

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 007 557**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2017 PCT/IB2017/056093**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2018 WO18073680**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2017 E 17784700 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024 EP 3525828**

54 Título: **Anticuerpos anti-EDB y conjugados anticuerpo-fármaco**

30 Prioridad:

17.10.2016 US 201662409081 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2025

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.00%)
66 Hudson Boulevard East
New York, NY 10001-2192, US**

72 Inventor/es:

**HOOPER, ANDREA THERESE;
MARQUETTE, KIMBERLY ANN;
SUBRAMANYAM, CHAKRAPANI;
GERBER, HANS-PETER y
MAY, CHAD MICHAEL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 007 557 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-EDB y conjugados anticuerpo-fármaco

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-EDB y a conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs). La presente invención se refiere adicionalmente a los métodos de uso de dichos anticuerpos y ADCs para el tratamiento de trastornos que expresan EDB+ de FN, tales como el cáncer.

Antecedentes de la invención

Las fibronectinas son glicoproteínas adhesivas de alto peso molecular presentes en forma soluble en el plasma y en otros fluidos corporales, y en forma insoluble en la matriz extracelular (ECM). La variante de corte y empalme del dominio B extra de la fibronectina 1 (EDB+ de FN o EDB) es una proteína ECM que no se internaliza. EDB es un dominio de homología tipo III de 91 aminoácidos que se inserta en la molécula de fibronectina mediante un mecanismo de corte y empalme alternativo a nivel de la transcripción primaria siempre que se produce una remodelación del tejido. Se ha demostrado que EDB+ de FN se acumula selectivamente en el estroma alrededor de los vasos sanguíneos nuevos en tumores y otras patologías, pero está en gran medida ausente en la vasculatura adulta normal. Zardi et al., *Embo J.* 6(8): 2337-42 (1987). EDB+ de FN se expresa en muchos tumores agresivos y, dependiendo del tipo de tumor, muestra patrones de expresión predominantemente vasculares o estromales difusos. Carnemolla et al., *J. Cell Biol.* 108(3): 1139-48 (1989).

Se ha aislado mediante tecnología de presentación de fagos un anticuerpo que se une específicamente al dominio EDB de la fibronectina (FN), el anticuerpo L19. Carnemolla et al., *Int. J. Cancer* 68(3): 397-405 (1996); Neri et al., *Nat. Biotechnol.* 15(12): 1271-5. (1997); Pini et al., *J. Biol. Chem.* 273(34): 21769-76 (1998). El anticuerpo L19 puede tefir los vasos sanguíneos tumorales en una amplia gama de modelos tumorales experimentales y en secciones de tumores humanos y otros trastornos angiogénicos. Carnemolla et al., *J. Cell Biol.* 108(3): 1139-48 (1989); Kaczmarek et al., *Int. J. Cancer* 59(1): 11-6 (1994); Berndt et al., *Histochem. Cell Biol.* 109(3): 249-55 (1998).

Se han explorado diversas estrategias de focalización utilizando diferentes formatos del anticuerpo L19 en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal scFv(L19), Birchler et al. *Nat. Biotechnol.* 17: 984-8 (1999), proteínas de fusión que incluyen interleucina-12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral (TNF alfa) fusionados con scFv(L19), Halin C. et al. *Cancer Res.* 63(12):3202-10 (2003) y la proteína inmune pequeña L19 (SIP) sola y conjugada con un fotosensibilizador, Fabbrini M. et al. *Int J Cancer* 118(7):1805-13 (2006).

Aunque se han divulgado diversas terapias basadas en anticuerpos L19, sigue existiendo una necesidad clínica significativa de desarrollar terapias dirigidas a EDB+ de FN aún más mejoradas y optimizadas, tal como conjugados anticuerpo-fármaco, para aquellos pacientes con trastornos o enfermedades que expresan EDB+ de FN, tal como cánceres asociados con la expresión de EDB+ de FN y/o cánceres que expresan EDB+ de FN.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende (a) un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al dominio B extra (EDB) de fibronectina (FN), en el que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDRs que comprenden SEQ ID NOs: 3, 5 y 7, y una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDRs que comprenden SEQ ID NOs: 12, 13 y 14, en el que la cadena pesada comprende un residuo de cisteína diseñado en la posición 290 (K290C), de acuerdo con la numeración del índice EU de Kabat, y en el que la cadena ligera comprende un residuo de cisteína diseñado en la posición 183 (cK183C), de acuerdo con la numeración de Kabat, (b) un enlazador y (c) un fármaco. En algunos aspectos, un conjugado anticuerpo-fármaco comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 1 o 21, y una región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 10.

La presente invención también proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 10; o una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, un conjugado anticuerpo-fármaco comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 19 o 25, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31. También se describen en la presente memoria conjugados anticuerpo-fármaco, en los que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, comprenden una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 8, 17, 23, 27 o 29, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 15, pero estos no son aspectos de la invención tal como se reivindica.

La presente invención también proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 19 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31; una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31.

- 5 También se divulga en la presente memoria, pero no es un aspecto de la invención tal como se reivindica, es un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, que tiene una región constante de la cadena pesada y/o cadena ligera que comprende un residuo de cisteína diseñado para conjugación específica del sitio. En algunos aspectos, un conjugado anticuerpo-fármaco tiene una región constante de la cadena pesada que comprende un residuo de cisteína diseñado en la posición 290 (K290C), de acuerdo con la numeración del índice EU de Kabat. En algunos aspectos, un conjugado anticuerpo-fármaco tiene una región constante de la cadena ligera que comprende un residuo de cisteína diseñado en la posición 183 (κK183C), de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunos aspectos, un conjugado anticuerpo-fármaco tiene una región constante de la cadena pesada que comprende un residuo de cisteína diseñado en la posición 290 (K290C), de acuerdo con la numeración del índice EU de Kabat, y una región constante de la cadena ligera comprende un residuo de cisteína diseñado en la posición 183 (κK183C), de acuerdo con la numeración de Kabat.

- La presente invención proporciona adicionalmente un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, que comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una etiqueta diseñada que contiene glutamina insertada en el anticuerpo o que reemplaza uno o más aminoácidos endógenos en el anticuerpo. En algunos aspectos, un conjugado anticuerpo-fármaco tiene una etiqueta diseñada que contiene glutamina insertada en el anticuerpo en la posición E294-N297. En algunos aspectos, un conjugado anticuerpo-fármaco tiene una etiqueta que contiene glutamina que comprende una secuencia de aminoácidos LLQG (SEQ ID NO: 40). En algunos aspectos, un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene una región constante de la cadena pesada que comprende adicionalmente una lisina (K) que sustituye a una arginina (R) en la posición 222 (K222R), de acuerdo con la numeración del índice EU de Kabat.

La presente invención también proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una lisina (K) que sustituye a una arginina (R) en la posición 94 (K94R), de acuerdo con la numeración de Kabat.

- La presente invención proporciona adicionalmente un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene un enlazador que es un enlazador escindible. En algunos aspectos, el enlazador escindible se selecciona del grupo que consiste en vc, diS, diS-C₂OCO y AcLys-vc.

La presente invención proporciona adicionalmente un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene un fármaco que es un agente citotóxico. En algunos aspectos, el agente citotóxico es una auristatina. En algunos aspectos, la auristatina se selecciona del grupo que consiste en 0101, 1569, 9411 y 4574.

- La presente invención también proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende (a) un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDRs que comprenden SEQ ID NOS: 3, 5 y 7, y una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDRs que comprenden SEQ ID NOS: 12, 13 y 14, (b) un enlazador vc y (c) un fármaco 0101.

- La presente invención también proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende (a) un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 10; (b) un enlazador vc y (c) un fármaco 0101.

- La presente invención también proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende (a) un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31; (b) un enlazador vc y (c) un fármaco 0101.

- La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un conjugado anticuerpo-fármaco de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. La presente invención también proporciona una composición que comprende una pluralidad de conjugados anticuerpo-fármaco de la invención, y opcionalmente un portador farmacéutico, en el que la composición tiene una DAR promedio que varía de 3 a 5. La presente invención también proporciona una composición que comprende una pluralidad de conjugados anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones, y opcionalmente un portador farmacéutico, en el que la composición tiene una DAR promedio que varía de 1 a 3.

- La presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica para una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo de la invención. La presente invención proporciona adicionalmente un vector que comprende cualquier ácido nucleico de la invención. Además, la presente invención proporciona una célula hospedera que comprende cualquier ácido nucleico de la invención.

La presente invención proporciona un proceso para producir un conjugado anticuerpo-fármaco de la invención que comprende: (a) unir el enlazador al fármaco; (b) conjugar el enlazador y el fármaco al anticuerpo; y (c) purificar el conjugado anticuerpo-fármaco. En algunos aspectos, la conjugación es específica del sitio en uno o más residuos de cisteína diseñados y/o residuos de glutamina diseñados en el anticuerpo.

- 5 La presente invención también proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco de la invención para uso en un método para tratar un trastorno o enfermedad que expresa EDB+ de FN, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un conjugado anticuerpo-fármaco de la invención a un sujeto con necesidad del mismo. En algunos aspectos, el trastorno o enfermedad que expresa EDB+ de FN es cáncer. En algunos aspectos, el cáncer es un tumor sólido o un cáncer en la sangre. En algunos aspectos, el tumor sólido es cáncer de tiroides, sarcoma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de útero, mesotelioma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer testicular, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer endocrino, cáncer del timo, cáncer de cerebro, cáncer suprarrenal, cáncer de ojo, cáncer cervical y cáncer de pulmón. En algunos aspectos, el cáncer en la sangre es leucemia, linfoma o mieloma.
- 10
- 15 También se describe en la presente memoria, pero no es un aspecto de la invención tal como se reivindica, es el uso de un conjugado anticuerpo-fármaco de la invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o enfermedad que expresa EDB+ de FN en un sujeto. En algunos aspectos, el trastorno o enfermedad que expresa EDB+ de FN es cáncer. En algunos aspectos, el cáncer es un tumor sólido o un cáncer en la sangre. En algunos aspectos, el tumor sólido es cáncer de tiroides, sarcoma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de útero, mesotelioma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer testicular, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer endocrino, cáncer del timo, cáncer de cerebro, cáncer suprarrenal, cáncer de ojo, cáncer cervical y cáncer de pulmón. En algunos aspectos, el cáncer en la sangre es leucemia, linfoma o mieloma.
- 20
- 25 Descripción breve de las figuras
- La Figura 1A y 1B muestran las propiedades de unión de los anticuerpos [A] EDB-L19, EDB-PFE y EDB-(K94R); y los anticuerpos [B] EDB-(K94R) y EDB-(,cK183C-K94R-290C).
- La Figura 2 muestra la expresión de EDB+ de FN utilizando análisis de ARN-Seq en modelos de cáncer de xenoinjerto derivado de pacientes humanos (PDX).
- 30 Las Figuras 3A y 3B muestran las curvas de unión de ELISA para [A] el anticuerpo EDB-L19 y ADC de EDB-L19-vc-0101, y el anticuerpo EDB-(,cK183C-K94R-290C) y ADC de EDB-(,cK183C-K94R-290C)-vc-0101; y [B] el anticuerpo EDB-(K94R) y ADC de EDB-(K94R)-vc-0101, y el anticuerpo EDB-(,cK183C-K290C) y ADC de EDB-(,cK183C-K290C)-vc0101.
- 35 La Figura 4 muestra la expresión de EDB+ de FN mediante inmunodetección tipo Western en células WI38-VA13 y HT-29.
- Las Figuras 5A-5F muestran la eficacia antitumoral en PDX-NSX-11122, un modelo de xenoinjerto derivado de pacientes NSCLC (PDX) de cáncer humano de expresión de EDB+ de FN alta, de [A] EDB-L19-vc-0101 a 0.3, 0.75, 1.5 y 3 mg/kg; [B] EDB-L19-vc-0101 a 3 mg/kg y 10 mg/kg de EDB-L19-diS-DM1 unido por disulfuro; [C] EDB-L19-vc-0101 a 1 y 3 mg/kg y 5 mg/kg de EDB-L19-diS-C₂-OCO-1569 unido por disulfuro; [D] EDB-(κK183C+K290C)-vc-0101 de conjugación específica del sitio y EDB-L19-vc-0101 conjugado convencionalmente (ADC1) a dosis de 0.3, 1 y 3 mg/kg y 1.5 mg/kg, respectivamente; [E] EDB-(,cK183C-K94R-K290C)-vc-0101 de conjugación específica del sitio a dosis de 0.3, 1 y 3 mg/kg; y [F] grupo dosificado con EDB-(,cK183C-K94R-K290C)-vc-0101 a 3 mg/kg como curvas de inhibición del crecimiento tumoral para cada ratón individual portador del tumor.
- 40
- 45 Las Figuras 6A-6F muestran eficacia antitumoral en H-1975, un modelo de xenoinjerto derivado de pacientes NSCLC (CLX) de cáncer humano de expresión de EDB+ de FN moderada a alta, de [A] EDB-L19-vc-0101 a 0.3, 0.75, 1.5 y 3 mg/mg; [B] EDB-L19-vc-0101 y EDB-L19-vc-1569 a 0.3, 1 y 3 mg/kg; [C] EDB-L19-vc-0101 y EDB-(H16-K222R)-AcLys-vc-CPI-8314 a 0.5, 1.5 y 3 mg/kg y 0.1, 0.3 y 1 mg/kg, respectivamente; [D] EDB-(κK183C+K290C)-vc-0101 de conjugación específica del sitio y EDB-L19-vc-0101 conjugado convencionalmente a 0.5, 1.5 y 3 mg/kg; [E] EDB-L19-vc-0101 y EDB-(K94R)-vc-0101 a 1 y 3 mg/kg; y [F] EDB-(κK183C+K290C)-vc-0101 y EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 a 1 y 3 mg/kg.
- 50
- La Figura 7 muestra la eficacia antitumoral en HT29, un modelo CLX de colon de cáncer de humano de expresión de EDB+ de FN moderada, de EDB-L19-vc-0101 y EDB-L19-vc-9411 a 3 mg/kg.
- La Figuras 8A y 8B muestran la eficacia antitumoral de EDB-L19-vc-0101 a 0.3, 1 y 3 mg/kg en [A] PDX-PAX-13565, un PDX pancreático de expresión de EDB+ de FN de moderada a alta; y [B] PDX-PAX-12534, un PDX pancreático de expresión de EDB+ de FN de baja a moderada.
- 55

La figura 9 muestra la eficacia antitumoral de EDB-L19-vc-0101 a 1 y 3 mg/kg en Ramos, un modelo de linfoma CLX de cáncer de humano de expresión de EDB+ de FN moderada.

Las Figuras 10A y 10B muestran la eficacia antitumoral en EMT-6, un modelo de carcinoma de mama singénico de ratón, de [A] EDB-(κ K183C-K94R-K290C)-vc-0101 a 4.5 mg/kg; y [B] grupo EDB-(κ K183C-K94R-K290C)-vc-0101 dosificado a 4.5 mg/kg como curvas de inhibición del crecimiento tumoral para cada ratón individual portador del tumor.

La Figura 11 muestra los recuentos absolutos de neutrófilos para EDB-L19-vc-0101 conjugado convencionalmente a 5 mg/kg en comparación con EDB-(κ K183C-K94R-K290C)-vc-0101 (ADC4) de conjugación específica del sitio a 6 mg/kg.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos y conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs) que se unen al dominio B extra (EDB) de la fibronectina (FN), denominados "EDB+ de FN" o "EDB", indistintamente. La invención también proporciona procesos para preparar los ADCs utilizando anticuerpos anti-EDB, enlazadores y fármacos (cargas útiles). La invención proporciona adicionalmente ADCs generados utilizando tecnología de conjugación convencional y/o específica del sitio. Los anticuerpos y ADCs de la invención son útiles para la preparación y fabricación de composiciones, tales como medicamentos, que se pueden utilizar en el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos hiperproliferativos caracterizados por o asociados con la expresión de EDB+ de FN, tal como el cáncer. La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican para los anticuerpos anti-EDB utilizados en la fabricación de los ADCs de EDB.

Los ADCs comprenden un componente de anticuerpo conjugado a un fármaco, generalmente mediante el uso de un enlazador. Los ADCs generados mediante tecnología de conjugación convencional unen aleatoriamente el fármaco al anticuerpo a través de residuos de lisina o cisteína que se encuentran endógenamente en la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo. En consecuencia, dichos ADCs son una mezcla heterogénea de especies que tienen diferentes proporciones fármaco:anticuerpo (DAR). Los ADCs generados mediante tecnología de conjugación específica del sitio enlazan el fármaco al anticuerpo en residuos diseñados específicamente en la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo. Como tales, los ADCs de conjugación específica del sitio son una mezcla homogénea de ADCs compuestos por una especie con una proporción fármaco:anticuerpo (DAR) definida. Por lo tanto, los ADCs de conjugación específica del sitio demuestran una estequiometría uniforme que resulta en una farmacocinética, una biodistribución y un perfil de seguridad mejorados.

Los ADCs de la presente invención incluyen anticuerpos anti-EDB conjugados con uno o más fármacos mediante un enlazador (es decir, formando fracciones enlazador-fármaco). La presente invención proporciona ADCs que tienen (a) un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a EDB; (b) un enlazador y (c) un fármaco. La presente invención proporciona adicionalmente ADCs de la fórmula Ab-(L-D), en el que (a) Ab es un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a EDB, y (b) L-D es una fracción de fármaco-enlazador, en la que L es un enlazador y D es un fármaco. En otro aspecto, la presente invención proporciona ADCs de la fórmula Ab-(L-D)_p, en el que (a) Ab es un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a EDB, (b) L-D es una fracción de fármaco-enlazador, en el que L es un enlazador y D es un fármaco y (c) *p* es el número de fracciones de fármaco-enlazador unidas al anticuerpo.

El número de fracciones de fármaco-enlazador unidas a un anticuerpo puede ser cualquier cantidad preferible para el desarrollo de un ADC. En algunos aspectos, el número de fracciones de fármaco-enlazador por anticuerpo es 4. En otros aspectos, el número de fracciones de fármaco-enlazador por anticuerpo es 3. En otro aspecto, el número de fracciones de fármaco-enlazador por anticuerpo es 2. En otro aspecto, el número de fracciones de fármaco-enlazador por anticuerpo es 1. En otros aspectos, el número de fracciones de fármaco-enlazador por anticuerpo es mayor que 4, tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o mayor que 12 fracciones de fármaco-enlazador por anticuerpo.

Adicionalmente, la presente invención proporciona ADCs, en los que las fracciones de fármaco-enlazador se unen al anticuerpo a través de tecnología de conjugación convencional o específica del sitio. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-EDB, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, están conjugados o enlazados a un fármaco tal como un agente citotóxico, citostático y/o terapéutico, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria. Por ejemplo, un agente citotóxico se puede enlazar o conjugar con un anticuerpo anti-EDB como se describe en la presente memoria para la administración local dirigida del agente citotóxico. También se proporcionan métodos para preparar y fabricar dichos ADCs y uso de los mismos en aplicaciones clínicas.

A diferencia de otros ADCs que se están siendo desarrollando para dirigirse a las proteínas expresadas en la superficie celular que se internalizan, los ADCs de la presente invención se dirigen a EDB, una proteína expresada en la matriz extracelular (ECM). Dirigirse a una proteína expresada en la ECM puede proporcionar beneficios en comparación con dirigirse a una proteína expresada en las células tumorales. El ADC puede acceder directamente a la diana sin tener que penetrar a través de las barreras del estroma y la ECM comunes en muchos cánceres humanos difíciles de tratar. Adicionalmente, la focalización de EDB en la ECM con un ADC proporciona un mecanismo específico para acceder a muchos tipos de células difíciles de alcanzar en el microambiente tumoral. Esto puede provocar la liberación extracelular de una carga útil citotóxica o un fármaco, lo que provoca la muerte de una variedad de células, a través de mecanismos tales como la muerte celular/el arresto del ciclo celular de células tumorales y/o células del estroma mediante un mecanismo espectador. Además, mecanismos adicionales incluyen, pero no se limitan a, angiogénesis desregulada o colapso/focalización vascular citotóxica, normalización vascular, inmunomodulación e inducción de diferenciación celular y/o impedimento de la transición epitelial a mesenquimal.

Los ejemplos proporcionados en la presente memoria demuestran las características mejoradas obtenidas durante la generación de anticuerpos anti-EDB y ADC de EDB, tal como la optimización del alotipo para reducir la inmunogenicidad, la eliminación de la lisina COOH terminal para aumentar la homogeneidad del producto y la introducción de mutaciones para mitigar el riesgo de la posible glicación y disminuir la heterogeneidad (véase los Ejemplos 1 y 2). Además, como se muestra en los Ejemplos, los ADCs de EDB generados utilizando diversas tecnologías de conjugación convencionales y específicas del sitio (es decir, cisteínas, lisinas y/o etiquetas que contienen glutamina ("Q") donadoras de acilo) y diversas fracciones de fármaco-enlazador demuestran una eficacia robusta *in vitro* e *in vivo* (véase los ejemplos 6 a 8). Los ejemplos proporcionados en la presente memoria también mostraron que los ADCs de EDB generados mediante conjugación específica del sitio a través de residuos de cisteína diseñados demostraron características mejoradas en comparación con los ADCs de EDB generados utilizando conjugación convencional a través de residuos de cisteína, tal como un perfil farmacocinético (PK) mejorado (es decir, mayor exposición y estabilidad de la conjugación que conduce a menos efectos tóxicos fuera de la diana), estabilidad térmica favorable y perfil de seguridad no clínico (es decir, alivio de la mielosupresión) (véase los ejemplos 9, 10 y 11, respectivamente). Además, la característica mejorada de los ADCs de EDB generados mediante tecnologías de conjugación específica del sitio puede permitir dosis más altas en el tratamiento humano y así proporcionar una mayor eficacia. En algunos aspectos, los ADCs de EDB pueden comprender una sustitución de la lisina (K) en la posición 290 (de acuerdo con el índice EU de Kabat) en la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana con una cisteína reactiva (C) (K290C) y/o una sustitución de la lisina (K) en la posición 183 (de acuerdo con Kabat) en la región constante de la cadena ligera Kappa humana con una cisteína reactiva (C) (κK183C) para permitir la conjugación específica del sitio.

Dominio B extra de la fibronectina

Tal como se utiliza en la presente memoria, "EDB+ de FN" y "EDB" se utilizan indistintamente y se refieren a la fibronectina (FN) que contiene el dominio B extra (EDB). Además, "anticuerpos anti-EDB" y "anticuerpos anti-EDB+ de FN" se utilizan indistintamente y se refieren a anticuerpos que se unen a EDB. "Conjugados anticuerpo-fármaco anti-EDB", "conjugados anticuerpo-fármaco EDB", "ADCs anti-EDB", "ADCs de EDB" se utilizan indistintamente y se refieren a ADCs que comprenden anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen a EDB y están conjugados o enlazados a un fármaco. La FN es una glicoproteína de alto peso molecular presente en la matriz extracelular (ECM) y está involucrada en los procesos de adhesión y migración celular, incluyendo embriogénesis, cicatrización de heridas, coagulación sanguínea, defensa del hospedero y metástasis. La FN generalmente existe como un dímero formado por dos subunidades de ~250 kDa casi idénticas unidas covalentemente cerca de su C terminal mediante un par de enlaces disulfuro. Cada monómero consta de tres tipos de unidades repetidas: repeticiones de FN de tipo I, tipo II y tipo III. Un solo gen de 75 kb codifica para FN, sin embargo, se observan veinte variantes de proteína en humanos. El corte y empalme alternativo del gen de FN ocurre en tres regiones, lo que da como resultado la inclusión o exclusión de una de las dos repeticiones de tipo III, llamadas dominio A extra (EDA) y dominio B extra (EDB), y de un segmento que conecta otras dos repeticiones de tipo III, llamado segmento de conexión de tipo III (IIICS). EDB es una secuencia de 91 aminoácidos que es 100 % idéntica en ratones, ratas, conejos, perros, monos, cinomólogos y humanos. Se proporciona una secuencia de nucleótidos de EDB+ de FN representativa bajo el acceso No. NM_001306129.1 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se proporciona bajo el acceso No. NP_001293058.1. Las secuencias de aminoácidos de EDB y 7-EDB-8-9 recombinante de humano se proporcionan en la Tabla 1. La 7-EDB-8-9 recombinante de humano comprende EDB flanqueado por el dominio 7 en el amino terminal y el dominio 8 y dominio 9 en el carboxilo terminal de EDB.

Tabla 1. Secuencias de EDB y 7-EDB-8-9

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
33	EDB	EVPQLTDLFSVDITDSSIGLRWTPPLNSSTIIGYRITVVAAGEGIPFEDFV DSSVGYYTGTGLEPGIDYDISVITLINGGESAPTTLTQQT
34	Proteína FN-7-EDB-89-HIS de humano	<u>VVTQLSPPTNLHLEANPDTGVLAVSWERSTTPDITGYRITTTPTNGQQ</u> <u>GNSLEEVVHADQSSCTFDNLSPGLEYNVSVYTVKDDKESVPISDTIIP</u> EVPQLTDLFSVDITDSSIGLRWTPPLNSSTIIGYRITVVAAGEGIPFEDFV DSSVGYYTGTGLEPGIDYDISVITLINGGESAPTTLTQQT <u>AVPPPTDLR</u> <u>FTNIGPDTMRVTWAPPPSIDLTNFLVRYSPVKNEEDVAELSISPSDNA</u> <u>VVLTNLLPGTEYVVSVSVEQHESTPLRGRQKT</u> <u>GLDSPTGIDFSDIT</u> ANSFTVHWIAPRATITGYRIRHHPEHFSGRPREDRVPHSRNSITLTNL TPGTEYVVSIVALNGREESPLLIGRSRSHHHHHH
35	Proteína FN-7-EDB-89-HIS de Cinomólogo	<u>VVTPLSPPTNLHLETNPDTGVLTVSWERSTTPDITGYRITTTPTNGQQ</u> <u>GYSLEEVVHADQSSCTFDNLSPGLEYNVSVYTVKDDKESVPISDTIIP</u> EVPQLTDLFSVDITDSSIGLRWTPPLNSSTIIGYRITVVAAGEGIPFEDFV DSSVGYYTGTGLEPGIDYDISVITLINGGESAPTTLTQQT <u>AVPPPTDLR</u> <u>FTNIGPDTMRVTWAPPPSIDLTNFLVRYSPVKNEEDVAELSISPSDNA</u> <u>VVLTNLLPGTEYVVSVSVEQHESTPLRGRQKT</u> <u>GLDSPTGIDFSDIT</u> ANSFTVHWIAPRATITGYRIRHHPEHMSGRPREDRVPPSRNSITLTNL TPGTEYVVSIVALNGREESPLLIGRSRSHHHHHH
36	Proteína FN-7-EDB-89-HIS de rata	<u>VVTPLSPPTNLHLEANPDTGVLTVSWERSTTPDITGYRITTTPTNGQQ</u> <u>GTALEEVVHADQSSCTFENLNPGLNPGLEYNVSVYTVKDDKESAPISDTVIP</u> EVPQLTDLFSVDITDSSIGLRWTPPLNSSTIIGYRITVVAAGEGIPFEDFV DSSVGYYTGTGLEPGIDYDISVITLINGGESAPTTLTQQT <u>AVPPPTDLR</u> <u>FTNIGPDTMRVTWAPPPSIDLTNLLVRYSPVKNEEDVAELSISPSDNA</u> <u>VVLTNLLPGTEYLVSVSSVEQHESTPLRGRQKT</u> <u>GLDSPTGDFSSDV</u> TANSFTVHWVAPRAPITGYIIRHHAHESAGRPRQDRVPPSRNSITLTNL LNPGEYIVTIIAVNGREESPLLIGRSRSHHHHHH

Anticuerpos anti-EDB

Los anticuerpos de la presente invención se unen específicamente a EDB. Para la preparación de ADCs de la invención, un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede ser cualquier anticuerpo (incluyendo los anticuerpos descritos en la presente memoria), o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se una específicamente a EDB. El anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se puede aislar, purificar o derivatizar para uso en la preparación de un ADC de EDB.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo" o "Ab" se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de reconocer y de unirse a una diana o un antígeno específicos, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento del antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. El término puede abarcar cualquier tipo de anticuerpo, incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, "fragmentos de unión al antígeno" (o porción), tal como Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, Fc, etc., de anticuerpos intactos que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno determinado (por ejemplo, EDB), una región determinante de la complementariedad aislada (CDR), anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, mutantes de los mismos, proteínas de fusión que tienen un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo del dominio), anticuerpos de cadena sencilla (ScFv) y de dominio sencillo (por ejemplo, anticuerpos de tiburón y camélido), maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23(9): 1126-1136), anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que incluya un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos pueden ser de origen murino, de rata, humano o de

cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados). En algunos aspectos de la invención, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de los ADCs de EDB divulgados es un anticuerpo humano quimérico, humanizado o recombinante, o el fragmento de unión a EDB del mismo.

Los anticuerpos nativos o de origen natural y las inmunoglobulinas nativas son típicamente glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150,000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (LC) idénticas y dos cadenas pesadas (HC) idénticas. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios o regiones constantes (por ejemplo, bisagra, CH1, CH2 o CH3), denominados "dominios CH". Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) y un dominio constante, denominado "dominio CL". El término "región constante" o "dominio constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tal como la unión al receptor Fc (FcR), la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), la opsonización, el inicio de la citotoxicidad dependiente del complemento y la desgranulación de los mastocitos. Las regiones constantes de los anticuerpos EDB se pueden derivar de regiones constantes de una cualquiera de IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, cualquiera de los isotipos de las mismas (por ejemplo, isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de IgG), así como subclases y versiones mutadas de las mismas.

El dominio CH1 incluye el primer dominio de la región constante (el amino más terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina que se extiende, por ejemplo, desde alrededor de las posiciones 118-215 de acuerdo con el índice EU de Kabat. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y el amino terminal de la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina, y no forma parte de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina.

La región bisagra incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región de bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, lo que permite que las dos regiones de unión al antígeno N terminal se muevan independientemente. Las regiones de bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios de bisagra superior, medio e inferior.

El dominio CH2 incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde alrededor de las posiciones 231-340 de acuerdo con el índice EU de Kabat. El dominio CH2 es único porque no está estrechamente emparejado con otro dominio. En lugar de ello, se interponen dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas por N entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. En algunos aspectos, el anticuerpo (o fragmento del mismo) de la invención comprende un dominio CH2 derivado de una molécula de IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunos aspectos, la IgG es una IgG humana.

El dominio CH3 incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de cadena pesada que se extiende aproximadamente 110 residuos desde el N terminal del dominio CH2, por ejemplo, desde alrededor de las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice EU de Kabat. El dominio CH3 normalmente forma la porción C terminal del anticuerpo. Sin embargo, en algunas inmunoglobulinas, dominios adicionales se pueden extender desde el dominio CH3 para formar la porción C terminal de la molécula (por ejemplo, el dominio CH4 en la cadena μ de IgM y la cadena ϵ de IgE). En algunos aspectos, el anticuerpo (o fragmento del mismo) de la invención comprende un dominio CH3 derivado de una molécula de IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunos aspectos, la IgG es una IgG humana.

El dominio CL incluye el dominio de la región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina que se extiende, por ejemplo, desde alrededor de las posiciones 108-214 de acuerdo con el índice EU de Kabat. El dominio CL es adyacente al dominio VL. En algunos aspectos, el anticuerpo (o fragmento del mismo) de la invención comprende un dominio constante de la cadena ligera kappa (CL κ). En algunos aspectos, el anticuerpo (o fragmento del mismo) comprende un dominio constante de la cadena ligera lambda (CL λ). CL κ tiene los loci polimórficos conocidos CL κ -V/A45 y CL κ -L/V83 (utilizando numeración de Kabat), lo que permite los polimorfismos Km(1): CL κ -V45/L83; Km(1,2): CL κ -A45/L83; y Km(3): CL κ -A45/V83. Los polipéptidos, anticuerpos y ADCs de la invención pueden tener componentes de anticuerpos con cualquiera de estas regiones constantes de cadena ligera.

La región Fc generalmente comprende un dominio CH2 y un dominio CH3. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana generalmente se define para extenderse desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230 (de acuerdo con el índice EU de Kabat), hasta el carboxilo terminal del mismo. Una región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991).

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea solas o en combinación. Como se sabe en la técnica, las regiones variables de la cadena pesada y ligera constan cada una de cuatro regiones marco (FR)

conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDRs de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FRs y, junto con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión del antígeno de los anticuerpos.

- 5 Una CDR de un dominio variable se puede identificar de acuerdo con las definiciones de Kabat (Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C.), Chothia (Chothia et al., Nature 342:877-883, (1989)), la acumulación de Kabat y Chothia, definición de AbM (derivada utilizando el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (ahora Accelrys®)), definición de contacto (basada en contactos de antígenos observados, establecidos en MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745, (1996)), y/o definición conformacional (Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166, 2008) o cualquier método de determinación de CDR bien conocido en la técnica. Tal como se utiliza en la presente memoria, una CDR se puede referir a CDRs definidas por cualquier aproximación conocida en la técnica, incluyendo combinaciones de aproximaciones. Para la presente invención, las CDRs establecidas en la Tabla 2 a continuación se derivaron utilizando las definiciones de Kabat y Chothia. Los anticuerpos anti-EDB, o el fragmento de unión al antígeno los mismos, de la presente invención incluyen una o más CDR(s) (tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o las seis CDRs).

- 20 Un anticuerpo, un ADC o un polipéptido que "se une específicamente" o "se une preferencialmente" (utilizados indistintamente en la presente memoria) a una diana o un antígeno (por ejemplo, proteína EDB) es un término bien entendido en la técnica, y los métodos para determinar dicha unión específica o preferencial también son bien conocidos en la técnica. Se dice que una molécula muestra "unión específica" o "unión preferencial" si reacciona o se asocia con mayor frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferencialmente" a una diana o un antígeno si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que cuando se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferencialmente a un epítipo de EDB es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que cuando se une a otros epítopos de EDB o epítopos que no son EDB.

- 30 El término "afinidad de enlace" o " K_D " tal como se utiliza en la presente memoria, se pretende referir a la constante de disociación del equilibrio de una interacción antígeno-anticuerpo particular. La K_D es la proporción entre la tasa de disociación, también llamada "tasa de disociación" o " k_d ", a la tasa de asociación, o "tasa de asociación" o " k_a ". Por lo tanto, K_D es igual a k_d/k_a y se expresa como concentración molar (M). De ello se deduce que cuanto menor sea la K_D , más fuerte es la afinidad de enlace. Por lo tanto, una K_D de 1 μ M indica una afinidad de unión débil en comparación con una K_D de 1 nM. Los valores K_D de los anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo se realiza mediante el uso de resonancia plasmónica de superficie, normalmente utilizando un sistema de biosensor tal como un sistema BIAcore®. En la técnica se conocen otros ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de ligandos tal como anticuerpos hacia dianas, incluyendo, por ejemplo, ELISAs, inmunodetección tipo Western RIAs y análisis de citometría de flujo.

- 40 Un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a EDB está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos a EDB). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. También se entiende que, al leer esta definición, por ejemplo, un anticuerpo (o fracción o epítipo) que se une específica o preferencialmente a una primera diana puede o no unirse específica o preferencialmente a una segunda diana.

En algunos aspectos de la invención, un ADC de EDB incluye un anticuerpo que compite por la unión a EDB humano con, y/o se une al mismo epítipo que, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, descrito en la presente memoria.

- 50 El término "competir", tal como se utiliza en la presente memoria con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, se une a un epítipo de una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de modo que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítipo cognado disminuye de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, donde la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también disminuye de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede ser el caso, pero no necesariamente. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, donde cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando cognado, ya sea en la misma, mayor o menor medida, se dice que los anticuerpos "compiten de forma cruzada" entre sí por la unión de su(s) respectivo(s) epítipo(s). La presente invención abarca tanto los anticuerpos competidores como los de competencia cruzada. Independientemente del mecanismo por el cual ocurre dicha competencia o competencia

cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítipo común o porción del mismo), el técnico experto apreciaría, basándose en las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, que dichos anticuerpos competidores y/o de competencia cruzada están abarcados y pueden ser útiles para los métodos divulgados en la presente memoria.

- 5 El anticuerpo "L19", también denominado en la presente memoria como anticuerpo "EDB-L19", es un anticuerpo humano que se une a EDB. El anticuerpo L19 se divulga y caracteriza en Publicación Internacional PCT No. WO1997/045544, WO1999/058570 y WO2001/062800, y las secuencias de L19-EDB se proporcionan en la presente memoria en la Tabla 2 (SEQ ID NOs. 1-16).

- 10 En algunos aspectos de la invención, los anticuerpos utilizados para preparar ADCs de EDB pueden ser anticuerpos monoclonales. El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen a la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, las cuales normalmente
15 incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como siendo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se debe de interpretar como que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular.

- 20 En algunos aspectos de la invención, los anticuerpos utilizados para preparar ADCs de la invención pueden ser monovalentes, es decir, que tienen un sitio de unión al antígeno por molécula (por ejemplo, IgG o Fab). En algunos casos, un anticuerpo monovalente puede tener más de un sitio de unión al antígeno, pero los sitios de unión provienen de diferentes antígenos. En algunos aspectos de la invención, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de un ADC de la invención puede incluir un "anticuerpo bivalente", es decir, que
25 tiene dos sitios de unión al antígeno por molécula (por ejemplo, IgG). En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades del antígeno. Alternativamente, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos. Un anticuerpo "biespecífico", "doblemente específico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido que tiene dos sitios de unión al antígeno diferentes. Los dos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo biespecífico se unen a dos epítopes diferentes, los cuales pueden residir en la misma diana proteica o en
30 diferentes.

El término "anticuerpo quimérico" pretende referirse a anticuerpos en los cuales parte o la totalidad de las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el cual las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

- 35 Tal como se utiliza en la presente memoria, anticuerpo "humanizado" o "injertado con CDR" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tal como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Preferiblemente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las
40 cuales los residuos de una o más CDRs del receptor se reemplazan por residuos de una o más CDRs de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

- Los anticuerpos de la invención se pueden producir utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación de fagos, tecnologías sintéticas o combinaciones de dichas tecnologías u otras tecnologías fácilmente conocidas en la técnica (véase, por
45 ejemplo, Jayasena, S.D., Clin. Chem., 45: 1628-50 (1999) y Fellouse, F.A., et al, J. Mol. Biol., 373(4):924-40 (2007)). Se puede encontrar orientación adicional en Sambrook J. & Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley,
50 John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); y Coligan et al., Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003).

- Los ácidos nucleicos que codifican para las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos utilizados para preparar los ADCs de la invención se pueden clonar en un vector para expresión o propagación. La secuencia
55 que codifica para el anticuerpo de interés se puede mantener en un vector en una célula hospedera y luego la célula hospedera se puede expandir y congelar para uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en cultivos celulares se puede llevar a cabo a través de la clonación de genes de anticuerpos de células B por medios conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Tiller et al., J. Immunol. Methods 329:112-124, 2008; Patente U.S. No. 7,314,622.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una construcción, la cual es capaz de administrar y, preferiblemente, expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula hospedera. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes condensadores catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, tal como células productoras.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "célula hospedera" incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de vector(es) para la incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células hospederas incluyen la progenie de una única célula hospedera, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una célula hospedera incluye células transfectadas in vivo con un polinucleótido(s) de esta invención.

Como es conocido en la técnica, "polinucleótido", "ácido nucleico/nucleótido" y "oligonucleótido" se utilizan indistintamente en la presente memoria, e incluyen formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, análogos de los mismos o cualquier sustrato que se pueda incorporar a una cadena mediante la ADN o ARN polimerasa. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los polinucleótidos pueden ser naturales, sintéticos, recombinantes o cualquier combinación de los mismos.

Para todas las posiciones de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada discutidos en la presente invención, la numeración es de acuerdo con el índice Eu descrito por primera vez en Edelman et al., 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85, que describe la secuencia de aminoácidos de la proteína de mieloma Eu, la cual es la primera IgG1 humana secuenciada. El índice Eu de Edelman et al. también se establece en Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda. Por tanto, el "índice EU de acuerdo con lo establecido en Kabat" o "índice EU de Kabat" se refiere al sistema de numeración de residuos basado en el anticuerpo humano Eu de IgG de Edelman et al., según lo establecido en Kabat 1991.

El sistema de numeración utilizado para la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera es el establecido en Kabat 1991.

Los ADCs de EDB de la presente invención se pueden conjugar con el fármaco/carga útil utilizando tecnología de cisteína convencional o tecnología de conjugación específica del sitio. Para permitir la conjugación específica del sitio a través de cisteínas diseñadas, el dominio constante se puede modificar para proporcionar un residuo de cisteína reactivo diseñado en uno o más sitios específicos (a veces denominados como mutantes "Cys"). Para permitir la conjugación específica del sitio a través de la conjugación basada en transglutaminasa, una etiqueta que contiene glutamina ("Q") donadora de acilo o una glutamina endógena se vuelve reactiva mediante el diseño de polipéptidos en presencia de transglutaminasa y una amina.

La presente invención prevé la optimización del anticuerpo L19-EDB mediante la generación de un anticuerpo no inmunogénico. En algunos aspectos, la región constante de IgG1 humana de L19-EDB que comprende un alotipo de G1m(a) que tiene ácido aspártico (D) en la posición 356 y leucina (L) en la posición 358, puede sustituirse por un alotipo no G1m(a) que tiene ácido glutámico (E) en la posición 356 y metionina (M) en la posición 358 (de acuerdo con la numeración del índice EU de Kabat).

Además, para reducir los posibles riesgos químicos y la unión del antígeno a un sitio putativo de glicación de proteínas, los anticuerpos anti-EDB de la presente invención pueden tener una región variable de la cadena pesada que comprende una mutación de lisina (K) en la posición 94 (de acuerdo con la numeración del índice EU de Kaba) a una arginina (R), por ejemplo (K94R).

Para la conjugación específica del sitio a través de cisteínas diseñadas, el dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo anti-EDB puede comprender un residuo de cisteína diseñado reactivo en la posición 290 (K290C), de acuerdo con la numeración del índice EU de Kabat. Se pueden introducir sustituciones de cisteína adicionales. En otro aspecto, el dominio constante de la cadena ligera del anticuerpo anti-EDB puede comprender un residuo de cisteína diseñado reactivo en la posición 183 (κK183C), de acuerdo con la numeración de Kabat. Se pueden introducir sustituciones de cisteína adicionales.

Para la conjugación específica del sitio a través de residuos de glutamina diseñados, el dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo anti-EDB puede comprender una etiqueta diseñada que contiene glutamina H16 LLQG (SEQ ID NO: 40). Además, para optimizar esta conjugación específica del sitio, el aminoácido lisina (K) en la posición 222 (de acuerdo con el índice EU de Kabat) en la cadena pesada puede sustituirse por una arginina (R), por ejemplo (K222R).

Las modificaciones de aminoácidos se pueden realizar mediante cualquier método conocido en la técnica y muchos de estos métodos son bien conocidos y rutinarios para el técnico experto, por ejemplo, mutaciones, sustituciones, eliminaciones y/o adiciones. Por ejemplo, pero no como limitación, las sustituciones,

eliminaciones e inserciones de aminoácidos se pueden lograr utilizando cualquier técnica bien conocida basada en PCR. Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar mediante mutagénesis dirigida al sitio (véase, por ejemplo, Zoller and Smith, 1982, Nucl. Acids Res. 10:6487-6500; y Kunkel, 1985, PNAS 82:488).

En algunos aspectos de la invención, los ADCs de EDB incluyen un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una cadena pesada y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a cualquiera de las cadenas pesadas o ligeras divulgadas en la presente memoria. Los residuos que han sido alterados pueden estar en la región variable o en la región constante del anticuerpo. En algunos aspectos, no hay más de 1, 2, 3, 4 o 5 residuos que hayan sido alterados en comparación con cualquiera de las cadenas pesadas o ligeras divulgadas en la presente memoria.

El término "porcentaje idéntico" en el contexto de secuencias de aminoácidos significa el número de residuos en dos secuencias que son iguales cuando se alinean para lograr la máxima correspondencia. Hay varios algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden utilizar para medir el porcentaje de identidad de aminoácidos (es decir, la herramienta de alineación local básica o BLAST®). A menos que se especifique lo contrario, se utilizan los parámetros predeterminados para un programa o algoritmo en particular.

Para uso en la preparación de ADCs de EDB, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser sustancialmente puros, es decir, al menos 50 % puros (es decir, libres de contaminantes), más preferiblemente, al menos 90 % puros, más preferiblemente, al menos 95 % puros, aún más preferiblemente, al menos 98 % puros, y lo más preferiblemente, al menos 99 % puros.

Las Tablas 2 y 3 proporcionan las secuencias de aminoácidos (proteínas) y las secuencias de ácidos nucleicos (ADN) asociadas de los anticuerpos anti-EDB de la presente invención. Las CDRs son como es definido por Kabat y Chothia. Los residuos sombreados identifican mutaciones, sustituciones y/o inserciones de aminoácidos relacionadas con la optimización de anticuerpos y los residuos subrayados identifican mutaciones, sustituciones y/o inserciones de aminoácidos relacionadas con la tecnología de conjugación específica del sitio.

Tabla 2. Secuencias de anticuerpos anti-EDB

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
1	Proteína EDB-L19 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AED TAVYYCAKPFYFDYWGQGT LVT VSS
2	ADN de EDB-L19 VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT AGCAGTTTTTCGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGTGGTAGTTCGGGTACCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACCGTTTCCGTAT TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCGAGT
3	EDB L19 VH CDR1 Kabat	SFSMS
4	EDB-L19 VH CDR1 Chothia	GFTSSF
5	EDB-L19 VH CDR2 Kabat	SISGSSGTTYADSVKG
6	EDB-L19 VH CDR2 Chothia	SGSSGT
7	EDB-L19 VH CDR3 Kabat/Chothia	PFPYFDY

8	Proteína IgG1 humana EDB-L19 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKPFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
9	ADN de EDB-L19 HC	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT AGCAGTTTTTCGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGTGGTAGTTCGGGTACCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACCGTTTCCGTAT TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGTG CGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC AAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
		ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
10	Proteína EDB-L19 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPR LLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTG RIPPTFGQGTKVEIK

11	ADN de EDB-L19 VL	GAAATTGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAGCTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTATTATGCATCCAGCAGGGCCACTGGC ATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTAT TACTGTCAGCAGACGGGTCGTATTCCGCCGACGTTCCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAA
12	EDB-L19 VL CDR1 Kabat/Chothia	RASQSVSSSFLA
13	EDB-L19 VL CDR2 Kabat/Chothia	YASSRAT
14	EDB-L19 VL CDR3 Kabat/Chothia	QQTGRIPPT
15	Proteína Kappa humana EDB- L19 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPR LLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTG RIPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFI YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
16	ADN de EDB-L19 LC	GAAATTGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAGCTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTATTATGCATCCAGCAGGGCCACTGGC ATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTAT TACTGTCAGCAGACGGGTCGTATTCCGCCGACGTTCCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC CCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
17	Proteína EDB-PFE HC	EVQLLESQGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRLED TAVYYCAKPFYFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTLS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
18	ADN de EDB-PFE HC	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT

		AGCAGTTTTTCGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGTGGTAGTTCGGGTACCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACCGTTTCCGTAT TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTG CGTCGACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGGACCGTCACTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCC AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGT
19	Proteína EDB-(K290C) HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKPFYFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTCPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

20	ADN de EDB- (K290C) HC	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT AGCAGTTTTTCGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGTGGTAGTTCGGGTACCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTC AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACCGTTTCCGTAT TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTG CGTCGACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG
		AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC A A A A C C C AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACATGCC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGT
21	Proteína EDB-(K94R) VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AED TAVYYCAR PFPYFDYWGQGLTVTVSS
22	ADN de EDB- (K94R) VH	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT AGCAGTTTTTCGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGTGGTAGTTCGGGTACCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTC AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGACCGTTTCCGTAT TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT
23	Proteína EDB-(K94R) HC	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AED TAVYYCAR PFPYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

24	ADN de EDB-(K94R) HC	<p>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTT AGCAGTTTTTCGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGTGGTAGTTCGGGTACCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGACCGTTTCCGTAT TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTG CGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCA GGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTCTAC AGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT</p>
		<p>GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGT</p>
25	Proteína EDB-(K94R-K290C) HC	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKG LEWVSSIISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARPPFPYFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTCPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>

26	ADN de EDB- (K94R- K290C) HC	<p>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT AGCAGTTTTTCGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGTGGTAGTTCGGGTACCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGACCGTTTTCCGTAT TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTG CGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTAAACCC AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACATGCC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCCGGA</p>
27	Proteína EDB-(H16- K222R) HC	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AED TAVYYCAKFPFYFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDRTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPRELLOGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>

28	ADN de EDB- (H16-K222R) HC	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT AGCAGTTTTTCGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGTGGTAGTTCCGGTACCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACCGTTTCCGTAT TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTG CGTCGACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT CTTGTGACCGCACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAGAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGCTGCTGCAGGGGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
29	Proteína EDB-(K94R- H16-K222R) HC	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AED TAVYYCARPPFPYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDRTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPRELLOGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	EDB-(K94R- H16-K222R) HC	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT AGCAGTTTTTCGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG

	ADN	GGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGTGGTAGTTTCGGGTACCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGACCGTTTCCGTAT TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTG CGTCGACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT CTTGTGACCGCACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGCTGCTGCAGGGGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCCGGA
31	Proteína EDB- (κK183C) LC	EIVLTQSPGTL ^S LSLSPGERATL ^S SCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPR LLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTG RIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS ^V FIFPPSDEQLKSGTASV ^V CLLN ^N F YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK ^D STYLS ^S SLT ^L LS ^C A DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
32	ADN de EDB- (κK183C) LC	GAAATTGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAGCTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTATTATGCATCCAGCAGGGCCACTGGC ATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTAT TACTGTCAGCAGACGGGTCTGATTCCGCGACGTTCCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCTGCGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA ^C CCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

En algunos aspectos de la invención, un ADC de EDB incluye un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al dominio B extra (EDB) de fibronectina (FN).

- 5 En aspectos de la invención, un anticuerpo de la presente invención, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL), en el que la VH tiene tres CDRs que comprenden SEQ ID NOs: 3, 5 y 7. En aspectos de la invención, un anticuerpo,

o un fragmento de unión al antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL), en el que la VL tiene tres CDRs que comprenden SEQ ID NOs: 12, 13 y 14. Un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, tiene un VH que tiene tres CDRs que comprenden SEQ ID NOs: 3, 5 y 7; y una VL que tiene tres CDRs que comprenden SEQ ID NOs: 12, 13 y 14.

- 5 En otro aspecto, un anticuerpo de la presente invención, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 3, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 5 y una CDR3 de VH de SEQ ID NO: 7 (de acuerdo con Kabat). En otro aspecto, un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 12, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 13 y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 14 (de acuerdo con Kabat y Chothia).

- 10 En algunos aspectos de la invención, un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede tener una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NOs: 1 o 21 y/o una región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 10. Un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender: una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 10; una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 10; una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 10; o una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 10.

- 20 En otro aspecto de la invención, un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede tener una cadena pesada que comprende una cualquiera de SEQ ID NOs: 19 o 25, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31. Se describen en la presente memoria, pero no de acuerdo con la invención, un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NOs: 8, 17, 23, 27 y 29, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 15.

- 25 Un anticuerpo de la presente invención, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender: una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 19 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 31; una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 31.

- 30 Un anticuerpo de la presente invención, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender: una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 19 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31; una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31.

- 35 Tabla 3. SEQ ID NOs para diversos anticuerpos anti-EDB. CDRs en Kabat y Chothia.

	VH	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH	HC	VL	CDR1 de VL	CDR2 de VL	CDR3 de VL	LC
EDB-L19	1	3 (4)	5 (6)	7	8	10	12	13	14	15
EDB-PFE	1	3 (4)	5 (6)	7	17	10	12	13	14	15
EDB-(κK183C-K290C)	1	3 (4)	5 (6)	7	19	10	12	13	14	31
EDB-(K94R)	21	3 (4)	5 (6)	7	23	10	12	13	14	15
EDB-(κK183C-K94R-K290C)	21	3 (4)	5 (6)	7	25	10	12	13	14	31
EDB-(H16-K222R)	1	3 (4)	5 (6)	7	27	10	12	13	14	15
EDB-(K94R-H16-K222R)	21	3 (4)	5 (6)	7	29	10	12	13	14	15

Fármacos

Los fármacos útiles en la preparación de los ADCs de EDB divulgados incluyen cualquier sustancia que tenga actividad biológica o detectable, por ejemplo, agentes terapéuticos, etiquetas detectables, agentes de unión,

etc., y profármacos, los cuales se metabolizan a un agente activo in vivo. Un fármaco también puede ser un derivado de fármaco, en el que un fármaco ha sido funcionalizado para permitir la conjugación con un anticuerpo de la invención.

Un agente terapéutico es un agente que ejerce un efecto citotóxico, citostático y/o inmunomodulador sobre las células cancerígenas o las células inmunes activadas. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes citostáticos y agentes inmunomoduladores. Un efecto citotóxico se refiere al agotamiento, eliminación y/o la muerte de una o más células diana. Un agente citotóxico se refiere a un agente que tiene un efecto citotóxico y/o citostático en una célula. Un efecto citostático se refiere a la inhibición de la proliferación celular. Un agente citostático se refiere a un agente que tiene un efecto citostático sobre una célula, inhibiendo así el crecimiento y/o la expansión de un subconjunto específico de células. Un agente quimioterapéutico se refiere a un agente que es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Un agente inmunomodulador se refiere a un agente que estimula la respuesta inmune a través de la producción de citocinas y/o anticuerpos y/o modulando la función de las células T, inhibiendo o reduciendo así el crecimiento de un subconjunto de células (es decir, células tumorales), ya sea directa o indirectamente, permitiendo que otro agente sea más eficaz.

En algunos aspectos, el fármaco es un fármaco permeable a la membrana. En tales aspectos, la carga útil puede provocar un efecto espectador en el que las células que pueden no expresar EDB+ de FN o tener EDB+ de FN unido a su superficie, pero que rodean a la célula que está unida por el ADC, son destruidas por la carga útil permeable a la célula. Esto ocurre cuando la carga útil se libera del anticuerpo (es decir, mediante la escisión de un enlazador escindible) y cruza la membrana celular y, tras la difusión, induce la muerte de las células circundantes.

De acuerdo con los métodos divulgados, los ADCs de EDB se pueden producir o generar teniendo (a) un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a EDB; (b) un enlazador y (c) un fármaco. La proporción fármaco a anticuerpo (DAR), o carga del fármaco, indica el número de moléculas del fármaco conjugadas por anticuerpo. Las composiciones, los lotes y/o las formulaciones de una pluralidad de ADCs se pueden caracterizar mediante una DAR promedio. La DAR y la DAR promedio se pueden determinar mediante diversos medios convencionales, tal como espectroscopia UV, espectroscopia de masas, ensayo de ELISA, métodos radiométricos, cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), electroforesis y HPLC.

En aspectos de la invención, un ADC de EDB puede tener una DAR de 1, una DAR de 2, una DAR de 3, una DAR de 4, una DAR de 5, una DAR de 6, una DAR de 7, una DAR de 8, una DAR de 9, una DAR de 10, una DAR de 11, una DAR de 12 o una DAR mayor que 12. En aspectos de la invención, un ADC de EDB puede tener una molécula del fármaco, o 2 moléculas del fármaco, o 3 moléculas del fármaco, o 4 moléculas del fármaco, o 5 moléculas del fármaco, o 6 moléculas del fármaco, o 7 moléculas del fármaco, u 8 moléculas del fármaco, o 9 moléculas del fármaco, o 10 moléculas del fármaco, u 11 moléculas del fármaco, o 12 moléculas del fármaco o más de 12 moléculas.

En aspectos de la invención, un ADC de EDB puede tener una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 2 a alrededor de 4, o una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 3 a alrededor de 5, o una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 4 a alrededor de 6, o una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 5 a alrededor de 7, o una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 6 a alrededor de 8, o una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 7 a alrededor de 9, o una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 8 a alrededor de 10, o una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 9 a alrededor de 11, o una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 10 a alrededor de 12, etc. En algunos aspectos, las composiciones, los lotes y/o las formulaciones de ADCs de EDB pueden tener una DAR promedio de alrededor de 1, o una DAR promedio de alrededor de 2, una DAR promedio de alrededor de 3, o una DAR promedio de alrededor de 4, o una DAR promedio de alrededor de 5, una DAR de alrededor de 6, o una DAR promedio de alrededor de 7, o una DAR promedio de alrededor de 8, o una DAR promedio de alrededor de 9, o una DAR promedio de alrededor de 10, o una DAR promedio de alrededor de 11, o una DAR promedio de alrededor de 12 o una DAR promedio mayor que 12. Tal como se utiliza en los intervalos anteriores de DAR promedio, el término "alrededor de" significa +/- 0.5 %.

Una composición, un lote y/o una formulación de ADCs de EDB se puede caracterizar por un intervalo preferible de DAR promedio, por ejemplo, una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 3 a alrededor de 5, una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 3 a alrededor de 4, o una DAR promedio en el intervalo de alrededor de 4 a alrededor de 5. Además, una composición, un lote y/o una formulación de ADCs de EDB se puede caracterizar por un intervalo preferible de DAR promedio, por ejemplo, una DAR promedio en el intervalo de 3 a 5, una DAR promedio en el intervalo de 3 a 4, o una DAR promedio en el intervalo de 4 a 5.

En algunos aspectos de la invención, una composición, un lote y/o una formulación de ADCs de EDB se puede caracterizar por una DAR promedio de alrededor de 1.0, o una DAR promedio de 1.0, o una DAR promedio de 1.1, o una DAR promedio de 1.2, o una DAR promedio de 1.3, o una DAR promedio de 1.4, o una DAR promedio de 1.5, o una DAR promedio de 1.6, o una DAR promedio de 1.7, o una DAR promedio de 1.8, o una DAR promedio de 1.9. En otro aspecto, una composición, un lote y/o una formulación de ADCs de EDB se puede

caracterizar por una DAR promedio de alrededor de 2.0, o una DAR promedio de 2.0, o una DAR promedio de 2.1, o una DAR promedio de 2.2, o una DAR promedio de 2.3, o una DAR promedio de 2.4, o una DAR promedio de 2.5, o una DAR promedio de 2.6, o una DAR promedio de 2.7, o una DAR promedio de 2.8, o una DAR promedio de 2.9. En otro aspecto, una composición, un lote y/o una formulación de ADCs de EDB se puede caracterizar por una DAR promedio de alrededor de 3.0, o una DAR promedio de 3.0, o una DAR promedio de 3.1, o una DAR promedio de 3.2, o una DAR promedio de 3.3, o una DAR promedio de 3.4, o una DAR promedio de 3.5, o una DAR promedio de 3.6, o una DAR promedio de 3.7, o una DAR promedio de 3.8, o una DAR promedio de 3.9. En otro aspecto, una composición, un lote y/o una formulación de ADCs de EDB se puede caracterizar por una DAR promedio de alrededor de 4.0, o una DAR promedio de 4.0, o una DAR promedio de 4.1, o una DAR promedio de 4.2, o una DAR promedio de 4.3, o una DAR promedio de 4.4, o una DAR promedio de 4.5, o una DAR promedio de 4.6, o una DAR promedio de 4.7, o una DAR promedio de 4.8, o una DAR promedio de 4.9, o una DAR promedio de 5.0.

En otro aspecto, una composición, un lote y/o una formulación de ADCs de EDB se puede caracterizar por una DAR promedio de 12 o menos, una DAR promedio de 11 o menos, una DAR promedio de 10 o menos, una DAR promedio de 9 o menos, una DAR promedio de 8 o menos, una DAR promedio de 7 o menos, una DAR promedio de 6 o menos, una DAR promedio de 5 o menos, una DAR promedio de 4 o menos, una DAR promedio de 3 o menos, una DAR promedio de 2 o menos o una DAR promedio de 1 o menos.

En otros aspectos, una composición, un lote y/o una formulación de ADCs de EDB se puede caracterizar por una DAR promedio de 11.5 o menos, una DAR promedio de 10.5 o menos, una DAR promedio de 9.5 o menos, una DAR promedio de 8.5 o menos, una DAR promedio de 7.5 o menos, una DAR promedio de 6.5 o menos, una DAR promedio de 5.5 o menos, una DAR promedio de 4.5 o menos, una DAR promedio de 3.5 o menos, una DAR promedio de 2.5 o menos, una DAR promedio de 1.5 o menos.

En algunos aspectos de la presente invención, los métodos para la conjugación convencional mediante residuos de cisteína y las condiciones de purificación divulgadas en la presente memoria proporcionan una composición, un lote y/o una formulación de ADCs de EDB con una DAR promedio optimizada en el intervalo de alrededor de 3 a 5, preferiblemente alrededor de 4.

En algunos aspectos de la presente invención, los métodos para la conjugación específica del sitio mediante residuos de cisteína diseñados y las condiciones de purificación divulgadas en la presente memoria proporcionan una composición, un lote y/o una formulación de ADCs de EDB con una DAR promedio optimizada en el intervalo de alrededor de 3 a 5, preferiblemente alrededor de 4.

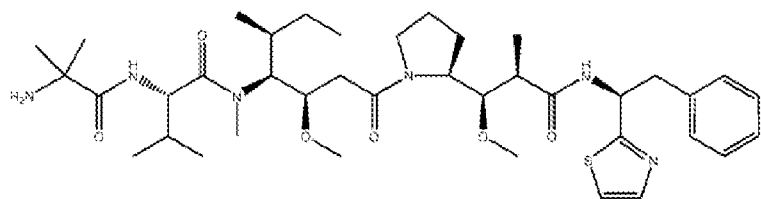
En algunos aspectos de la presente invención, los métodos para la conjugación específica del sitio mediante condiciones de conjugación y purificación basadas en transglutaminasa divulgadas en la presente memoria proporcionan una composición, un lote y/o una formulación de ADCs de EDB con una DAR promedio optimizada en el intervalo de alrededor de 1 a 3, preferiblemente alrededor de 2.

Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, una antraciclina, una auristatina, CC-1065, una dolastatina, una duocarmicina, una enediina, una geldanamicina, una maitansina, una puomicina, un taxano, un alcaloide de la vinca, SN-38, tubulisina, hemiasterlina y estereoisómeros, isómeros, análogos o derivados de los mismos. También se pueden utilizar toxinas vegetales, otras proteínas bioactivas, enzimas (es decir, ADEPT), radioisótopos y fotosensibilizadores (es decir, para terapia fotodinámica).

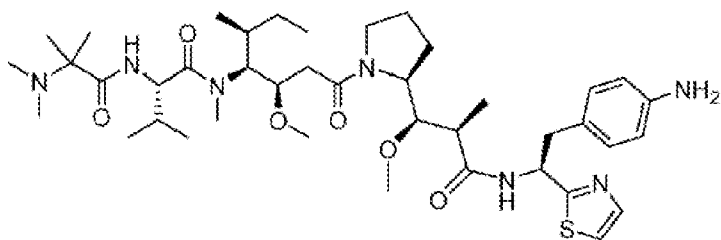
Las antraciclinas se derivan de bacterias *Streptomyces* y se han utilizado para tratar una amplia gama de cánceres, tal como leucemias, linfomas, cáncer de mama, de útero, de ovario y de pulmón. Las antraciclinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, daunorrubicina, doxorubicina (es decir, adriamicina), epirubicina, idarrubicina, valrubicina y mitoxantrona.

Las dolastatinas y sus análogos peptídicos y derivados, las auristatinas, son agentes antimetabólicos muy potentes que han demostrado tener actividad anticancerígena y antifúngica. Véase, por ejemplo, Patente U.S. No. 5,663,149 y Pettit et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965, (1998). Las dolastatinas y auristatinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, dolastatina 10, auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), MMAD (monometil auristatina D o monometil dolastatina 10), MMAF (monometil auristatina F o N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina), MMAE (monometil auristatina E o N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-norefedrina), éster de ácido 5-benzoilvalérico-AE (AEVB) y otros nuevos.

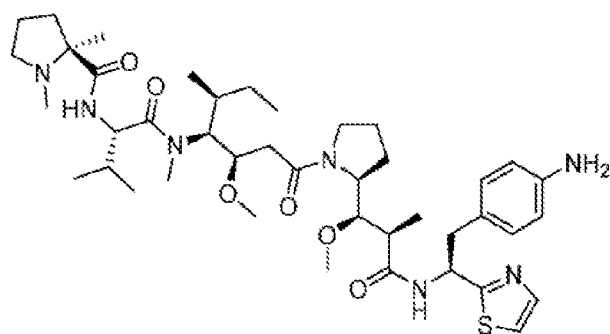
En algunos aspectos, el fármaco/la carga útil es una auristatina. Las auristatinas inhiben la proliferación celular mediante la inhibición de la formación de microtúbulos durante la mitosis a través de la inhibición de la polimerización de la tubulina. Publicación Internacional PCT No. WO 2013/072813, divulga auristatinas que son útiles en los ADCs de EDB de la presente invención y proporciona métodos para producir las auristatinas. Por ejemplo, la carga útil 0101 tiene la estructura:



la carga útil 1569 que tiene la estructura:

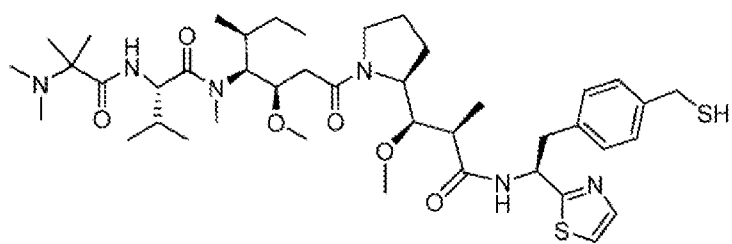


la carga útil 9411 que tiene la estructura:

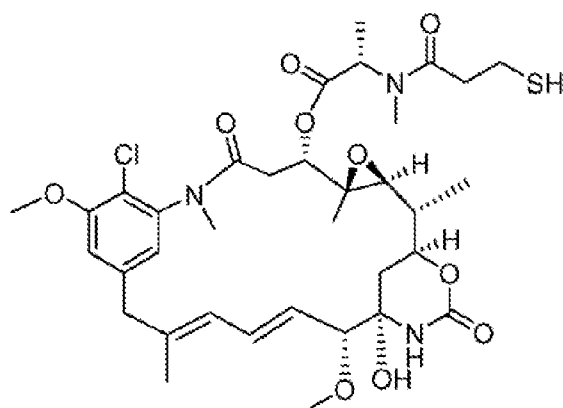


5

la carga útil 4574 que tiene la estructura:

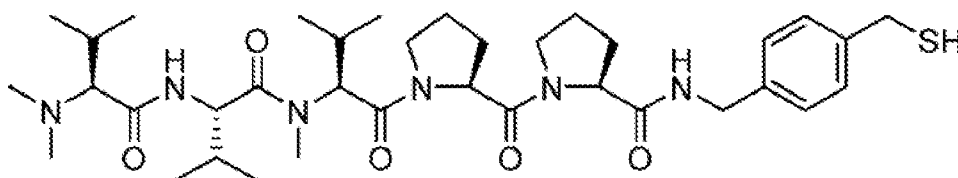


la carga útil DM1 que tiene la estructura:



y

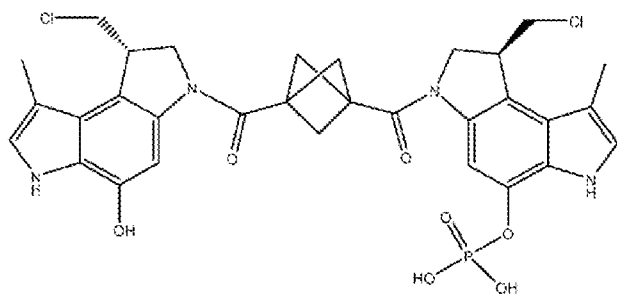
la carga útil Cemadotin que tiene la estructura:



- 5 La duocarmicina y el CC-1065 son monómeros basados en CPI que actúan como agentes alquilantes de ADN con potencia citotóxica. Véase Boger and Johnson, PNAS 92:3642-3649, 1995. Las dolastatinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, (+)-docarmicina A y (+)-duocarmicina SA, y (+)-CC-1065.

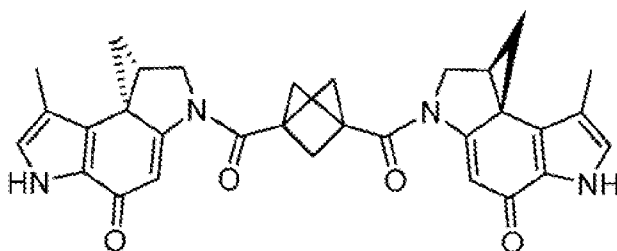
En algunos aspectos, el fármaco/la carga útil es un dímero de CPI o CBI. Los dímeros de CPI inducen el entrecruzamiento del ADN entre cadenas y una potente citotoxicidad. Publicación Internacional PCT No. WO2015/110935, divulga dímeros de CPI y CBI que son útiles en los ADCs de EDB de la presente invención y proporciona métodos para producir los dímeros de CPI y CBI. Por ejemplo, el dímero de carga útil CPI-8314 tiene la estructura:

10



y

- 15 la carga útil CPI-0326 que tiene la estructura:



Las enediínas son una clase de productos bacterianos antitumorales caracterizados por ya sea anillos de nueve y diez miembros o por la presencia de un sistema cíclico de enlaces triples dobles triples conjugados. Las

- enediínas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, caliqueamicina, esperamicina y dinemicina. La caliqueamicina, también llamada complejo LL-E33288, por ejemplo, β -caliqueamicina, γ -caliqueamicina o N-acetil- γ -caliqueamicina (gamma-caliqueamicina (γ_1)), es un antibiótico enediínico que se aisló originalmente como un producto natural del organismo del suelo *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis* (Zein et al. Science 27:240(4856):1198-1201, 1988); genera rupturas en el ADN de doble cadena y posteriormente induce la apoptosis en las células diana (Zein et al. Science 27:240(4856):1198-1201, 1988; Nicolaou et al. Chem. Biol. Sep;1(1):57-66, 1994; Prokop et al. Oncogene 22:9107-9120, 2003). El análogo disulfuro es N-acetil- γ -calicheamicina dimetilhidrazida.
- Las geldanamycinas son antibióticos de ansamicina benzoquinona que se unen a Hsp90 (proteína de choque térmico 90) y se han utilizado como fármacos antitumorales. Las geldanamycinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, 17-AAG (17-N-Alilamino-17-Demetoxigeldanamicina) y 17-DMAG (17-Dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina).
- Las maitansinas o sus derivados, los maitansinoides, inhiben la proliferación celular mediante la inhibición de la formación de microtúbulos durante la mitosis a través de la inhibición de la polimerización de la tubulina. Véase Remillard et al., Science 189:1002-1005, 1975. Las maytansinas y maitansinoides ejemplares incluyen, pero no se limitan a, la mertansina (DM1) y sus derivados, así como ansamitocina.
- Los taxanos son diterpenos que actúan como agentes anti tubulina o inhibidores mitóticos. Los taxanos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel (por ejemplo, TAXOL®) y docetaxel (TAXOTERE®).
- Los alquiloides de la vinca también son agentes anti tubulina. Los alquiloides de la vinca ejemplares incluyen, pero no se limitan a, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina.
- En algunos aspectos de la invención, el agente es un agente inmunomodulador. Los ejemplos de un agente inmunomodulador incluyen, pero no se limitan a, gancyclovir, etanercept, tacrolimus, sirolimus, voclosporina, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetilo, metotrexato, glucocorticoide y sus análogos, citocinas, xantinas, factores de crecimiento de células madre, linfotoxinas, factor de necrosis tumoral (TNF), factores hematopoyéticos, interleucinas (por ejemplo, interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 e IL-21), factores estimulantes de colonias (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF)), interferones (por ejemplo, interferones- α , β y γ), el factor de crecimiento de células madre denominado "factor S 1", la eritropoyetina y la trombopoyetina, o una combinación de los mismos.
- Los agentes inmunomoduladores útiles en la invención también incluyen antihormonas que bloquean la acción de las hormonas sobre los tumores y agentes inmunosupresores que suprimen la producción de citocinas, regulan negativamente la expresión de autoantígenos o enmascaran los antígenos MHC. Las antihormonas representativas incluyen anti estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapnstona y toremifeno; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y agentes anti adrenales. Los agentes inmunosupresores representativos incluyen pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-sustituidas, azatioprina, ciclofosfamida, bromocriptina, danazol, dapsona, glutaraldehído, anticuerpos anti idiotípicos para antígenos MHC y fragmentos MHC, ciclosporina A, esteroides tal como glucocorticosteroides, citocinas o antagonistas del receptor de citocinas (por ejemplo, anticuerpos anti-interferón, anticuerpos anti-IL10, anticuerpos anti-TNF α , anticuerpos anti-IL2), estreptocinasa, TGF β , rapamicina, receptor de células T, fragmentos del receptor de células T y anticuerpos del receptor de células T.
- En algunos aspectos de la invención, el fármaco es una proteína terapéutica que incluye, pero no se limita a, una toxina, una hormona, una enzima y un factor de crecimiento.
- Los ejemplos de una proteína de toxina (o polipéptido) incluyen, pero no se limitan a, difteria (por ejemplo, cadena A de difteria), exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina, ricina (por ejemplo, cadena A de ricina), abrina (por ejemplo, cadena A de abrina), modeccina (por ejemplo, cadena A de modeccina), alfa sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, ribonucleasa (RNasa), ADNasa I, enterotoxina A de *Estafilococo*, proteína antiviral de la hierba carmín, gelonina, toxina de difteria, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, tricotecenos, péptidos inhibidores del nudo de cistina (ICK) (por ejemplo, ceratotoxinas) y conotoxina (por ejemplo, KIIIA o SmIIIA).
- Los ejemplos de hormonas incluyen, pero no se limitan a, estrógenos, andrógenos, progestinas y corticosteroides.
- En algunos aspectos de la invención, el fármaco es un oligonucleótido, tal como oligonucleótidos anti sentido.
- Los fármacos adicionales útiles en la invención incluyen agentes anti angiogénicos que inhiben la formación de vasos sanguíneos, por ejemplo, inhibidores de la farnesiltransferasa, inhibidores de la COX-2, inhibidores de VEGF, inhibidores de bFGF, inhibidores de la esteroide sulfatasa (por ejemplo, bis-sulfamato de 2-

metoxiestradiol (2-MeOE2bisMATE)), interleucina-24, trombospondina, proteínas de metalospondina, interferones de clase I, interleucina 12, protamina, angiostatina, laminina, endostatina y fragmentos de prolactina.

Los agentes anti proliferativos y proapoptóticos incluyen activadores de PPAR-gamma (por ejemplo, prostaglandinas de ciclopentenona (cyPGs)), retinoides, triterpinoides (por ejemplo, cicloartano, lupano, ursano, oleanano, friedelano, dammarano, cucurbitacina y triterpenoides limonoides), inhibidores del receptor de EGF (por ejemplo, HER4), rampamicina, CALCITRIOL® (1,25-dihidroxicolecalciferol (vitamina D)), inhibidores de la aromatasa (FEMARA® (letrozona)), inhibidores de la telomerasa, quelantes de hierro (por ejemplo, 3-aminopiridina-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (Triapina)), apoptina (proteína viral 3 - VP3 del virus de la anemia de pollo), inhibidores de Bcl-2 y Bcl-X(L), TNF-alfa, ligando FAS, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL/Apo2L), activadores de la señalización de TNF-alfa/ligando FAS/ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL/Apo2L) e inhibidores de la señalización de la vía de supervivencia PI3K-Akt (por ejemplo, UCN-01 y geldanamicina).

Los agentes quimioterapéuticos representativos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziidinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mequiorretamina, clorhidrato de óxido de mequiorretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfarnida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-EU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; anti adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico tales como ácido frólico; aceglatona; glicósido de aldofosfarnida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidamina; mitoguantrona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2'-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido (Ara-C); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology de Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer de Antony, France); quiorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aininopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; y capecitabina.

Los agentes terapéuticos adicionales que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen agentes fotosensibilizadores, tales como la Publicación U.S. No. 20020197262 y la Patente U.S. No. 5,952,329, para terapia fotodinámica; partículas magnéticas para termoterapia, tal como la Publicación U.S. No. 20030032995; agentes de unión, tales como péptidos, ligandos, ligandos de adhesión celular, etc., y profármacos tales como profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos que contienen β-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo.

Para los métodos de diagnóstico que utilizan anticuerpos anti-EDB, un fármaco puede incluir una etiqueta detectable utilizada para detectar la presencia de ECM o células que expresan EDB+ de FN in vitro o in vivo. Los radioisótopos que se pueden detectar in vivo, tal como los que se pueden detectar utilizando gammagrafía, obtención de imágenes por resonancia magnética o ultrasonido, se pueden utilizar en aplicaciones de diagnóstico clínico. Las etiquetas gammagráficas útiles incluyen emisores de positrones y emisores γ. Los agentes de contraste representativos para la obtención de imágenes de fuentes magnéticas son los iones paramagnéticos o superparamagnéticos (por ejemplo, hierro, cobre, manganeso, cromo, erbio, europio, disprosio, holmio y gadolinio), partículas de óxido de hierro y agentes de contraste solubles en agua. Para la detección ultrasónica, los gases o líquidos se pueden quedar atrapados en partículas inorgánicas porosas que se liberan como agentes de contraste de microburbujas. Para la detección in vitro, las etiquetas detectables útiles incluyen fluoróforos, epítopos detectables o agentes de unión y etiquetas radiactivas.

Por lo tanto, en algunos aspectos de la invención, el fármaco es un agente de obtención de imágenes (por ejemplo, un fluoróforo o una etiqueta PET (tomografía por emisión de positrones), una etiqueta SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotón único) o una etiqueta MRI (imágenes por resonancia magnética).

- 5 El término "etiqueta" cuando se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo "etiquetado". La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, etiquetas de radioisótopos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que sea detectable. Los radionucleidos que pueden servir como etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 y Pd-109. La etiqueta también podría ser una entidad no detectable, tal como una toxina.

- Los ejemplos de fluoróforos incluyen, pero no se limitan a, isotiocianato de fluoresceína (FITC) (por ejemplo, 5-FITC), amidita de fluoresceína (FAM) (por ejemplo, 5-FAM), eosina, carboxifluoresceína, eritrosina, Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700 o 750), carboxitetrametilrodamina (TAMRA) (por ejemplo, 5-TAMRA), tetrametilrodamina (TMR) y sulforodamina (SR) (por ejemplo, SR101).

- Se pueden incorporar radioisótopos terapéuticos o de diagnóstico u otras etiquetas (por ejemplo, etiquetas PET o SPECT) al agente para la conjugación con los anticuerpos anti-EDB como se describe en la presente memoria. El isótopo se puede unir directamente al anticuerpo, por ejemplo, en un residuo de cisteína presente en el anticuerpo, o se puede utilizar un quelante para mediar la unión del anticuerpo y el radioisótopo. Los radioisótopos adecuados para la radioterapia incluyen, pero no se limitan a, los emisores α , los emisores β y los electrones auger. Para aplicaciones de diagnóstico, los radioisótopos útiles incluyen emisores de positrones y emisores γ . Un anticuerpo anti-EDB de la invención puede adicionalmente ser yodado, por ejemplo, en un residuo de tirosina del anticuerpo, para facilitar la detección o el efecto terapéutico del anticuerpo.

- 25 Los ejemplos de un radioisótopo u otras etiquetas incluyen, pero no se limitan a, ^3H , ^{11}C , ^{13}N , ^{14}C , ^{15}N , ^{15}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Se , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{94}Tc , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{99}Tc , ^{103}Ru , ^{105}Rh , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{113}In , ^{121}Te , ^{122}Te , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{125}Te , ^{126}I , ^{131}I , ^{131}In , ^{133}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{153}Pb , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{165}Tm , ^{166}Dy , ^{166}H , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{169}Yb , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{197}Pt , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{201}Tl , ^{203}Hg , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{224}Ac , y ^{225}Ac .

- 30 Enlazadores

- Los ADCs de EDB de la presente invención se pueden preparar utilizando un enlazador para unir o conjugar directa o indirectamente un fármaco con un anticuerpo. Un enlazador es un compuesto bifuncional que une un fármaco y un anticuerpo para formar un ADC. Estos ADCs permiten la administración selectiva de fármacos a través de anticuerpos que se unen a antígenos o proteínas específicos. Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores escindibles y no escindibles. Un enlazador escindible normalmente es susceptible a la escisión y liberación del fármaco mediante condiciones intracelulares y extracelulares específicas. Los principales mecanismos por los cuales un fármaco conjugado se puede escindir de un anticuerpo intracelularmente incluyen la hidrólisis en el pH ácido de los lisosomas (hidrazonas, acetales y amidas tipo cis-aconitato), la escisión de péptidos mediante enzimas lisosomales (las catepsinas y otras enzimas lisosomales) y la reducción de disulfuros. Un fármaco conjugado se puede escindir de un anticuerpo extracelularmente mediante proteasas en un microambiente tumoral (TME), tal como las catepsinas. Como resultado de estos diferentes mecanismos de escisión, los mecanismos de unión del fármaco al anticuerpo también varían ampliamente y se puede utilizar cualquier enlazador adecuado.

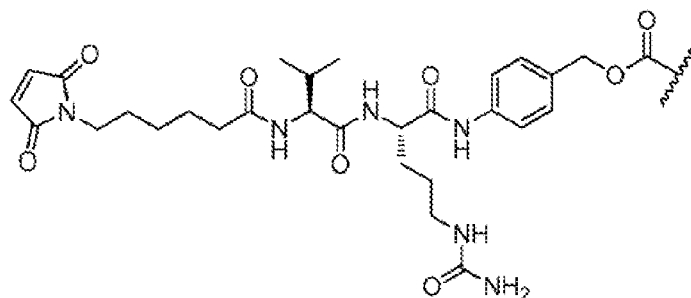
- Los enlazadores adecuados pueden incluir cualquier enlazador escindible. En algunos aspectos, los enlazadores adecuados incluyen un enlazador de valina-citrulina (val-cit), un enlazador de fenilalanina-lisina (phe-lys) o un enlazador de maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (vc), o contienen un dipéptido unido a elementos de inmolación adicionales, tales como enlazador de N-2~acetil-L-lisil-L-valil-L-citrulina-p-aminobenciloxicarbonil-N,N'-dimetilaminoetil-CO-(AcLys-vc), adecuado para la tecnología de conjugación basada en transglutaminasa. En otro aspecto, los enlazadores adecuados incluyen enlazadores disulfuro, tales como enlazador de sulfanil piridina (diS) y enlazador de 2-(piridin-2-ildisulfanil)etil carbamoilo (diS-C₂OCO). En otro aspecto, el enlazador puede ser un enlazador no escindible, tal como maleimidocaproilo (mc), maleimido-heptanoilo (me) y maleimido-Peg6C2 (MalPeg6C2). En otros aspectos, los enlazadores adecuados incluyen enlazadores hidrolizables a un pH específico o un intervalo de pH, tal como un enlazador de hidrazona.

- El enlazador puede estar unido covalentemente al anticuerpo a través de un enlace tioéster, por ejemplo, mediante la reacción de una maleimida o haloacetamida, presente en el enlazador con un residuo de cisteína nativo o diseñado presente en el anticuerpo. En otro aspecto, el enlazador puede estar unido covalentemente al anticuerpo mediante enlaces amida a los residuos de lisina presentes en el anticuerpo, por ejemplo, mediante la reacción de un ácido carboxílico activado con N-hidroxi-succinimida presente en el enlazador con una amina

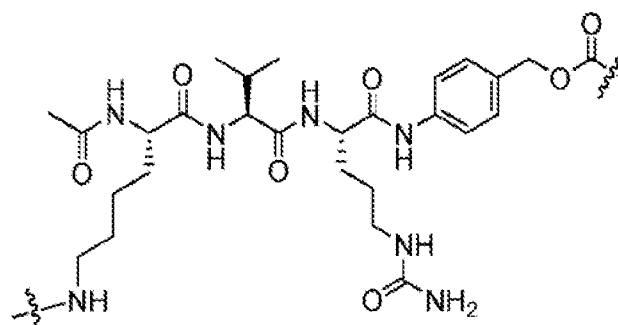
libre de un residuo de lisina. En otro aspecto, el enlazador puede estar unido covalentemente al anticuerpo mediante enlaces amida a las cadenas laterales de residuos de glutamina presentes o diseñados en el anticuerpo, por ejemplo, mediante una reacción enzimática catalizada por una enzima transglutaminasa que crea un nuevo enlace amida a partir de una amina primaria presente en el enlazador con una amida de cadena lateral de un residuo de glutamina.

En algunos aspectos, los enlazadores de la presente invención incluyen:

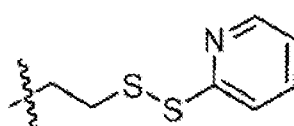
El enlazador "mc-vc-PABC" o "vc-PABC" o "vc" que tiene la estructura:



El enlazador "AcLys-vc-PABC-DMAE-CO" o "AcLys-vc" que tiene la estructura:

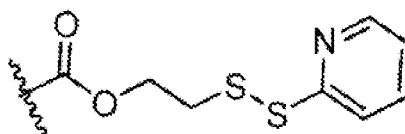


El enlazador diS que tiene la estructura:



y

El enlace dis-C₂OCO que tiene la estructura:



Métodos de preparación de los ADCs de EDB

En la presente memoria se proporcionan métodos para preparar ADCs de EDB de la presente invención. La presente invención proporciona adicionalmente un proceso para producir o generar ADCs de EDB conjugados de manera convencional y específica del sitio como se divulga en la presente memoria y puede incluir (a) unir el enlazador al fármaco; (b) conjugar la fracción enlazador-fármaco al anticuerpo; y (c) purificar el conjugado de anticuerpo fármaco. Véase los ejemplos 3 y 4.

En algunos aspectos, los ADCs de EDB se pueden generar utilizando conjugación convencional, no específica de fracciones de carga útil del enlazador a través de uno o más residuos de cisteína de un anticuerpo anti-EDB, o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

5 En otro aspecto, los ADCs de EDB se pueden generar utilizando conjugación específica del sitio de fracciones de carga útil del enlazador a través de uno o más residuos de cisteína reactivos diseñados en un dominio constante del anticuerpo anti-EDB. Los métodos de preparación de anticuerpos para la conjugación específica del sitio a través de residuos de cisteína diseñados se describen en la Publicación Internacional PCT No. WO2013/093809.

10 Los uno o más residuos de aminoácidos de una cadena pesada de un anticuerpo anti-EDB se pueden sustituir por otro aminoácido, tal como un residuo de cisteína, con el propósito de conjugarlo con un fármaco o una carga útil. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-EDB, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una región constante de la cadena pesada de anticuerpo que comprende un residuo de cisteína diseñado en la posición: 118 (114 de acuerdo con Kabat), 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 290, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 327, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 15 362, 370, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 o 444, o cualquier combinación de los mismos, de acuerdo con la numeración del índice EU de Kabat). En particular, se pueden utilizar las posiciones 118 (114 de acuerdo con Kabat), 290, 334, 347, 373, 375, 380, 388, 392, 421, 443 o cualquier combinación de las mismas. Se pueden introducir sustituciones de cisteína adicionales.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-EDB, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende un dominio constante de la cadena pesada que comprende un residuo de cisteína diseñado en la posición 290 (K290C), de acuerdo con la numeración del índice EU de Kabat.

Uno o más residuos de aminoácidos de un dominio constante de la cadena ligera de un anticuerpo anti-EDB se pueden sustituir por otro aminoácido, tal como un residuo de cisteína, con el propósito de conjugarlo con un fármaco o una carga útil. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-EDB, o un fragmento de 25 unión al antígeno del mismo, que comprende una región constante de la cadena ligera de anticuerpo que comprende (i) un residuo de cisteína diseñado en la posición 110, 111, 125, 149, 155, 158, 161, 183, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 207, 208 o 210, o cualquier combinación de los mismos, de acuerdo con la numeración de Kabat); (ii) un residuo de cisteína diseñado en una posición correspondiente al residuo 4, 42, 81, 100, 103, o 30 cualquier combinación de los mismos, de SEQ ID NO: 37, cuando el dominio constante está alineado con SEQ ID NO: 37 (cadena ligera kappa); o (iii) un residuo de cisteína diseñado en una posición correspondiente al residuo 4, 5, 19, 43, 49, 52, 55, 78, 81, 82, 84, 90, 96, 97, 98, 99, 101, o cualquier combinación de los mismos, de SEQ ID NO: 38, cuando el dominio constante está alineado con SEQ ID NO: 38 (cadena ligera lambda). Se pueden introducir sustituciones de cisteína adicionales.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-EDB o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende una región constante de la cadena ligera kappa del anticuerpo que comprende (i) un residuo de cisteína diseñado en la posición 111, 149, 188, 207, 210 o cualquier combinación de los mismos (preferiblemente 111 o 210), de acuerdo con la numeración de Kabat; o (ii) un residuo de cisteína diseñado en una posición correspondiente al residuo 4, 42, 81, 100, 103 o cualquier combinación de los mismos, de SEQ 40 ID NO: 37 (preferiblemente residuo 4 o 103), cuando el dominio constante está alineado con SEQ ID NO: 37.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-EDB o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende una región constante de la cadena ligera lambda del anticuerpo que comprende (i) un residuo de cisteína diseñado en la posición 110, 111, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208, 210, o cualquier combinación de las mismas (preferiblemente 110, 111, 125, 149, o 155), de 45 acuerdo con la numeración de Kabat; o (ii) un residuo de cisteína diseñado en una posición correspondiente al residuo 4, 5, 19, 43, 49, 52, 55, 78, 81, 82, 84, 90, 96, 97, 98, 99, 101, o cualquier combinación de los mismos de SEQ ID NO: 38 (preferiblemente el residuo 4, 5, 19, 43 o 49), cuando el dominio constante está alineado con SEQ ID NO: 38.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-EDB, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende un dominio constante de la cadena ligera que comprende (i) un residuo de cisteína diseñado en la posición 183 (κK183C), de acuerdo con la numeración de Kabat; o (ii) un residuo de cisteína diseñado en una posición correspondiente al residuo 76 de SEQ ID NO: 37, cuando dicho dominio constante está alineado con SEQ ID NO: 37.

SEQ ID NO: 37 (dominio constante C,c)

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG

55 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TITLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SENRGEC

SEQ ID NO 38 (dominio constante C_λ)

GQPKANPTVT LRPSSSEELQ ANKATLVCLI SDFYFGAVTV AWKADGSPVK
AGVETTKPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS

En otro aspecto, los ADCs de EDB se pueden generar utilizando tecnología de conjugación específica del sitio a través de una o más etiquetas que contienen glutamina donadoras de acilo diseñadas o residuos de glutamina endógenos que se vuelven reactivos en una región constante del anticuerpo anti-EDB. Los métodos de preparación de anticuerpos para la conjugación específica del sitio a través de etiquetas que contienen glutamina donadoras de acilo o residuos de glutamina se describen en la Publicación Internacional PCT No. WO2012/059882.

En algunos aspectos, la etiqueta que contiene glutamina donadora de acilo comprende al menos una glutamina (Q) y puede estar unida a diferentes posiciones de la cadena pesada y/o ligera (es decir, en el N terminal, el C terminal o internamente). En otro aspecto, la etiqueta que contiene glutamina donadora de acilo puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: : LLQGG (SEQ ID NO: 39), LLQG (SEQ ID NO: 40), LSLSQG (SEQ ID NO: 41), GGGLLQGG (SEQ ID NO: 42), GLLQG (SEQ ID NO: 43), LLQ, GSPLAQSHGG (SEQ ID NO: 44), GLLQGGG (SEQ ID NO: 45), GLLQGG (SEQ ID NO: 46), GLLQ (SEQ ID NO: 47), LLQLLQGA (SEQ ID NO: 48), LLQGA (SEQ ID NO: 49), LLQYQGA (SEQ ID NO: 50), LLQGSG (SEQ ID NO: 51), LLQYQG (SEQ ID NO: 52), LLQLLQG (SEQ ID NO: 53), SLLQG (SEQ ID NO: 54), LLQLQ (SEQ ID NO: 55), LLQLLQ (SEQ ID NO: 56), y LLQGR (SEQ ID NO: 57). En algunos aspectos, una etiqueta que contiene glutamina donadora de acilo reemplaza posiciones de aminoácidos de tipo silvestre en un dominio constante de la cadena pesada. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-EDB puede comprender una etiqueta que contiene acil glutamina que tiene la secuencia de aminoácidos LLQG (SEQ ID NO: 40) que reemplaza los aminoácidos en las posiciones E294- N297 (de acuerdo con el índice EU de Kabat) de la cadena pesada.

Las condiciones de reacción óptimas para la generación de ADCs se pueden determinar empíricamente mediante una variación de variables de reacción tal como la temperatura, el pH, la entrada de la fracción de carga útil del enlazador y la concentración de aditivos. Los expertos en la materia pueden determinar las condiciones adecuadas para la conjugación de otros fármacos sin la necesidad de realizar experimentación indebida. En los Ejemplos 3 y 4 se describen métodos representativos para conjugar y caracterizar ADCs de EDB.

Después de la conjugación, los conjugados se pueden separar, purificarse de los reactivos no conjugados y/o formas agregadas de los conjugados y caracterizarse mediante métodos convencionales. Esto incluye procesos tales como, pero no limitados a, espectrometría de masas, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), ultrafiltración/diafiltración, cromatografía de intercambio iónico (IEC), cromatografía de intercambio iónico (CF), mutagénesis dirigida al sitio, etiquetado de fluorescencia, cristalografía de rayos X, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), cromatografía en Sephacryl S-200 o cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Los medios HIC adecuados incluyen, pero no se limitan a, medio cromatográfico de flujo rápido en Phenyl Sepharose 6, medio cromatográfico de flujo rápido Butyl Sepharose 4, medio cromatográfico de flujo rápido Octyl Sepharose 4, medio cromatográfico Toyopearl Ether-650M, medio HIC de metilo Macro-Prep o medio HIC de t-butilo Macro-Prep.

La Tabla 13 proporciona los ADCs de EDB producidos de acuerdo con los métodos de conjugación y purificación descritos en la presente memoria y utilizados para generar los datos proporcionados en los Ejemplos.

En algunos aspectos de la invención, los ADC de EDB de la presente invención comprenden (a) un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a EDB; (b) un enlazador y (c) un fármaco.

En otro aspecto de la invención, los ADCs de EDB de la presente invención comprenden (a) un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a EDB; (b) un enlazador y (c) un fármaco, en el que el enlazador es un enlazador escindible o no escindible. En algunos aspectos, el enlazador es vc, diS, diS-C₂OCO o AcLyS-vc.

En otro aspecto de la invención, los ADCs de EDB de la presente invención comprenden (a) un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a EDB; (b) un enlazador y (c) un fármaco, en el que el fármaco es un agente citotóxico. En algunos aspectos, el fármaco es una auristatina. En algunos aspectos, el fármaco es un dímero de CPI o CBI. En algunos aspectos, la auristatina es 0101, 1569, 9411 o 4574. En algunos aspectos, el dímero de CPI es CPI-8314 o CPI-0326.

En algunos aspectos de la invención, los ADCs de EDB de la presente invención comprenden (a) un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende: una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 19 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31; una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31; (b) un enlazador y (c) un fármaco. En algunos aspectos, el enlazador es un enlazador escindible o no escindible. En algunos aspectos, el enlazador es vc, diS, diS-

C₂OCO o AcLys-vc. En algunos aspectos, el fármaco es un agente citotóxico. En algunos aspectos, el fármaco es una auristatina. En algunos aspectos, el fármaco es un dímero de CPI o CBI. En algunos aspectos, la auristatina es 0101, 1569, 9411 o 4574. En algunos aspectos, el dímero CPI es CPI-8314 o CPI-0326.

Usos de los ADCs de EDB

- 5 Los anticuerpos anti-EDB y los ADCs de EDB de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, métodos de tratamiento terapéutico y métodos de tratamiento de diagnóstico.

La presente invención proporciona un método para tratar trastornos o enfermedades que expresan EDB+ de FN, tales como cánceres o no cánceres asociados con la expresión de EDB+ de FN y/o cánceres que expresan EDB+ de FN, en un sujeto. La invención también proporciona un ADC de EDB, o una composición farmacéutica, como se describe en la presente memoria, para uso en un método para tratar un trastorno que expresa EDB+ de FN, tal como no cánceres o cánceres asociados con la expresión de EDB+ de FN y/o cánceres que expresan EDB+ de FN, en un sujeto. La invención proporciona adicionalmente el uso de un ADC de EDB, o una composición farmacéutica, como se describe en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno de expresión de EDB+ de FN, tal como no cánceres o cánceres asociados con la expresión de EDB+ de FN y/o cánceres que expresan EDB+ de FN, en un sujeto.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento o la progresión de un tumor en un sujeto que tiene un trastorno que expresa EDB, tal como no cánceres o cánceres asociados con la expresión de EDB+ de FN y/o cánceres que expresan EDB, incluyendo la administración al sujeto con necesidad del mismo de una cantidad eficaz de una composición (es decir, una composición farmacéutica) que tiene uno o más ADCs de EDB descritos en la presente memoria. En otros aspectos de la invención, se proporciona un método para inhibir la metástasis de células cancerígenas asociadas con la expresión de EDB+ de FN y/o cánceres que expresan EDB+ de FN en un sujeto, que incluye administrar al sujeto con necesidad de la misma una cantidad eficaz de una composición (es decir, una composición farmacéutica) que tiene uno o más ADCs de EDB descritos en la presente memoria. En otros aspectos de la invención, se proporciona un método para inducir la regresión de un tumor asociado con la expresión de EDB+ de FN y/o cánceres que expresan EDB+ de FN en un sujeto, que incluye administrar al sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición (es decir, una composición farmacéutica) que tiene uno o más ADCs de EDB descritos en la presente memoria.

En algunos aspectos, la expresión de EDB+ de FN se puede detectar en la matriz extracelular (ECM) adyacente a las células tumorales. El EDB+ de FN puede ser expresado por células distintas a los fibroblastos en el microambiente tumoral, incluyendo las células tumorales. El EDB+ de FN secretado se puede luego depositar en la matriz adyacente a las células tumorales o en la membrana plasmática de las células tumorales. En otros aspectos, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más ADCs de EDB descritos en la presente memoria para uso en un método como el descrito anteriormente. En otros aspectos, la invención proporciona el uso de uno o más ADCs de EDB como se describe en la presente memoria o una composición farmacéutica que comprende los ADCs de EDB como se describe en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para uso en los métodos descritos anteriormente.

Los cánceres asociados con la expresión de EDB+ de FN y/o cánceres que expresan EDB+ de FN generalmente pueden incluir cualquier cáncer asociado con el remodelado del tejido. Adicionalmente, los cánceres asociados con la expresión de EDB+ de FN y/o cánceres que expresan EDB+ de FN pueden incluir, pero no se limitan a, tumores sólidos y cánceres de sangre. En algunos aspectos, los tumores sólidos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de tiroides, sarcoma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de útero, mesotelioma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer testicular, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer endocrino, cáncer de timo, cáncer de cerebro, cáncer suprarrenal, cáncer de ojo, cáncer cervical y cáncer de pulmón. En otro aspecto, los cánceres de la sangre incluyen, pero no se limitan a, leucemia, linfoma y mieloma.

Los ADC de EDB de la presente invención son útiles en el tratamiento de trastornos que expresan EDB+ de FN, tales como cánceres asociados con la expresión de EDB+ de FN y/o cánceres que expresan EDB+ de FN. Los ADCs de EDB de la invención se pueden utilizar para tratar cánceres que expresan niveles altos de EDB+ de FN, niveles moderados de EDB+ de FN o niveles bajos de EDB+ de FN.

Por lo tanto, los pacientes que serán tratados con ADCs de EDB de la invención se pueden seleccionar con base en la expresión de biomarcadores, que incluyen, pero no se limitan a, ARNm (qPCR) de muestras tumorales a granel y expresión elevada de la proteína EDB+ de FN, lo que da como resultado una población de pacientes seleccionada para una expresión enriquecida de la diana en lugar del origen o la histología del tumor. La expresión de la diana se puede medir como una función del número de tinción de células en combinación con la intensidad de la tinción de las células.

El crecimiento del cáncer o la proliferación anormal se refiere a uno cualquiera de diversos índices que sugieren un cambio dentro de las células hacia una forma de cáncer más desarrollada o un estado del trastorno. La inhibición del crecimiento de células cancerígenas o de células de un trastorno proliferativo no neoplásico se puede analizar mediante métodos conocidos en la técnica, tal como el crecimiento retardado del tumor y la inhibición de la metástasis. Otros índices para medir la inhibición del crecimiento del cáncer incluyen una disminución en la supervivencia de las células cancerígenas, una disminución en el volumen o la morfología del tumor (por ejemplo, según se determina mediante tomografía computarizada (CT), ecografía u otro método de obtención de imágenes), destrucción de la vasculatura tumoral, un mejor desempeño en la prueba cutánea de hipersensibilidad retardada, un aumento en la actividad de los linfocitos T citolíticos y una disminución en los niveles de antígenos específicos del tumor.

Los resultados deseados de los métodos terapéuticos divulgados son generalmente medidas cuantificables en comparación con una medición de control o de referencia. Tal como se utilizan en la presente memoria, términos relativos tales como "mejorar", "aumentar" o "reducir" indican valores relativos a una molécula de control o comparativa, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en la presente memoria, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito en la presente memoria. Un individuo de control representativo es un individuo afectado con la misma forma de cáncer que el individuo que está siendo tratado, que tiene alrededor de la misma edad que el individuo que está siendo tratado (para asegurar que los estadios del trastorno en el individuo tratado y el individuo de control sean comparables).

Los cambios o mejoras en respuesta a la terapia son generalmente estadísticamente significativos. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "significancia" o "significativo" se refiere a un análisis estadístico de la probabilidad de que exista una asociación no aleatoria entre dos o más entidades. Para determinar si una relación es "significativa" o tiene "significancia" o no, se pueden realizar manipulaciones estadísticas de los datos denominadas "valor p". Aquellos valores p que caen por debajo de un punto de corte definido por el usuario se consideran significativos. Un valor p menor o igual a 0.1, menor que 0.05, menor que 0.01, menor que 0.005 o menor que 0.001 se puede considerar significativo.

Detección y diagnóstico *in vivo*

En otro aspecto, se proporciona un método para detectar, diagnosticar y/o monitorear un trastorno que expresa EDB+ de FN, tal como cánceres asociados con la expresión de EDB+ de FN y/o cánceres que expresan EDB+ de FN. Por ejemplo, los anticuerpos anti-EDB como se describen en la presente memoria se pueden etiquetar con una fracción detectable tal como un agente de obtención de imágenes y una etiqueta de enzima-sustrato. Los anticuerpos como se describen en la presente memoria también se pueden utilizar para ensayos de diagnóstico *in vivo*, tal como obtención de imágenes *in vivo* (por ejemplo, PET o SPECT) o un reactivo de tinción.

Después de la administración de un ADC de EDB a un sujeto, en el que el fármaco es una etiqueta detectable, y después de un tiempo suficiente para la unión, se puede visualizar la biodistribución de la proteína EDB+ de FN unida por el anticuerpo. Los métodos de diagnóstico divulgados se pueden utilizar en combinación con métodos de tratamiento. Además, los ADCs de EDB de la invención se pueden administrar con el doble propósito de detección y terapia.

Los métodos de detección no invasivos representativos incluyen gammagrafía (por ejemplo, SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotón único), PET (tomografía por emisión de positrones), obtención de imágenes con cámara gamma y escaneo rectilíneo), obtención de imágenes por resonancia magnética (por ejemplo, obtención de imágenes por resonancia magnética convencional, obtención de imágenes por transferencia de magnetización (MTI), espectroscopia por resonancia magnética de protones (MRS), obtención de imágenes ponderadas por difusión (DWI) y obtención de imágenes por resonancia magnética funcional (fMRI)) y ecografía.

Formulaciones

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de los ADCs de EDB divulgados en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable. Además, las composiciones pueden incluir más de un ADC de EDB divulgado en la presente memoria.

La composición utilizada en la presente invención puede incluir adicionalmente portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science and practice of Pharmacy 21st Ed., 2005, Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones, y pueden incluir amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tal como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo tal como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol;

ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tal como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). "Sal farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de una molécula o macromolécula. En la presente memoria se describen con más detalle los excipientes farmacéuticamente aceptables.

Se pueden utilizar diversas formulaciones de los ADCs de EDB para su administración, incluidas, pero no limitadas a, formulaciones que comprenden un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes estabilizadores, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes encapsulantes, amortiguadores y potenciadores de la penetración en la piel. Los excipientes, así como las formulaciones para la administración parenteral y no parenteral de medicamentos, se establecen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000.

En algunos aspectos de la invención, estos agentes se pueden formular para administración mediante inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). Por consiguiente, estos agentes se pueden combinar con vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, el momento y la repetición, van a depender del individuo en particular y del historial médico del individuo.

Las formulaciones terapéuticas de ADCs de EDB utilizadas de acuerdo con la presente invención se pueden preparar para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tenga el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, y pueden incluir amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tal como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tal como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones terapéuticas de ADC de EDB generalmente se colocan en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica. Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden estar en formas de dosificación unitarias tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones, o supositorios, para administración oral, parenteral o rectal, o administración por inhalación o insuflación.

Los agentes tensioactivos adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos, tales como polioxietilensorbitanos (por ejemplo, Tween™ 20, 40, 60, 80 o 85) y otros sorbitanos (por ejemplo, Span™ 20, 40, 60, 80 o 85). Las composiciones con un agente tensioactivo incluirán convenientemente entre 0.05 y 5 % de agente tensioactivo, y pueden estar entre 0.1 y 2.5 %. Se apreciará que se pueden agregar otros ingredientes, por ejemplo, manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables, si es necesario.

Se pueden preparar emulsiones adecuadas utilizando emulsiones grasas disponibles comercialmente, tal como INTRALIPID™, LIPOSYN™, INFONUTROL™, LIPOFUNDIN™ y LIPIPHYSAN™. El ingrediente activo se puede disolver en una composición de emulsión premezclada o, alternativamente, se puede disolver en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendras) y formar una emulsión al mezclarlo con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que se pueden añadir otros ingredientes, por ejemplo, glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas normalmente contendrán hasta 20 % de aceite, por ejemplo, entre 5 y 20 %. La emulsión de grasa puede incluir gotitas de grasa entre 0.1 y 1.0 µm, particularmente 0.1 y 0.5 µm, y tener un pH en el intervalo de 5.5 a 8.0. Las

composiciones de emulsión pueden ser aquellas preparadas mezclando un ADC de EDB con INTRALIPID™ o los componentes del mismo (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

La invención también proporciona kits para uso en los métodos instantáneos. Los kits de la invención incluyen uno o más contenedores que incluyen un anticuerpo EDB o un ADC de EDB como se describe en la presente memoria e instrucciones de uso de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención descritos en la presente memoria. Generalmente, estas instrucciones incluyen una descripción de la administración del anticuerpo EDB o ADC de EDB para los tratamientos diagnósticos o terapéuticos descritos anteriormente.

Las instrucciones relacionadas con el uso de un anticuerpo EBD o un ADC de EDB como se describen en la presente memoria generalmente incluyen información sobre la dosis, el esquema de dosificación y la vía de administración para el tratamiento previsto. Los contenedores pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes multidosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención son instrucciones típicamente escritas en una etiqueta o un inserto del embalaje (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables las instrucciones legibles por máquina (por ejemplo, instrucciones transportadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

Los kits de esta invención se presentan en embalajes adecuados. Los embalajes adecuados incluyen, pero no se limitan a, viales, botellas, frascos, embalaje flexible (por ejemplo, bolsas de plástico o Mylar selladas) y similares. También se contemplan paquetes para usar en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El contenedor también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo EDB o ADC de EDB. El contenedor puede incluir adicionalmente un segundo agente farmacéuticamente activo.

Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales, tal como amortiguadores e información interpretativa. Normalmente, el kit incluye un contenedor y una etiqueta o inserto(s) del paquete o asociado con el contenedor.

Dosis y administración

La presente invención proporciona ADCs de EDB administrados en una dosis eficaz. La frase "dosis eficaz" o "cantidad eficaz" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una cantidad de un ADC, fármaco, carga útil, compuesto o composición farmacéutica necesaria para lograr uno o más resultados terapéuticos benéficos o deseados. Para uso profiláctico, los resultados benéficos o deseados incluyen eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición del trastorno, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales del trastorno, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo del trastorno. Para uso terapéutico, los resultados benéficos o deseados incluyen resultados clínicos tales como reducción de la incidencia o mejora de uno o más síntomas de diversos trastornos que expresan EDB+ de FN, tal como el cáncer, la disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar el trastorno, la mejora del efecto de otro medicamento y/o el retraso de la progresión de los trastornos que expresan EDB+ de FN de los pacientes.

Una dosis eficaz se puede administrar en una o más administraciones. Una dosis eficaz de un ADC, fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede o no lograr junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, una "dosis eficaz" se puede considerar en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar que un solo agente se administra en una cantidad efectiva si, junto con uno o más agentes adicionales, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

Por ejemplo, cuando se administra a un sujeto con cáncer, una cantidad eficaz incluye una cantidad suficiente para provocar actividad anticancerígena, incluyendo la citólisis de células cancerígenas, la inhibición de la proliferación de células cancerígenas, la inducción de la apoptosis de células cancerígenas, la reducción de antígenos de células cancerígenas, el retraso del crecimiento del tumor y/o la inhibición de la metástasis. La reducción del tumor está ampliamente aceptada como un marcador clínico sustituto de la eficacia. Otro marcador de eficacia bien aceptado es la supervivencia libre de progresión.

Los ADCs de EDB de la presente invención se pueden administrar a un individuo a través de cualquier vía adecuada. Las personas expertas en la materia deben de entender que los ejemplos descritos en la presente memoria no pretenden ser limitativos sino ilustrativos de las técnicas disponibles. En consecuencia, en algunos aspectos de la invención, el ADC de EDB se administra a un individuo de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, intracraneal, transdérmica, subcutánea, intraarticular, sublingual, intrasinovial, mediante insuflación, intratecal, oral, por inhalación o tópica. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa, o localizada. Los

nebulizadores disponibles comercialmente para formulaciones líquidas, incluidos los nebulizadores de chorro y los nebulizadores ultrasónicos, son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas se pueden nebulizar directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar después de la reconstitución. Como alternativa, el ADC de EDB se puede aerosolizar utilizando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida, o inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

En algunos aspectos de la invención, los ADCs de EDB se administran mediante técnicas de administración local dirigidas o específicas del sitio. Los ejemplos de las técnicas de administración local dirigida o específica del sitio incluyen diversas fuentes de depósito implantables de un ADC de EDC o catéteres de administración local, tal como catéteres de infusión, catéteres permanentes o catéteres de aguja, injertos sintéticos, envolturas adventicias, derivaciones y estents u otros dispositivos implantables, portadores específicos del sitio, inyección directa o aplicación directa.

Para los propósitos de la presente invención, la dosis adecuada de un ADC de EDB puede depender del ADC de EDB particular (o composiciones del mismo) empleado, el tipo y la gravedad de los síntomas a tratar, si el agente se administra con propósitos terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente, la tasa de depuración del paciente para el agente administrado y la discreción del médico tratante. El médico puede administrar un ADC de EDB hasta alcanzar una dosis que logre el resultado deseado y más. La dosis y/o frecuencia pueden variar a lo largo del tratamiento, pero también pueden permanecer constantes. Las consideraciones empíricas, tal como la vida media, generalmente contribuirán a la determinación de la dosis. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos compatibles con el sistema inmunológico humano, tal como anticuerpos humanizados o anticuerpos totalmente humanos, para prolongar la vida media del anticuerpo y para evitar que el sistema inmunológico del hospedero ataque al anticuerpo. La frecuencia de la administración se puede determinar y ajustar a lo largo de la terapia y, en general, pero no necesariamente, se basa en el tratamiento y/o la supresión y/o la mejora y/o el retraso de los síntomas, por ejemplo, inhibición o retraso del crecimiento del tumor, etc. Alternativamente, pueden ser adecuadas las formulaciones de liberación continua sostenida de ADCs de EDB. Se conocen en la técnica diversas formulaciones y dispositivos para lograr una liberación sostenida.

Para los propósitos de la presente invención, una dosis diaria típica podría variar desde alrededor de cualquiera de 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg, a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se pueden utilizar dosis de alrededor de 1 mg/kg, alrededor de 2.5 mg/kg, alrededor de 5 mg/kg, alrededor de 10 mg/kg y alrededor de 25 mg/kg. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo del trastorno, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas o hasta que se alcanzan niveles terapéuticos suficientes, por ejemplo, para inhibir o retrasar el crecimiento/progresión del tumor o la metástasis de las células cancerígenas. Los regímenes de dosificación ejemplares pueden incluir la administración de dosis crecientes (por ejemplo, dosis inicial de 1 mg/kg y aumento gradual a una o más dosis más altas cada semana o durante un período de tiempo más largo). También pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de decaimiento farmacocinético que el médico desee lograr. Por ejemplo, en algunos aspectos de la invención, se contempla una dosificación de una a cuatro veces por semana. En otros aspectos se contempla la dosificación una vez al mes o una vez cada dos meses o cada tres meses, así como semanal, cada dos semanas y cada tres semanas. El progreso de esta terapia se puede monitorear fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluyendo el ADC de utilizado) puede variar con el tiempo.

En algunos aspectos de la invención, las dosis de un ADC de EDB se pueden determinar empíricamente en individuos a quienes se les ha administrado una o más veces un ADC de EDB. A los individuos se les pueden administrar dosis incrementales de un ADC de EDB. Para evaluar la eficacia, se puede seguir un indicador del trastorno.

La administración de un ADC de EDB de acuerdo con el método de la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del trastorno fisiológico del receptor, de si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico y de otros factores conocidos por los médicos expertos. La administración de un ADC de EDB puede ser esencialmente continua durante un período de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas.

Terapias de combinación

En algunos aspectos de la invención, los métodos descritos en la presente memoria incluyen además un paso de tratar a un sujeto con una forma adicional de terapia. En algunos aspectos, la forma adicional de terapia es una terapia adicional contra el cáncer que incluye, pero no se limita a, su uso en quimioterapia, radiación, cirugía, terapia hormonal y/o inmunoterapia adicional.

Los ADCs de EDB divulgados se pueden administrar como un tratamiento inicial o para el tratamiento de cánceres que no responden a las terapias convencionales. Además, los ADCs de EDB se pueden combinar con otras terapias (por ejemplo, escisión quirúrgica, radiación, fármacos anticancerígenos adicionales, etc.) para así producir efectos terapéuticos aditivos o potenciados y/o reducir la citotoxicidad de algunos agentes

anticancerígenos. Los ADCs de EDB de la invención se pueden coadministrar o coformular con agentes adicionales, o formularse para la administración consecutiva con agentes adicionales en cualquier orden.

Los ADCs de EDB de la invención se pueden utilizar en combinación con otros agentes terapéuticos que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos terapéuticos, ADCs, agentes inmunomoduladores, agentes citotóxicos y agentes citostáticos. Los agentes representativos útiles para la terapia de combinación también incluyen cualquiera de los fármacos descritos en la presente memoria anteriormente como útiles para la preparación de un ADC de EDB bajo el subtítulo "Fármacos".

Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, la administración de un agente quimioterapéutico, una vacuna, una terapia basada en células T CAR, radioterapia, una terapia con citocinas, una vacuna, un anticuerpo biespecífico, un ADC, un inhibidor de otras vías inmunosupresoras, un inhibidor de la angiogénesis, un activador de células T, un inhibidor de una vía metabólica, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de una vía de adenosina, un inhibidor de la tirosina quinasa que incluye, pero no se limita a, inlyta, inhibidores de ALK y sunitinib, un inhibidor de BRAF, un modificador epigenético, un inhibidor o agotador de células Treg y/o de células supresoras derivadas de mieloides, un inhibidor de JAK, un inhibidor de STAT, un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina, un agente bioterapéutico (que incluye, pero no se limita a, anticuerpos contra VEGF, VEGFR, EGFR, Her2/neu, otros receptores de factores de crecimiento, CD20, CD40, CD40L, CTLA-4, OX-40, 4-1BB e ICOS), un agente inmunogénico (por ejemplo, células cancerígenas atenuadas, antígenos tumorales, células presentadoras del antígeno tal como células dendríticas pulsadas con antígenos o ácidos nucleicos derivados de tumores, citocinas inmunoestimulantes (por ejemplo, IL-2, IFN α 2, GM-CSF) y células transfectadas con genes que codifican para citocinas inmunoestimulantes tal como, pero no limitado a, GM-CSF).

Anticuerpos representativos adicionales, que se pueden utilizar solos o como un ADC, incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-5T4 (por ejemplo, A1, A2 y A3), anticuerpos anti-CD19, anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, RITUXAN[®], ZEVALIN[®], BEXXAR[®]), anticuerpos anti-CD22, anticuerpos anti- (por ejemplo, MYLOTARG[®]), conjugados de anticuerpo-fármaco anti CD33, anticuerpos anti-Lewis Y (por ejemplo, Hu3S193, Mthu3S193, AGmthu3S193), anticuerpos anti-HER-2 (por ejemplo, HERCEPTIN[®] (trastuzumab), MDX-210, OMNITARG.RTM. (pertuzumab, rhuMAb 2C4)), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH[®]), anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, ERBITUX[®] (cetuximab), ABX-EGF (panitumumab)), anticuerpos anti-VEGF (por ejemplo, AVASTIN[®] (bevacizumab)), anticuerpos de complejos anti-ADN/histona (por ejemplo, ch-TNT-1/b), anticuerpos anti-CEA (por ejemplo, CEA-Cide, YMB-1003), hLM609, anticuerpos anti-CD47 (por ejemplo, 6H9), anticuerpos anti-VEGFR2 (o receptor que contiene el dominio de inserción de cinasa, KDR) (por ejemplo, IMC-1C11), anticuerpos anti-Ep-CAM (por ejemplo, ING-1), anticuerpos anti-FAP (por ejemplo, sibrotuzumab), anticuerpos anti-DR4 (por ejemplo, TRAIL-R), anticuerpos receptores de anti-progesterona (por ejemplo, 2C5), anticuerpos anti-CA19.9 (por ejemplo, GIVAREX[®]) y anticuerpos anti-fibrina (por ejemplo, MH-1).

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; callistatina; CC- 1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mequiorretamina, clorhidrato de óxido de mequiorretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enediínicos (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gammal I y caliqueamicina phiM, véase, por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bifosfonatos, tal como clodronato; una esperamicina; así como cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos relacionados con la cromoproteína enediina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), doxorubicina liposomal pegilada, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; anti adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores del ácido fólico tales como ácido frofínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio;

hidroxiurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofílico; 2-etilhidrazida; procarbazona; razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2, 2', 2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel y doxetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-1 1; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tal como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen agentes anti hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY1 17018, onapristona y toremifeno (Fareston); inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción del estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol, exemestano, formestano, fadrozol, vorozol, letrozol y anastrozol; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

En algunos aspectos, los ADCs de EDB se pueden utilizar en combinación con crizotinib, palbociclib, gemcitabina, ciclofosfamida, fluorouracilo, FOLFOX, ácido folínico, oxaliplatino, axitinib, malato de sunitinib, tofacitinib, bevacizumab, rituximab y traztuzumab.

En un aspecto, después del tratamiento con ADCs de EDB, puede ocurrir un aumento en los linfocitos infiltrantes del tumor, un aumento en las proporciones de CD8/CD4, un aumento en los macrófagos F4/80+ y/o un aumento en las proteínas inmunomoduladoras tales como PDL1 y 41BB, o cualquier combinación de las mismas. Por lo tanto, la combinación de un ADC de EDB y un inhibidor del punto de control inmune o un agente IO, tal como un anticuerpo monoclonal agonista anti-41BB y/o antagonista anti-PDL1, puede ser eficaz. (Véase el Ejemplo 12). Además, los ADCs de EDB de la invención por sí solos pueden tener mecanismos facilitadores inmunomoduladores y de agentes inmuno oncológicos (IO), que se pueden aumentar con una terapia de combinación.

En algunos aspectos, un ADC de EDB se puede utilizar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales dirigidos a un modulador del punto de control inmune, que incluyen pero no se limitan a, un agente (tal como un anticuerpo) dirigido a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3, B7-H3, B7-H4, B7-DC (PD-L2), B7-H5, B7-H6, B7-H8, B7-H2, B7-1, B7-2, ICOS, ICOS-L, TIGIT, CD2, CD47, CD80, CD86, CD48, CD58, CD226, CD155, CD112, LAIR1, 2B4, BTLA, CD160, TIM1, TIM-3, TIM4, VISTA (PDH1), OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, 4-1BB, 4-BBL, DR3, TL1A, CD40, CD40L, CD30, CD30L, LIGHT, HVEM, SLAM (SLAMF1, CD150), SLAMF2 (CD48), SLAMF3 (CD229), SLAMF4 (2B4, CD244), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (NTB-A), SLAMCF7 (CS1), SLAMF8 (BLAME), SLAMF9 (CD2F), CD28, CEACAM1 (CD66a), CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8, CEACAM1 -3AS CEACAM3C2, CEACAM1 -15, PSG1 -11, CEACAM1 -4C1, CEACAM1 -4S, CEACAM1 -4L, IDO, TDO, CCR2, vía de la adenosina-CD39-CD73 (A2AR), BTKs, TIKs, CXCR2, CCR4, CCR8, CCR5, vía de VEGF, CSF-1 o un modulador de la respuesta inmune innata.

Para las terapias de combinación, se administran un ADC de EDB y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales dentro de cualquier período de tiempo adecuado para la realización de la terapia prevista. Por lo tanto, los agentes individuales se pueden administrar de forma prácticamente simultánea (es decir, como una única formulación o dentro de minutos u horas) o consecutivamente en cualquier orden. Por ejemplo, los tratamientos con un solo agente se pueden administrar con una diferencia dentro de alrededor de 1 año entre sí, tal como dentro de alrededor de 10, 8, 6, 4 o 2 meses, o dentro de 4, 3, 2 o 1 semana(s), o dentro de alrededor de 5, 4, 3, 2 o 1 día(s).

Las terapias de combinación divulgadas pueden producir un efecto terapéutico sinérgico, es decir, un efecto mayor que la suma de sus efectos o resultados terapéuticos individuales. Por ejemplo, un efecto terapéutico sinérgico puede ser un efecto al menos alrededor de dos veces mayor que el efecto terapéutico obtenido por un solo agente, o la suma de los efectos terapéuticos obtenidos por los agentes individuales de una combinación dada, o al menos alrededor de cinco veces mayor, o al menos alrededor de diez veces mayor, o al menos alrededor de veinte veces mayor, o al menos alrededor de cincuenta veces mayor, o al menos alrededor de cien veces mayor. Un efecto terapéutico sinérgico también se puede observar como un aumento del efecto terapéutico de al menos el 10 % en comparación con el efecto terapéutico obtenido por un solo agente, o la suma de los efectos terapéuticos obtenidos por los agentes individuales de una combinación determinada, o al menos el 20 %, o al menos el 30 %, o al menos el 40 %, o al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, o al menos el 80 %, o al menos el 90 %, o al menos el 100 %, o más. Un efecto sinérgico es también un efecto que permite reducir la dosis de agentes terapéuticos cuando se utilizan en combinación.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos de aspectos específicos para llevar a cabo la presente invención se ofrecen sólo con propósitos ilustrativos.

Ejemplo 1

5 Generación de anticuerpos anti-EDB y preparación para la conjugación

Generación de anticuerpos anti-EDB

El ADNc que codifica para diversos anticuerpos completamente humanos que se unen a EDB se construyó utilizando una metodología de biología molecular estándar y se derivó del anticuerpo monoclonal humano L19 que se une específicamente a EDB (en adelante, "anticuerpo anti-EDB-L19" o "EDB-L19"). El anticuerpo EDB-L19 comprende una región constante IgG1 humana con alotipo de G1m(a) que tiene ácido aspártico (D) en la posición 356 y leucina (L) en la posición 358 (de acuerdo con el índice EU de Kabat) y una región constante de la cadena ligera Kappa humana. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo EDB-L19 se establecen en SEQ ID NOS. 1 y 10, respectivamente, y las cadenas pesada y ligera se establecen en SEQ ID NOS. 8 y 15, respectivamente.

Para producir un anticuerpo no inmunogénico, se introdujo un alotipo no G1m(a) que tenía ácido glutámico (E) en la posición 356 y metionina (M) en la posición 358 (de acuerdo con el índice EU de Kabat) en la cadena pesada de EDB-L19. Para generar la cadena pesada, la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada de EDB-L19 se fusionó al ADNc de la región constante de IgG1 humana con el alotipo de G1m^z, no (a), no (x). En algunos aspectos, los anticuerpos se alteraron adicionalmente para disminuir la variante de carga de un anticuerpo y aumentar la homogeneidad eliminando la lisina C terminal (K) de la región constante del anticuerpo IgG1 de EDB-L19 que genera EDB-PFE HC (SEQ ID NO: 17). Las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo EDB-PFE se establecen en las SEQ ID NOS. 17 y 15, respectivamente.

Como se muestra en la Tabla 4, se realizó una electroforesis capilar con obtención de imágenes (iCE) utilizando una iCE3 con Prince Autosampler para determinar el porcentaje de variantes de carga para las preparaciones de anticuerpos. El anticuerpo EDB-L19 tuvo un aumento sustancial en las especies básicas y una disminución del pico principal del anticuerpo como resultado del procesamiento incompleto de la lisina C terminal durante el cultivo celular en comparación con el anticuerpo EDB-PFE.

Tabla 4: Porcentaje (%) de variantes de carga para anticuerpos EDB.

Anticuerpo EDB	% Ácido	% Principal	% Básico
Ab EDB-L19 (HC con lisina C terminal)	19.60	49.44	30.96
Ab EDB-PFE (HC sin lisina C terminal)	23.16	71.92	4.92

30 Anticuerpos para conjugación específica del sitio mediante residuos de cisteína diseñados

Los métodos para preparar anticuerpos anti-EDB para la conjugación específica del sitio con diversas cargas útiles del enlace a través de residuos de cisteína diseñados reactivos se realizaron generalmente como se describe en Publicación Internacional PCT No. WO2013/093809. Uno o más residuos de la cadena pesada, tal como la posición K290 (de acuerdo con el índice EU de Kabat, o de la cadena ligera, tal como K183 (de acuerdo con Kabat), se alteraron a un residuo de cisteína (C) mediante mutagénesis dirigida al sitio.

En algunos aspectos, la posición K290 (de acuerdo con el índice EU de Kabat) en la región constante de la cadena pesada IgG1 humana del anticuerpo EDB-PFE se sustituyó con una cisteína reactiva (C) para permitir la conjugación específica del sitio que genera EDB-(K290C) HC (SEQ ID NO: 19). En otros aspectos, el residuo K183 (de acuerdo con Kabat) en la región constante de la cadena ligera Kappa humana se sustituyó por una cisteína reactiva (C) para permitir la conjugación específica del sitio generando EDB-(cK183C) LC (SEQ ID NO: 31).

Anticuerpos para conjugación específica del sitio mediante residuos de glutamina diseñados

Los anticuerpos anti-EDB se expresaron con subtipos de IgG1 humanos diseñados con residuos de glutamina reactivos, tal como etiquetas que contienen glutamina ("Q"), en varias posiciones de aminoácidos para la conjugación con varias cargas útiles del enlazador. Los métodos para preparar anticuerpos anti-EDB para la conjugación específica del sitio a través de residuos de glutamina reactivos se realizaron generalmente como se describe en Publicación Internacional PCT WO2012/059882.

En algunos aspectos, una etiqueta de glutamina H16 LLQG (SEQ ID NO: 40) fue diseñada dentro de la región Fc de IgG humana del anticuerpo EDB-PFE para permitir una conjugación específica del sitio mediada por la transglutaminasa DAR 2. Por ejemplo, en la cadena pesada del anticuerpo EDB-PFE, los aminoácidos en las posiciones E294-N297 (de acuerdo con el índice EU de Kabat) fueron reemplazados por la etiqueta LLQG que contiene glutamina H16 (SEQ ID NO: 40). En otros aspectos, los anticuerpos se modificaron adicionalmente para aumentar la especificidad de la conjugación con la etiqueta diseñada que contiene glutamina H16. El aminoácido lisina (K) en la posición 222 (de acuerdo con el índice EU de Kabat) en la cadena pesada fue sustituido por una arginina (R) generando EDB-(H16-K222R) HC (SEQ ID NO: 27). La sustitución K222R proporcionó un aumento en los ADCs homogéneos, un mejor entrecruzamiento intermolecular entre el anticuerpo y la carga útil del enlazador y/o una disminución significativa en el entrecruzamiento entre cadenas con la etiqueta que contiene glutamina H16 en el C terminal de la cadena ligera del anticuerpo.

Posibles riesgos químicos

Los posibles riesgos químicos, especialmente dentro de las CDRs, pueden afectar la heterogeneidad molecular y provocar la unión del antígeno a sitios putativos de glicación de proteínas. La glicación de proteínas es una glicosilación no enzimática que puede ocurrir en anticuerpos recombinantes durante el cultivo celular y las proteínas glicosiladas pueden sufrir reacciones adicionales para generar productos heterogéneos poco caracterizados, denominados colectivamente productos finales de glicación avanzada. Para mitigar el riesgo potencial de glicación, se mutó la posición K94 (numeración de Kabat) adyacente a CDR3 en la región variable de la cadena pesada de EDB-L19 a una arginina (R) para generar EDB-(K94R) VH (SEQ ID NO: 21) y luego se fusionó a una región constante de IgG1 humana para generar EDB-(K94R) HC (SEQ ID NO: 23). La mutación de glicación K94R también se introdujo dentro de las cadenas pesadas EDB-(K290C) y EDB-(H16-K222R) diseñadas para la conjugación específica del sitio para generar EDB-(K94R-K290C) HC (SEQ ID NO: 25) y EDB-(K94R-H16-K222R) HC (SEQ ID NO: 29), respectivamente.

Ejemplo 2

Caracterización de las propiedades de unión de las variantes del anticuerpo EDB

Análisis de afinidad de la unión

Se utilizó la resonancia de plasmón superficial (SPR) para caracterizar la cinética de unión de las variantes del anticuerpo anti-EDB al 7-EDB-89 recombinante humano, de mono cinomólogo y de rata (SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36, respectivamente) y para confirmar que las propiedades de unión de los anticuerpos anti-EDB que tienen la mutación de glicación K94R se mantuvieron completamente. La unión se detecta mediante la SPR de superficie de la luz láser que se refracta desde la superficie. El análisis de la cinética de la señal tasa de asociación (k_a) y tasa de disociación (k_d), permite la discriminación entre interacciones no específicas y específicas.

Un anticuerpo IgG anti-humano (GE Healthcare) se acopló mediante amina covalente en las 4 celdas de flujo de un chip sensor recubierto de dextrano carboximetilado CM5 a una densidad de alrededor de 10,000 unidades de resonancia (RUs) siguiendo el protocolo del fabricante y luego cada variante de anticuerpo anti-EDB se capturó a un nivel de aproximadamente 60-90 RUs. El amortiguador de corrida y de muestra utilizado fue el amortiguador HBS-EP+ (0.01 M de HEPES, 0.15 M de NaCl, 3 mM de EDTA y 0.05 % v/v de tensioactivo P20 pH 7.4). Se inyectó una serie de diluciones seriadas triples de 7-EDB-89 con una concentración que variaba de 600 nM a 11.1 nM sobre la superficie a una tasa de flujo de 50 μ L/minuto para una asociación de 60 segundos y una disociación de 120 segundos. Luego se regeneró la superficie con un pulso de 30 segundos de 3 M de $MgCl_2$, un pulso de 30 segundos de un amortiguador de regeneración iónica (0.46 M de KSCN, 1.83 M de $MgCl_2$, 0.92 M de urea y 1.83 M de guanidina-HCl pH 7.4) y luego se equilibró con un pulso de 30 segundos de amortiguador de corrida HBS-EP+. Todos los ensayos de SPR se realizaron a 25 °C con una tasa de recolección de datos de 1 Hz utilizando un instrumento T200 BIAcore® (GE Healthcare). Los sensogramas resultantes fueron referenciados doblemente (Myszka, D. G., J. Mol. Recognit., 12:279-284,1999) utilizando tanto una superficie de control como inyecciones de amortiguador. Las tasas constantes se determinaron ajustando los datos a un modelo Langmuir de 1:1 el software de evaluación T200 v2.0 con BIAcore® y la ecuación $K_D = k_d/k_a$. Cada experimento se corrió por duplicado y se determinó la K_D promedio. Como se muestra en la Tabla 5, los anticuerpos EDB-L19 y EDB-(K94R) muestran una unión comparable al 7-EDB-89 de humano. $t_{1/2}$ = vida media, $R_{m\acute{a}x}$ = respuesta máxima, RU = unidades de resonancia.

Tabla 5. Propiedades de unión de los anticuerpos EDB-L19 y EDB-(K94R).

7-EDB-89	Anticuerpo	K_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (s)	$R_{m\acute{a}x}$ (RU)	$Chi^2/R_{m\acute{a}x}$	K_D (nM)
Humano (1)	EDB-L19	5.03E+0 5	1.16E-01	5.97	61.7	0.24 %	230
Humano (2)	EDB-L19	4.86E+0 5	1.13E-01	6.13	61.5	0.20 %	232

							231 ± 1.4
							Avg ± SD
Humano (1)	EDB-(K94R)	5.39E+0 5	1.24E-01	5.59	36.4	0.08 %	230
Humano (2)	EDB-(K94R)	5.02E+0 5	1.13E-01	6.13	35.1	0.17 %	226
							228 ± 2.8
							Avg ± SD

Adicionalmente, se determinaron las afinidades de unión de los anticuerpos EDB-L19 y EDB-(κK183C-K94R-K290C) al 7-EDB-89 humano, de mono cinomólogo y de rata. Como se muestra en la Tabla 6, las afinidades de unión de los anticuerpos EDB-L19 y EDB-(κK183C-K94R-K290C) fueron similares. Como se muestra en la Tabla 7, las afinidades de unión del anticuerpo EDB-(κK183C-K94R-K290C) al 7-EDB-89 humano, de mono cinomólogo y de rata fueron comparables, lo que confirma que la reactividad entre especies se mantuvo después del diseño del anticuerpo EDB-L19 para permitir la conjugación específica del sitio y la eliminación del sitio de glicosilación putativo.

Tabla 6. Propiedades de unión de los anticuerpos anti-EDB 7-EDB-89.

7-EDB-89	Anticuerpo EDB-L19			EDB-(κK183C-K94R-K290C)		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
Humano	6.15E+05	9.75E-02	159	1.40E+06	3.12E-01	223
Mono	5.60E+05	1.05E-01	188	ND	ND	ND
Rata	5.08E+05	1.07E-01	210	ND	ND	ND

Tabla 7. Propiedades de unión del anticuerpo EDB-(κK183C-K94R-K290C) a 7-EDB-89.

7-EDB-89	Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 (s)	Rmáx (RU)	Chi2/Rmáx	K _D (nM)
Humano	EDB-(κK183C-K94R-K290C)	3.42E+05	1.16E-01	6.0	67.0	0.20 %	340.0
Mono cino	EDB-(κK183C-K94R-K290C)	3.30E+05	1.19E-01	5.8	62.6	0.29 %	361.5
Rata	EDB-(κK183C-K94R-K290C)	2.98E+05	1.23E-01	5.7	62.1	0.31 %	412.5

Unión competitiva mediante ELISA

Las propiedades de unión de los anticuerpos EDB-(K94R) y EDB-(κK183C-K94R-K290C) se evaluaron adicionalmente utilizando un ELISA de competencia con EDB-L19 biotinilado para confirmar que la unión a EDB se mantuvo completamente. 7-EDB-89 humano (SEQ ID NO: 34) se inmovilizó (100 ng/pocillo) en una placa de ELISA de 96 pocillos y se añadió 20 ng/mL de anticuerpo EDB-L19 biotinilado para competir con concentraciones variables de anticuerpo anti-EDB modificado y se detectó la unión utilizando un anticuerpo anti-estreptavidina-HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL).

Como se muestra en la Figura 1A y en la Tabla 8, los anticuerpos EDB-L19 y EDB-(K94R) tuvieron valores de concentración de inhibición máxima media similares. La Figura 1B y la Tabla 9 muestran que los anticuerpos EDB-(K94R) y EDB-(κK183C-K94R-K290C) también tuvieron valores de concentración de inhibición máxima media similares. Esto indica que los anticuerpos modificados EDB-(K94R) y EDB-(κK183C-K94R-K290C) conservaron las propiedades de unión a EDB y que la modificación (K94R) de la cadena pesada y/o la introducción de cisteínas reactivas diseñadas para la conjugación específica del sitio no alteraron la unión a EDB.

Tabla 8. Competencia con bioEDB-L19 por la unión a 7-EDB-89 humano.

Anticuerpo	IC ₅₀ [nM]
EDB-L19	12.7
EDB-(K94R)	13.1

Tabla 9. Competencia con bioEDB-L19 por la unión a 7-EDB-89 humano.

Anticuerpo	IC ₅₀ [nM]
EDB-(K94R)	19.7
EDB-(κK183C-K94R-K290C)	19.0

Análisis de avidéz

- 5 Se determinó que la afinidad de unión del anticuerpo EDB-L19 es una interacción de unión baja a ~230 nM. Por lo tanto, se utilizó SPR para investigar si la avidéz influía en la unión a niveles diana diferenciales dentro del microambiente tumoral. Densidades variables de 7-EDB-89 humano (SEQ ID NO: 34) se acoplaron covalentemente con amina a celdas de flujo individuales de un chip sensor recubierto de dextrano carboximetilado CM5. El amortiguador de corrida y de muestra fue el descrito anteriormente para el análisis de
- 10 afinidad de unión. Se inyectó una serie de diluciones seriadas triples del anticuerpo EDB-L19 en una concentración que variaba de 6 nM a 0.074 nM a una tasa de flujo de 50 µL/minuto para una asociación de 110 segundos y una disociación de 900 segundos. Luego, la superficie se regeneró con dos pulsos de 30 segundos de un amortiguador de regeneración iónica (0.46 M de KSCN, 1.83 M de MgCl₂, 0.92 M de urea y 1.83 M de guanidina-HCl pH 7.4) y luego se equilibró con un pulso de 30 segundos de amortiguador de corrida HBS-EP+.
- 15 Cada experimento se corrió por duplicado y se determinaron los valores promedio de k_a , k_d y K_D .

Como se muestra en la Tabla 10, los resultados mostraron que a medida que aumentaba el nivel de 7-EDB-89 humano inmovilizado, las tasas de disociación (k_d) disminuían y las afinidades posteriores aumentaban. Los valores de la K_D aparente fueron proporcionales a los niveles de inmovilización de 7-EDB-89 humano y confirmaron que el anticuerpo EDB-L19 se une a EDB con un gran componente de avidéz.

20 Tabla 10. Valores de K_D aparentes de EDB de la unión del anticuerpo EDB.

Analito	Ligando	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	R _{máx} (RU)	Chi ² /R _{máx}	KD (pM)
EDB-L19	7-EDB-89 Alto: 650 RU	4.34E+06	2.06E-04	3364.1	194.8	4.77 %	47.4
EDB-L19	7-EDB-89 Alto: 650 RU	4.42E+06	1.72E-04	4029.1	187.7	0.73 %	38.8
AVG ± STD		4.38E+06	1.89E-04				43.1 ± 6.08
EDB-L19	7-EDB-89 Med: 90 RU	4.46E+06	8.83E-04	784.8	38.9	2.20 %	198
EDB-L19	7-EDB-89 Med: 90 RU	2.71E+06	4.53E-04	1529.8	40.6	2.54 %	167
AVG ± STD		3.59E+06	6.68E-04				182.5 ± 21.9
EDB-L19	7-EDB-89 Bajo: 50 RU	2.02E+06	1.13E-03	613.3	27.5	9.49 %	557
EDB-L19	7-EDB-89 Bajo: 50 RU	2.81E+06	7.65E-04	905.9	23.6	2.06 %	272
AVG ± STD		2.42E+06	9.48E-04				414.5 ± 201.5

Polirreactividad de los anticuerpos anti-EDB

La polirreactividad se ha asociado con una rápida eliminación *in vivo* (Hotzel et al. mAbs 4(6):753-760, 2012) e interacciones proteína-proteína indeseables (Xu et al. Protein Eng Des Sel 26(10): 663-670 (2013). Se ha demostrado que una prueba de ELISA de unión directa de ADN e insulina se correlaciona con la farmacocinética (PK) conocida de anticuerpos validados clínicamente. Se evaluaron diluciones seriadas de anticuerpos a partir de 10 µg/mL por cuadruplicado en un ensayo de baja astringencia para determinar su unión al ADN o a la insulina que se revistió directamente sobre una placa de ELISA.

Como se muestra en la Tabla 11, tanto el anticuerpo EDB-(K94R) como el EDB-(κK183C-K94R-K290C) tienen puntuaciones de polirreactividad muy bajas que son comparables o mejores que el control negativo que tiene propiedades de PK óptimas. Adicionalmente, los puntajes de polirreactividad fueron significativamente más bajos que los del anticuerpo de control positivo que tenía una PK deficiente y resultó en una eliminación rápida.

Tabla 11. Puntuaciones de polirreactividad de anticuerpos anti-EDB.

Anticuerpo	Puntuación de polirreactividad	
	ADN	Insulina
Control negativo	4.805	5.027
Control positivo	15.741	12.171
EDB-(K94R)	0.429	2.725
EDB-(κK183C-K94R-K290C)	0.412	4.267

Cromatografía de FcRn

Se utilizó la cromatografía de FcRn para investigar la posible influencia mediada por carga de la introducción de cisteínas diseñadas reactivas en una región constante de IgG1 de tipo silvestre en la farmacocinética dependiente de FcRn. La evaluación de anticuerpos utilizando la metodología de columna de FcRn ha demostrado que el tiempo de elución mostró una correlación positiva con la eliminación en primates humanos y no humanos (Schoch A. et al. PNAS, 2015, Vol. 112). Las columnas de afinidad de FcRn se prepararon de acuerdo con Schlothauer et al., mAbs 5(4): 576-586, 2013. A continuación, se inyectaron 50 µg de anticuerpo EDB-(κK183C-K94R-K290C) o ADC de EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 y luego se eluyeron mediante un gradiente de pH lineal (30 CV) de pH 5.5-8.8 dentro de 60 minutos utilizando 20 mM de MES, 150 mM de NaCl, pH 5.5 y 20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 8.8 como eluyentes.

Como se muestra en la Tabla 12, el tiempo de elución relativo de la columna de FcRn del anticuerpo EDB-(κK183C-K94R-K290C) y del ADC de EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 fueron consistentes con parámetros de PK aceptables. Estos datos demuestran que la incorporación del residuo de cisteína diseñado reactivo K290 en la región constante de IgG1 no afecta la unión de FcRn.

Tabla 12. Tiempo de elución relativo de la columna de FcRn.

Anticuerpo o ADC	Tiempo de elución relativo de FcRn (min)	Ancho del pico al 50 % de altura
EDB-(κK183C-K94R-K290C)	0.62	1.19
EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101	2.00	1.57

Ejemplo 3

Bioconjugación de los ADCs de EDB

Los anticuerpos anti-EDB de la presente invención se conjugaron con fármacos/cargas útiles a través de enlaces para generar ADCs de EDB. El método de conjugación utilizado fue la conjugación convencional (es decir, a través de residuos de cisteína aleatorios) o la conjugación específica del sitio (es decir, a través de

residuos de cisteína diseñados o residuos de glutamina diseñados). La Tabla 13 muestra los métodos de conjugación utilizados para varios ADCs de EDB.

Método A: Conjugación convencional mediante residuos de cisteína

- 5 El anticuerpo anti-EDB a 27 mg/ml en PBS, pH 7.2 se redujo con 2.3 a 2.6 veces (m/m) de TCEP a 37 °C durante 2 horas y luego se conjugó. La proporción molar fue generalmente de 2.5 veces, pero se optimizó dependiendo de la cantidad de conjugado de anticuerpo para lograr una DAR promedio final óptima de alrededor de 4.0. El anticuerpo parcialmente reducido conjugado con 6 a 7 veces (m/m) de carga útil del enlazador en PBS con DMA al 10 % a 25 °C durante 1 hora. El exceso de carga útil del enlazador se extinguió con L-cisteína a 25 °C durante 15 minutos. El ADC crudo se dializó durante la noche en PBS a 4-6 °C.
- 10 El ADC crudo se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en Superdex 200 en PBS y el pico del monómero recolectado se almacenó a 4-6 °C o se dializó en 20 mM de histidina, sacarosa al 8.5 %, pH 5.8; se filtró de manera estéril y se congeló a -70 °C. El anticuerpo huNeg-8.8 de control negativo se conjugó mediante el mismo método.

Método B: Conjugación específica del sitio a través de residuos de cisteína diseñados

- 15 Dos gramos de anticuerpo anti-EDB, generado con residuos de cisteína diseñados reactivos, a 27.2 mg/ml en PBS, pH 7.2, se redujeron con 15 veces (m/m) de TCEP a 37 °C durante 7 horas y se desalinizaron en G-25 Sephadex® en PBS para eliminar el exceso de TCEP. Las cisteínas inter cadena se oxidaron con 30 veces de DHA (m/m) a 4-6 °C durante la noche. El DHA se eliminó mediante desalinización en G-25 Sephadex® en PBS. Para el ADC que tiene un mayor grado de protección de glutatión, en lugar de la protección de cisteína preferible
- 20 de la cisteína específica del sitio, se utilizó 100 veces de TCEP (m/m) para la reducción.
- El anticuerpo reducido y oxidado se conjugó con 9 veces (m/m) de carga útil del enlazador en PBS con DMA al 10 % a 25 °C durante 2 horas. El exceso de carga útil del enlazador se extinguió con 9 veces (m/m) de L-cisteína a 25 °C durante 15 minutos. El ADC crudo se dializó durante la noche en PBS a 4-6 °C.
- 25 El ADC crudo se purificó mediante SEC en Superdex 200 en PBS y el pico del monómero recolectado se dializó en 20 mM de histidina, sacarosa al 8.5 %, pH 5.8; se filtró en condiciones estériles y se congeló a -70 °C. El anticuerpo huNeg-8.8 de control negativo se conjugó mediante el mismo método.

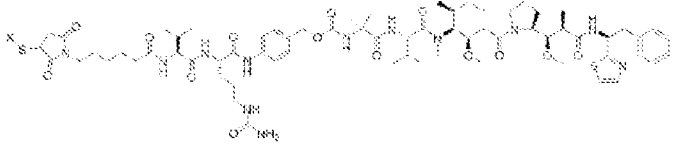
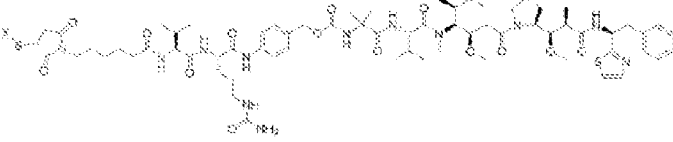
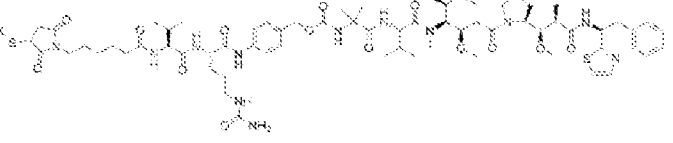
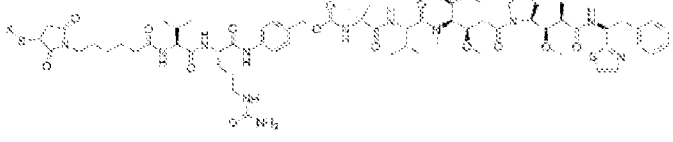
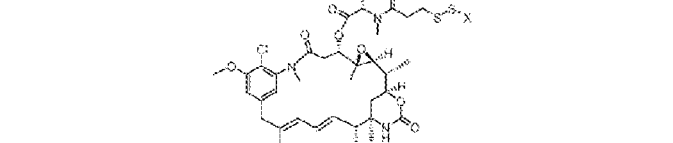
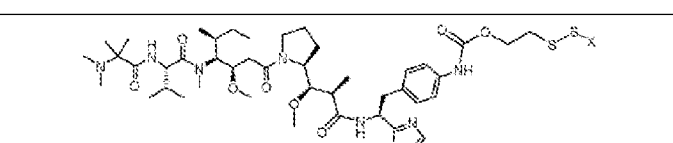
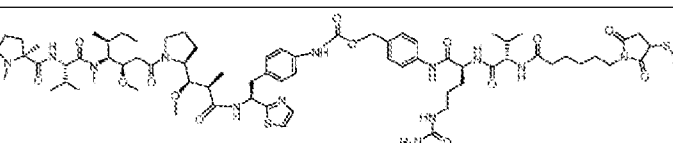
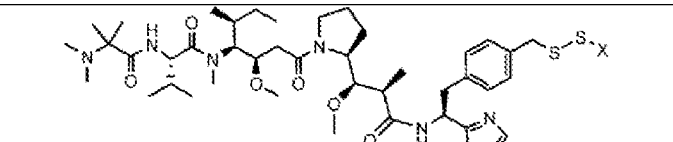
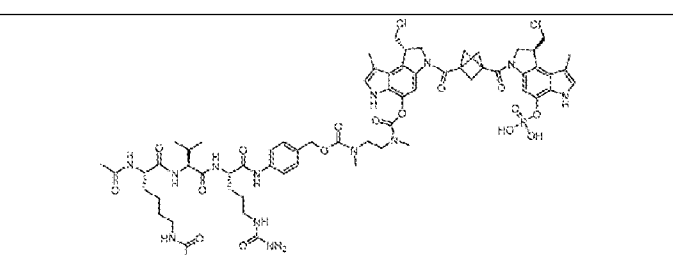
Método C: Conjugación específica del sitio a través de residuos de glutamina diseñados

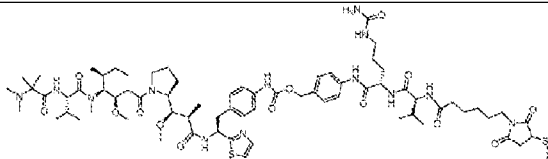
- 30 El anticuerpo anti-EDB, generado con residuos de glutamina diseñados reactivos, se dializó en el amortiguador de reacción; 100 mM de fosfato, 200 mM de NaCl, pH 7.0. Se conjugaron 20 mg/ml de anticuerpo con la carga útil del enlazador (10 veces m/m) a temperatura ambiente durante 15 horas, utilizando 1 unidad de transglutaminasa (TG) purificada comercial por mg de anticuerpo, con mezcla, en 100 mM de fosfato de potasio, 200 mM de NaCl, DMSO al 10 %. El ADC crudo se centrifugó y el sobrenadante se purificó mediante SEC.
- El ADC crudo se purificó mediante SEC en Superdex 200 en PBS, se recolectó el pico del monómero y se dializó en 20 mM de histidina, sacarosa al 8.5 %, pH 5.8; se filtró de manera estéril y se congeló a -70 °C. El anticuerpo huNeg-8.8 de control negativo se conjugó mediante el mismo método.
- 35

Método D: Conjugación convencional a través de residuos de cisteína utilizando enlaces disulfuro

- El anticuerpo anti-EDB a 27 mg/ml en PBS, pH 7.2 se redujo parcialmente utilizando 5 veces (m/m) de TCEP a 37 °C durante 2 horas y se desalinizó utilizando un SEC G-25 Sephadex®
- 40 El anticuerpo parcialmente reducido se conjugó con 12-15 veces (m/m) de carga útil del enlazador reducido en 67 mM de HEPES, pH 7.0 con 0.7 mM de DTPA y DMA al 7 % a 25 °C durante 15 minutos. El exceso de carga útil del enlazador se extinguió con 20 veces de NEM (m/m) a 25 °C durante 15 minutos.
- El ADC crudo se purificó mediante SEC en Superdex 200 en PBS con 50 mM de DHA y 50 mM de DTPA, y se recolectó el pico del monómero que se almacenó a 4-6 °C. Se conjugó un control negativo mediante el mismo método.

- 45 Tabla 13. Estructuras de diversos ADCs de EDB (X representa un anticuerpo).

# de ADC	ADC	Estructura	Método
ADC1	EDB-L19-vc-0101		A
ADC2	EDB-(κK183C-K290C)-vc-0101		B
ADC3	EDB-(K94R)-vc-0101		A
ADC4	EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101		B
ADC5	EDB-L19-diS-DM1		D
ADC6	EDB-L19-diS-C2OCO-1569		D
ADC7	EDB-L19-vc-9411		A
ADC8	EDB-diS-L19-4574		D
ADC9	EDB-(H16-K222R)-AcLys-vc-CPI-8314		C

ADC10	EDB-L19-vc-1569		A
-------	-----------------	--	---

Ejemplo 4

Caracterización de los ADCs de EDB

- Los ADCs de EDB de la presente invención se caracterizaron utilizando una combinación de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), LC-MS y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). La proporción fármaco-anticuerpo (DAR) promedio se determinó mediante espectrometría de masas (MS). La Tabla 14 proporciona características analíticas de diversos ADCs de EDB.

- LC-MS:** Columna = Waters BEH300-C4, 2.1 × 100 mm (P/N = 186004496); Instrumento = Acquity UPLC con un detector de espectrometría de masas SQD2; Tasa de flujo = 0.7 mL/min; Temperatura = 80 °C; Amortiguador A = agua + ácido fórmico al 0.1 %; Amortiguador B = acetonitrilo + ácido fórmico al 0.1 %. El gradiente corre del 3 % de B al 95 % de B durante 2 minutos, se mantiene en el 95 % de B durante 0.75 minutos y luego se reequilibra en 3 % de B. La muestra se reduce con TCEP o DTT inmediatamente antes de la inyección. El eluato se monitorea mediante LCMS (400-2000 daltons) y el pico de proteína se deconvoluciona utilizando MaxEnt1. La DAR se reporta como una carga promedio ponderada como se describió anteriormente.

- SEC:** Columna: Superdex200 (5/150 GL); Fase móvil: Solución salina amortiguada con fosfato que contiene acetonitrilo al 2 %, pH 7.4; Tasa de flujo = 0.25 mL/min; Temperatura = ambiente; Instrumento: Agilent 1100 HPLC.

- HIC:** Columna: TSK Gel Butil NPR, 4.6 mm × 3.5 cm (P/N = S0557-835); Amortiguador A = 1.5 M de sulfato de amonio que contiene 10 mM de fosfato, pH 7; Amortiguador B = 10 mM de fosfato, pH 7 + alcohol isopropílico al 20 %; Tasa de flujo = 0.8 mL/min; Temperatura = ambiente; Gradiente = 0 % de B a 100 % de B durante 12 minutos, mantener al 100 % de B durante 2 minutos, luego reequilibrar al 100 % de A; Instrumento: Agilent 1100 HPLC.

Tabla 14. Características analíticas de los ADCs de EDB.

# de ADC	ADC	Rendimiento aislado (%)	Tiempo de retención de HPLC-HIC	Masa Δ observada para HC	DAR (método LC/MS)	DAR (Método HIC)
ADC1	EDB-L19-vc-0101	64	8.7	1342	3.4	3.4
ADC2	EDB-(κK183C-K290C)-vc-0101	63	8.9	1341	3.8	4.0
ADC3	EDB-(K94R)-vc-0101	65	8.6	1342	3.7	4.1
ADC4	EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101	71	8.9	1341	3.8	3.9
ADC5	EDB-L19-diS-DM1	80	8.9	738	4.4	4.9
ADC6	EDB-L19-diS-C ₂ OCO-1569	84	6.4	889.6	4.4	4.7
ADC7	EDB-L19-vc-9411	80	8.3	1397	5.3	4.9
ADC8	EDB-L19-diS-4574	75	6.5	816	5.2	5.2

ADC9	EDB-(H16-K222R)-Aclys-vc-CPI-8314	78	5.2	1343	2.0	1.7
ADC10	EDB-L19-vc-1569	82	7.4	1385	4.3	4.2

Ejemplo 5

Expresión de EDB+ de FN

- 5 Para realizar una investigación amplia de las indicaciones de cáncer para la terapia basada en ADC de EDB, se analizó la expresión de EDB+ de FN a nivel de proteína y ARNm en tumores humanos y modelos de PDX.

Análisis de ARN-Seq de la expresión de EDB+ de FN

- 10 Se analizaron datos de RNA-Seq de 10660 muestras de tumores individuales recolectadas como parte del proyecto Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) (National Cancer Institute at NIH, Bethesda, MD) ampliando 31 tipos de tumores. Los datos de expresión a nivel de isoforma se obtuvieron del software OmicSoft (Cary, NC). La expresión de EDB+ de FN se calculó como la suma de los niveles de expresión de las isoformas de fibronectina (FN1) que albergan EDB. Los niveles de expresión se midieron por fragmento por kilobase de transcripción por millón de lecturas (FPKM) y el sumario de las estadísticas de los niveles de expresión de EDB+ de FN para cada tipo de tumor se muestran en la Tabla 15. Generalmente, se considera que el gen está expresado si el FPKM es alrededor de 1 o superior.
- 15 La Tabla 15 muestra el análisis de ARN-Seq de EDB+ de FN en tumores humanos. La expresión de EDB+ de FN se demuestra en una amplia gama de indicaciones de tumores humanos, que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de tiroides, sarcoma, carcinoma de mama, adenocarcinoma de páncreas, glioblastoma, colangiocarcinoma, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma renal, melanoma, carcinosarcoma uterino, mesotelioma, carcinoma de células escamosas de pulmón, adenocarcinoma de recto y colon, carcinoma hepatocelular de hígado, carcinoma de colon, cistadenocarcinoma seroso de ovario y carcinoma de vejiga.
- 20

Tabla 15. Análisis de ARN-Seq de EDB+ de FN en muestras de TCGA.

Tipo de tumor/enfermedad	Valor medio (FPKM)	Cuantil superior	Cuantil inferior	Valor máximo
Carcinoma de tiroides	216.69	628.03	14.20	3541.43
Sarcoma	96.86	226.41	22.20	1450.21
Carcinoma invasivo de mama	36.92	77.75	14.77	1062.56
Adenocarcinoma de páncreas	35.08	67.03	14.02	549.68
Glioblastoma multiforme	28.74	56.74	11.76	1171.19
Colangiocarcinoma	27.77	55.99	10.34	458.05
Adenocarcinoma de pulmón	23.31	49.16	10.85	1105.41
Carcinoma renal de células claras	22.91	39.34	11.49	346.83
Melanoma cutáneo de la piel	22.13	54.48	7.89	2131.95
Carcinosarcoma uterino	21.08	56.70	7.28	185.43
Mesotelioma	20.13	52.36	3.64	205.08
Carcinoma de células escamosas de pulmón	19.13	42.86	8.75	1004.73
Adenocarcinoma de recto	15.69	33.20	6.02	221.89
Carcinoma hepatocelular del hígado	13.29	37.22	4.32	472.23
Adenocarcinoma de colon	12.24	27.77	3.87	275.90

Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello	11.37	32.52	3.47	1111.18
Cistoadenocarcinoma seroso de ovario	11.25	27.51	5.00	425.09
Carcinoma urotelial de vejiga	10.03	29.64	2.28	467.12
Tumores de células germinales testiculares	8.68	72.28	2.94	1395.34
Adenocarcinoma de próstata	5.92	11.03	2.74	648.96
Cromóforo renal	5.21	8.07	1.71	1788.92
Feocromocitoma y paraganglioma	4.95	12.24	2.06	118.84
Timoma	3.58	27.15	0.30	1173.35
Glioma cerebral de grado inferior	3.19	6.94	1.53	163.17
Carcinoma adrenocortical	2.40	4.87	0.52	112.69
Carcinoma endometrial del cuerpo uterino	2.20	7.36	0.49	172.08
Melanoma uveal	1.81	3.72	0.89	16.59
Carcinoma de células escamosas cervicales y adenocarcinoma endocervical	1.79	6.34	0.56	258.49
Carcinoma de células papilares renales	1.76	6.80	0.64	2291.27
Neoplasia linfóide linfoma difuso de células B grandes	0.34	1.11	0.12	51.63
Leucemia mieloide aguda	0.00	0.13	0.00	5.84

Se realizó la cuantificación de la expresión genética en los datos de ARN-Seq de 160 xenoinjertos derivados de pacientes internos de Pfizer (PDX) modelos de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, melanoma, páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de pulmón de células pequeñas utilizando el programa RSEM. Véase Li et al., BMC Bioinformatics, 12:323, 2011. La expresión de EDB+ de FN se calculó como la suma de los niveles de expresión de las isoformas de fibronectina (FN1) que albergan EDB. Como se muestra en la Figura 2, EDB+ de FN se expresó en niveles variables (todas las muestras tenían niveles >1) en todos los tipos de tumores analizados. Datos representados como fragmento por kilobase de transcripción por millón de lecturas (FPKM).

10 Detección inmunohistoquímica (IHC) de la expresión de EDB+ de FN

La expresión de la proteína EDB+ de FN en el cáncer humano se validó mediante IHC utilizando el anticuerpo EDB-L19 en secciones congeladas. Secciones de tejido fresco congelado de ocho micrones que se embebieron en el compuesto O.C.T. Tissue-Tek (Sakura Finetek) se fijaron durante 4 minutos en una mezcla 3:1 de acetona y etanol al 100 % y luego se sumergieron en formalina amortiguada neutra al 10 % durante 20 segundos. Los portaobjetos se enjuagaron en TBS. La actividad de la peroxidasa endógena se inactivó con Peroxidized 1 (Biocare Medical) durante 10 minutos. Las interacciones proteicas no específicas se bloquearon durante 10 minutos con Background Punisher (Biocare Medical). El anticuerpo EDB-L19 o el anticuerpo de control negativo de isotipo huNeg-8.8 se precomplejó con IgG anti-humana de conejo (Jackson ImmunoResearch) a una concentración final de 3 µg/ml y 0.5 µg/ml respectivamente, durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla precomplejada se incubó con exceso de IgG humana completa (Jackson ImmunoResearch) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se agregó a los portaobjetos durante 1 hora. Las secciones se lavaron en TBS y se incubaron con SignalStain Boost Rabbit HRP (CellSignaling Technologies) durante 30 minutos. La señal cromogénica se desarrolló con DAB+ (Dako) durante 5 minutos y posteriormente se extinguió con H₂O destilada. Los portaobjetos se contrateñieron brevemente con hematoxilina CAT (Biocare Medical), se lavaron con agua, se deshidrataron en alcoholes graduados, se aclararon con xileno y se cubrieron con medio de montaje Permount (FisherChemicals). Se realizó y confirmó el análisis de la expresión.

Como se muestra en la Tabla 16, la proteína EDB+ de FN se expresó en niveles moderados a altos en todas las indicaciones de cáncer humano analizadas, incluyendo el carcinoma de cabeza y cuello (datos no mostrados), el carcinoma de páncreas, el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), el carcinoma de ovario y el carcinoma de mama. La expresión en todos los tumores fue predominantemente estromal

(incluyendo los fibroblásticos y los asociados con la vasculatura), aunque también se observó cierta tinción de células tumorales.

Tabla 16. Expresión de la proteína EDB+ de FN en cáncer humano evaluada mediante ensayo de IHC.

Tipo de tumor	# muestras de pacientes	% muestras con positividad estromal de EDB+ de FN	
		Negativo/Bajo	Moderado/Alto
Pancreático	20	30	70
Pulmón	15	0	100
Mama	12	8	92
Ovárico	10	0	100

5 Ejemplo 6

Unión in vitro de los ADCs de EDB

Para evaluar la unión relativa de los anticuerpos anti-EDB y los ADCs de EDB a EDB, las placas MaxiSorp de 96 pocillos se recubrieron con 0.5 o 1 µg/ml de 7-EDB-89 humano (SEQ ID NO: 34) en PBS y se incubaron durante la noche a 4 °C con agitación suave. Luego, las placas se vaciaron, se lavaron con 200 µl de PBS y se bloquearon con 100 µl de amortiguador de bloqueo (ThermoScientific) durante 3 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el amortiguador de bloqueo, se lavaron los pocillos con PBS y se incubaron con 100 µl de anticuerpos anti-EDB o ADCs de EDB los cuales se diluyeron en serie (4 veces) en amortiguador de ensayo de ELISA (EAB; BSA al 0.5 % / Tween-20 al 0.02 %/ PBS). La primera columna de la placa se dejó vacía y la última columna de la placa se llenó con EAB como controles en blanco. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se retiraron los reactivos y se lavó la placa con 200 µl de Tween-20 al 0.03 % en PBS (PBST). Se añadió IgG-Fc-HRP anti-humano (Thermo/Pierce) diluido 1:5000 en EAB en 100 µl a los pocillos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó con 200 µl de PBST, luego se agregaron 100 µl de BioFX TMB (Fisher) y se dejó desarrollar el color durante 4 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 µl de 0.2 N de ácido sulfúrico y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Victor (Perkin Elmer, Waltham, MA).

La Tabla 17 proporciona la unión relativa de los anticuerpos anti-EDB y los ADCs de EDB al fragmento de proteína 7-EDB-89 de humano unida a una placa de 96 pocillos en formato de ELISA. Todos los anticuerpos y ADCs dirigidos a EDB se unieron a la proteína diana con una afinidad similar en el intervalo de 19 pM a 58 pM. Por el contrario, los anticuerpos y ADCs que no se dirigen a EDB tienen valores de EC₅₀ alta >10,000 pM. Las curvas de unión de ELISA representativas se ilustran en las Figuras 3A y 3B.

Tabla 17. Anticuerpo anti-EDB y unión de ADC a EDB de humano.

# de ADC o anticuerpo	ADC o Nombre del anticuerpo	Avg EC ₅₀ (pM)	SD
Ab1	EDB-L19	27.0	-
ADC1	EDB-L19-vc-0101	37.8	12.8
ADC11	Neg-vc-0101	>10,000	-
Ab2	EDB-(κK183C-K290C)	30.2	1.6
ADC2	EDB-(κK183C-K290C)-vc-0101	58.4	17.0
ADC12	Neg-(κK183C-K290C)-vc-0101	>10,000	ND
Ab3	EDB-(K94R)	15.0	-
ADC3	EDB-(K94R)-vc-0101	37.1	14.6
Ab4	EDB-(κK183C-K94R-K290C)	44.8	8.7
ADC4	EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101	56.7	13.5
ADC5	EDB-L19-diS-DM1	21.3	-

ADC6	EDB-L19-diS-C ₂ OCO-1569	30.7	-
ADC7	EDB-L19-vc-9411	37.5	-
ADC15	Neg-vc-9411	>10,000	-
ADC8	EDB-L19-diS-4574	31.9	-
Ab5	EDB-(H16-K222R)	19.3	-
ADC9	EDB-(H16-K222R)-AcLys-vc-CPI-8314	39.4	2.5
ADC17	Neg-(H16-K222R)-AcLys-vc-CPI-8314	>10,000	-
EC ₅₀ media \pm desviación estándar y número (n) de determinaciones. ND = no determinado.			

Ejemplo 7

Citotoxicidad *in vitro* de los ADCs de EDB

Cultivo celular

- 5 WI38-VA13 son fibroblastos de pulmón humano transformados con SV40 obtenidos de ATCC y mantenidos en medio MEM Eagles (Cell-Gro), suplementado con FBS al 10 %, aminoácidos no esenciales MEM al 1 %, piruvato de sodio al 1 %, 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina y 2 mM de GlutaMax. Los HT29 se derivan del carcinoma colorrectal humano (ATCC) y se mantienen en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % y glutamina al 1 %.

- 10 Detección de transcripción de EDB+ de FN

- Para el análisis de la expresión genética y la transcripción de EDB+ de FN, las células proliferantes adherentes WI38-VA13 y HT29 se disociaron de los matraces de cultivo celular con TrypLE Express (Gibco). Se utilizó el kit RNeasy Mini (Qiagen) para purificar el ARN total de los pellets de células recolectadas. El ADN residual se eliminó mediante el Set RNase-Free DNase (Qiagen) durante la purificación del ARN. Se utilizó el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems) para la transcripción reversa de ARN total a ADNc. El ADNc se analizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando TaqMan Universal Master Mix II, con UNG (Applied Biosystems). La señal de EDB+ de FN fue detectada por el cebador de TaqMan Hs01565271_m1 y normalizada con el promedio de ambas señales de ACTB (cebador de TaqMan Hs99999903_m1) y GAPDH (cebador de TaqMan Hs99999905_m1). Todos los cebadores fueron de ThermoFisher Scientific. Se muestran datos de un experimento representativo.

Detección de la proteína EDB+ de FN mediante inmunodetección tipo Western

- Para la detección de EDB+ de FN mediante inmunodetección tipo Western, se cosecharon células proliferantes adherentes WI38-VA13 y HT29 mediante raspado celular. Los lisados celulares se prepararon en amortiguador de lisis celular (Cell Signaling Technology) con inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa. El lisado tumoral se preparó en amortiguador de lisis RIPA o en amortiguador de lisis celular 2X (Cell Signaling Technology) con inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa. Los lisados de proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE y después con inmunodetección tipo Western. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y luego se bloquearon con leche al 5 % /TBS, después de una incubación con el anticuerpo EDB-L19 y el anticuerpo anti-GAPDH (Cell Signaling Technology) durante la noche a 4 °C. Después del lavado, el blot anti-EDB se incubó con el anticuerpo secundario IgG anti-humano ligado a HRP ECL (GE Healthcare) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, la señal EDB+ de FN fue revelada por el sustrato de inmunodetección tipo Western Pierce ECL 2 (Thermo Scientific) y detectada por películas de rayos X. El blot anti-GAPDH se incubó con anticuerpo secundario IgG anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 680 (Invitrogen) en amortiguador de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, la señal de GAPDH fue detectada por el sistema de obtención de imágenes LI-COR Odyssey. El análisis densitométrico de inmunodetección tipo Western de EDB+ de FN se realizó utilizando el densitómetro de obtención de imágenes calibrado Bio-Rad GS-800 y se cuantificó utilizando el software Quantity One versión 4.6.9. Se muestran datos de un experimento representativo.

- La figura 4 muestra la expresión de EDB+ de FN mediante inmunodetección tipo Western en células WI38-VA13 y HT29. EDB+ de FN se expresa en la línea celular WI38-VA13 y la línea celular de carcinoma de colon HT29 es negativa cuando se cultiva *in vitro*.

Detección de proteína EDB+ de FN mediante citometría de flujo

El anticuerpo EDB-L19 se utilizó para medir la expresión de EDB+ de FN en la superficie celular de las células WI38-VA13 o HT29 mediante citometría de flujo. Las células se disociaron mediante amortiguador de disociación celular no enzimático (Gibco) y se incubaron con amortiguador de flujo frío (FB, BSA al 3 %/PBS+Ca+Mg) en hielo para bloquearlas. Luego, las células se incubaron con anticuerpos primarios en hielo en FB. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS-Ca-Mg frío y luego se incubaron con tinte de viabilidad (Biosciences) para discriminar células vivas y muertas, de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Las señales se analizaron en un citómetro de flujo BD Fortessa y los datos se analizaron utilizando el software BD FACS DIVA. Se muestran datos de un experimento representativo.

En la Tabla 18 se resumen los resultados de inmunodetección tipo Western, qRT-PCR y citometría de flujo. Los datos demuestran que WI38-VA13 es EDB+ de FN positivo y HT29 es EDB+ de FN negativo.

Tabla 18. Caracterización de la expresión de EDB+ de FN en células WI38 VA13 y HT29

Línea celular	qRT-PCR ($2^{-\Delta\Delta C(t)}$)	Western (densidad normalizada (OD/mm ²))	Unión por citometría de flujo (MFI-GeoMean (EDB+ de FN sin tefir))
WI38-VA13	0.224247	475.397	4480
HT29	0.000049	0.093	2

Ensayos de citotoxicidad in vitro

Las células WI38-VA13 o HT29 en proliferación se cosecharon de matraces de cultivo con amortiguador de disociación celular no enzimático y se cultivaron durante la noche en placas de 96 pocillos (Corning) a 1000 células/pocillo en una cámara humidificada (37 °C, CO₂ al 5 %). Al día siguiente, las células se trataron con ADCs de EDB o ADCs de control de isotipo que no se unen a EDB agregando 50 µl de stock 3x por duplicado a 10 concentraciones. En algunos experimentos, las células se sembraron a 1500 células/pocillo y se trataron el mismo día. Luego, las células se incubaron con ADCs de EDB o ADCs de control de isotipo que no se unen a EDB durante cuatro días. En el día de la cosecha, se agregaron 50 µl de Cell Titer Glo (Promega) a las células y se incubaron 0.5 horas a temperatura ambiente. La luminiscencia se midió en un lector de placas Victor (Perkin Elmer, Waltham, MA). La viabilidad celular relativa se determinó como un porcentaje de pocillos de control no tratados. Los valores de IC₅₀ se calcularon utilizando el modelo logístico de cuatro parámetros #203 con XLfit v4.2 (IDBS).

La Tabla 19 muestra la IC₅₀ (ng/ml de anticuerpo) de los tratamientos con ADC de EDB en ensayos de citotoxicidad realizados en células de carcinoma de colon WI38-VA13 (línea celular tumoral positiva para EDB+ de FN) y HT29 (línea celular tumoral negativa para EDB+ de FN). Los ADCs de EDB indujeron la muerte celular en la línea celular que expresaba EDB+ de FN. Los valores de IC₅₀ fueron similares para todos los ADCs de EDB que tenían carga útil del enlazador vc-0101, en el intervalo de aproximadamente 184 ng/ml a 216 ng/ml (EDB-L19-vc-0101, EDB-(κK183C-K290C)-vc-0101, EDB-(K94R)-vc-0101, EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101). Los ADCs del control negativo vc-0101 fueron sustancialmente menos potentes, con valores IC₅₀ de aproximadamente 70 a 200 veces mayores que los ADCs de EDB-vc-0101. Todos los ADCs de vc-0101 tenían valores de IC₅₀ 46 a 83 veces mayores en la línea de células tumorales EDB+ de FN negativas, HT29. Por lo tanto, los ADCs de EDB dependían de la expresión de EDB+ de FN para su citotoxicidad in vitro.

Otros ADCs de EDB basados en auristatina con enlaces escindibles por proteasa "vc", EDB-L19-vc-9411 y EDB-L19-vc-1569, también mostraron una potente citotoxicidad en células WA38-VA13 con una alta selectividad de alrededor de 50 a 180 veces en comparación con los ADCs de control negativo correspondientes y una selectividad de alrededor de 25 a 140 veces en comparación con la línea celular de no expresión. El ADC de EDB-L19-diS-DM1 tuvo una potencia similar a los ADCs de vc-0101, sin embargo, una selectividad mucho menor en comparación con el ADC de control negativo (alrededor de 3 veces) y con las células HT29 (alrededor de 0.9 veces).

Tabla 19. Citotoxicidad in vitro de ADCs de EDB y ADCs de control que no se unen a EDB.

# de ADC	Nombre del ADC	WI38-VA13			HT29		
		Avg IC ₅₀	SD	n	Avg IC ₅₀	SD	n
ADC1	EDB-L19-vc-0101	184	143	23	15,346	4448	5
ADC11	Neg-vc-0101	19,585	6762	16	10,731	8193	24
ADC2	EDB-(κK183C-K290C)-vc-0101	198	176	6	9,276	83	2

ADC12	Neg-(κK183C-K290C)-vc-0101	>40,000	ND	4	21,913	2635	2
ADC3	EDB-(K94R)-vc-0101	184	138	7	10,577	2065	2
ADC4	EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101	216	94	6	15,584	58	3
ADC5	EDB-L19-diS-DM1	268	150	8	237	180	2
ADC13	Neg-diS-DM1	879	82	5	ND	ND	ND
ADC6	EDB-L19-diS-C2OCO-1569	21	8	6	5	3	2
ADC14	Neg-diS-C2OCO-1569	36	6	3	ND	ND	ND
ADC7	EDB-L19-vc-9411	46	22	3	1,153	-	1
ADC15	Neg-vc-9411	2,514	260	3	1,243	-	1
ADC8	EDB-L19-diS-4574	487	406	4	429	228	2
ADC16	Neg-diS-4574	1,279	-	1	ND	ND	ND
ADC9	EDB-(H16-K222R)-Aclys-vc-CPI-8314	34	30	5	3,449	-	1
ADC17	Neg-AcLys-vc-IPC-8314	2,656	876	3	15,110	15,408	2
ADC10	EDB-L19-vc-1569	40	11	2	5,702	-	1
ADC18	Neg-vc-1569	7283	-	1	ND	ND	ND
IC ₅₀ media ± desviación estándar y número (n) de determinaciones. ND = no determinado.							

Como se muestra en la Tabla 20, las cargas útiles no conjugadas fueron altamente potentes en ambas líneas celulares, independientemente de la expresión de EDB+ de FN, lo que indica que estas células son sensibles a los agentes citotóxicos utilizados como cargas útiles de ADC.

5 Tabla 20. Potencia de la citotoxicidad in vitro de diversos compuestos no conjugados.

Nombre de la carga útil	WI38-VA13			HT29		
	Avg IC ₅₀ (nM)	SD	n	Avg IC ₅₀ (nM)	SD	n
Carga útil-1569	0.269	0.134	7	0.074	0.080	3
Carga útil-DM1	3.06	2.77	5	2.63	2.30	8
Carga útil-0101	0.392	0.326	12	0.090	0.043	14
Carga útil-0326	<0.001	ND	2	0.049	0.028	2
Carga útil-4574	3.54	1.14	2	3.65	1.89	2
Carga útil-9411	0.519	0.144	2	0.197	0.177	3
Carga útil-Cemadotin	24.2	2.14	2	43.8	-	1
IC ₅₀ media ± desviación estándar y número (n) de determinaciones. ND = no determinado.						

Ejemplo 8

Eficacia in vivo de los ADCs de EDB

10 Los ADCs de EDB se evaluaron en xenoinjertos de líneas celulares (CLX), xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) y modelos tumorales singénicos. La expresión de EDB+ de FN se detectó mediante un ensayo inmunohistoquímico (IHC) como se describió previamente en la presente memoria.

Para generar modelos CLX, se implantaron 8×10^6 hasta 10×10^6 células de las líneas tumorales H-1975, HT29 o Ramos en ratones desnudos atímicos hembra por vía subcutánea. Las células Ramos y H-1975 para inoculación se suspendieron en Matrigel al 50 % y al 100 % (BD Biosciences), respectivamente. Para el modelo de Ramos, los animales recibieron irradiación de cuerpo entero (4 Gy) antes de la inoculación celular para facilitar el establecimiento de tumores. Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó aproximadamente de 160 a 320 mm³, los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento, con 8-10 ratones en cada grupo. Los ADCs o el vehículo (PBS) se administraron por vía intravenosa en el día 0 y luego los animales recibieron una dosis cada 4 días durante 4 a 8 dosis. Los tumores se midieron una o dos veces por semana y el volumen del tumor se calculó como volumen (mm³) = (ancho × ancho × largo)/2. Se monitoreó el peso corporal de los animales durante 4 a 9 semanas y no se observó pérdida de peso en ninguno de los grupos de tratamiento.

Para generar modelos de PDX, se recolectaron tumores de animales donadores y se implantaron fragmentos de tumores de aproximadamente 3 x 3 mm por vía subcutánea en el flanco de ratones desnudos atímicos hembra (para el modelo PDX-NSX-11122) o ratones NOD SCID (para los modelos de PDX-PAX-13565 y PDX-PAX-12534) utilizando un trocar de calibre 10. Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó aproximadamente de 160 a 260 mm³, los ratones fueron asignados aleatoriamente en grupos de tratamiento, con 7-10 ratones en cada grupo. El régimen de dosificación y la vía de administración de ADCs o vehículo (PBS), así como los procedimientos de medición del tumor, son los mismos que los descritos anteriormente para los modelos CLX. Se monitoreó el peso corporal de los animales durante 5 a 14 semanas y no se observó pérdida de peso en ninguno de los grupos de tratamiento. La inhibición del crecimiento del tumor se representa gráficamente como un promedio del tamaño del tumor ± SEM.

Expresión de EDB+ de FN

Como se muestra en la Tabla 21, la expresión de EDB+ de FN en los modelos CLX H-1975, HT29 y Ramos, los modelos de PDX PDX-NSX-11122, PDX-PAX-13565 y PDX-PAX-12534 y los modelos de tumores singénicos EMT-6 se midió mediante la unión del anticuerpo EDB-L19 y la posterior detección en el ensayo de IHC. El CLX de HT-29 era un CLX de expresión moderada, pero fue negativa cuando se examinó *in vitro* debido al predominio de la expresión de proteínas en el CLX que se deriva del estroma tumoral.

Tabla 21. Expresión de EDB+ de FN

Modelo de eficacia	Tipo de tumor	Expresión general de EDB+ de FN
PDX-NSX-11122	PDX NSCLC	Alto
EMT-6	Carcinoma mamario singénico de ratón (mama)	Alto
PDX-PAX-13565	PDX Adenocarcinoma de páncreas	Moderado/Alto
H-1975	CLX NSCLC	Moderado/Alto
HT29	CLX Cáncer colorrectal	Moderado
Ramos	CLX Linfoma de Burkitt	Moderado
PDX-PAX-12534	PDX Adenocarcinoma de páncreas	Bajo/Moderado

PDX NSCLC PDX-NSX-11122

Se evaluaron los efectos de diversos ADCs en PDX-NSX-11122, un modelo PDX de cáncer humano de NSCLC que expresa altos niveles de EDB+ de FN. La Figura 5A muestra la actividad antitumoral de EDB-L19-vc-0101 a 0.3, 0.75, 1.5 y 3 mg/kg. Los datos demuestran que EDB-L19-vc-0101 mostró regresión tumoral en una manera dependiente de la dosis a 3 mg/kg y 1.5 mg/kg.

Se comparó la eficacia antitumoral de los ADCs ligados a vc con la de los ADCs ligados a disulfuro. Las Figuras 5B y 5C muestran la actividad antitumoral de EDB-L19-vc-0101 a 3 mg/kg en comparación con 10 mg/kg de EDB-L19-diS-DM1 unido por disulfuro y EDB-L19-vc-0101 a 1 y 3 mg/kg en comparación con 5 mg/kg de EDB-L19-diS-C₂OCO-1569 unido por disulfuro, respectivamente. Como se muestra en las Figuras 5B y 5C, EDB-L19-vc-0101 demostró una mayor eficacia en comparación con los ADCs de control negativo de isotipo y los ADCs que se generaron utilizando un enlazador disulfuro, EDB-L19-diS-DM1 y EDB-L19-dis-C₂OCO-1569. Además, los animales portadores de tumores que fueron tratados con EDB-L19-vc-0101 presentaron un crecimiento tumoral retardado a 1 mg/kg y regresiones completas a 3 mg/kg. Los datos demuestran que EDB-L19-vc-0101 (ADC1) inhibe el crecimiento de xenoinjertos de NSCLC PDX-NSX-11122 en una manera dependiente de la dosis.

Se evaluó la actividad de los ADCs de conjugación convencional y específica del sitio. La figura 5D muestra la eficacia antitumoral del conjugado específico del sitio EDB-(κK183C+K290C)-vc-0101 en comparación con el EDB-L19-vc-0101 conjugado convencionalmente a dosis de 0.3, 1 y 3 mg/kg y 1.5 mg/kg, respectivamente. La eficacia basada en el nivel de dosis fue comparable y el EDB-(κK183C+K290C)-vc-0101 condujo a la regresión del tumor de manera dependiente de la dosis.

Se evaluó la actividad de los ADCs de EDB vc-0101 que tienen diversas mutaciones. La Figura 5E muestra la eficacia antitumoral del conjugado específico del sitio EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 a las dosis de 0.3, 1 y 3 mg/kg. EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 indujo regresión tumoral a 1 y 3 mg/kg. La Figura 5F muestra las curvas de inhibición del crecimiento tumoral para los 10 ratones individuales portadores de tumores en el grupo EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 dosificado a 3 mg/kg de la Figura 5E. Las regresiones tumorales en el grupo de 3 mg/kg fueron completas y duraderas en 8 de 10 ratones (80 %) al final del estudio (95 días).

CLX NSCLC H-1975

Se evaluaron los efectos de diversos ADCs de CPI y de auristatina ligada a vc en H-1975, un modelo CLX de NSCLC de cáncer humano de expresión de EDB+ de FN de moderada a alta. La Figura 6A muestra EDB-L19-vc-0101 evaluado para actividad antitumoral a 0.3, 0.75, 1.5 y 3 mg/mg. Los datos demuestran que EDB-L19-vc-0101 mostró regresión tumoral de manera dependiente de la dosis a 3 mg/kg y a tan solo a 1.5 mg/kg. La Figura 6B muestra que se evaluaron EDB-L19-vc-0101 y EDB-L19-vc-1569 para determinar su actividad antitumoral a 0.3, 1 y 3 mg/kg. Los datos demuestran que EDB-L19-vc-0101 y EDB-L19-vc-1569 mostraron regresión tumoral de manera dependiente de la dosis.

Se comparó la actividad antitumoral de los ADCs de auristatina ligados a vc con la de los ADCs de CPI. Como se muestra en la Figura 6C se evaluaron EDB-L19-vc-0101 y EDB-(H16-K222R)-AcLys-vc-CPI-8314 a 0.5, 1.5 y 3 mg/kg y 0.1, 0.3 y 1 mg/kg, respectivamente. Tanto EDB-L19-vc-0101 como EDB-(H16-K222R)-AcLys-vc-CPI-8314 mostraron regresión tumoral en las dosis más altas evaluadas.

Se evaluó la actividad de los ADCs de EDB de conjugación convencional y específica del sitio. La Figura 6D muestra la eficacia antitumoral del conjugado específico del sitio EDB-(κK183C+K290C)-vc-0101 en comparación con el conjugado convencional EDB-L19-vc-0101 a dosis de 0.5, 1.5 y 3 mg/kg. La eficacia basada en el nivel de dosis fue comparable y el EDB-(κK183C+K290C)-vc-0101 condujo a la regresión del tumor de manera dependiente de la dosis.

Se evaluó la actividad de los ADCs de EDB vc-0101 que tienen diversas mutaciones. La Figura 6E muestra la eficacia antitumoral de EDB-L19-vc-0101 y EDB-(K94R)-vc-0101 a 1 y 3 mg/kg. La Figura 6F muestra la eficacia antitumoral de EDB-(κK183C+K290C)-vc-0101 y EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 a dosis de 1 y 3 mg/kg. Los 4 ADCs demostraron una eficacia similar en el modelo H-1975 independientemente de si contenían las mutaciones κK183C-K290C y/o K94R. Además, todos los ADCs analizados demostraron una eficacia antitumoral robusta, incluyendo regresiones tumorales a 3 mg/kg. Estos datos demuestran que la introducción de las mutaciones κK183C-K290C y/o K94R no afectó negativamente a la eficacia de los ADCs.

CLX de colon HT29

Se evaluaron los efectos de diversos ADCs de auristatina ligados a vc en HT29, un modelo CLX de cáncer de colon humano con expresión de EDB+ de FN moderada. Como se muestra en la Figura 7, se probaron, EDB-L19-vc-0101 y EDB-L19-vc-9411 para determinar su actividad antitumoral a 3 mg/kg. Tanto EDB-L19-vc-0101 como EDB-L19-vc-9411 mostraron regresión tumoral a la dosis de 3 mg/kg a lo largo del tiempo.

PDXs pancreáticos PDX-PAX-13565 y PDX-PAX-12534

Se evaluó la eficacia antitumoral de EDB-L19-vc-0101 en modelos de PDX pancreáticos humanos. Como se muestra en la Figura 8A, se evaluó EDB-L19-vc-0101 a 0.3, 1 y 3 mg/kg en PDX-PAX-13565, un PDX pancreático de expresión de EDB+ de FN de moderada a alta. Como se muestra en la Figura 8B, se evaluó EDB-L19-vc-0101 a 0.3, 1 y 3 mg/kg en PDX-PAX-12534, un PDX pancreático de expresión de EDB+ de FN de baja a moderada. EDB-L19-vc-0101 demostró regresión tumoral de manera dependiente de la dosis en ambos modelos de PDX pancreáticos evaluados.

Linfoma CLX Ramos

Se evaluó la eficacia antitumoral de EDB-L 19-vc-01 01 en Ramos, un modelo de linfoma CLX de expresión de EDB+ de FN moderada. Se evaluó la actividad antitumoral de EDB-L19-vc-0101 a 1 y 3 mg/kg. Como se muestra en la Figura 9, EDB-L19-vc-0101 mostró regresión tumoral a la dosis de 3 mg/kg en una manera dependiente de la dosis.

Modelo singénico de mama EMT-6

Se evaluó la eficacia antitumoral de EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 en EMT-6, un modelo de carcinoma de mama singénico de ratón en un contexto inmunocompetente. Como se muestra en la Figura 10A, EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 demostró inhibición del crecimiento tumoral a 4.5 mg/kg. La inhibición del crecimiento del tumor se representó gráficamente como un promedio del tamaño del tumor en once animales portadores de tumores ± SEM. La Figura 10B muestra las curvas de inhibición del crecimiento tumoral para los 11 ratones individuales portadores de tumores en el grupo EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 dosificado a 4.5 mg/kg. Las regresiones tumorales en el grupo de 4.5 mg/kg fueron completas y duraderas en 9 de 11 ratones (82 %) al final del estudio (34 días).

Ovárico

- 10 Se examinó la actividad de EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 en modelos PDX humanos de carcinoma de ovario y de mama que expresan EDB+ de FN. Se ha observado actividad en dosis de 3 mg/kg y 10 mg/kg (datos no mostrados).

Ejemplo 9

Farmacocinética (PK)

- 15 Se determinó la exposición de los conjugados de anticuerpo-fármaco de EDB-L19-vc-0101 convencionalmente conjugado y EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 de conjugación específica del sitio después de una administración de una dosis en bolo intravenoso (IV) de 5 o 6 mg/kg en monos cinomólogos, respectivamente. Las concentraciones de anticuerpos totales (Ab total; medición tanto de mAb conjugado como de mAb no conjugado), ADC (mAb que está conjugado con al menos una molécula de fármaco) se midieron mediante ensayos de unión al ligando (LBA) y las concentraciones de la carga útil 0101 liberada se midieron utilizando espectrometría de masas. La cuantificación de las concentraciones totales de Ab y ADC se logró mediante el ensayo de unión al ligando (LBA) utilizando la estación de trabajo Gyrolab® con detección de fluorescencia. La proteína de captura biotinilada utilizada fue un anti-hlgG de oveja y el anticuerpo de detección fue el anti-hlgG de cabra Alexa Fluor 647 para anticuerpos totales o el mAb anti-0101 Alexa Fluor 647 para ADC (los datos fueron procesados mediante el sistema Watson v 7.4 LIMS). Se prepararon muestras in vivo para el análisis de carga útil no conjugada utilizando precipitación de proteínas y se inyectaron en un espectrómetro de masas AB Sciex API5500 (QTRAP) utilizando ionización por electrospray (ESI) Turbo IonSpray positiva y modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM). Las transiciones de 743.6→188.0 y 751.6→188.0 se utilizaron para el analito y el estándar interno deuterado, respectivamente. La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron con el software Analyst versión 1.5.2 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canada).

- La farmacocinética del Ab total, ADC y la carga útil liberada de monos cinomólogos dosificados con ADC de EDB-L19-vc-0101 (a 5 mg/kg) y ADC de EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 (6 mg/kg) se muestran en la Tabla 22. La exposición del ADC de EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 de conjugación específica del sitio mostró una mayor exposición (un aumento de ~2.3X medido por el AUC normalizado a la dosis) y una mayor estabilidad de la conjugación cuando se compara con el conjugado convencional. La estabilidad de la conjugación se evaluó tanto por la mayor proporción de ADC/Ab (84 % versus 75 %) como por la menor exposición a la carga útil liberada (AUC normalizada a la dosis; 0.0058 versus 0.0082 µg*h/mL) para el ADC conjugado específico del sitio EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 en comparación con el ADC convencional EDB-L19-vc-0101, respectivamente. NA= no aplicable.

- 40 Tabla 22. Sumario de la farmacocinética en primates no humanos.

ADC	Dosis (mg/kg)	Analito	C _{máx} (µg/ml)	AUC ₀₋₅₀₄ (µg*hr/ml)	Terminal T _{1/2} (día)	AUC/Dosis	ADC/Ab (%)
EDB-L19-vc-0101 (ADC1)	5	Ab	114 ± 27	6907 ± 1997	5.1 ± 2.2	1381 ± 399	-
		ADC	110 ± 31	5190 ± 1453	4.6 ± 1.0	1038 ± 291	75 ± 2
		Carga útil	0.00053 ± 0.00025	0.0411 ± 0.0160	NA	0.0082 ± 0.0032	-
EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 (ADC4)	6	Ab	164 ± 36	17600 ± 3045	6.4 ± 1.3	2933 ± 507	-
		ADC	156 ± 30	14567 ± 2122	5.9 ± 1.1	2428 ± 354	84 ± 3

		Carga útil	0.00024 ±0.00021	0.0349 ±0.0030	NA	0.0058 ±0.0005	-
--	--	---------------	---------------------	-------------------	----	-------------------	---

Ejemplo 10

Evaluación de la estabilidad térmica de los ADCs de EDB

- Se utilizó calorimetría diferencial de barrido (DCS) para determinar la estabilidad térmica de las variantes de anticuerpos anti-EDB y los ADCs de EDB de conjugación convencional y específica del sitio correspondientes. Las muestras formuladas en PBS-CMF pH 7.2 se dispensaron en la bandeja de muestras de un MicroCal VP-Capillary DSC con muestreador automático (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ), se equilibraron durante 5 minutos a 10 °C y luego se escanearon hasta 110 °C a una tasa de 100 °C por hora. Se seleccionó un período de filtrado de 16 segundos. Los datos brutos se corrigieron según la línea de base y se normalizó la concentración de proteína. Se utilizó Origin Software 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA) para ajustar los datos a un modelo MN2-State con un número adecuado de transiciones.

- Tal como se muestra en la Tabla 23, se evaluaron diversos anticuerpos anti-EDB y ADCs de EDB, utilizando tecnología de conjugación tanto específica del sitio como convencional, y mostraron una estabilidad térmica favorable según lo determinado por la primera transición de fusión (T_m1) >65 °C. Estos resultados demuestran que el anticuerpo EDB-(κK183C-K94R-K290C) y el ADC de κK183C- K94R-K290C-vc-0101 que incorporan residuos de cisteína diseñados fueron térmicamente estables.

Tabla 23: Estabilidad térmica de las variantes de anticuerpos EDB y los ADCs de EDB

ADCs	t_{m1}	t_{m2}	t_{m3}
EDB-L19-vc-0101	66.00 ± 0.15	80.97 ± 0.25	84.11 ± 0.06
EDB-(K94R)-vc-0101	65.61 ± 0.14	80.24 ± 0.22	83.43 ± 0.05
EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101	66.00 ± 0.10	80.24 ± 0.43	83.27 ± 0.10
Anticuerpos	t_{m1}	t_{m2}	t_{m3}
EDB-(κK183C-K94R-K290C)	75.28 ± 0.12	81.56 ± 0.37	84.24 ± 0.12
EDB-L19	72*	82*	85*
*Valores determinados en un experimento diferente a otros reportados en la tabla			

Ejemplo 11

Estudios de toxicidad

- El perfil de seguridad no clínico del conjugado convencional EDB-L19-vc-0101 y del conjugado específico del sitio EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 se caracterizó en estudios exploratorios de dosis repetidas (Q3Wx3) en ratas Wistar-Han y monos cinomólogos. La rata y el mono cinomólogo se consideraron especies no clínicas farmacológicamente relevantes para la evaluación de toxicidad debido a la homología de secuencia de proteína del 100 % con EDB humano, así como a la afinidad de unión similar de los anticuerpos EDB-L19 y EDB-(κK183C-K94R-K290C) a rata, humano y mono mediante ensayo de Biacore, como se demuestra en el Ejemplo 2.

- Se evaluó EDB-L19-vc-0101 en ratas Wistar Han y monos cinomólogos hasta 10 y 5 mg/kg/dosis, respectivamente, y se evaluó EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 en monos cinomólogos hasta 12 mg/kg/dosis. A las ratas o monos se les administró una dosis intravenosa una vez cada 3 semanas (los días 1, 22 y 43) y se les sacrificó el día 46 (3 días después de la 3^a dosis). Se evaluaron los signos clínicos, cambios en el peso corporal, consumo de alimentos, parámetros de patología clínica, peso de los órganos y observaciones macroscópicas y microscópicas de los animales. En estos estudios no se observó mortalidad ni cambios significativos en el estado clínico de los animales.

- No hubo indicios de toxicidad dependiente de la diana en los tejidos/órganos que expresaban EDB+ de FN en ratas y monos. En ambas especies, la principal toxicidad fue la mielosupresión reversible con cambios hematológicos asociados. En monos, se observó una marcada neutropenia transitoria con EDB-L19-vc-0101 conjugado convencionalmente a 5 mg/kg/dosis, mientras que solo se observaron efectos mínimos en los recuentos de neutrófilos con EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 de conjugación específica del sitio a 6

mg/kg/dosis, como se muestra en la Tabla 24 y la Figura 11. Los puntos representan la media y las barras de error representan ± 1 desviación estándar (SD) de la media.

Los datos demuestran un alivio significativo de la mielosupresión mediante la conjugación específica del sitio. El perfil de toxicidad de EDB-L19-vc-0101 y EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 fue consistente con los efectos independientes de la diana de estos conjugados y se determinó que las dosis más altas no gravemente tóxicas (HNSTD) para EDB-L19-vc-0101 y EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 fueron ≥ 5 mg/kg/dosis y ≥ 12 mg/kg/dosis, respectivamente.

Tabla 24. Recuentos absolutos de neutrófilos en monos cinomólogos durante la duración del estudio.

	0 mg/kg (vehículo)		EDB-L19-vc-0101 (5 mg/kg)		EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 (6 mg/kg)	
Día	Animal # 1	Animal # 2	Animal # 1	Animal # 2	Animal # 1	Animal # 2
-7	3.26	2.9	8.48	4.67	2.41	7.42
7	3.54	2.52	7.08	2.29	3.96	4.3
10	3.16	6.83	0.11	0.82	2.66	1.56
15	3.06	1.98	11.41	3.65	1.37	1.44
31	3.87	4.17	0.39	2.07	1.91	2.22
38	3.09	5.63	16.17	2.73	1.97	1.13
45	3.53	2.07	13.02	1.83	1.4	3.78

Ejemplo 12

Combinaciones IO

A medida que las células cancerígenas mueren, liberan antígenos que son absorbidos y presentados por las células dendríticas (DCs). Debido a las mutaciones en estas células tumorales, algunos de estos antígenos incluyen neopéptidos de cáncer, los cuales tienen el potencial de ser presentados por las DCs maduras a las células T, activándolas así e induciendo el direccionamiento antitumoral. Sin embargo, los mecanismos reguladores negativos están regulados positivamente en los pacientes con cáncer. Por ejemplo, la señalización a través de puntos de control tal como las vías PD-1/PD-L1 puede limitar el reconocimiento de los neopéptidos y la activación de las células T.

Las cargas útiles conjugadas con anticuerpos en el formato ADC pueden participar para activar las vías de maduración de células dendríticas, lo que resulta en una mayor presentación cruzada de antígenos tumorales, lo que permite el cebado de células T y una mayor orientación de las células T tumorales. Los ADCs de EDB de la presente invención, que comprenden diversas cargas útiles tal como la Carga útil-0101, se utilizaron para mejorar el reconocimiento inmunológico de neoantígenos tumorales mediante la creación de entornos tumorales inmunogénicos. Estos entornos se vuelven sensibles a los agentes inmunooncológicos que bloquean las vías reguladoras negativas, cuando el ADC de EDB y el agente inmunooncológico se administran en combinación.

Los datos de estudios de eficacia de tumores singénicos EMT6 tratados con EDB-L19-vc-0101 sugieren que se indujo una respuesta efectora a la Carga útil-0101. Se observó una mayor infiltración de células T CD3+ en los tumores tratados con EDB-L19-vc-0101 versus los controles del vehículo. Además, se observó una mayor expresión de PDL1 en los tumores tratados, lo que sugiere una liberación de IFN γ debido a la mayor respuesta de las células T efectoras.

La combinación de ADCs de EDB con agentes que se dirigen a las vías inmunomoduladoras, tal como los anticuerpos antagonistas anti-PDL1 o los anticuerpos agonistas anti-41BB, probablemente mejorará la eficacia antitumoral y proporcionará respuestas más duraderas.

Ejemplo 13

Biomarcador/Mecanismo de acción

El modelo PDX NSCLC PDX-NSX-11122 se desarrolló en ratones desnudos como se describió previamente. Los ADC de EDB-(K94R)-vc-0101, EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 y Neg-vc-0101 se administraron mediante inyección en la vena de la cola a 3 mg/kg (4 animales por punto de tiempo por grupo). A las 96 horas después de una única administración, los animales fueron anestesiados y perfundidos con salina. Después de la perfusión salina, se extrajeron los tumores y se prepararon para la medición de anticuerpos y ADC mediante un ensayo de unión al ligando (LBA), o se prepararon para inmunohistoquímica (IHC).

Ensayo de unión al ligando (LBA)

Para los ensayos de LBA, se añadió amortiguador 5x a las muestras de tumor. El reactivo de extracción de tejido (Invitrogen) contenía inhibidor de proteasa al 1 % (Sigma), (v/p) con una dilución final de 6x (μg/mL de homogeneizado → μg/g del tejido). Se añadieron perlas de acero inoxidable y se homogeneizó el tejido utilizando un Mini-Beadbeater-96 (BioSpec). El homogeneizado (-100- 300 μL dependiendo del tamaño de la muestra) se transfirió a un vial adecuado (tubo Marsh) y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos (4 °C). El homogeneizado centrifugado se diluyó (MRD) con Super Block™ para análisis de acuerdo con el protocolo analítico.

Tal como se muestra en la Tabla 25, se utilizaron ensayos de unión al ligando para determinar las concentraciones medias de anticuerpos totales y ADC plasmático (μg/mL) y concentraciones tumorales (μg/g) después de la administración de una dosis única de ADCs de EDB. Los datos demuestran que EDB-(K94R)-vc-0101 y EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 se detectaron en el sitio del tumor en niveles aumentados, medidos por el anticuerpo total y ADC, en comparación con Neg-vc-0101. Además, se observó una disminución de la proporción plasma-tumor tanto para el ADC como para el anticuerpo total para EDB-(K94R)-vc-0101 y EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 en comparación con Neg-vc-0101, lo que indica una mayor eficiencia de la focalización específica del tumor de los ADCs dirigidos a EDB.

Tabla X. Concentraciones plasmáticas y tumorales medias de Ab total y ADC en PDX NSCLC.

ADC	Modalidad	Plasma a las 96 horas (μg/mL)	Tumor a las 96 horas (μg/g)	Proporción plasma/tumor
EDB-(K94R)-vc-0101	Ab Total	13.1 ± 3.7	10.2 ± 2.6	1.3
	ADC	12.0 ± 4.0	8.93 ± 1.77	1.3
EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101	Ab Total	10.3 ± 2.4	7.17 ± 2.40	1.4
	ADC	8.19 ± 2.03	6.01 ± 1.96	1.4
Neg-vc-0101	Ab Total	24.2 ± 6.6	4.74 ± 0.84	5.1
	ADC	20.2 ± 5.8	3.67 ± 0.80	5.5

Inmunohistoquímica (IHC)

Para la detección inmunohistoquímica de la distribución de ADC y los biomarcadores de respuesta corriente abajo, las muestras se fijaron en formalina amortiguada neutra al 10 % durante 48 horas. Después de la fijación, las muestras se embebieron en parafina y se cortaron a 5 μm. Las secciones de parafina cortadas se desparafinaron en sustituto de xileno y se rehidrataron con alcoholes graduados en agua destilada. Los antígenos se recuperaron en: 10 mM de amortiguador Citrato pH 6.0 (Invitrogen) para detección de fosfo-histona H3 y caspasa 3 escindida o amortiguador de Borg Decloaker pH 9.5 (Biocare Medical) para la detección de IgG anti-humano y la detección de anti-0101 en una olla a presión (Electron Microscopy Sciences) y enfriado a temperatura ambiente. La peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 10 minutos. Las interacciones proteicas no específicas se bloquearon con el bloqueo de proteínas (DAKO) durante 20 minutos. Las secciones de tejido se incubaron con anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron: 0.3 μg/mL de anticuerpo IgG Pan anti-humano (Epitomics); 10 μg/mL de Ab anti-0101; 0.13 μg/mL de histona H3 anti-fosfo (pHH3, Cell Signaling Technologies); 1.3 μg/mL de anti-caspasa 3 escindida (Cell Signaling Technologies). Para evitar la detección de ratón sobre ratón, los anticuerpos isotipo anti-0101 se etiquetaron con AlexaFluor 488 utilizando el kit de etiquetado de proteínas Alexa Fluor 488 (Life Technologies). Los anticuerpos primarios no etiquetados se detectaron con el reactivo Signalstain Boost (Cell Signaling Technologies) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios etiquetados con AlexaFluor 488 se detectaron con 1 μg/ml de anti-AlexaFluor488 de conejo (Life Technologies) durante 45 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación con el reactivo Signalstain Boost (Cell Signaling Technologies) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó DAB+ (3',3'-Diaminobenzidina; Dako) para desarrollar el color durante 5 minutos. Las secciones se contrateñieron

brevemente con hematoxilina, se lavaron con agua, se deshidrataron en alcoholes graduados, se aclararon con sustituto de xileno y se cubrieron con medio de montaje Permout.

- 5 A las 96 horas después de una dosis única, tanto el EDB-(K94R)-vc-0101 convencional como EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 de conjugación específica del sitio se detectaron de manera similar mediante IHC de IgG anti-humano en el modelo PDX PDX-NSX-11122. Se observó un aumento en las células positivas para pHH3, un marcador del arresto mitótico, en los tumores tratados con EDB-(K94R)-vc-0101 y EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 en comparación con los tratados con el ADC de control negativo (Neg-vc-0101). La mayoría de las células que albergaban el marcador del arresto mitótico pHH3 eran células neoplásicas, lo que sugiere el efecto espectador. La tinción de caspasa 3 escindida indicó un aumento de la apoptosis en aquellos
- 10 tumores tratados con EDB-(K94R)-vc-0101 (y EDB-(κK183C-K94R-K290C)-vc-0101 en comparación con los tumores tratados con el ADC de control negativo (Neg-vc-0101).

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende:

(a) un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al dominio B extra de fibronectina, en el que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDRs que comprenden SEQ ID NOs: 3, 5 y 7, y una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDRs que comprenden SEQ ID NOs: 12, 13 y 14, en el que la cadena pesada comprende un residuo de cisteína diseñado en la posición 290 (K290C), de acuerdo con la numeración del índice EU de Kabat, y en el que la cadena ligera comprende un residuo de cisteína diseñado en la posición 183 (κK183C), de acuerdo con la numeración de Kabat,

(b) un enlazador, y

(c) un fármaco.

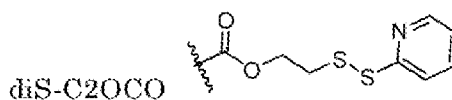
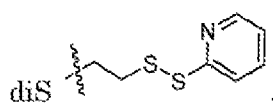
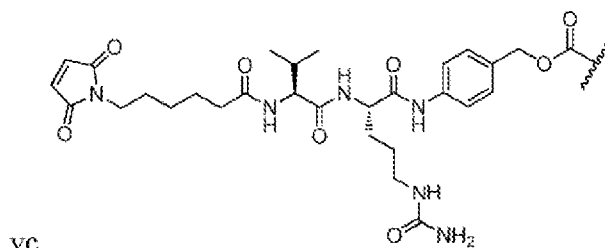
2. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 1 o 21, y una región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 10.

3. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 19 o 25, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31.

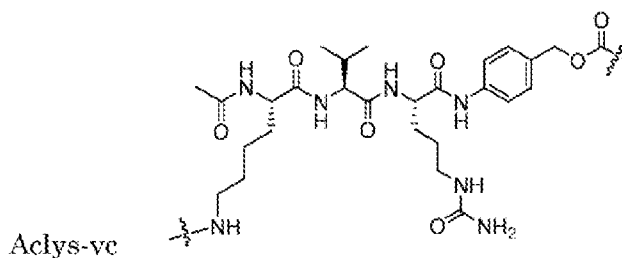
4. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una mutación de lisina a arginina en la posición 94 (K94R), de acuerdo con la numeración de Kabat.

5. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el enlazador es un enlazador escindible.

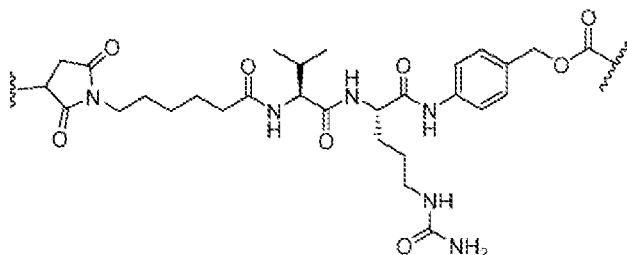
6. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el enlazador se selecciona del grupo que consiste en



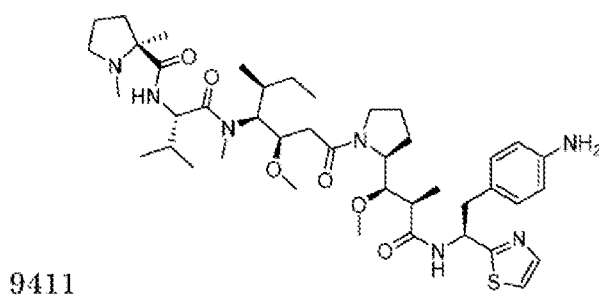
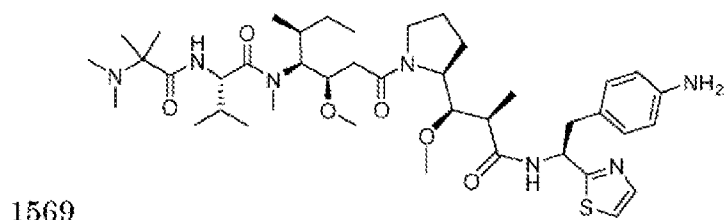
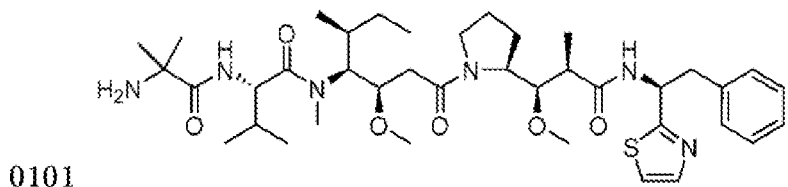
y



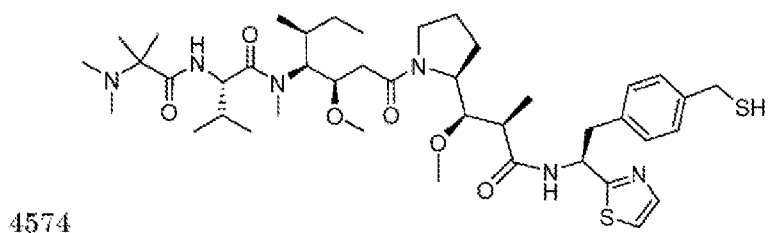
7. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el enlazador, cuando se conjuga con el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, y el fármaco comprende la siguiente estructura:



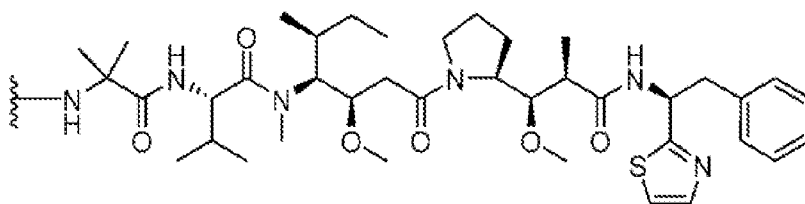
- 5 8. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el fármaco es un agente citotóxico.
9. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el fármaco es una auristatina.
- 10 10. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 9, en el que la auristatina se selecciona de un grupo que consiste en



y



- 15 11. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 9, en el que la auristatina es 0101 y en el que la auristatina conjugada con el enlazador comprende la siguiente estructura:



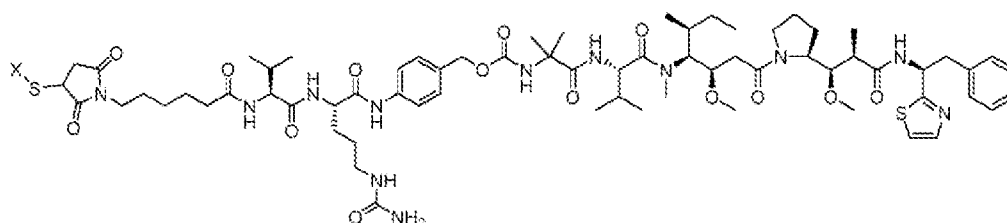
12. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 10, un enlazador vc y auristatina 0101.

5 13. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 25 y la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 31, un enlazador vc y auristatina 0101.

14. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 5-11, que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 19 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31, un enlazador vc y auristatina 0101.

10

15. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el agente citotóxico, el enlazador y el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, están enlazados para generar la estructura:



15 en el que:

X-S representa el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que S es el átomo de azufre de al menos un residuo de cisteína en el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo.

16. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende

(a) un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al dominio B extra de fibronectina, en el que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31;

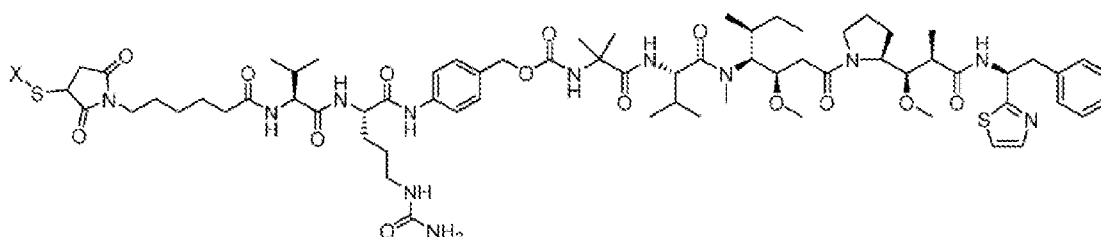
20

(b) un enlazador escindible y

(c) un fármaco citotóxico,

en el que el enlazador escindible, el fármaco citotóxico y el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, están enlazados para generar la estructura:

25



en el que:

X-S representa el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, y S es el átomo de azufre de al menos un residuo de cisteína en el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo.

17. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un portador farmacéuticamente aceptable.
18. Una composición que comprende una pluralidad de conjugados anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, y opcionalmente un portador farmacéutico, en el que la composición tiene una DAR promedio que varía de 3 a 5 o de 1 a 3.
19. Un ácido nucleico que codifica para una cadena pesada y una cadena ligera del anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o un vector que comprende el ácido nucleico o una célula hospedera que comprende el ácido nucleico o el vector.
20. Un proceso para producir un conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que comprende:
 - (a) unir el enlazador al fármaco;
 - (b) conjuguar el enlazador y el fármaco con el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, y
 - (c) purificar el conjugado anticuerpo-fármaco, opcionalmente en el que la conjugación es específica del sitio en uno o más residuos de cisteína diseñados en el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo.
21. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para uso en el tratamiento de un trastorno o enfermedad que expresa EDB+ de FN en un sujeto.
22. El conjugado anticuerpo-fármaco para uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el trastorno o enfermedad que expresa EDB+ de FN es cáncer.
23. El conjugado anticuerpo-fármaco para uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer de páncreas, linfoma y cáncer de mama.

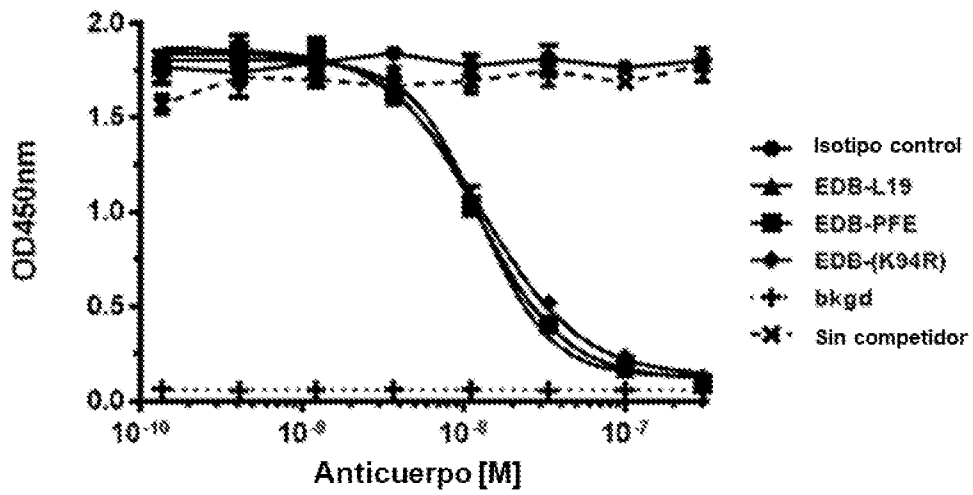


FIG. 1A

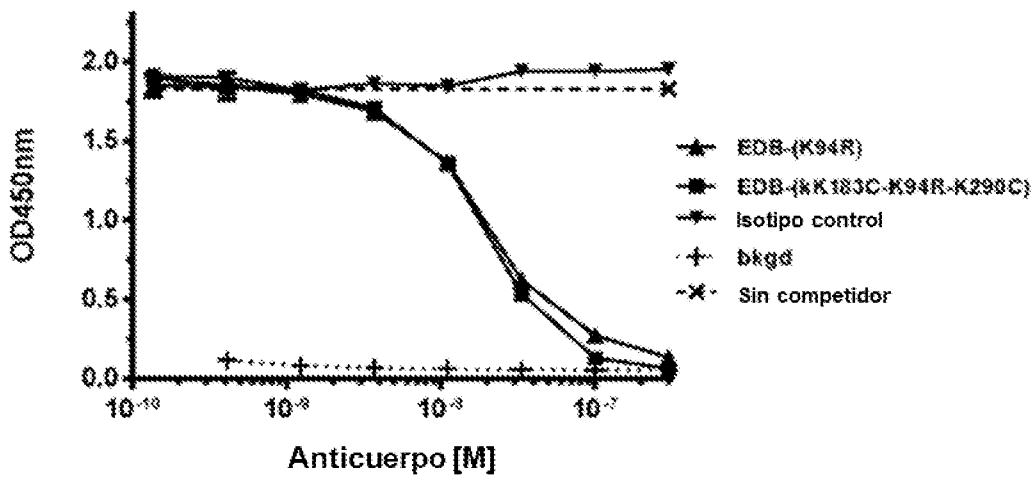


FIG. 1B

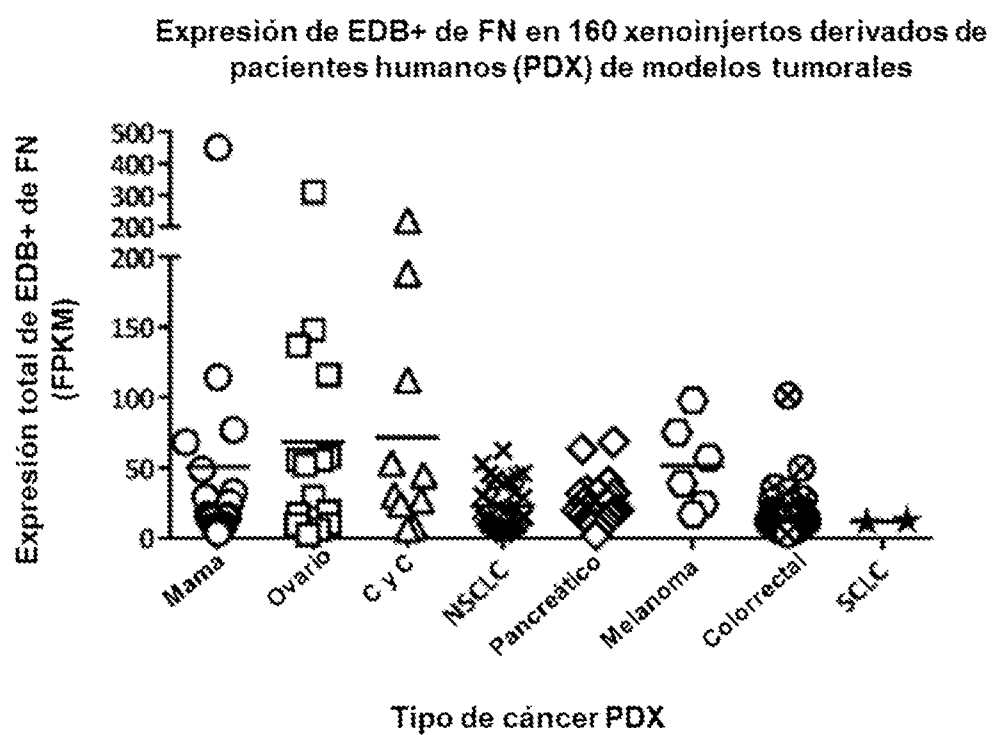


FIG. 2

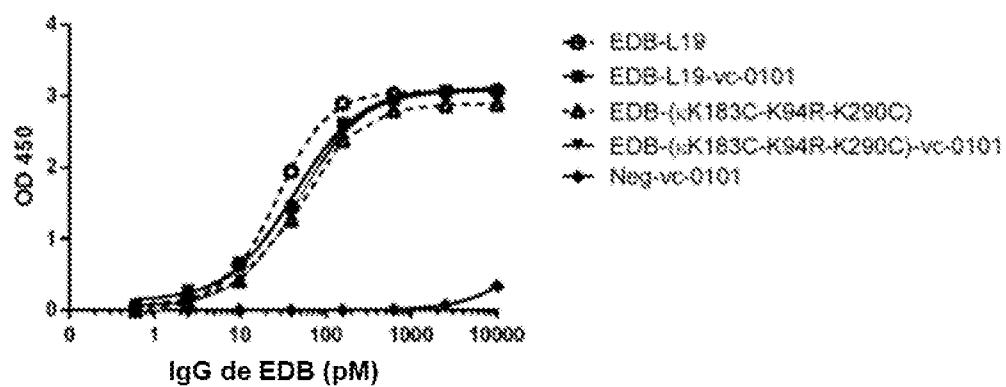


FIG. 3A

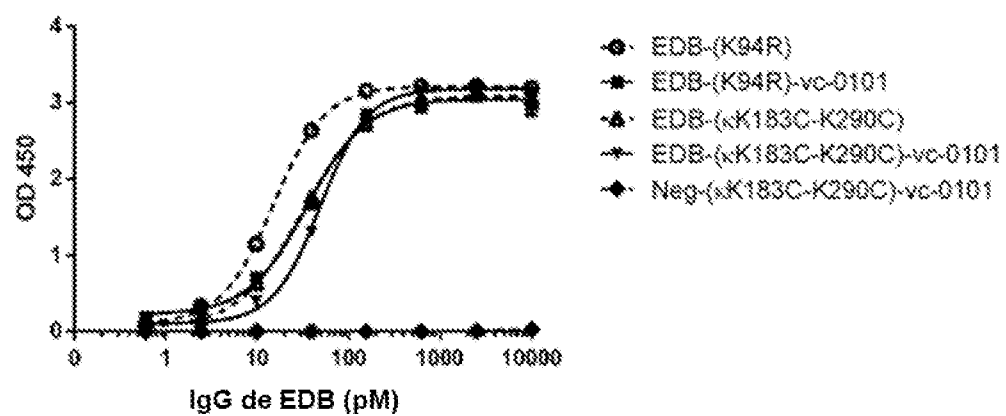


FIG. 3B

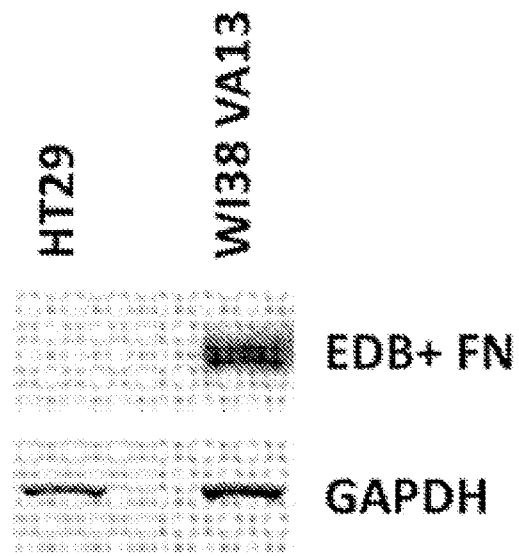


FIG. 4

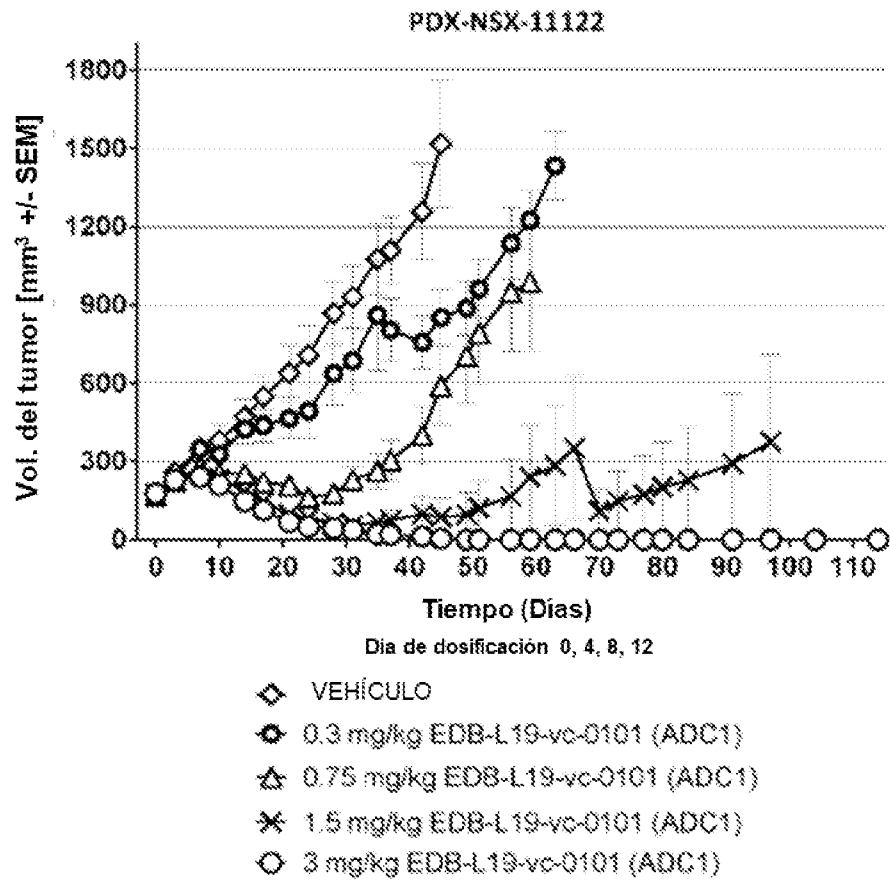


FIG. 5A

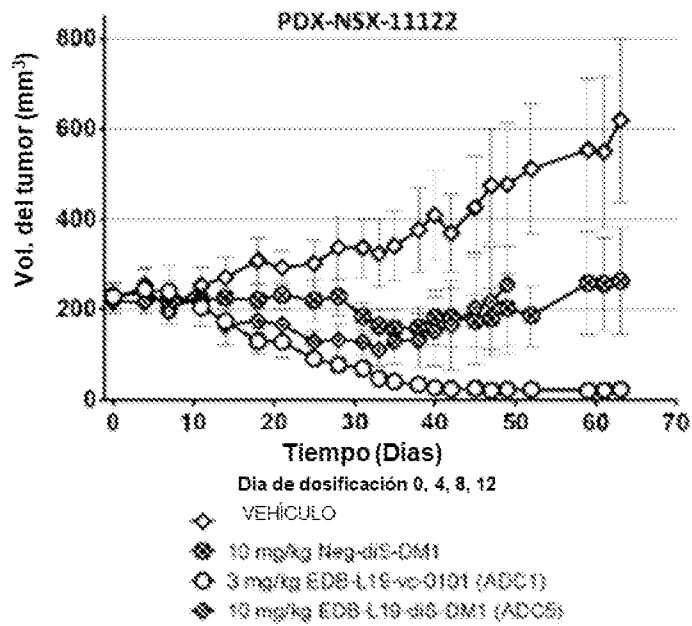


FIG. 5B

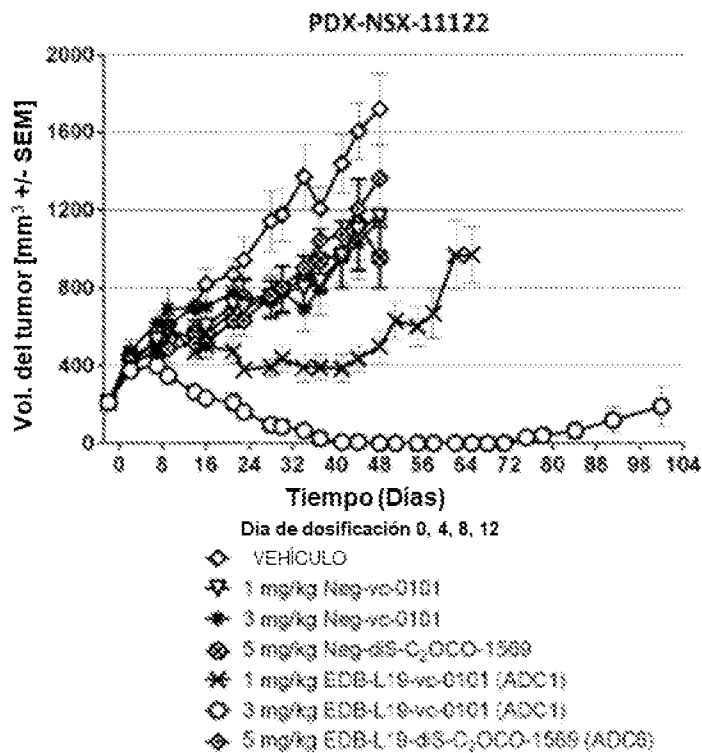
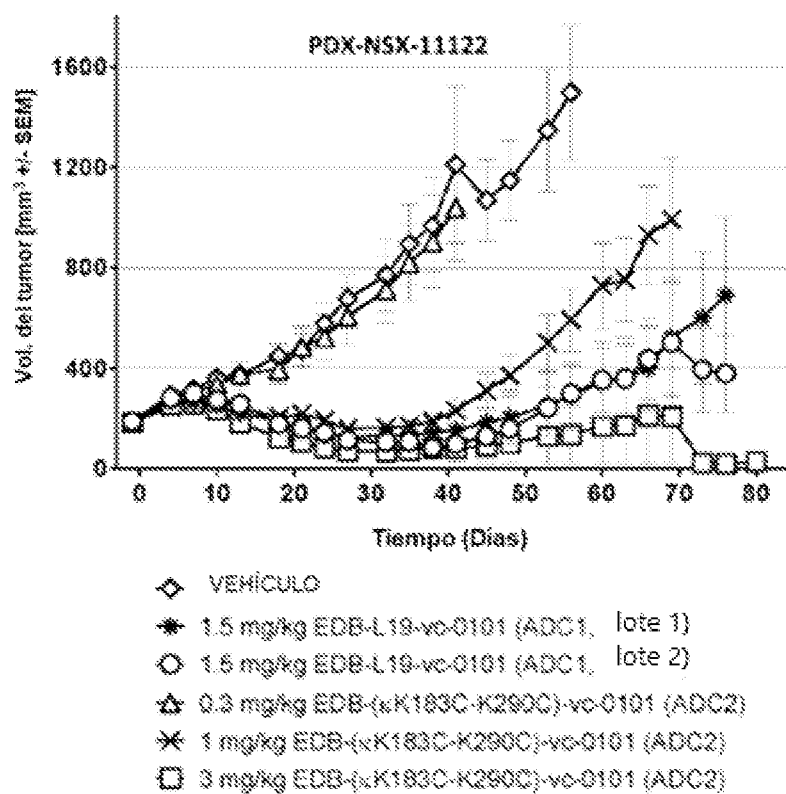


FIG. 5C

**FIG. 5D**

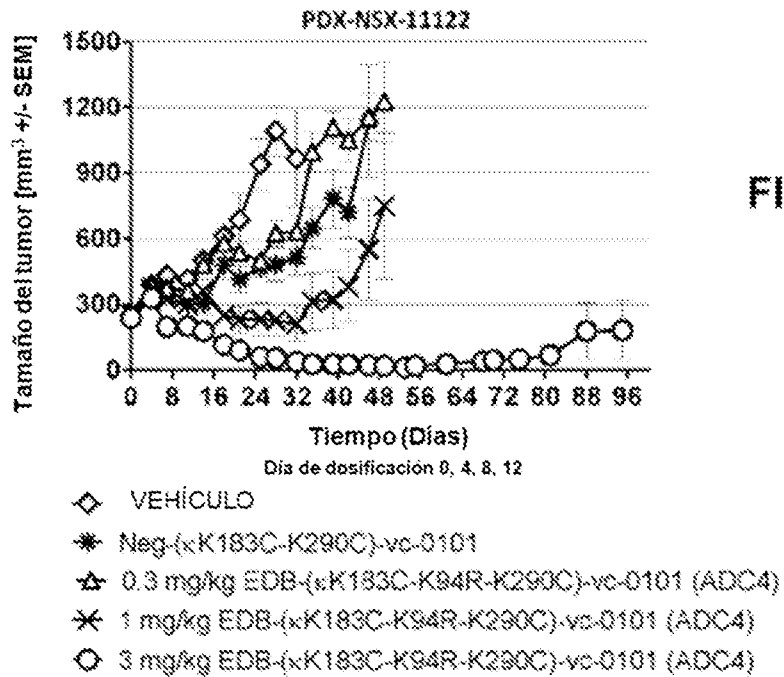


FIG. 5E

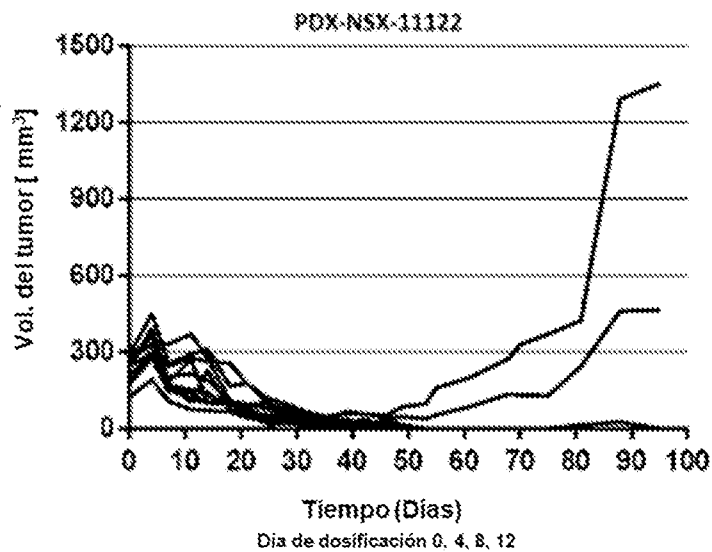


FIG. 5F

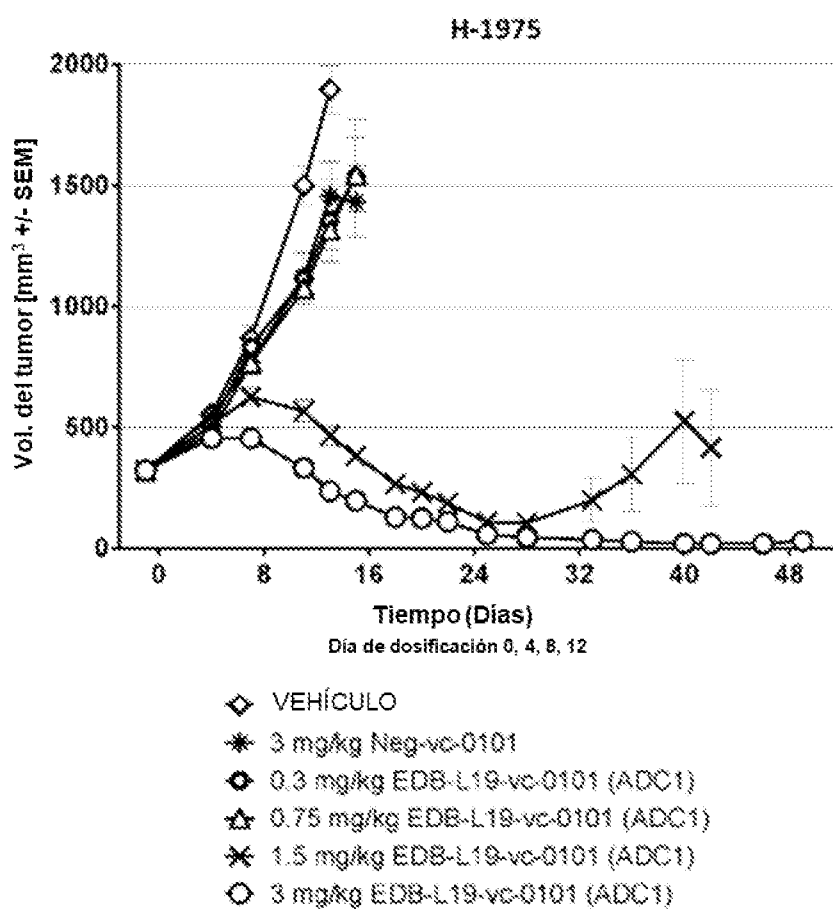


FIG. 6A

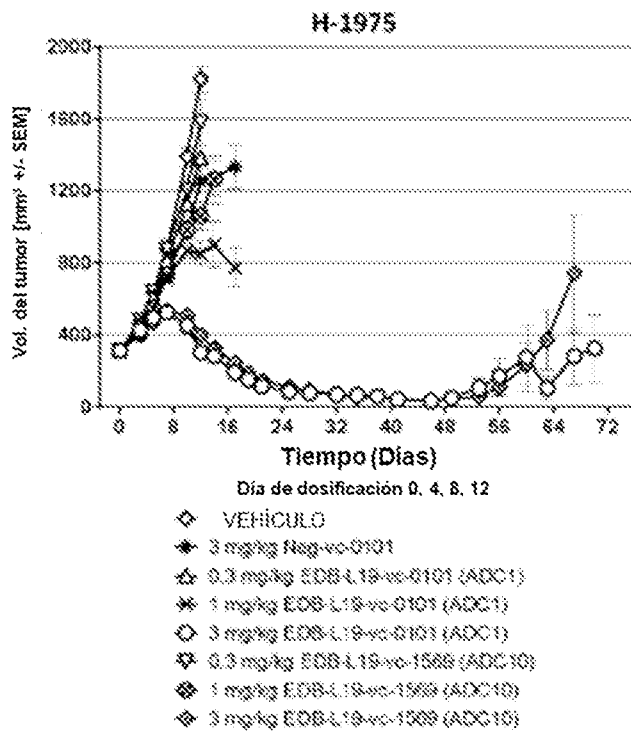


FIG. 6B

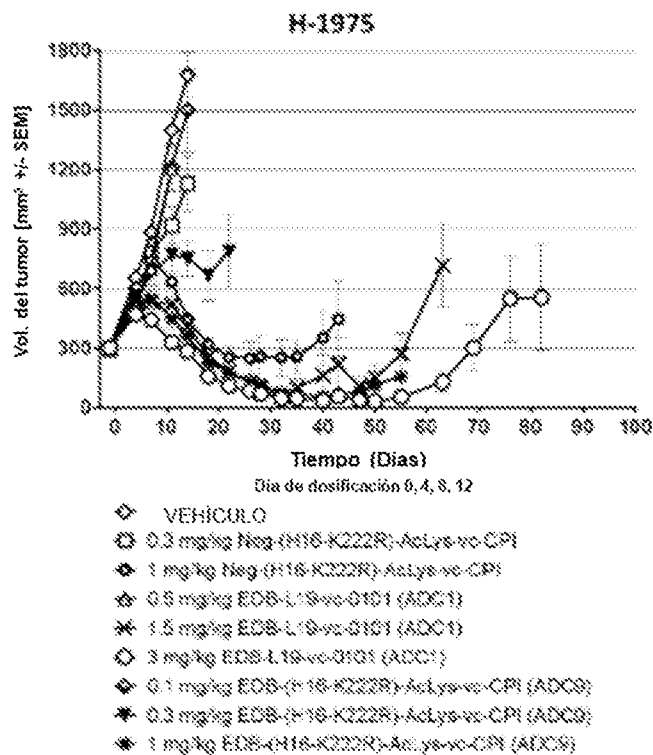


FIG. 6C

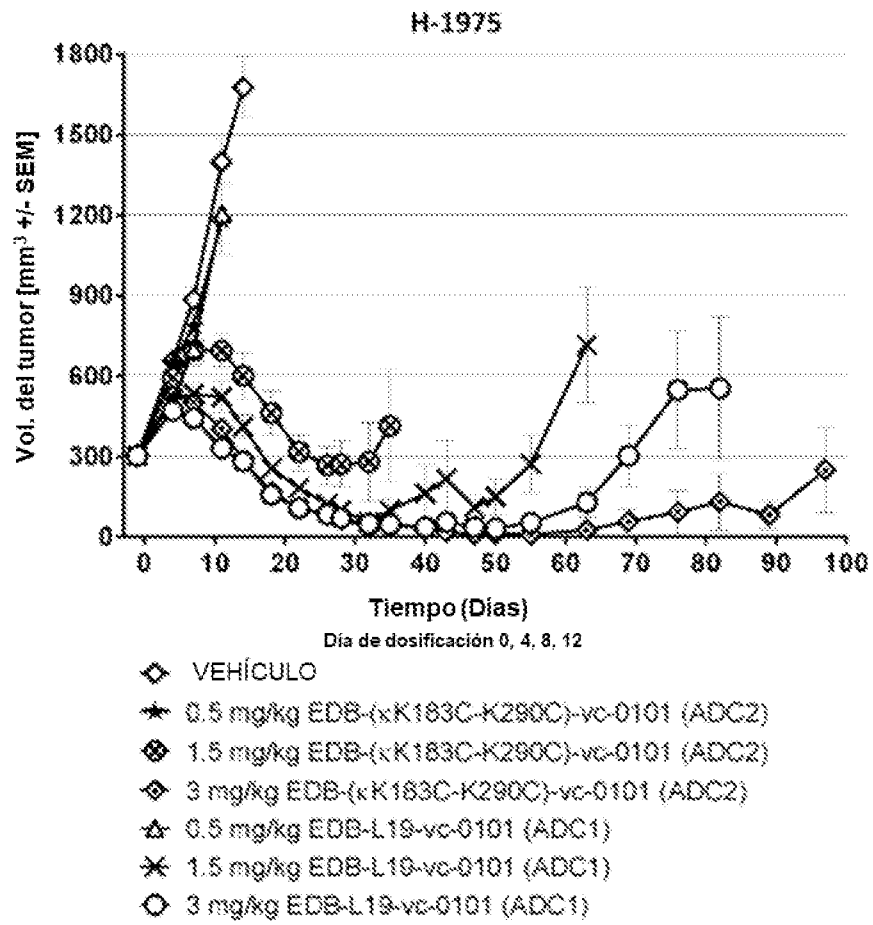


FIG. 6D

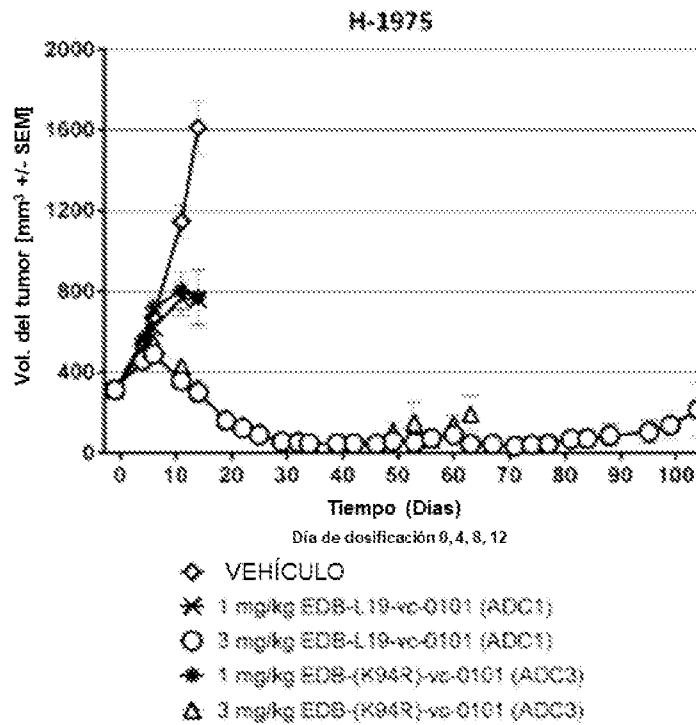


FIG. 6E

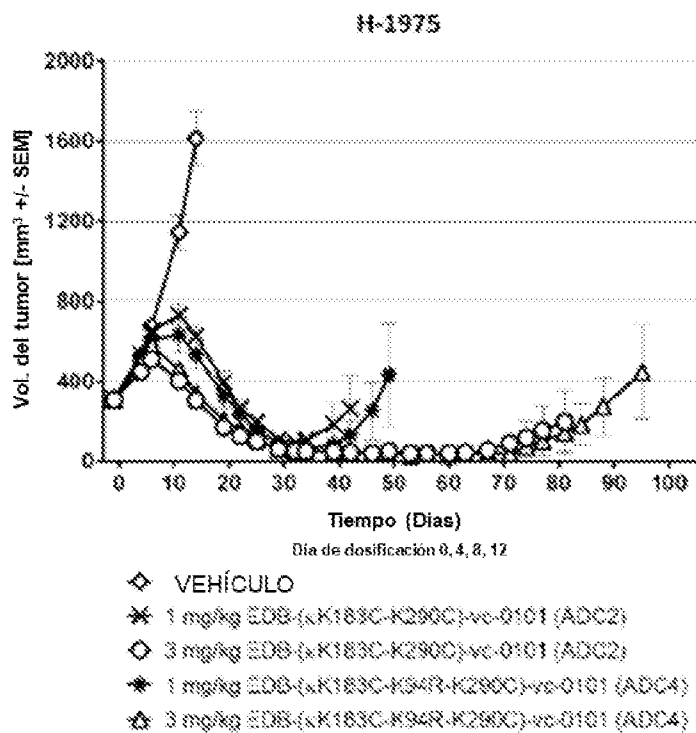
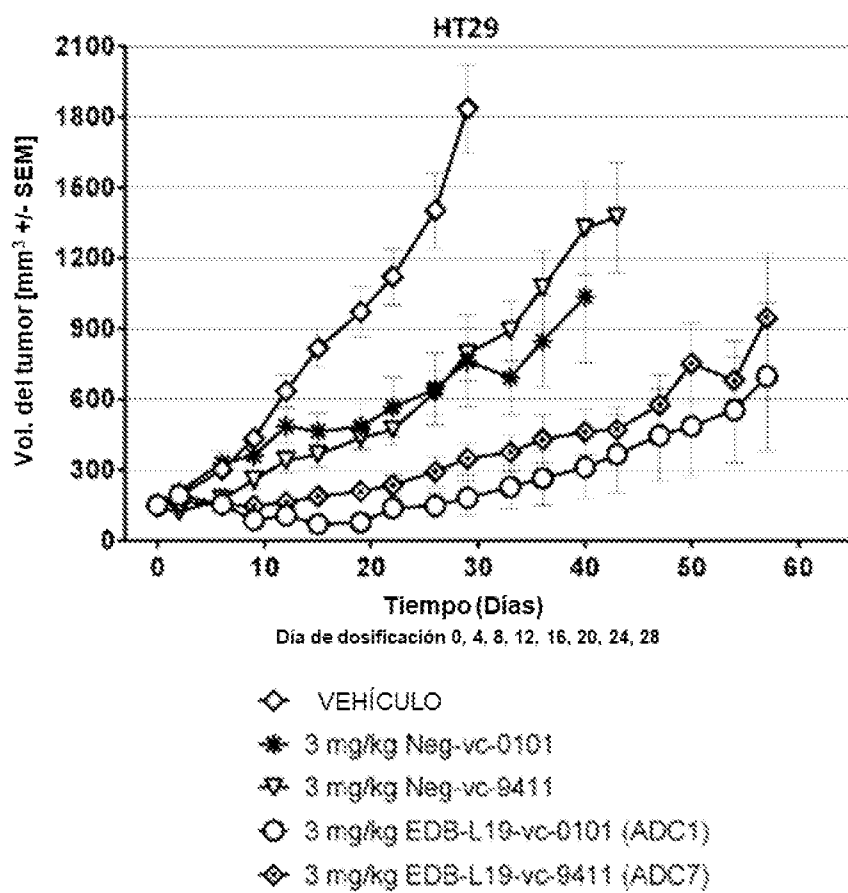


FIG. 6F

**FIG. 7**

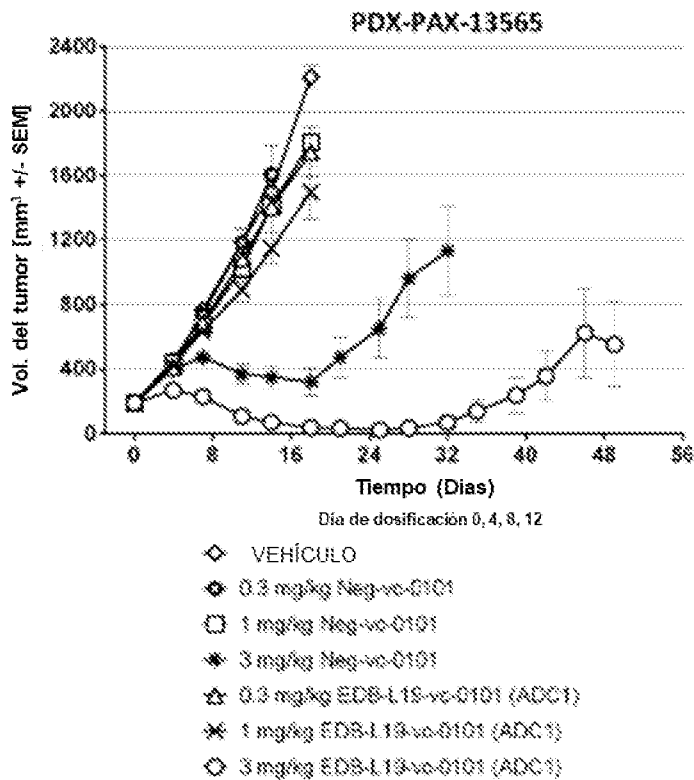


FIG. 8A

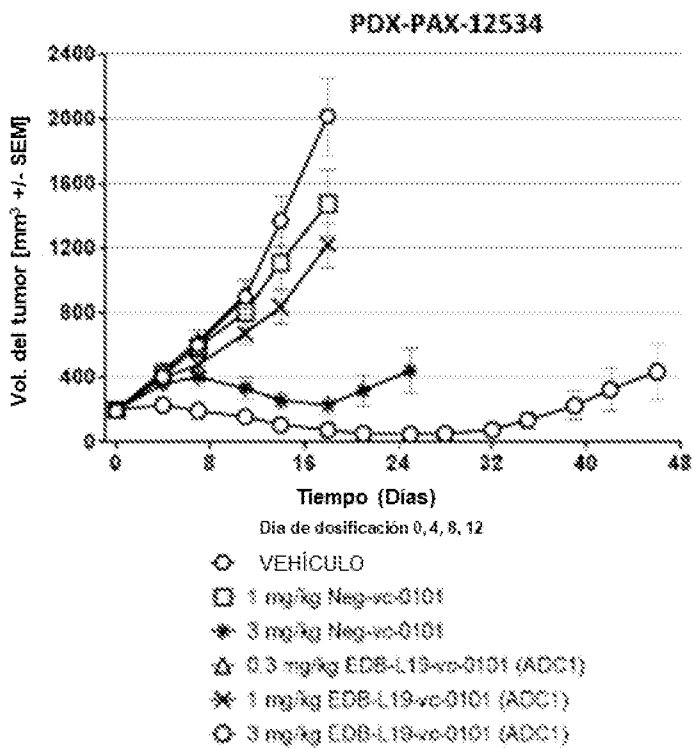


FIG. 8B

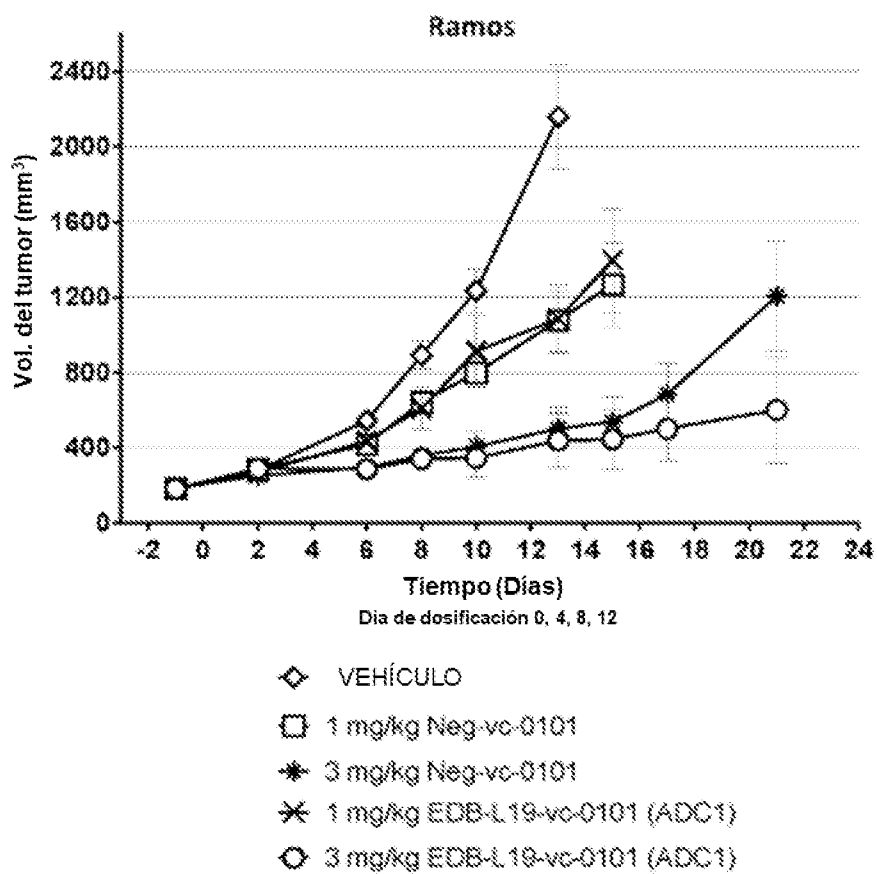


FIG. 9

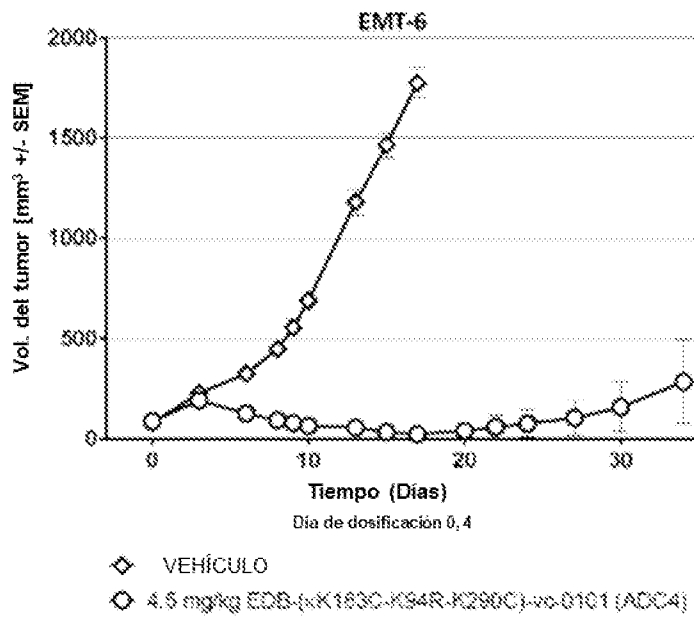


FIG. 10A

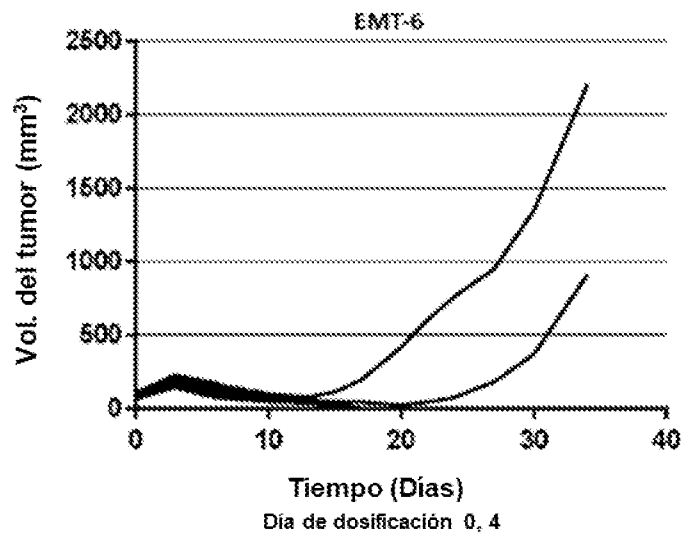


FIG. 10B

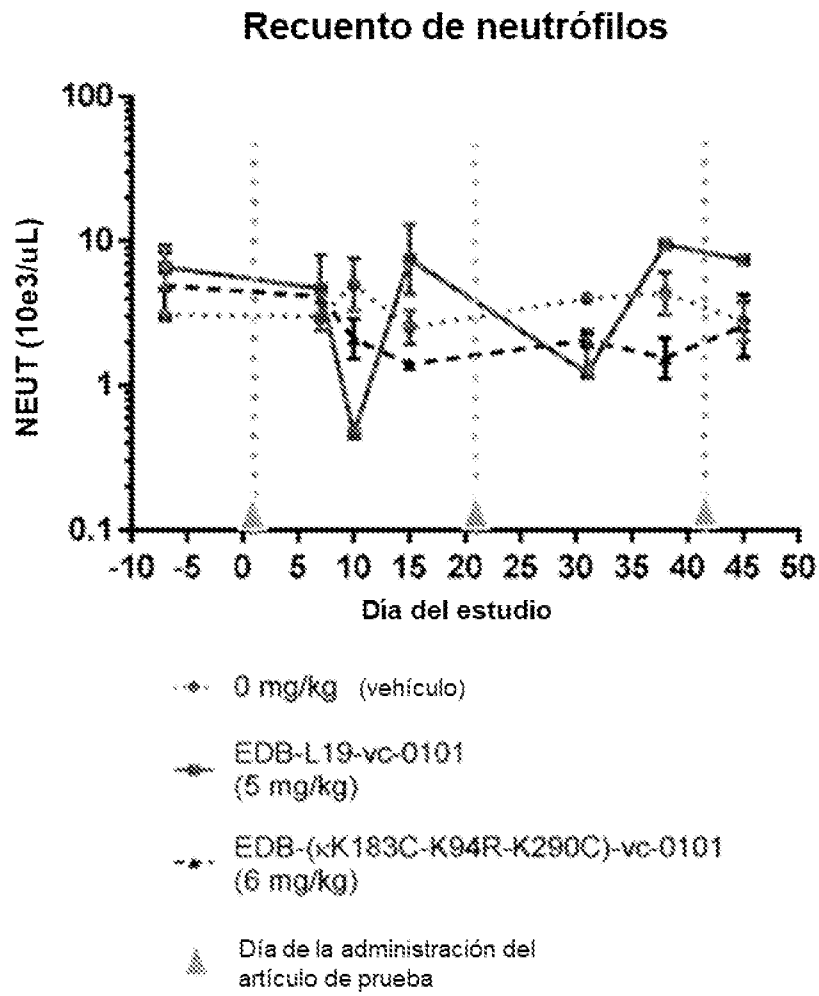


FIG. 11