la invención. En algunas formas de realización, el cáncer a tratar es un cáncer del sistema gastrointestinal (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer esofágico, cáncer gastroesofágico o cáncer de estómago). En algunas formas de realización, el cáncer a tratar es cáncer pancreático.

En una forma de realización, el cáncer es un cáncer colorrectal, por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal, leiomiosarcoma colorrectal, linfoma colorrectal, melanoma colorrectal, o un tumor neuroendócrino colorrectal. En una forma de realización particular, el cáncer es cáncer metastásico de colon. En otra forma de realización, el cáncer es un cáncer de estómago (por ejemplo, adenocarcinoma gástrico, linfoma, o sarcoma), o metástasis del mismo. En otra forma de realización, el cáncer es un cáncer esofágico (por ejemplo, un carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma del esófago).

El método puede ser útil para tratar un trastorno importante en cualquier estadio o subclasificación. Por ejemplo, el método puede usarse para tratar cáncer de colon en estadio temprano o tardío, o cáncer de colon de cualquiera de los estadios 0, I, IIA, lIB, IlIA, IIIB, IIIC, y IV.

En algunas formas de realización, un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención se administra en ciclos de tratamiento. Un "ciclo de tratamiento" consiste en un periodo de tratamiento, durante el cual se administra el conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención como se describió precedentemente, seguido por un periodo de descanso, durante el cual no se administra conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. El ciclo de tratamiento puede repetirse según sea necesario para alcanzar el efecto deseado.

Los conjugados de anticuerpo y fármaco descritos en la presente pueden usarse en combinación con otras terapias. Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir una composición de la presente invención coformulada con, y/o coadministrada con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más agentes anticancerígenos, por ejemplo, agentes citotóxicos o citostáticos adicionales, tratamiento con hormonas, vacunas, y/u otras inmunoterapias. En otras formas de realización, los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención se administran en combinación con otras modalidades de tratamiento terapéutico, que incluyen cirugía, radiación, criocirugía, y/o termoterapia. Dichas terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente dosificaciones menores de

los agentes terapéuticos administrados, evitando de esta manera las posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diferentes monoterapias.

Administrado "en combinación", tal como se usa en la presente, se refiere a que se administran dos (o más) tratamientos diferentes al sujeto durante el curso de la afección del sujeto con el trastorno, por ejemplo, los dos o más tratamientos se administran después que el sujeto ha sido diagnosticado con el trastorno y antes que el trastorno se haya curado o eliminado. En algunas formas de realización, la administración de un tratamiento se realiza aun cuando comienza la administración del segundo, tal que existe una superposición. Esto algunas veces es referido en la presente como administración "simultánea" o "concurrente". En otras formas de realización, la administración de un tratamiento termina antes que comience la administración del otro tratamiento. En algunas formas de realización de cualquiera de los casos, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más eficaz, por ejemplo, se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en mayor medida, que lo que se hubiese observado si el segundo tratamiento se hubiese administrado en ausencia del primer tratamiento o se observa la situación análoga con el primer tratamiento. En algunas formas de realización, la administración es tal que la reducción en un síntoma, u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor que lo que se hubiese observado con la administración de un tratamiento en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, completamente aditivo, o más que aditivo. La administración puede ser tal que aún puede observarse un efecto del primer tratamiento administrado cuando se administra el segundo.

En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención se usa en combinación con un agente quimioterapéutico. Los Ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos de daño al ADN incluyen inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo, irinotecan, topotecan, camptotecina y análogos o metabolitos de los mismos, y doxorubicina); inhibidores de topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido, tenipósido, y daunorubicina); agentes alquilantes (por ejemplo, melfalán, clorambucilo, busulfán, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, decarbazina, metotrexato, mitomicina C, y ciclofosfamida); intercaladores del ADN (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, y carboplatino); intercaladores del ADN y generadores de radicales libres tales como bleomicina; y miméticos de nucleósidos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina, e hidroxiurea).

Las terapias combinadas pueden incluir agentes quimioterapéuticos que alteran la replicación de la célula, tales como: paclitaxel, docetaxel, y análogos relacionados; vincristina, vinblastina, y análogos relacionados; talidomida, lenalidomida, y análogos relacionados (por ejemplo, CC-5013 y CC-4047); inhibidores de proteína tirosina quinasa (por ejemplo, imatinib mesilato y gefitinib); inhibidores del

proteasoma (por ejemplo, bortezomib, ixazomib, carfilzomib); inhibidores de NF-κB, que incluye inhibidores de IκB quinasa; anticuerpos que se unen a proteínas sobreexpresadas en cánceres y que por ello reducen la replicación celular (por ejemplo, trastuzumab, rituximab, cetuximab, y bevacizumab); y otros inhibidores de proteínas o enzimas que se conoce que tienen expresión aumentada, se sobreexpresan o están activadas en cánceres, cuya inhibición disminuye la replicación celular.

La selección de uno o más agentes terapéuticos o modalidad del tratamiento a combinar con un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención dependerá del trastorno a tratar. El uno o más agentes adicionales o modalidad de tratamiento puede incluir, por ejemplo, terapias aprobadas estándares para la indicación a ser tratada. Por ejemplo, cuando el conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención se usa para tratar cáncer de colon, puede usarse en combinación con, por ejemplo, cirugía; terapia con radiación; 5-fluorouracilo (5-FU), capecitibina, leucovorina, irinotecan, oxaliplatino, bevacizumab, cetuximab, panitumum, o combinaciones de los mismos (por ejemplo, oxaliplatino / capecitibina (XELOX), 5-fluorouracilo / leucovorinl-oxaliplatino (FOLFOX), 5-fluorouracilo / leucovorin / irinotecan (FOLFIRI), FOLFOX más bevacizumab, o FOLFIRI plus bevacizumab).

En otro aspecto, la invención describe el uso de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención en la elaboración de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de cáncer, por ejemplo, un cáncer gastrointestinal, por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, o cáncer de estómago. En algunas formas de realización, el cáncer es cáncer pancreático. En una forma de realización, el medicamento se usa para tratar un cáncer colorrectal, por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal, leiomiosarcoma colorrectal, linfoma colorrectal, melanoma colorrectal, o un tumor neuroendócrino colorrectal. En una forma de realización particular, el medicamento se usa para tratar cáncer metastásico de colon. En otra forma de realización, el medicamento se usa para tratar cáncer de estómago (por ejemplo, adenocarcinoma gástrico, linfoma, o sarcoma), o metástasis del mismo. En otra forma de realización, el medicamento se usa para tratar un cáncer esofágico (por ejemplo, un carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma del esófago).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos proveen formas de realización ilustrativas de la divulgación. Una persona con experiencia ordinaria en el arte reconocerá las numerosas modificaciones y variaciones que pueden realizarse sin alterar el espíritu o alcance de la divulgación. Dichas modificaciones y variaciones están abarcadas dentro del alcance de la divulgación. Los Ejemplos no limitan la divulgación en ningún sentido.

<u>Ejemplo 1</u>: Generación de una línea celular de producción de anticuerpos

Para generar un clon de línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que expresa 5F9 con una productividad mayor a 600 mg/L, se generaron vectores de expresión para 5F9 por subclonado de la región variable de la cadena liviana (SEQ ID NO:8) y de la región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO:7) en el vector de expresión pLKTOK58, conteniendo el Fc de IgG1 humano WT y el gen de resistencia a neomicina. La expresión del producto de fusión región variable-IgG1 de 5F9 está bajo el control del promotor EF-1α.

Clonado y secuenciación de las regiones variables del anticuerpo monoclonal humano 5F9 anti-GCC

Se aisló ARN total (conjunto de componentes RNeasy de Qiagen) del subclon 8.2 del hibridoma de humano 46.5F9. Este hibridoma porta la región constante Kappa "estándar" publicada de la cadena liviana (Nos. de acceso al GenBank AW383625 o BM918539) y la región constante de la cadena pesada de IgG2 "estándar" publicada (Nos. de acceso al GenBank BX640623 o AJ294731). Se sintetizó ADNc con cola de poli-G con 5' race-ready, por métodos tradicionales (*Nature Methods*, 2:629-630 (2005)). La región variable de la cadena liviana se amplificó por PCR a partir de ADNc por 5' race usando un oligo de anclaje poli-C en combinación con un cebador reverso para la región constante Kappa. La región variable de la cadena pesada se amplificó con un cebador reverso específico por la región constante de IgG2 en combinaciones múltiples con cebadores directos específicos por las secuencias líderes de la cadena pesada conocidas. Los productos de la PCR se clonaron con TOPO® (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.) y se secuenciaron con los cebadores M13F y M13R.

Construcción de los vectores de expresión de mamífero que portan el anticuerpos monoclonal humano anti-GCC 5F9

Se construyeron los vectores de expresión de mamífero que portan las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de 5F9 para generar líneas celulares CHO de producción. Para la construcción nativa, se subclonaron las regiones variables de las cadenas liviana y pesada de 5F9 en pLKTOK58D (Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 20040033561). Este vector porta dos marcadores de selección de mamífero, que incluye la resistencia a neomicina y DHFR/metotrexato (para la amplificación). El vector permite la coexpresión de ambas cadenas liviana y pesada a partir de promotores de EF-1α en tándem, cada uno localizado corriente arriba de las regiones constantes de líder-constante Kappa y líder-IgG1 del vector (Fc de tipo salvaje). Para el subclonado, se amplificaron por PCR las regiones variables de las cadenas liviana y pesada a partir de los clones TOPO de secuencia confirmada con cebadores específicos de gen que contienen sitios de restricción únicos

para el clonado direccional en las uniones de las respectivas regiones líder-Kappa y líder-IgG1 del vector. Las secuencias de los cebadores son las siguientes (las secuencias específicas de la región variable de 5F9 están con fuente en negrita):

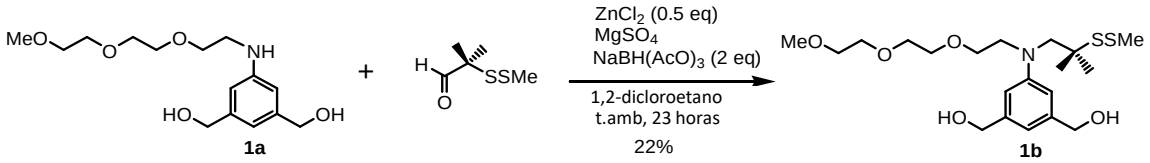
Cebadores líder-variable de la cadena liviana de 5F9 nativo:
Directo NotI
5'
*ataagaatGCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAAC AGCTACAGGTGTCCACTCC***GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTG-**3'
(SEQ ID NO:13)
Reverso BsiWI
5'- *GCCACCGTACG***TTTGATTTCCACGTTGGTCCCTTGGCCGAACGTC**-3'
(SEQ ID NO:14)
Cebadores líder-variable de la cadena pesada de 5F9 nativo:
Directo EcoRI
5' –
ccgGAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCT ACAGGTGTCCACTCC**CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGAC**-3'
(SEQ ID NO:15)
Reverso BlpI
5 '-GGAGGCTGAGC**TGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCCCCAGTGGTC**-3'
(SEQ ID NO:16)
Los clones se confirmaron por secuenciación de ADN de hebra doble de las cadenas liviana y pesada.
Se usaron dos métodos de transfección para introducir las construcciones en células CHO: el proceso MPI tradicional y el proceso Crucell. Las transfecciones de células CHO se iniciaron con la construcción de 5F9 nativo usando el proceso MPI tradicional. Se usaron ADN linealizados y no linealizados, con transfección por electroporación o Lipopfectamina 2000 CD. Se generaron aproximadamente 30 conjuntos estables mediante selección en medio sin nucleósidos G418, y metotrexato 5 nM. En base al análisis FMAT de los niveles de producción de anticuerpo, se seleccionaron tres conjuntos estables para el clonado. El conjunto con la mayor producción secretó anticuerpo a 12,2 µg/ml. Estos tres conjuntos se congelaron.
Los elementos Crucell STAR pueden evaluarse para realizar vectores de expresión de 5F9 conteniendo un elemento STAR.

Las secuencias de ácido nucleico de las cadenas pesada y liviana de 5F9 detalladas a continuación se insertaron en el vector pTOK58D.

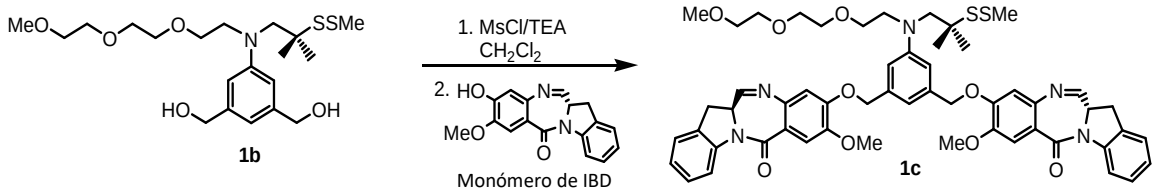
Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada de 5F9 en el vector pTOK58D:
atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactcccaggtgcagctacagcagtggggcgcaggactgttgaa
gccttcggagaccctgtccctcacctgcgctgtctttggtgggtctttcagtggttactactggagctggatccgccagcccccagggaaggggctg
gagtggattggggaaatcaatcatcgtggaaacaccaacgacaacccgtccctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacacgtccaagaa
ccagttcgccctgaagctgagttctgtgaccgccgcggacacggctgtttattactgtgcgagagaacgtggatacacctatggtaactttgaccac
tggggccagggaaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
ggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgca
caccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctg
caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccca
gcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgt
ggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgg
gaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggt
ctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccc
atcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagca
atgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaaga
gcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccggg
taaataa (SEQ ID NO:17)

Secuencia de ácido nucleico de la cadena liviana de 5F9 en el vector pTOK58D:
atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgaaatagtgatgacgcagtctccagccaccctgtctgtctc
caggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagaaacttagcctggtatcagcagaaacctggccaggctcccagg
ctcctcatctatggtgcatccaccagggccactggaatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggacagagttcactctcaccatcggcag
cctgcagtctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtataaaacctggcctcggacgttcggccaagggaccaacgtggaaatcaaacgtac
ggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccaga
gaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcac
ctacagcctcagcagcaccctgaccctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagc
t cgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEQ ID NO:18)

Ejemplo 2: Preparación de Agente Farmacológico Citotóxico CDA-1

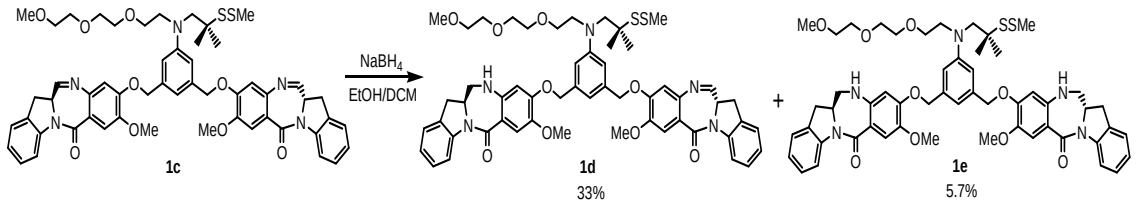


Se agregaron triacetoxiborohidruro de sodio (1,1 g, 5,18 mmol) y cloruro de zinc en polvo (353 mg, 2,59 mmol) a una solución agitada de anilina 1a (1,55 g, 5,18 mmol) y 2-(metilditio)-isobutiraldehído (0,7 mL, 5,18 mmol) en 1,2-diclorometano anhidro (20 mL), seguido por agregado de sulfato de magnesio anhidro (800 mg). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 6 horas, y luego se agregó una segunda porción de 2-(metilditio)-isobutiraldehído (0,7 mL, 5,18 mmol) y triacetoxiborohidruro de sodio (1,1 g, 5,18 mmol). Se continuó agitando a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se filtró mediante celite y se lavó con diclorometano. Se concentró el filtrado y se purificó el resto por cromatografía en gel de sílice (Combiflash, columna de 40 g, diclorometano/MeOH) para dar el compuesto **1b** (487 mg y = 22%) como aceite incoloro. También se recuperó el material inicial sin reaccionar de anilina **1a** (1,02 g) con 65% de rendimiento. ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ6,76 (s, 2H), 6,63 (s, 1H), 4,55 (s, 4H), 3,65-3,51 (m, 14H), 3,35 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,33 (s, 6H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ149,0, 142,35, 114,0, 111,1, 71,98, 70,7, 70,6, 70,5, 67,6, 65,5, 59,75, 59,1, 53,9, 51,9, 26,6, 25,7, 20,75; MS (m/z) hallada 456,2 $(M + Na)^+$.

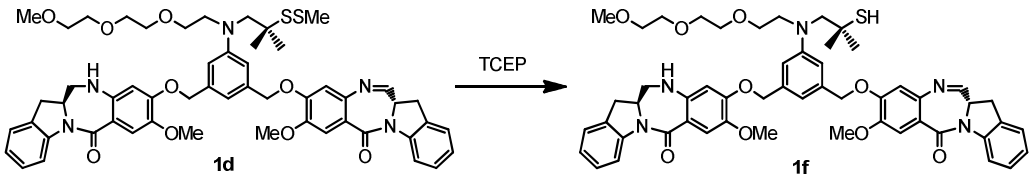


Se agregó trimetilamina (234 µL, 1,68 mmol) a una solución agitada de compuesto **1b** (243 mg, 0,56 mmol) en diclorometano anhidro (3,5 mL). Se enfrió la mezcla a -10 ºC y se agregó cloruro de metanosulfonilo (113 µL, 1,46 mmol) lentamente en 15 min a través de una jeringa. La solución se siguió agitando durante 60 min a entre -10 y -7 °C y se extinguió mediante el agregado de hielo/agua. Luego se diluyó la misma con acetato de etilo y se lavó con agua fría. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, se concentró, y se sometió a alto vacío para dar los mesilatos como aceite amarillento claro (340 mg). Se transfirieron los mesilatos a una botella de 10 mL de fondo redondo con acetato de etilo/diclorometano, se concentraron, y se sometieron a alto vacío. Se agregó monómero de IBD (412 mg, 1,4 mmol) seguido por agregado de dimetilformamida anhidra (3 mL) y carbonato de potasio anhidro (232 mg, 1,68 mmol). La mezcla amarillenta obtenida se agitó a temperatura ambiente durante una noche, luego se diluyó con diclorometano y se lavó con solución salina. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. Se disolvió el

residuo en diclorometano, se sembró en una columna de gel de sílice, y se eluyó con diclorometano/ metanol (15:1 luego 10:1). Las fracciones que contenían el compuesto **1c** se combinaron y se concentraron para dar 705 mg de producto crudo que se purificó adicionalmente por HPLC de fase reversa preparativa (columna C-18, fluida con acetonitrilo/agua) para dar el compuesto **1c** como sólido esponjoso amarillento (181 mg, y = 33%). 1H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ8,28 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,86 (d, J = 3,6 Hz, 2H), 7,59 (s, 2H), 7,31-7,26 (m, 4H), 7,12 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 6,87-6,80 (m, 5H), 5,18 (dd, J_1 = 20,8 Hz, J_2 =12,4 Hz, 4H), 4,50-4,47 (m, 2H), 3,99 (s, 6H), 3,75-3,48 (m, 18H), 3,37 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,32 (s, 6H); MS (m/z) hallada1025,9 $(M + H_2O + Na)^+$, 1043,9 $(M + 2H_2O + Na)^+$, 983,8 $(M - H)^-$, 1055,8 $(M + 4\ H_2O - H)^-$.



Se agregó borohidruro de sodio (0,9 mg, 0,023 mmol) a una solución agitada de compuesto **1c** (112 mg, 0,114 mmol) en diclorometano anhidro (0,3 mL) y etanol absoluto (0,6 mL) a 0 ºC. Se sacó el baño de hielo después de 5 min. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas y se enfrió a 0 ºC. Se extinguió la mezcla con cloruro de amonio saturado, se diluyó con diclorometano, y se separó. Se lavó la fase orgánica con solución salina, se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Na_2S0_4), se filtró mediante celite, y se concentró. Se purificó el residuo por HPLC de fase reversa (columna C-18, acetonitrilo/agua). Se extrajeron las fracciones correspondientes con diclorometano y se concentraron para obtener los productos **1d**, **1e**, y el material inicial sin reaccionar **1c**. Compuesto **1d**: 37,1 mg (y = 33%), MS (m/z): hallada 1010,4 $(M + Na)^+$, 1028,4 $(M + H_2O + Na)^+$, 1040,3 $(M + 3H_2O - H)^-$; compuesto **1e**: 6,4 mg (y = 5,7%), MS (m/z): hallada 1012,4 $(M + Na)^+$; compuesto **1c**: 44,1 mg (y = 39%).



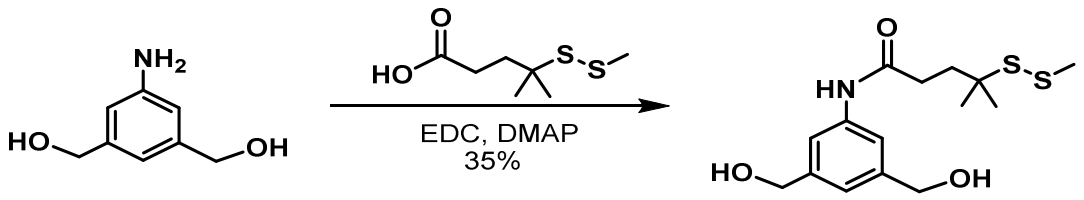
(CDA-1B)

Se agregó solución de TCEP recién preparada (17 mg de sal de HCl de TCEP neutralizada con bicarbonato de sodio saturado a pH entre 6 y 6,5, luego se diluyó con 0,5 mL de solución amortiguadora de fosfato a pH 6,5) a una solución agitada de compuesto **1d** (23,6 mg, 0,024 mmol) en acetonitrilo (3 mL) y metanol (3 mL) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a temperatura

ambiente durante 3 horas, y luego se diluyó con diclorometano y agua desionizada y se separó. Se lavó la fase orgánica con solución salina, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se filtró. Se concentró el filtrado y se sometió a alto vacío para dar 22 mg de compuesto **1f** (CDA-1B) como espuma amarillenta clara.

CDA-1A, la forma sulfonada de CDA-1B se puede preparar por tratamiento de CDA-1B con $NaHSO_3$. Véanse las condiciones de reacción ejemplificativas para convertir CDA-2B a CDA-2A en el Ejemplo 3 más adelante.

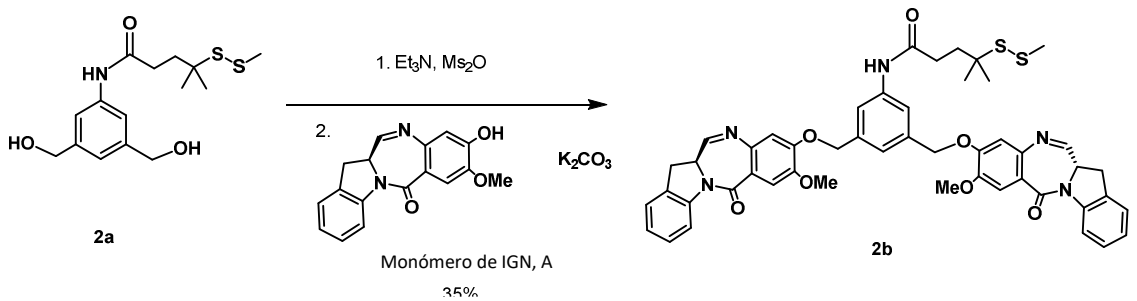
<u>Ejemplo 3</u>: Preparación de Agente Farmacológico Citotóxico CDA-2



2a

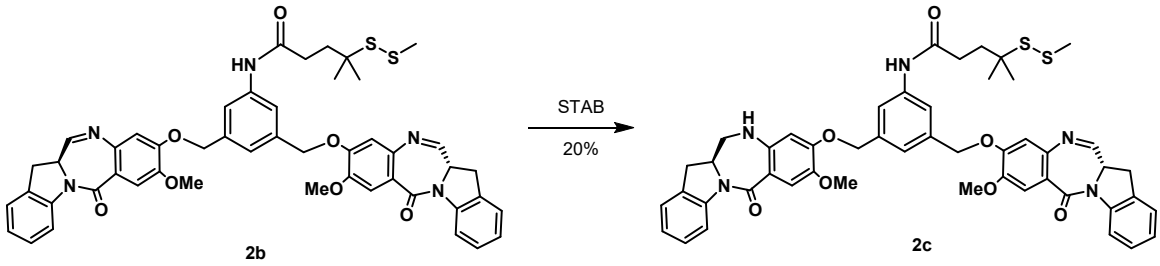
El compuesto ácido (12S,12aS)-9-((3-(4-mercapto-4-metilpentanamido)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)bencil)oxi)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-12-sulfónico (CDA-2A) se preparó como sigue:

Se agregó ácido 4-metil-4-(metildisulfanil)pentanoico (1,281 g, 6,59 mmol), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (2,53 g, 13,19 mmol), y 4-dimetilaminopiridina (0,081 g, 0,659 mmol) a una solución agitada de (5-amino-1,3-fenileno)dimetanol (1,01 g, 6,59 mmol) en dimetilformamida anhidra (16,48 mL) y tetrahidrofurano anhidro (16,48 ml). La mezcla resultante se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Se extinguió la reacción con cloruro de amonio saturado solución y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL). Se lavaron los extractos orgánicos con agua y solución salina, luego se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. La solución se filtró y concentró en vacuo y el residuo resultante se purificó por cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo/hexanos) para obtener el compuesto **2a** como un sólido blanco (0,70 g, 32% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, DMSO-*d6*: δ9,90 (s, 1H) 7,43 (s, 2H), 6,93 (s, 1H), 5,16 (t, 2H, J = 5,7 Hz), 4,44 (d, 4H, J = 5,7 Hz), 2,43 (s, 3H), 2,41-2.38 (m, 2H), 1,92-1,88 (m, 2H), 1,29 (s, 6H). MS (m/z): hallada 330,0 (M = 1)[1].



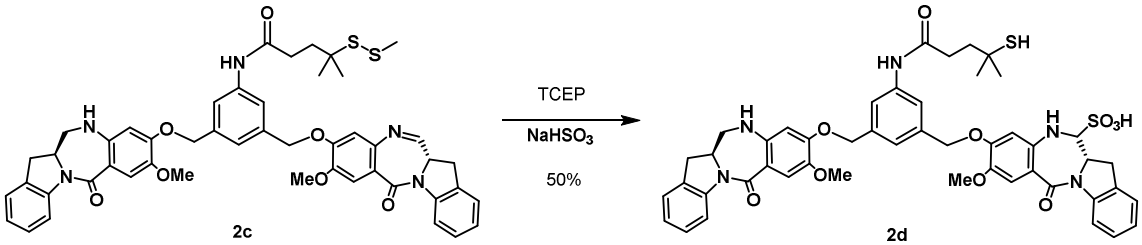
Se agregó trimetilamina (463 µl, 3,32 mmol) a solución de compuesto **2a** (219 mg, 0,665 mmol) enfriada (-10 ºC) en diclorometano anhidro (6,65 mL), seguido por agregado en forma de goteo de anhídrido metanosulfónico (298 mg, 1,662 mmol). Se agitó la mezcla a -10 ºC durante 2 horas, luego se extinguió la mezcla con hielo/agua y se extrajo con acetato de etilo frío (2 x 30 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con hielo/agua, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para obtener el dimesilato crudo.

El dimesilato crudo (227 mg, 0,467 mmol) y monómero de IGN A (303 mg, 1,028 mmol) se disolvieron en DMF anhidro (3,11 mL). Se agregó carbonato de potasio (161 mg, 1,169 mmol) y se agitó la mezcla durante 18 horas a temperatura ambiente. Se agregó agua desionizada y el precipitado resultante se filtró y lavó con agua. Se redisolvió el sólido en diclorometano y se lavó con agua. Se secó la fase orgánica con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo crudo por cromatografía en gel de sílice (metanol/diclorometano) para dar el compuesto **2b** (227 mg, 36% de rendimiento). MS (m/z): hallada 882,5 $(M + 1)^+$.



Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (37,3 mg, 0,167 mmol) a una suspensión de compuesto **2b** (227 mg, 0,167 mmol) en 1,2-dicloroetano anhidro (3,346 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora, después de lo cual se extinguió con solución saturada de cloruro de amonio. Se extrajo la mezcla con diclorometano y se lavó con solución salina. Se secó la fase orgánica con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo crudo por RP-HPLC (C-18, agua/acetonitrilo). Se extrajeron las fracciones conteniendo el producto deseado con diclorometano, se

secaron con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto **2c** (35 mg, 19% de rendimiento). MS (m/z), hallada 884,3 $(M + 1)^+$.

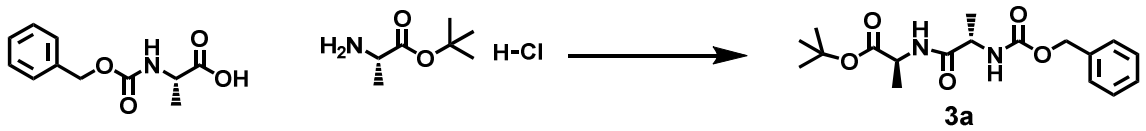


Se agregó clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (17,51 mg, 0,060 mmol), neutralizado con solución saturada de bicarbonato de sodio (0,2 mL) en solución amortiguadora de fosfato de sodio (132 µL, 0,75 M, pH 6,5), a una solución de compuesto **2c** (18 mg, 0,017 mmol) en acetonitrilo (921 µL) y metanol (658 µL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3,5 horas, luego se diluyó con diclorometano y agua desionizada. Se separó la fase orgánica, se lavó con solución salina, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para obtener el tiol crudo (CDA-2B). MS (m/z), hallada 838,3 $(M + 1)^+$.

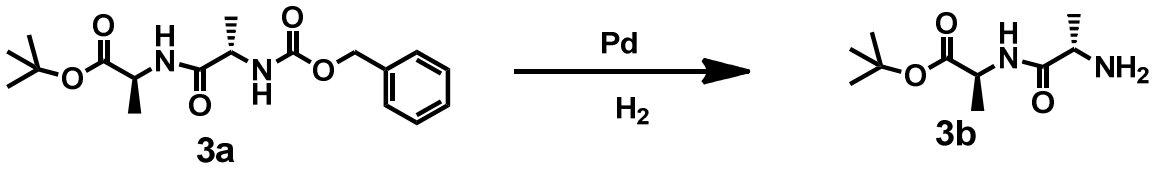
El tiol crudo (CDA-2B) (15,5 mg, 0,018 mmol) se disolvió en 2-propanol (1,23 mL). Luego se agregaron agua desionizada (617 µL) y bisulfito de sodio (5,77 mg, 0,055 mmol), y la mezcla se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. Se congeló la reacción en un baño de acetona/hielo seco, se liofilizó, y se purificó por RP-HPLC (C-18, agua desionizada/acetonitrilo). Las fracciones conteniendo el producto deseado se congelaron y liofilizaron para dar el compuesto ácido (12S,12aS)-9-((3-(4-mercapto-4-metilpentanamida)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)bencil)oxi)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-12-sulfónico (compuesto 2d o CDA-2A) (6,6 mg, 39% de rendimiento). MS (m/z), hallada 918,2 $(M - 1)^-$.

<u>Ejemplo 4</u>: Preparación del Agente Farmacológico Citotóxico CDA-3

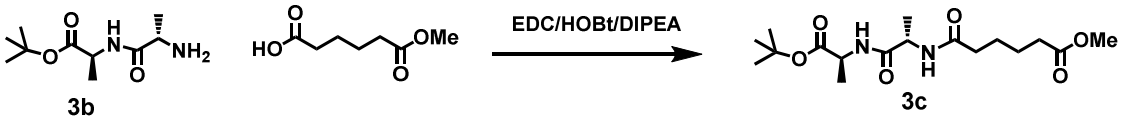
La síntesis de 2,5-dioxopirrolidin-1-il 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato (CDA-3B) se llevó a cabo como sigue:



Se disolvieron ácido (S)-2-(((benciloxi)carbonil)amino)propanoico (5 g, 22,40 mmol) y clorhidrato de (S)-tert-butil 2-aminopropanoato (4,48 g, 24,64 mmol) en DMF anhidro (44,8 mL), y se agregaron EDC·HCl (4,72 g, 24,64 mmol), HOBt (3,43 g, 22,40 mmol), y DIPEA (9,75 mL, 56,0 mmol). La reacción se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y luego se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado, agua, y solución salina. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se concentró. Se purificó el aceite crudo a través de cromatografía en gel de sílice (hexanos/acetato de etilo) para dar el compuesto **3a** (6,7 g, 85% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,38-7,31 (m, 5H), 6,53-6,42 (m, 1H), 5,42-5,33 (m, 1H), 5,14 (s, 2H), 4,48-4,41 (m, 1H), 4,32-4,20 (m, 1H), 1,49 (s, 9H), 1,42 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 1,38 (d, 3H, J = 7,2 Hz).

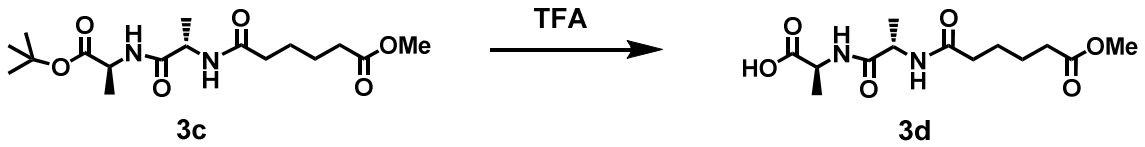


El compuesto **3a** (6,7 g, 19,12 mmol) se disolvió en metanol (60,7 mL) y agua (3,03 mL). Se purgó la solución con argón durante 5 min. Se agregó lentamente paladio sobre carbono (húmero, 10%) (1,017 g, 0,956 mmol). La reacción se agitó durante una noche bajo una atmósfera de hidrógeno. La solución se filtró mediante celite, se lavó con metanol, y se concentró. Luego se azeotropó con metanol y acetonitrilo, y el aceite resultante se colocó directamente en alto vacío para dar el compuesto **3b** (4,02 g, 97% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,78-7,63 (m, 1H), 4,49-4,42 (m, 1H), 3,55-3,50 (m, 1H), 1,73 (s, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,39 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,36 (d, 3H, J = 6,8 Hz).

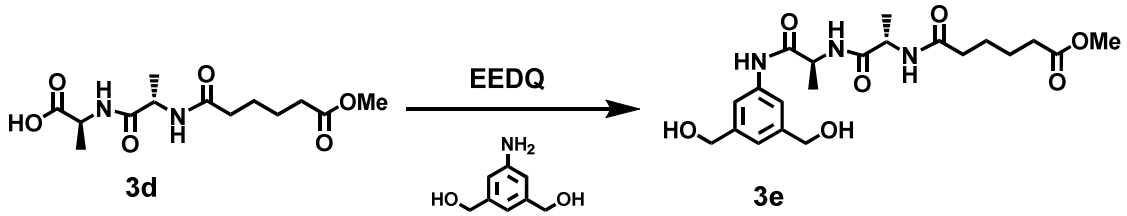


El compuesto **3b** (4,02 g, 18,59 mmol) y mono metiladipato (3,03 mL, 20,45 mmol) se disolvieron en DMF anhidro (62,0 mL). Se agregaron EDC·HCl (3,92 g, 20,45 mmol), HOBt (2,85 g, 18,59 mmol) y DIPEA (6,49 mL, 37,2 mmol). Se agitó la mezcla durante una noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano/metanol (150 mL, 5:1), y se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado, y solución salina. Se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y limpió. El

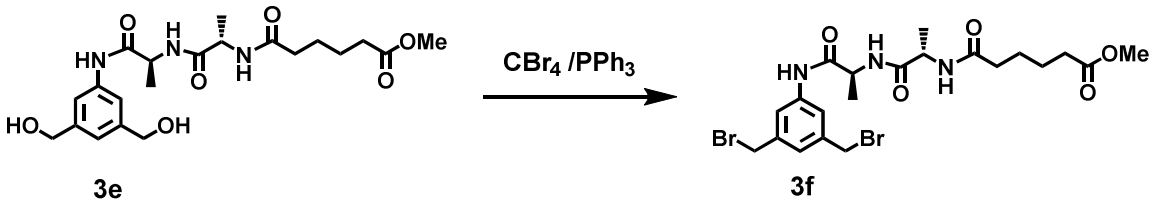
compuesto se azeotropó con acetonitrilo (5X), luego se sometió a alto vacío a 35 °C para dar el compuesto **3c** (6,66 g, 100% de rendimiento). Se usó el material crudo al siguiente paso sin purificación. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6,75 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 6,44 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 4,52-4,44 (m, 1H), 4,43-4,36 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 2,35-2,29 (m, 2H), 2,25-2,18 (m, 2H), 1,71-1,60 (m, 4H), 1,45 (s, 9H), 1,36 (t, 6H, J = 6,0 Hz).



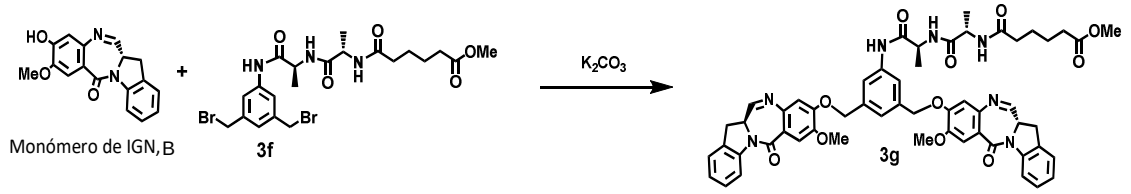
El Compuesto **3c** (5,91 g, 16,5 mmol) se agitó en TFA (28,6 mL, 372 mmol) y agua desionizada (1,5 mL) a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró con acetonitrilo y se colocó bajo alto vacío para dar el compuesto crudo **3d** como sólido pegajoso (5,88 g, 100% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,21 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 6,81 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 4,69-4,60 (m, 1H), 4,59-4,51 (m, 1H), 3,69 (s, 3H), 2,40-2,33 (m, 2H), 2,31-2,24 (m, 2H), 1,72-1,63 (m, 4H), 1,51-1,45 (m, 3H), 1,42-1,37 (m, 3H).



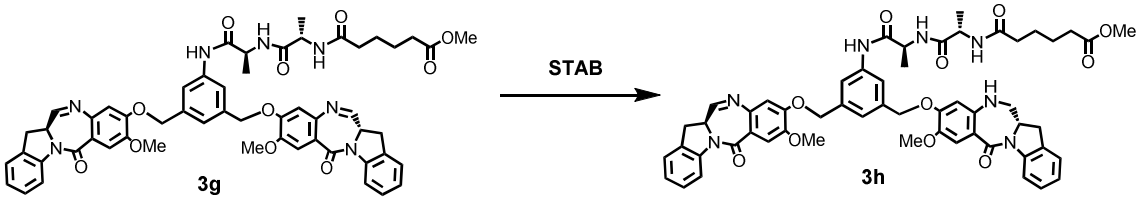
El Compuesto **3d** (5,6 g, 18,52 mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (118 mL) y metanol anhidro (58,8 mL). Luego se agregaron (5-amino-1,3-fenileno)dimetanol (2,70 g, 17,64 mmol) y EEDQ (8,72 g, 35,3 mmol), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se limpió el solvente y se agregó acetato de etilo. La lechada resultante se filtró, se lavó con acetato de etilo, y se secó bajo vacío/N_2 para dar el compuesto **3e** (2,79 g, 36% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6): δ 9,82 (s, 1H), 8,05, (d, 1H, J = 9,2 Hz), 8,01 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 7,46 (s, 2H), 6,95 (3, 1H), 5,21-5,12 (m, 2H), 4,47-4,42 (m, 4H), 4,40-4,33 (m, 1H), 4,33-4,24 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 2,33-2,26 (m, 2H), 2,16-2,09 (m, 2H), 1,54-1,46 (m, 4H), 1,30 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,22 (d, 3H, J = 4,4 Hz).



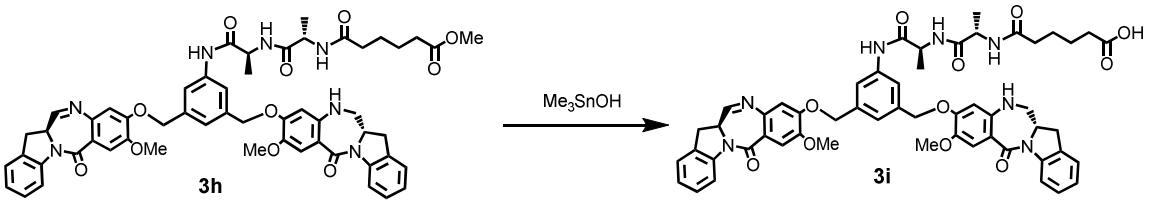
El Compuesto **3e** (0,52 g, 1,189 mmol) y tetrabromuro de carbono (1,183 g, 3,57 mmol) se disolvieron en DMF anhidro (11,89 mL). Luego se agregó trifenilfosfina (0,935 g, 3,57 mmol), y la reacción se agitó bajo argón durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (10:1) y se lavó con agua y solución salina, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El material crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para dar el compuesto **3f** (262 mg, 39% de rendimiento). 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6): δ10,01 (s, 1H), 8,11 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 8,03 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 7,67 (s, 2H), 7,21 (s, 1H), 4,70-4,64 (m, 4H), 4,40-4,32 (m, 1H), 4,31-4,23 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 2,34-2,26 (m, 2H), 2,18-2,10 (m, 2H), 1,55-1,45 (m, 4H), 1,31 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,21 (d, 3H, J = 7,2 Hz).



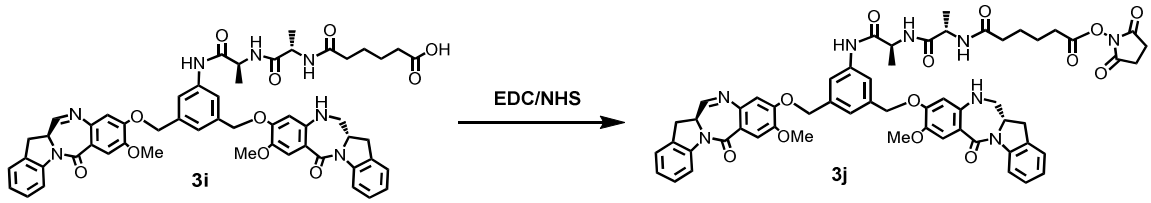
Se disolvieron el dibromuro de compuesto **3f** y monómero de IGN B en DMF. Se agregó carbonato de potasio y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se agregó agua a la mezcla de reacción para precipitar el producto. La lechada se agitó a temperatura ambiente y luego se filtró y se secó bajo vacío/N_2. El material crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice (diclorometano/ metanol) para dar el compuesto 3g (336 mg, 74% de rendimiento). LCMS = 5,91 min (método de 15 min). MS (m/z): 990,6 $(M + 1)^+$.



Se disolvió compuesto diimina **3g** en 1,2-dicloroetano. Se agregó $NaBH(OAc)_3$ (STAB) a la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se extinguió con solución saturada de NH_4Cl. Se separaron las capas y se lavaron con solución salina, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El material crudo se purificó a través de RPHPLC (columna de C-18, acetonitrilo/agua) para dar el compuesto **3h** (85,5 mg, 25% de rendimiento). LCMS =6,64 min (método de 15 min). MS (m/z): 992,6 $(M + 1)^+$.



El Compuesto **3h** se disolvió en 1,2-dicloroetano. Se agregó trimetilestananol a la mezcla de reacción y se calentó a 80 ºC durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió luego a temperatura ambiente y se diluyó con agua. Se acidificó la fase acuosa a pH ~ 4 con HCl 1 M. Se extrajo la mezcla con CH_2Cl_2/MeOH. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con solución salina, se secaron sobre Na_2SO_4, y se concentraron. Se pasó el material crudo por un tapón de sílice para dar el compuesto **3i** (48,8 mg, 80% de rendimiento). LCMS = 5,89 min (método de 15 min). MS (m/z): 978,6 $(M + 1)^+$.



Se agregó EDC·HCl a una solución agitada de compuesto ácido **3i** y N-hidroxisuccinamida en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con agua y solución salina. Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El material crudo se purificó mediante RPHPLC (columna de C-18, acetonitrilo/agua) para dar 2,5-dioxopirrolidin-1-il 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino [1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6] [1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil) fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato, compuesto **3j** o CDA-3B (8,2 mg, 30% de rendimiento). LCMS = 6,64 min (método de 15 min). MS (m/z): 1075,4 $(M + 1)^+$.

CDA-3A, la forma sulfonada de CDA-3B, se puede preparar por tratamiento de CDA-3B con $NaHSO_3$. Véanse las condiciones de reacción ejemplificativas para convertir CDA-2B a CDA-2A en el Ejemplo 3 precedentemente.

<u>Ejemplo 5</u>: Preparación de Conjugados de Anticuerpo y Fármaco

A. Preparación de hu5F9-CDA-1

i. Conjugación

Se intercambió el anticuerpo 5F9 humano en solución amortiguadora de HEPES 15 mM a pH 8,5 antes de la conjugación. Luego se hicieron los conjugados siguiendo un protocolo de reacción de 2 pasos.

En el paso 1, se tituló el conector sulfo-SPDB (véase, por ejemplo, el párrafo [042], Patente de los EE.UU. 8.236.319) con anticuerpo 5F9 (exceso molar representativo descrito en la Tabla 2) en una proporción 97/3 acuosa:orgánica de HEPES 15 mM, pH 8,5 y dimetilacetamida (DMA) a una concentración final de anticuerpo de 4 mg/mL. Esta mezcla de reacción se incubó durante 2 horas en un baño de agua a 25 °C, y luego se purificó como se describe más adelante.

En el paso 2, se agregaron 1,5 equivalentes molares de CDA-1 sobre el sulfo-SPDB a la mezcla de anticuerpo-conector en una proporción 85/15 acuosa:orgánica de HEPES 15 mM, pH 8,5 y DMA. Esta mezcla de reacción se incubó durante 4 horas en un baño de agua a 25 °C antes de su purificación en solución amortiguadora de formulación (histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, 8,5% de sacarosa, 0,01% de Tween-20, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2).

Tabla 2

Conjugado	**Exceso molar de sulfo-SPDB**	**Escala de conjugación (mg)**	**Rendimiento de conjugación**
5F9-CDA-1	7,0	50	35%

ii. Purificación

La mezcla de reacción 5F9-sulfo-SPDB se purificó usando columnas de Sephadex G-25 NAP equilibradas en fosfato de potasio 10 mM, pH 7,9. La mezcla de reacción purificada se filtró usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm antes del análisis de la proporción de conector a anticuerpo (LAR).

La mezcla de reacción de conjugación de 5F9-sulfo-SPDB-CDA-1 (5F9-CDA-1) se filtró a través de columnas de filtración en gel de Sephadex G-25 equilibradas con histidina 20 mM, cloruro de sodio 50 mM, 8,5% de sacarosa, 0,01% de Tween-20, y bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2. El conjugado purificado se filtró usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm y se almacenó durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, se filtró nuevamente el conjugado sulfonado usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm antes de su análisis.

B. Preparación de hu5F9-CDA-2

i. Conjugación

Se intercambió el anticuerpo 5F9 humano en solución amortiguadora de HEPES 15 mM a pH 8,5 antes de la conjugación. Luego se elaboraron los conjugados usando un protocolo de reacción de dos pasos. En el paso 1, se tituló el conector de sulfo-SPDB con anticuerpo 5F9 (exceso molar representativo

descrito en la Tabla 3) en una proporción 97/3 acuosa:orgánica de HEPES 15 mM a pH 8,5 y DMA a una concentración final de anticuerpo de 4 mg/mL. Esta mezcla de reacción se incubó durante 2 horas en un baño de agua a 25 °C, y luego se purificó como se describe más adelante.

En el paso 2, se agregaron 1,5 molar de CDA-2 sobre sulfo-SPDB a la mezcla de anticuerpo-conector en una proporción 85/15 acuosa:orgánica de HEPES 15 mM a pH 8,5 y DMA. Esta mezcla de reacción se incubó durante 4 horas en un baño de agua a 25 °C antes de su purificación en solución amortiguadora de formulación (histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, 8,5% de sacarosa, 0,01% de Tween-20, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2).

Tabla 3

Conjugado	**Exceso molar de sulfo-SPDB**	**Escala de conjugación (mg)**	**Rendimiento de conjugación**
5F9-CDA-2	8,0	20	23%

ii. Purificación

Se purificó la mezcla de reacción de 5F9-sulfo-SPDB usando columnas de Sephadex G-25 NAP equilibradas en fosfato de potasio 10 mM, pH 7,9. La mezcla de reacción purificada se filtró usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm antes del análisis de la LAR.

La mezcla de reacción de conjugación 5F9-sulfo-SPDB-CDA-2 (5F9-CDA-2) se filtró a través de columnas de filtración de gel Sephadex G-25 equilibradas con histidina 20 mM, cloruro de sodio 50 mM, 8,5% de sacarosa, 0,01% de Tween-20, y bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2. El conjugado purificado se filtró usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm y se almacenó durante una noche a 4 °C. Al día siguiente se filtró nuevamente el conjugado sulfonado usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm antes de su análisis.

C. Preparación de hu5F9-CDA-3

i. Conjugación y purificación: Protocolo de plataforma

El anticuerpo 5F9 de humano se intercambió con solución amortiguadora en HEPES 15 mM, pH 8,5 antes de la conjugación. Luego se prepararon los conjugados 5F9-CDA-3 usando la forma sulfonatada de CDA-3, CDA-3A. El CDA-3A inicialmente se sulfonató mediante la incubación de CDA-3B con un exceso molar de 5 veces de bisulfito y succinato de sodio 50 mM (pH 5,0) en una solución orgánica:acuosa 90/10 a temperatura ambiente durante 3 horas seguido por incubación durante la noche a 4 °C. La reacción de conjugación luego se realizó usando 2,0 mg/ml de anticuerpo 5F9 en

HEPES 15 mM, pH 8,5 y con agregado de CDA-3A en un exceso molar específico en base al anticuerpo (véase la Tabla 4 para la conjugación representativa). La reacción de conjugación tuvo una composición acuosa:orgánica 90/10 final de HEPES 15 mM, pH 8,5 y DMA, y se incubó en un baño de agua a 25 °C durante 4 horas antes de la purificación en solución amortiguadora de formulación (histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2).

La mezcla de reacción de conjugación de 5F9-CDA-3 se purificó usando columnas de Sephadex G-25 NAP equilibradas con histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, y bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2. El conjugado purificado se filtró usando un filtro de PVDF de jeringa de 0,22 µm y se dializó durante la noche contra solución amortiguadora de formulación fresca a 4 °C, seguido por diálisis a temperatura ambiente durante 4 horas usando solución amortiguadora de formulación fresca. El conjugado se volvió a filtrar usando un filtro de PVDF de jeringa de 0,22 µm antes del análisis.

Tabla 4

Conjugado	**Exceso molar de CDA-3 sulfonado**	**Escala de conjugación (mg)**	**Rendimiento de conjugación**
5F9-CDA-3	5,4	220	24%

ii. Conjugación y purificación: Protocolo optimizado I

Se exploraron diferentes parámetros que incluyen fuerza isotónica, conductividad, pH, concentración de la reacción, y equivalentes molares de CDA-3 para optimizar el rendimiento del conjugado 5F9-CDA-3 deseado. De estos resultados surgió un protocolo optimizado utilizando solución amortiguadora EPPS 75 mM, pH 8,0. Similar al protocolo de plataforma estándar, se hicieron conjugados 5F9-CDA-3 usando CDA-3A sulfonado (preparado como se describe en la sección previa). La reacción de conjugación optimizada se realizó usando 2,0 mg/ml de anticuerpo 5F9 en EPPS 75 mM, pH 8,0 y con el agregado de CDA-3A en un exceso molar específico en base al anticuerpo (véase la Tabla 5 para la conjugación representativa). La reacción de conjugación tuvo una composición acuosa:orgánica 90/10 final de EPPS 75 mM, pH 8,0 y DMA, y se incubó en un baño de agua a 25 °C durante 4 horas antes de la purificación en solución amortiguadora de formulación (histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2).

La mezcla de la reacción de conjugación de 5F9-CDA-3 se purificó usando columnas de Sephadex G-25 NAP equilibradas con histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, y bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2. El conjugado se filtró usando un filtro de PVDF de jeringa de 0,22 µm

y se dializó durante la noche contra solución amortiguadora de formulación fresca a 4 °C, seguido por diálisis a temperatura ambiente durante 4 horas usando solución amortiguadora de formulación fresca. El conjugado se volvió a filtrar usando un filtro de PVDF de jeringa de 0,22 µm antes del análisis.

Tabla 5

Conjugado	**Exceso molar de CDA-3 sulfonado**	**Escala de conjugación (mg)**	**Rendimiento de conjugación**
5F9-CDA-3	4,0	60	64%

iii Conjugación y Purificación: Protocolo optimizado II

Sulfonación optimizada

El CDA-3B se sulfonató como a continuación para generar CDA-3A. A 3,75 ml de succinato de sodio 50 mM, pH 3,3, se agregó DMA en la cantidad de 6,11 ml. Después de mezclar y equilibrar a 10 ºC en un baño de agua, se agregaron y mezclaron 1,39 ml de una solución madre de CDA-3B 21,5 mM en DMA (30,0 µmol de CDA-3). Luego de este agregado, se introdujeron 3,75 ml de una solución acuosa de bisulfito de sodio 20 mM (2,5 equivalentes, 75 µmol) a la reacción. Después de mezclar, la reacción se dejó proceder a 10 ºC durante 15,5 horas y se usó inmediatamente en el próximo paso sin purificación. El análisis por cromatografía líquida (fase reversa) de la mezcla de reacción indicó un 92,4% de conversión a CDA-3A con un 2,4% remanente de CDA-3B sin reaccionar que se muestra en la Figura 9A. La identidad del pico de CDA-3A se confirmó por LC/MS como se muestra en la Figura 9B.

Detención posterior a la conjugación

Con el objetivo de determinar una condición en donde un aumento en la fuerza iónica posterior a la conjugación produce una disminución en la formación de las especies de alto peso molecular (HMW), se llevó a cabo la siguiente optimización. El anticuerpo 5F9 (2 mg/ml) se conjugó a 3,8 equivalentes molares de CDA-3A a 22°C durante entre 80 y 90 minutos. La composición final de la reacción de conjugación comprendió EPPS 130 mM, pH 8,7 con DMA 15% en volumen. Inmediatamente al completarse la reacción de conjugación, se diluyeron las alícuotas con el volumen indicado de la solución de detención como se describe en la Tabla 6. Los cambios en el porcentaje de las especies de HMW se monitoreó durante el tiempo indicado mantenido a 22°C. En base a este hallazgo, se seleccionaron las diluciones entre 1,4 y 1,6 veces usando EPPS 750 mM, y diluciones entre 1,4 y 1,6 veces usando EPPS 750 mM /clorhidrato de histidina 150 mM. En el siguiente ejemplo de conjugación, se usó una dilución de 1,5 veces usando EPPS 750 mM/clorhidrato de histidina 150 mM. En la Tabla 6

se describen los efectos de las soluciones de detención sobre la estabilidad del conjugado 5F9-CDA-3 en crudo. El conjugado 5f9-CDA-3 en crudo se incubó con diferentes soluciones de detención durante la cantidad específica de tiempo y se determinaron los cambios en el porcentaje de especies de peso molecular por cromatografía de exclusión molecular.

Tabla 6

Experimento	Solución de detención	Veces de dilución	Reacción en crudo (ml)	Volumen de solución de detención (ml)	Tiempo luego del mezclado (min)	Δ %HMW (inicial-final)*	Precipitación visible
1	Ninguna (control para los experimentos 2-6)	NA	0,5	NA	720	2,0	No
2	6,7% de peso en volumen de sacarosa, bisulfito de sodio 50 µM	2,0	0,5	0,5	760	NA	Sí
3	13,4% de peso en volumen de sacarosa, bisulfito de sodio 50 µM	2,0	0,5	0,5	800	NA	sí

4	20% de peso en volumen de sacarosa, bisulfito de sodio 100 µM	1,5	0,5	0,25	840	NA	sí
5	histidina 50 mM, 6,7 % de peso en volumen de sacarosa, bisulfito de sodio 50 µM, pH 5,5	2,0	0,5	0,5	880	NA	sí
6	EPPS 130 mM, bisulfito de sodio 50 µM, pH 8,7	2,0	0,5	0,5	920	NA	sí
7	Ninguna (control para los experimentos 8-13)	NA	0,5	NA	850	2,4	no
8	Ácido succínico 400 mM, bisulfito de sodio 50 µM	1,2	0,5	0,075	890	4,2	No
9	Ácido succínico 60 mM, bisulfito de sodio 50 µM	2,0	0,5	0,5	930	2,3	no

10	Ácido succínico 60 mM, sacarosa 13,4%, bisulfito de sodio 50 µM	2,0	0,5	0,5	970	4,2	no
11	EPPS 300 mM, bisulfito de sodio 50 µM, pH 8,7	2,0	0,5	0,5	1010	1,0	no
12	EPPS 500 mM, bisulfito de sodio 50 µM, pH 8,7	2,0	0,5	0,5	1050	0,8	no
13	EPPS 700 mM, bisulfito de sodio 50 µM, pH 8,7	2,0	0,5	0,5	1090	0,6	no
14	Ninguna (control para los experimentos 15-20)	NA	1,0	NA	880	2,9	no
15	Clorhidrato de histidina 600 mM	1,4	1,0	0,4	600	2,8	No
16	Clorhidrato de histidina 600 mM	1,5	1,0	0,5	640	3,2	no
17	Clorhidrato de histidina 600 mM	1,6	1,0	0,6	680	3,6	no
18	Clorhidrato de histidina 600 mM, 20% de peso en volumen de sacarosa	1,4	1,0	0,4	720	2,7	no
19	Clorhidrato de histidina 600 mM, 20% de peso en volumen de sacarosa	1,5	1,0	0,5	760	2,9	no

20	clorhidrato de histidina 600 nM, 20% de peso en volumen de sacarosa	1,6	1,0	0,6	800	2,9	no
21	Ninguna (control de los experimentos 22-27)	NA	1,0	NA	840	2,2	no
22	EPPS 750 mM	1,4	1,0	0,4	600	0,4	no
23	EPPS 750 mM	1,5	1,0	0,5	640	0,5	No
24	EPPS 750 mM	1,6	1,0	0,6	680	0,4	no
25	EPPS 750 mM, clorhidrato de histidina 150 mM	1,4	1,0	0,4	720	0,5	no
26	EPPS 751 mM, clorhidrato de histidina 150 mM	1,5	1,0	0,5	760	0,5	no
27	EPPS 752 mM, clorhidrato de histidina 150 mM	1,6	1,0	0,6	800	0,5	no

* Calculado por sustracción del % de HMW del control apropiado a t=0 min del experimento %HMW al tiempo indicado en la tabla.

Conjugación y Purificación optimizados

En un reactor de vidrio con camisa de 1 L equipado con un agitador superior conteniendo 325 ml de EPPS 130 mM, pH 8,7, 68,6 ml de DMA. Luego del mezclado y equilibrado de la solución a 22 ºC, se introdujeron 100 ml de una solución 10,0 mg/ml de anticuerpo 5F9 en EPPS 130 mM, pH 8,7 al reactor y se dejó mezclar durante 15 minutos. Posteriormente se introdujeron 12,8 ml de la solución 2 mM de CDA-3A (25,5 µmol, 3,7 equivalentes de anticuerpo 5F9; preparado usando el protocolo de sulfonación optimizado descrito previamente) a la solución de reacción. Después de agitar durante 60 min a 22 ºC, se transfirieron 250 ml de una solución acuosa conteniendo clorhidrato de histidina 150 mM y EPPS 750 mM al recipiente de reacción. Después de mezclar vigorosamente, este material se filtró a través de un filtro Millipore Optiscale 47 Express SHC 0,5/0,2 µM. La mezcla de reacción en crudo luego se concentró por ultrafiltración con un casete TangenX 0,02 m^2 HyStream 30 kD Sius LSN TFF a una concentración de proteína en bruto calculada de 2,5 mg/ml. Luego del paso de concentración, la solución se diafiltró contra 4,8 L de una solución amortiguadora de histidina 50 mM, 6,7 % de peso en volumen (peso/volumen) de sacarosa, 0,1% de volumen en volumen (volumen/volumen) de polisorbato-80, bisulfito de sodio 50 µM, pH 5,5. Después de la diafiltración, la solución de retentato se filtró con un filtro Millipore Optiscale 47 Express SHC 0,5/0,2 µM. Luego del almacenamiento a entre 2 y 8 ºC durante 2 d, la solución se diluyó a 1,0 mg/ml de conjugado por agregado del volumen necesario de solución amortiguadora adicional de histidina 50 mM, sacarosa 6,7% de peso en volumen sacarosa, polisorbato-80 0,1% de volumen en volumen, bisulfito de sodio 50 µM, pH 5,5. Esta solución luego se filtró mediante un filtro Millipore Optiscale 47 Durapore 0,22 µM dando 818 ml de conjugado 1,0 mg/ml. La DAR medida del conjugado final es 2,6 por UV/vis con 97,4% de monómero y 2,5% de HMW por SEC. El rendimiento final del producto fue 82%.

D. Preparación de 5F9-PVAdG-CDA-3

Se usó el protocolo descrito en la sección previa utilizando solución amortiguadora EPPS 75 mM, pH 8,0 para preparar el conjugado 5F9-PVAdG-CDA-3. El anticuerpo 5F9-PVAdG contiene sustituciones de aminoácido que reemplazan a ELLG en la cadena pesada de IgG1 (SEQ ID NO:9), que son importantes para la unión de FcɣRIIIb, con PVA, los aminoácidos altamente conservados en IgG2 en el lugar análogo (Vidarsson y col., IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, Frontiers in Immunology, 5(520): 1-17(2014)).

La reacción de conjugación se llevó a cabo usando anticuerpo 5F9 PVAdG a 2,0 mg/ml en EPPS 75 mM, pH 8,0 con el agregado de CDA-3A sulfonado con un exceso molar específico en base al anticuerpo (véase la Tabla 6 para la conjugación representativa). La reacción de conjugación tuvo una

composición acuosa:orgánica 90/10 final de EPPS 75 mM, pH 8,0 y DMA, y se incubó en un baño de agua a 25 °C durante 4 horas antes de la purificación en solución amortiguadora de formulación (histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2).

La mezcla de reacción de conjugación de 5F9-PVAdG-CDA-3 se purificó usando columnas de Sephadex G-25 HiPrep equilibradas con histidina 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, sacarosa 8,5%, Tween-20 0,01%, bisulfito de sodio 50 µM, pH 6,2. El conjugado purificado se filtró usando un filtro de PVDF de jeringa de 0,22 µm antes del análisis.

Tabla 7

Conjugado	**Exceso molar de CDA-3 sulfonado**	**Escala de conjugación (mg)**	**Rendimiento de conjugación**	**Relación de CDA-3 / anticuerpo**	**Conjugado monomérico**
5F9-PVAdG-CDA-3	3,9	98	78%	2.85	99%

<u>Ejemplo 6</u>: Análisis de los conjugados de anticuerpo y fármaco

A. Determinación de la relación Conector a Anticuerpo (LAR)

La concentración del anticuerpo en 5F9-sulfo-SPDB purificado se determinó por espectroscopia en el rango ultravioleta/visible (UV/Vis) usando valores de absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción para el anticuerpo 5F9 (ε= 224.000 M^{-1}; Tabla 8). La concentración del conector sulfo-SPDB se midió asumiendo una relación 1:1 de molécula unida por tiopiridina liberada por el tratamiento con ditiotreitol (DTT) en solución amortiguadora pH 7,5, seguido por un ensayo en UV/Vis a 343 nm (ε= 8.080 M^{-1}). La relación de concentraciones molares de conector a anticuerpo se informa como el valor LAR.

B. Determinación de la relación de fármaco a anticuerpo (DAR)

La concentración de anticuerpo 5F9 y CDA en muestras de conjugado purificado se determinó por UV/Vis usando valores de absorbancia a 280 nm y 330 nm. Debido a que el anticuerpo y los CDA absorben a 280 nm, se requirió una ecuación binomial para considerar la porción de señal total atribuible a cada unidad. Los CDA solos absorben a 330 nm, por lo tanto la concentración a esa longitud de onda puede atribuirse solamente a la molécula efectora. Los valores de coeficiente de extinción de la unidad conjugada se describen en la Tabla 7.

Los componentes anticuerpo y CDA se cuantificaron usando las siguientes expresiones algebraicas, que tienen en cuenta la contribución de cada constituyente a cada longitud de onda:

$C_{CDA} = A_{330} / \varepsilon_{330\ nm\ IGN}$

$C_{Ab} = (A_{280} - (\varepsilon_{280\ nm\ IGN}/\varepsilon_{330\ nm\ IGN}) \times A_{330}) / \varepsilon_{280\ nm\ Ab}$

A_x es el valor de absorbancia a la longitud de onda X nm, mientras que C_{Ab} es la concentración molar del anticuerpo (es decir, 5F9) y C_{CDA} es la concentración molar de CDA. La relación de CDA:Ab (DAR) se calculó como la relación de las concentraciones molares anteriores. Las concentraciones en mg/ml (g/L) de 5F9 y CDA se calcularon usando los pesos moleculares que se describen en la Tabla 8.

Tabla 8

Porción	**MW de unidad conjugada* (g/mol)**	**ε_{280} ($M^{-1}cm^{-1}$)**	**ε_{330} ($M^{-1}cm^{-1}$)**
5F9 anticuerpo	144.898	224.000	n/a
CDA-1	942	30.115	15.484
CDA-2	838	30.115	15.484
CDA-3	961	30.115	15.484
CDA-3*	961	34.150	16.270

*Recalculado usando protocolo alternativo para usar en Conjugación y Purificación: Protocolo optimizado II.

C. Determinación del porcentaje de conjugado monomérico

El porcentaje de conjugado monomérico en muestras de 5F9-CDA purificado se determinó mediante análisis por HPLC usando cromatografía de exclusión molecular (SEC). Se inyectaron aproximadamente entre 10 y 100 µg de conjugado 5F9-CDA en un instrumento de HPLC con una columna SEC unida (TSK GEL G3000SWxl 5 µm, 7,8 mm x 30 cm, No. de Parte 08541; columna de protección recomendada TSK GEL, 4 cm, No. de Parte 08543, TOSOH Biosciences, King of Prussia, PA), y se corrió a 0,5 ml por minuto con una fase móvil isocrática de perclorato de sodio 400 mM, fosfato de sodio 50 mM, isopropanol 5%. Se recolectó la señal de absorbancia durante 30 minutos a longitud de ondas de 280 nm y 330 nm.

El monómero del anticuerpo 5F9 típicamente eluyó a aproximadamente 17 minutos, mientras que el monómero conjugado de 5F9-CDA con frecuencia eluyó como un doblete con picos a aproximadamente 17 y aproximadamente 19 minutos. Las especies de alto peso molecular (HMW, por

ejemplo, dímero, agregado) y las especies de bajo peso molecular (LMW, por ejemplo, fragmento) típicamente eluyeron a aproximadamente 12 y aproximadamente 24 minutos, respectivamente.

El % de anticuerpo monomérico (o conjugado) se calculó a partir del área del pico a 280 nm del pico de los 17 minutos (o el doblete 17/19), y se comparó con el área de todos los picos de proteínas combinados. La DAR para el pico del monómero también se determinó por sustitución de las áreas de pico de las señales a 280 nm y 330 nm en los espacios A_{280} y A_{330} en las ecuaciones C_{CDA} y C_{Ab} que se muestran en la sección anterior, y luego dividiendo C_{CDA}/C_{Ab}.

D. Determinación del porcentaje de CDA no conjugado

La cantidad de CDA no conjugado ("fármaco libre") presente en las muestras de 5F9-CDA purificado se determinó mediante el análisis por UPLC usando SEC en tándem y columnas en fase reversa C-18 ("columna dual"). Se conectaron dos columnas Waters Acquity UPLC Protein BEH SEC (1,7 µm, 4,6 x 30 mm, No. de Parte 186005793, Waters Corporation, Milford, MA) en serie para separar el conjugado de 5F9-CDA intacto del fármaco libre, que luego se canalizó a una columna Waters Cortecs UPLC C-18 (2,1 x 50 mm, No. de Parte 186007093) para separar y cuantificar las especies de CDA libre. El conjugado 5F9-CDA se preparó por dilución con acetonitrilo (ACN) a 20% (volumen en volumen) de ACN, se inyectó en la serie de columnas (25 µL), y se corrió de acuerdo con el gradiente que se describe en la Tabla 9:

Tabla 9

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
0,0	0,35	70	30
1,0	0,35	70	30
8,0	0,35	20	80
9,0	0,35	5	95
10,0	0,35	5	95
10,1	0,35	70	30
11,0	0,35	70	30
12,0	0,35	70	30
13,5	0,35	70	30
14,0	0,35	95	5
20,0	0,35	95	5
21,0	0,0	95	5

Tabla 9: Tasa de flujo = 0,35 ml/min; tiempo de corrida = 12,5 minutos; temperatura de columna C-18 = 30 °C; fases móviles = A: 0,1% (volumen en volumen) de TFA en agua, B: 0,1% (volumen en volumen) de TFA en ACN

La columna se desvió de la SEC en línea a C-18 a los 2,2 minutos y se regresó a SEC en línea a los 14,0 minutos. La señal se recogió a 265 nm. Usando una curva estándar derivada de CDA-1 o CDA-3, se calculó la cantidad de fármaco libre presente en la muestra a partir de los picos encontrados en la ventana entre 2,2 y 14,0 minutos, usando las siguientes fórmulas:

$ng_{libre\ CDA\text{-}1} = (AUC_{265\ nm} + 353) / 5406$

$ng_{libre\ CDA\text{-}3} = (AUC_{265\ nm} + 11805) / 4888$

% libre de CDA = $ng_{libre\ CDA} / ng_{inyectado}$

<u>Ejemplo 7</u>: caracterización de los conjugados de anticuerpo y fármaco

Líneas celulares

Las líneas celulares usadas para los ensayos funcionales fueron pares de células de células transfectadas con GCC y 293 de riñón embriónico humano (HEK) control de vector. Las células HEK293 se transfectaron con GCC de longitud completa marcado con myc bajo el control del promotor de CMV, o con un vector vacío (pN8mycSV40), y se seleccionaron en blasticidina. Los clones HEK293-GCC#2 demostraron la mayor expresión de GCC. La expresión de GCC en las células HEK293-GCC#2 se analizó adicionalmente usando ensayos de unión a célula entera con ligando radiomarcado (ST-toxina), y la cuantificación de los niveles de receptor de GCC sugirieron que las células HEK293-GCC#2 expresan más GCC que otras líneas celulares que expresan GCC (por ejemplo, células HT-29 de adenocarcinoma colorrectal humano transfectadas con GCC y células de adenocarcinoma de colon humano T84)

A. Ensayos de unión/afinidad a células

Para determinar la capacidad de cada conjugado de anticuerpo y fármaco para unirse a células que expresan GCC, se evaluaron conjugados de 5F9-CDA mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecto usando citometría de flujo. Las células HEK293-GCC#2 y las control de vector se hicieron crecer en medio de cultivo de células estándar suplementado con suero fetal bovino 10% (FBS). Las células se removieron no enzimáticamente de la superficie de la placa usando Versene (ThermoFisher Scientific, Washington, DC; No. de catálogo 15040-066), se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm en un tubo estéril conteniendo FBS, y se lavaron en 3% FBS/solución salina amortiguada con fosfato (PBS) sin Ca^{2+} o Mg^{2+}. Este paso de centrifugación-lavado se repitió una vez más antes que las células se resuspendieran a una concentración de 5 x 10^6 células/ml en 3% FBS/PBS, y se agregaron

a los pocillos experimentales de una placa de 96 pocillos con fondo en V en alícuotas de 100 µL (aproximadamente 500.000 células). La placa se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm.

Luego de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante de cada pocillo y se reemplazó por 50 µL de solución de conjugado de anticuerpo y fármaco primario. Las soluciones de 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3 se prepararon cada una a una concentración final de 1 µg/ml. La placa de 96 pocillos se cubrió y se incubó a 4°C (sobre hielo) durante 1 hora antes de eliminar las soluciones de los pocillos y las células se lavaron dos veces en 100 µL de 3% FBS/PBS (sin Ca^{2+} o Mg^{2+}).

Se diluyó el anticuerpo secundario de cabra F(ab')2 anti-IgG humana, conjugado a ads-PE de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL; No. de catálogo 2043-09) 1:200, de acuerdo a la sugerencia del fabricante. Después de completar el segundo lavado, se agregaron 50 µL de la solución de anticuerpo secundario a cada pocillo experimental, y la placa de 96 pocillos cubierta se colocó a 4°C (sobre hielo) durante 1 hora. Luego se centrifugó la placa, y el sobrenadante se reemplazó por 100 µL de 3% FBS/PBS (sin Ca^{2+} o Mg^{2+}). Este paso de centrifugación-lavado se repitió durante un total de dos ciclos. Las células finalmente se reconstituyeron en 200 µL de PBS (sin Ca^{2+} o Mg^{2+}) y se cargaron en el citómetro de flujo BD FACS Canto (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Los datos se analizaron usando el programa de computación del sistema FACS II Canto y la configuración de filtros apropiada.

La conjugación de un CDA con una molécula de anticuerpo podría alterar la afinidad de dicho anticuerpo por su antígeno blanco, o alterar la unión a células del mencionado anticuerpo a su antígeno. En la **Figura 1** se demuestra que la conjugación de CDA no afecta o reduce la unión del anticuerpo 5F9 a GCC. Los valores de afinidad son comparables entre 5F9 no conjugado (**Figura 1A**), y los conjugados de 5F9-CDA de la invención (Figuras **1B-1D**). En la Tabla 9 se demuestra que la conjugación de CDA a 5F9 en los conjugados de 5F9-CDA no afecta o reduce la unión de la molécula de anticuerpo a GCC.

Tabla 10

Anticuerpo o conjugados de anticuerpo y fármaco	**Afinidad (ng/ml)**
5F9	35
5F9-CDA-1	28
5F9-CDA-2	31
5F9-CDA-3	28

B. Ensayos de citotoxicidad/potencia

Para medir cada capacidad del conjugado 5F9-CDA para matar células que expresan GCC, se realizaron ensayos de citotoxicidad. En este ensayo, las células HEK293-GCC#2 que expresan GCC y las células control del vector se sembraron a una densidad de 2 x 10^3 por pocillo en una placa de 96 pocillos bien profundos por triplicado. Inmediatamente se agregaron diluciones en serie de los 5F9-CDA a los pocillos sembrados, y la placa se incubó a 37 °C durante 96 horas. Luego de la incubación, se evaluó la viabilidad celular usando el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI), de acuerdo a lo recomendado por el fabricante. Se normalizó la viabilidad a las células control no tratadas, y se calculó el error como el error estándar de la media (SEM).

La potencia relativa de los conjugados de 5F9-CDA en células HEK293-GCC#2 se muestra en la Figura **2**. 5F9-CDA-2 (**Figura 2B**) y 5F9-CDA-3 (**Figura 2C**) son conjugados de anticuerpo y fármaco más potentes que 5F9-CDA-1 (**Figura 2A**). Véase la Tabla 11. Estos ensayos también demuestran que los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención hacen blanco específicamente y matan las células que expresan GCC, y tienen citotoxicidad significativamente reducida en células que no expresan el antígeno GCC.

Tabla 11

Anticuerpo o Conjugados de anticuerpo y fármaco	**IC_{50} (pM)**
5F9-CDA-1	49,7
5F9-CDA-2	7,47
5F9-CDA-3	3,07

C. Ensayos de internalización

Se evaluó la internalización de la molécula de anticuerpo anti-GCC en células HEK293-GCC#2 que expresan GCC y en células control del vector usando microscopía de inmunofluorescencia. Las células se hicieron crecer sobre cubreobjetos y se colocaron sobre hielo durante 10 minutos antes de la incubación con el anticuerpo 5F9 (10 µg/ml) en medio de cultivo frío durante 20 minutos sobre hielo. El medio que contiene anticuerpo luego se reemplazó por medio de cultivo fresco, y las células se incubaron a 37 °C durante entre 2 y 3 horas o se mantuvieron a 4 °C (sobre hielo). Después de un lavado en PBS y una fijación breve en paraformaldehído 4% a temperatura ambiente, las células se permeabilizaron durante 15 minutos en TRITON X-100 5%. La localización del anticuerpo 5F9 se determinó con un anticuerpo anti-IgG marcado de manera fluorescente usando microscopía confocal de barrido láser. El anticuerpo 5F9 se localizó en la superficie celular de las células que expresan GCC

al estar sobre hielo, mientras que las células incubadas a 37 °C mostraron una tinción moteada dentro de la membrana celular, indicativo de internalización. No se detectó internalización en las células control de vector.

<u>Ejemplo 8</u>: Evaluación i*n vivo*

A. Eficacia de ADC en modelos de tumor

Se evaluó la eficacia in vivo de los conjugados de 5F9-CDA en modelos de xenoinjerto de ratón.

Para todos los estudios de eficacia, se inocularon de manera subcutánea ratones CB-17 SCID hembra (entre 6 y 7 semanas de edad) en el flanco con 5 x 10^6 células HEK293-GCC#2, o se inocularon ratones atímicos entre 6 y 7 semana de edad con fragmentos de tumor de 2 mm x 3 mm de tumores primarios humanos (PHTX) de pacientes (a), (b), y (c), en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) sin FBS 10% trasplantados serialmente en el flanco. Los animales se randomizaron a grupos de tratamiento cuando el volumen del tumor promedio alcanzó aproximadamente los 200 mm^3. Los grupos de tratamiento (*n* = 5 por grupo) incluyeron un grupo control dosificado con el vehículo apropiado, un grupo control dosificado con chKTI-CDA, o los grupos experimentales dosificados con los conjugados de 5F9-CDA de la invención.

El anticuerpo KTI quimérico (chKTI) es un anticuerpo quimérico murino/humano derivado del hibridoma HB-9515 de ATCC, descrito en la Patente de los EE.UU. 4.959.310; Brandon y col., *J. Food Sci.* 53:97-101 (1988); Brandon y col., *J. Agric. Food Chem.* 36:1336-1341 (1988); Brandon y col., *J. Agric. Food Chem*. 39:327-335 (1991); y Brandon y col., *Crop Sci*. 32:1502-1505 (1992). El anticuerpo chKTI se une al inhibidor de tripsina de soja Kunitz (KTI). El anticuerpo chKTI no está dirigido contra GCC, y se usó como un control del conjugado Ab-CDA.

Los ratones se administraron con una inyección intravenosa individual de solución que contiene diferentes dosis de conjugado 5F9-CDA o tratamiento control una vez por semana durante tres semanas (es decir, un régimen fraccionado de dosificación a los Días 0, 7, y 14), o una dosis aguda individual del mismo (es decir, dosificación solo en el día 0). El crecimiento del tumor se monitoreó una vez por semana durante 11 semanas usando un calibre vernier. El volumen promedio del tumor se calculó usando la fórmula ($V = [W^2 \times L]/2$). Se determinó la eficacia antitumoral de los agentes experimentales por comparación del volumen promedio del tumor de la rama del control con vehículo respecto a cada agente experimental.

En ratones que portaban los tumores HEK293-GCC, los conjugados de 5F9-CDA lograron una actividad antitumoral duradera (Figura **3**). Específicamente, no se produjo el recrecimiento hasta entre 5 y 6 semanas luego del tratamiento con 5F9-CDA-1 y 5F9-CDA-2 (**Figuras 3A** y **3B**). La actividad antitumoral fue más pronunciada en los estudios con 5F9-CDA-3, en donde el recrecimiento

típicamente no ser observó hasta entre 8 y 9 semanas posteriores al tratamiento (**Figura 3C**). Notar que el grupo tratado con 5F9-CDA-1 se dosificó a 60 µg/kg mientras que los grupos tratados con 5F9-CDA-2 y 5F9-CDA-3 se dosificaron a 10 µg/kg, haciendo a la actividad antitumoral observada con 5F9-CDA-3 incluso más importante.

En los modelos colorrectales de xenoinjerto de tumor primario humano (PHTX), el tratamiento con 5F9-CDA-1 (entre 60 y 180 µg/kg) retrasó el inicio del recrecimiento hasta 5 semanas en PHTX(a) (**Figura 4A** y **4D**), y PHTX(b) (**Figura 5A**), el cual es un modelo que es refractario a tratamiento con MLN0264 (5F9-vcMMAE, véase la US 8.785.600) (**Figura 4A** y **4D)**. La inhibición del crecimiento se observó incluso durante periodos más largos de tiempo en tumores PHTX(a), PHTX(b), y PHTX(c) tratados con 5F9-CDA-2 (**Figuras 4B**, **4E, 5B**, y **6A**) o 5F9-CDA-3 (**Figuras 4C**, **4F, 5C**, y **6B**) a dosis menores (entre 20 y 60 µg/kg). De manera similar a las observaciones en los ratones que portaban tumores HEK293-GCC, la administración intravenosa de 5F9-CDA-3 produjo el mayor retraso del recrecimiento del tumor, variando en un rango de al menos entre 8 y 14 semanas posteriores al tratamiento.

Los valores de tumor/control (T/C) se muestran en la Tabla 12 para los estudios de eficacia *in vivo* realizados en cada modelo de tumor primario. T/C es una medida que informa el tamaño del tumor para una dada rama de tratamiento (T) en relación a la rama control (C). Una actividad antitumoral fuerte en general se define como un T/C ≤ 0,40. Para cada estudio, se calculó el T/C en el último día que se midió la rama control. El 5F9-CDA-1 alcanzó un valor T/C ≤ 0,40 a dosis mayores (90 y 120 µg/kg), mientras que 5F9-CDA-2 y 5F9-CDA-3 alcanzaron valores de T/C ≤ 0,40 a dosis menores (entre 20 y 45 µg/kg) en cada uno de los modelos.

Tabla 12

	HEK293-GCC Día 14	PHTX(a) Día 37	PHTX(b) Día 47	PHTX(c) Día 43
5F9-CDA-1 120 µg/kg QW3			0,40	
5F9-CDA-1 180 µg/kg individual		0,34		
5F9-CDA-1 60 µg/kg QW3	0,03	0,32		
5F9-CDA-2 10 µg/kg QW3	0,04	0,22		
5F9-CDA-2 30 µg/kg QW3			0,15	

5F9-CDA-2 30 µg/kg individual		0,16		
5F9-CDA-2 60 µg/kg individual				0,15
5F9-CDA-3 10 µg/kg QW3	0,03	0,12		
5F9-CDA-3 20 µg/kg QW3			0,09	
5F9-CDA-3 30 µg/kg individual		0,14		
5F9-CDA-3 60 µg/kg individual				0,11

B. Estudios de farmacocinética/farmacodinámica

Se realizaron estudios para determinar la farmacocinética (PK) de los conjugados de 5F9-CDA en ratones que portaban tumores HEK293-GCC. Los estudios PK siguieron el mismo protocolo de inoculación subcutánea que los estudios de eficacia descritos precedentemente. Cuando el volumen promedio del tumor alcanzó aproximadamente los 500 mm^3, se randomizaron los animales a los grupos de tratamiento.

Se administraron los ratones con una dosis intravenosa individual de los conjugados de 5F9-CDA o vehículo a 30 µg/kg. Se sacrificaron tres animales a cada punto de tiempo definido (1, 24, 48, 96, 168, 336, y 504 horas) posterior a la inyección, y se recolectaron muestras de tumor y sangre entera. Las muestras de sangre se transfirieron a tubos separadores de suero (BD Biosciences; No. de catálogo 365956). Los tejidos tumorales se fijaron en formalina y se embebieron en parafina para el análisis de los cambios de biomarcadores farmacodinámicos, como se describió precedentemente.

C. Evaluación PK del anticuerpo total y ADC total en plasma

Se realizó la evaluación de la cantidad de anticuerpo total y conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) total en las muestras de sangre murina luego del tratamiento con 5F9-CDA usando un inmunoensayo tipo sandwich. Se recubrió una placa de 96 pocillos con proteína que comprenden el dominio extracelular de GCC, fusionada a una región Fc de ratón. Esta porción del antígeno GCC tiene la capacidad de capturar el conjugado 5F9-CDA presente en las muestras. Se usó un anticuerpo de burro rutenilado anti-Fc-γ humano para detectar el 5F9-CDA capturado para el ensayo de anticuerpo total, mientras que se usó un anticuerpo anti-CDA rutenilado para medir el ADC total. En presencia de solución amortiguadora de lectura que contenía tripropilamina, la marca de rutenio produce una señal

quimioluminiscente que es disparada por voltaje. La quimioluminiscencia se midió en un instrumento MESO QuickPlex SQ 120 (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD).

Los niveles de anticuerpo total y ADC total fueron apreciablemente diferentes entre sí luego del tratamiento con 5F9-CDA-1, particularmente en los puntos de tiempo de 168 y 336 horas (**Figura 7A**). Esta diferencia sugiere algún grado de inestabilidad del ADC en circulación. Por el contrario, los niveles de anticuerpo total y ADC total fueron comparables para todos los puntos de tiempo para 5F9-CDA-2 y 5F9-CDA-3 (**Figuras 7B** y **7C**), indicando que estos conjugados eran estable *in vivo*.

En la Tabla 13 a continuación se informan los parámetros PK calculados usando análisis no compartimental. Notablemente, el 5F9-CDA-3 demostró una depuración más lenta (CL) que 5F9-CDA-1 o 5F9-CDA-2. Esta diferencia dio como resultado una exposición mayor del conjugado 5F9-CDA-3 en el tiempo, tal como lo reflejan los valores del área bajo la curva (AUC).

Tabla 13

Analito	Tratamiento	$t_{1/2}$	C_0	AUC_{final}	AUC_{INF}	CL	Vss
		(hr)	(µg/ml)	(hr*µg/ml)	(hr*µg/ml)	(ml/hr/kg)	(ml/kg)
Ab total	5F9-CDA-1	101,0	52,3	1,740	1,880	0,9	93,9
ADC total		30,6	45,7	1,510	1,540	1,1	43,0
Ab total	5F9-CDA-2	150,3	33,2	2,300	2,526	0,81	149,46
ADC total		64,4	34,37	1,650	1,890	1,08	87,35
Ab total	5F9-CDA-3	262,5	36,98	2,744	3,551	0,55	175,8
ADC total		190,2	38,32	3,261	3,763	0,52	116,22

D. Actividad de biomarcador PD luego de la administración individual de ADC 5F9

Se detectaron los biomarcadores farmacodinámicos (PD) por tinción inmunohistoquímica de secciones embebidas en parafina de tumores HEK293-GCC#2. La secciones se montaron sobre portaobjetos de vidrio, se incubaron con una solución en base a EDTA (pH 9,0) para la recuperación de epitope durante 20 minutos a 100 °C, y se bloquearon en bloqueo con proteínas libre de suero (Dako, Carpinteria, CA; No. de catálogo X0909) para prevenir la unión no específica de anticuerpo. Luego se prepararon las soluciones de anticuerpo primario con anticuerpos que reconocen fosfo-CHK1 (1:200; AbCam, Cambridge, MA; No. de catálogo MIL2.091411.fzh) y fosfo-γ-H2AX (1:1500; Cell Signaling Technologies, Beverly, MA; No. de catálogo 9178), y se incubaron con las secciones en una cámara

humidificada durante hora. La quinasa punto de control 1 (CHK1) es una proteína quinasa específica de serina/treonina cuya activación es indicativa de la detención del ciclo celular y determinadas formas de estrés genotóxico, mientras que γ-H2AX es un miembro de la familia de histonas que se vuelve fosforilado durante el reclutamiento y localización de las proteínas de reparación de ADN. Se usó el reactivo de detección polímero DAB (3,3'-diaminobenzidina) para la detección y visualización de las tinciones, y se usaron algoritmos de análisis de imágenes habituales para determinar la cantidad de tinción en relación a la tinción de fondo. Los resultados se informaron como el porcentaje de células positivas para el antígeno/células viables totales en secciones de tejido.

En la Figura 8 se muestra que una administración individual de cada conjugado 5F9-CDA dio como resultado un aumento marcado en fosfo-CHK1 (**Figura 8A**) y fosfo-γ-H2AX (**Figura 8B**), y que este aumento fue más pronunciado luego del tratamiento con 5F9-CDA-2 y 5F9-CDA-3. Por lo tanto, los biomarcadores de respuesta de daño al ADN pueden usarse para detectar la actividad de los conjugados de 5F9-CDA *in vivo*.

En resumen, 5F9-CDA-1, 5F9-CDA-2, y 5F9-CDA-3 han sido todos ensayados *in vitro* e *in vivo* para el impacto en el crecimiento celular/tumoral en modelos positivos para GCC. En conjunto, los datos generados con cada uno de estos ADC sugieren que 5F9-CDA-3 posee mayor actividad dependiente de GCC en un amplio rango de modelos. Mientras que el margen de actividad para 5F9-CDA-2 y 5F9-CDA-3 fue comparable *in vitro*, los ADC comienzan a separarse cuando se ensayan *in vivo*. La tolerabilidad de cada ADC luego de una administración individual o dosificación repetida es comparable en modelos de cáncer murinos preclínicos, aún la actividad antitumoral es más pronunciada en comparación al correspondiente ADC control de isotipo. Más aún, la actividad antitumoral de 5F9-CDA-3 es consistentemente más duradera que la observada para 5F9-CDA-2. Esto se ilustra en las Figuras 3 a 6 usando dosificación fraccionada y/o siguiendo una administración individual. Los datos PK que se muestran en la Figura 8 se calcularon usando análisis no compartimental. Notablemente, el 5F9-CDA-3 demostró una depuración más lenta (CL) que 5F9-CDA-1 o 5F9-CDA-2. Esta diferencia dio como resultado una exposición mayor del conjugado 5F9-CDA-3 en el tiempo, tal como lo reflejan los valores del área bajo la curva (AUC). Consistente con esta observación, los autores también han observado una activación más robusta de los biomarcadores PD pCHK-1 y pg-H2AX luego de una administración individual de 5F9-CDA-3.