

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 012**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2015** **PCT/GB2015/052800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016** **WO16046574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2015** **E 15785171 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024** **EP 3197501**

54 Título: **Materiales biológicos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

25.09.2014 GB 201416960

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

14.10.2024

73 Titular/es:

ANTI-KOR BIOPHARMA LIMITED (100.0%)
Stevenage Bioscience Catalyst,
Gunnels Wood Road
Stevenage, Hertfordshire SG1 2FX, GB

72 Inventor/es:

DEONARAIN, MAHENDRA PERSAUD;
YAHIOGLU, GOKHAN;
STAMATI, IOANNA;
SAOUROS, SAVVAS y
KAPADNIS, PRASHANT BHIMRAO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 982 012 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

Materiales biológicos y usos de los mismos

La invención se refiere a compuestos terapéuticos dirigidos optimizados que comprenden una molécula portadora y un agente terapéutico activo, proporcionando así tratamientos clínicos más eficaces para diversas enfermedades que requieren una acción terapéutica dirigida.

El tratamiento actual de las enfermedades es predominantemente no dirigido. Los fármacos se administran por vía sistémica u oral, lo que expone a muchos otros tejidos además de los tejidos enfermos. En la terapia del cáncer, por ejemplo, los fármacos quimioterapéuticos actúan sobre mecanismos de especial importancia en las células cancerosas (normalmente relacionados con el ADN o la replicación celular). Sin embargo, otras células no cancerosas también pueden absorber el fármaco quimioterapéutico y verse afectadas, tales como las células madre de la médula ósea que se dividen rápidamente, lo que provoca inmunosupresión y enfermedad (efectos secundarios habituales de los tratamientos quimioterapéuticos). En las enfermedades infecciosas, se introduce en la sangre (por vía oral o inyectable) un fármaco antibacteriano que suele interferir en una determinada vía metabólica bacteriana. La exposición de otros tejidos al fármaco puede provocar efectos secundarios, así como el grave problema de la farmacoresistencia. Las células infectadas por virus también son difíciles de tratar, ya que su metabolismo suele ser prácticamente idéntico al de las células humanas no infectadas.

Existe la hipótesis generalizada de que los futuros avances de la medicina consistirán probablemente en adaptar los medicamentos a la enfermedad. Esto significa administrar la terapia en el tejido u organismo diana correcto, en lugar del enfoque no selectivo azaroso de la mayoría de los fármacos convencionales utilizados en la actualidad. De este modo, se administrarán dosis más bajas, se reducirán los efectos secundarios y las toxicidades y, en general, mejorará la respuesta clínica de los pacientes.

Hay muchos fármacos utilizados clínicamente en la actualidad que son muy buenos en el tratamiento de enfermedades específicas, una vez que el fármaco se ha acumulado en el tejido correcto. Por lo tanto, el problema radica en transporte dirigido específico de los fármacos más que en su mecanismo de acción. Dirigir fármacos u otros efectores a las células deseadas es un ámbito bien establecido. Uno de los principales enfoques del transporte dirigido consiste en utilizar anticuerpos o ligandos específicos de célula como elemento de transporte dirigido de una molécula multifuncional (por ejemplo, Hudson P.J., Expert Opin. Investig. Drugs, 2000, 9: 1231-1242; Borsi L., *et al.*, Blood, 2003, 102: 4384-4392).

Los anticuerpos han evolucionado de forma natural para actuar como primera línea de defensa en el sistema inmunitario de los mamíferos. Son glucoproteínas complejas que presentan una especificidad exquisita y una enorme diversidad. Esta diversidad se debe al reordenamiento programado de genes y a la mutagénesis selectiva, lo que da lugar a un gran número de secuencias de anticuerpos diferentes. Esta diversidad significa que los anticuerpos pueden unirse prácticamente a cualquier molécula diana, que suele ser de naturaleza proteica. Ahora es posible imitar la selección y producción de anticuerpos *in vitro*, seleccionando anticuerpos humanos recombinantes contra prácticamente cualquier diana deseada (Hoogenboom H.R., Nature Biotechnology, 2005, 23: 1105-1116).

Los anticuerpos pueden unirse con un alto grado de especificidad a células diana que expresan el receptor apropiado. La afinidad de un anticuerpo es una medida de lo bien que un anticuerpo se une a la diana (antígeno). Suele describirse mediante una constante de disociación en equilibrio (K_d). Para los anticuerpos que deben internalizarse, la tasa de asociación es más importante, ya que la tasa de disociación es menos crucial si el anticuerpo se introduce en la célula. Existen diversas tecnologías para seleccionar y manipular anticuerpos con las propiedades estructurales y de unión deseadas (Wu A.M. y Senter P.D., Nature Biotechnology, 2005, 23: 1137-1146).

Como ocurre con todas las moléculas biológicas, el tamaño del anticuerpo afecta a su farmacocinética *in vivo* (Deonarain, M.P. *et al.*, 1997, Protein Eng., 10, 89-98; Batra S.K. *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 2002, 13: 603-608). Las moléculas de mayor tamaño permanecen más tiempo en la circulación debido a su lenta depuración (las glucoproteínas de gran tamaño se depuran por captación específica en el hígado). En el caso de los anticuerpos completos (peso molecular 150 KDa) que reconocen un antígeno de células cancerosas en un sistema modelo experimental de ratón, el tumor puede captar entre el 30 % y el 40 %, pero como persisten más tiempo en la circulación, se tarda entre 1 y 2 días en alcanzar una proporción tumor:sangre superior a uno. Las proporciones tumor:sangre habituales son de 5 a 10 hacia el día 3 (Boxer G.M. *et al.*, Br. J. Cancer, 1994, 69: 307-314). En los ensayos clínicos con anticuerpos completos, la cantidad que llega realmente a los tumores es aproximadamente el 1 % de la observada en modelos de ratón, pero con proporciones similares de tumor a órgano (Epenetos A.A. *et al.*, Cancer Res., 1986, 46: 3183-3191). Si se une otra molécula al anticuerpo, el nuevo tamaño y las propiedades químico-físicas determinan la farmacocinética alterada. Además, propiedades tales como la carga neta y la hidrofilia pueden afectar a la cinética de transporte dirigido (Gangopadhyay, A. *et al.*, Nucl. Med. Biol., 1996, 23: 257-261).

Algunos antígenos de la superficie celular son estáticos o se internalizan muy lentamente cuando se unen a un ligando, tal como un anticuerpo. Algunos tienen una función que requiere internalización, tal como la transducción de señales celular o la captación de metales y lípidos. Los anticuerpos pueden utilizarse para administrar agentes intracelularmente a través de dichos antígenos.

En los últimos años, los anticuerpos monoclonales (MAb) han cambiado revolucionado la medicina al facilitar el desarrollo de fármacos que pueden dirigirse específicamente a marcadores biológicos asociados con enfermedades [Carter P.J., Nat. Rev. Immunol., 2006, 6:343-357]. Esto tiene muchas aplicaciones, desde la inhibición de factores relacionados con la enfermedad, tales como el VEGF en el cáncer o el TNF en las enfermedades inflamatorias, hasta la destrucción de tumores en el cáncer. En las enfermedades proliferativas, las células afectadas suelen tener receptores de superficie celular asociados o sobreexpresados en ese tipo de célula (por ejemplo, células normales mutadas en el cáncer [Scott A.M. *et al.*, Nat. Rev. Cancer, 2012, 12:278-287] o células inmunitarias sobreestimuladas en enfermedades autoinmunitarias [Chan A.C. y Carter P.J., Nat. Rev. Immunol., 2010, 10:301-316]). Muchos de los receptores asociados a tumores actúan como factores de crecimiento que provocan una transducción de señales incontrolada que conduce a la formación de tumores. Algunos ejemplos de estos receptores son los miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico ("epidermal growth factor receptor", EGFR) (EGFR/erbB1, ErbB2/HER2, HER3 y HER4), el receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina-1 y el receptor Notch [Fauvel B. y Yasri A., MAbs, 2014, 6:838-851; Ménard S. *et al.*, Oncogene, 2003, 22, 6570-6578; Ranganathan P. *et al.*, Nat. Rev. Cancer, 2011, 11:338-351; Parikh R.A. *et al.*, OncoTargets Ther., 2014, 7:969-983; Werooha S.J. y Haluska P., Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 2012, 41:335-350]

Los MAb pueden unirse a receptores asociados a tumores e inhibir la señalización oncogénica, lo que conduce a la regresión o ablación del tumor [Scott A.M. *et al.*, Nat. Rev. Cancer, 2012, 12:278-87,4; Fauvel B. y Yasri A., MAbs, 2014, 6:838-851]. Los MAb completos de diversas subclases de inmunoglobulinas también pueden provocar respuestas inmunitarias que conduzcan a la erradicación de tumores [Vanneman M. y Dranoff G., Nat. Rev. Cancer, 2012, 12:237-251].

Los tumores pueden desarrollar mecanismos para superar la intervención de los MAb, tales como el aumento de la expresión del receptor [Nahta R. *et al.*, Nature Clinical Practice Oncology, 2006, 3, 269-280], la regulación al alza de vías de transducción de señales oncogénicas alternativas o mutaciones en proteínas de vías de transducción de señales [Nahta R. *et al.*, Nature Clinical Practice Oncology, 2006, 3, 269-280; Gallardo A., *et al.*, Br. J. Cancer, 2012, 106:1367-1373] y amortiguando la respuesta inmunitaria [Pardoll D.M., Nat. Rev. Cancer, 2012, 12:252-264]. Los MAb aprobados para su comercialización, tal como trastuzumab (Herceptin®), cetuximab (Erbix®) y panitumumab (Vectabix®), pueden prolongar la supervivencia durante varios meses, pero a menudo se considera que no son lo suficientemente potentes como para lograr curaciones significativas [Scott A.M. *et al.*, Nat. Rev. Cancer, 2012, 12:278-287; Sliwkowski M.X. y Mellman I., Science, 2013, 341:1192-1198]. Además, los pacientes pueden volverse resistentes al tratamiento con MAb, lo que provoca recaídas, menos opciones de tratamiento y una menor supervivencia [Nahta R. *et al.*, Nature Clinical Practice Oncology, 2006, 3, 269-280; Brand T.M. *et al.*, Cancer Biol Ther., 2011, 11:777-792].

Un objetivo deseable en el campo de la administración de fármacos es administrar específicamente un resto citotóxico a las zonas del cuerpo humano afectadas por enfermedades, de forma que se erradiquen las células enfermas sin afectar a las células normales ni provocar efectos secundarios no deseados o perjudiciales. Adjuntar una carga activa citotóxica a los MAb intactos puede aumentar su potencia de destrucción celular y cambiar el mecanismo de acción citotóxica de los efectos inmunomediados y mediados por la transducción de señales a una destrucción más directa de las células tumorales [Flygare J.A. *et al.*, Chem. Biol. Drug Des., 2013, 81:113-121; Sievers E.L. y Senter P.D., Annu. Rev. Med., 2013, 64:15-29; Chari R.V. *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2014, 53, 3796-3827; Teicher B.A. y Chari R.V., Clin. Cancer Res., 2011, 17:6389-6397]. Esto tiene el potencial de superar la resistencia farmacológica al anticuerpo "libre" y cualquier afección relacionada con el sistema inmunitario que impida un resultado satisfactorio [Barok M. *et al.*, Breast Cancer Res., 2011, 13:R46; Baron J.M. *et al.*, J. Oncol. Pharm. Pract., 2014 [publicación electrónica antes de impresión]. Los denominados conjugados de anticuerpo-fármaco ("antibody-drug conjugates", ADC) son bien conocidos en la técnica y han sido objeto de considerables investigaciones para generar ADC potentes, específicos, más seguros y estables [Flygare J.A. *et al.*, Chem. Biol. Drug Des., 2013, 81:113-121; Sievers E.L. y Senter P.D., Annu. Rev. Med., 2013, 64:15-29; Chari R.V. *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2014, 53, 3796-3827; Teicher B.A. y Chari R.V., Clin. Cancer Res., 2011, 17:6389-6397; Adair J.R. *et al.*, Expert. Opin. Biol. Ther., 2012, 12:1191-1206; LoRusso P.M. *et al.*, Clin. Cancer Res., 2011, 17:6437-6447].

Las corrientes de investigación más recientes están empezando a ser prometedoras debido a los anticuerpos humanos o humanizados bien caracterizados/validados que se unen de forma estable a fármacos extremadamente potentes que alteran la función de los microtúbulos (por ejemplo, auristatinas y maitansinoides [Alley S.C. *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2009, 330:932-938; Erickson H.K. *et al.*, Cancer Res., 2006, 66:4426-4433]) y agentes que dañan el ADN (por ejemplo, caliqueamicina y PBD [Kung Sutherland M.S. *et al.*, Blood, 2013, 122:1455-1463; de Vries J.F. *et al.*, Leukemia, 2012, 26:255-364]). Los ADC, tales como el trastuzumab-emtansina (Kadcyla®) han demostrado una eficacia clínica superior (mayor supervivencia y menos efectos secundarios) que el mismo anticuerpo no conjugado más fármacos de quimioterapia libres [Amiri-Kordestani L. *et al.*, Clin. Cancer Res., 2014, 20:4436-4441]. Los fármacos citotóxicos menos potentes, tales como la doxorubicina, se siguen desarrollando como ADC, pero surgen limitaciones debido a que el MAb de transporte dirigido no administra suficiente fármaco [Govindan S.V. *et al.*, Mol. Cancer Ther., 2013, 12:968-978]. Los trabajos para mejorar los ADC y la conjugación de fármacos con moléculas portadoras se han centrado en el uso de polímeros como conectores para unir el portador y el fármaco [Carlson B., Biotechnology Healthcare, 2012, 9:28-31; documento US 8808679 B2]. Este enfoque es eficaz para unir las dos moléculas, pero aumenta el tamaño y la complejidad de la síntesis de los conjugados. El aumento del tamaño macromolecular de un ADC conlleva cambios en la farmacocinética, tales como el aumento de la semivida en sangre [Deonarain M.P. *et al.* (2015), Exp. Opin. Drug Discov., 10, 463-481; Constantinou A., *et al.* (2010), Biotechnol. Lett., 32: 609-622] y la

farmacodinámica, tal como la disminución de la penetración tumoral [Dennis M.S. *et al.* (2007), *Cancer Res.*, 67: 254-261]). Un enfoque directo para mejorar la eficacia de los ADC es la conjugación específica de sitio que da lugar a conjugados más homogéneos de DAR ("Drug Antibody Ratio", proporción de fármaco a anticuerpo) baja (normalmente de 2 a 4), lo que implica que una DAR alta no es un enfoque eficaz debido al aumento de la toxicidad por la mayor exposición a la carga activa y la reacción adversa a los agregados de especies de DAR alta no optimizadas [Hamblett *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10: 7063-7070].

Se ha obtenido una gran experiencia clínica con los ADC [Amiri-Kordestani L. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2014, 20:4436-4441], pero siguen existiendo limitaciones significativas [Lu D. *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2014, 74:399-410; Monjanel H. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 2014, 166:306-308; Robak T. y Robak E., *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2014, 23:911-924]. Utilizando los procedimientos de conjugación descritos en la técnica, la carga de fármaco en el anticuerpo no es lo suficientemente alta como para administrar concentraciones suficientes de fármacos al tejido diana que conduzcan a la curación a largo plazo [Teicher B.A. y Chari R.V., *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17:6389-6397], o para producir una respuesta significativa cuando la diana se expresa a niveles bajos [Wang X. *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 2011, 10:1728-1739]. Una baja carga de fármaco también es perjudicial cuando se utilizan fármacos con una toxicidad relativamente baja, tales como la doxorubicina, los taxanos y el metotrexato, ya que se necesita una mayor cantidad de estos fármacos para conseguir el efecto terapéutico necesario. Sin embargo, el intento de utilizar ADC con cargas más elevadas suele conducir a ADC con una función de unión reducida [Chari R.V. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2014, 53, 3796-3827; Burke, P.J. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20, 1242-1250], solubilidad reducida [Chari R.V. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2014, 53, 3796-3827; Hollander, I. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19, 358-361; Burke, P.J. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20, 1242-1250; Zhao R.Y. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2011, 54:3606-3623] y la tendencia a la agregación [Chari R.V. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2014, 53, 3796-3827; Hollander, I. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19, 358-361; Burke, P.J. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20, 1242-1250; Zhao R.Y. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2011, 54:3606-3623; King, H. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 1999, 10, 279-288] (los tres conducen a propiedades farmacocinéticas deficientes) [Hamblett, K.J. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10, 7063-7070; Shen B.Q., *Nat Biotechnol.*, 2012, 30:184-189], reducción del transporte del fármaco, menor eficacia terapéutica, aumento de los efectos secundarios y toxicidad no deseada [Litvak-Greenfeld D. y Benhar I., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, 64:1782-1799] a los tejidos implicados en el metabolismo y la depuración del fármaco, tales como el sistema hepático y renal.

Otra limitación de los anticuerpos y ADC actuales son los efectos secundarios indeseables de una semivida en suero prolongada (de 1 a 3 semanas) [Litvak-Greenfeld D. y Benhar I., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, 64:1782-1799; E.L. Sievers, *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 2001, 19, 3244-3254] que puede provocar daños gastrointestinales, neuropatía periférica e inmunosupresión [J.J. Lee y S.M. Swain, *J. Clin. Oncol.*, 2006, 24:1633-1642; M.A. Jordan y L. Wilson, *Nat. Rev. Cancer*, 2004, 4, 253-265]. Además, las terapias actuales basadas en anticuerpos completos y los ADC presentan unas propiedades de difusión deficientes y unas propiedades de perfusión tisular inferiores [Teicher B.A. y Chari R.V., *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17:6389-6397; Jain R.K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, 64:353-365; Dennis M.S. *et al.*, *Cancer Res.*, 2007, 67:254-261] que hacen que una menor concentración llegue al núcleo o a las zonas peor vascularizadas del tumor sólido [Teicher B.A. y Chari R.V., *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17:6389-6397; Dennis M.S. *et al.*, *Cancer Res.*, 2007, 67:254-261]. Por lo tanto, los ADC actuales son menos eficaces contra los tumores sólidos de mayor tamaño [Teicher B.A. y Chari R.V., *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17:6389-6397], tumores poco vascularizados o tumores con un estroma denso.

Hamblett *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10: 7063-7070 investigaron en detalle la carga de fármaco de la monometil auristatina E (MMAE) sobre un anticuerpo monoclonal anti-CD30. Descubrieron que, mientras que la medida de la potencia de CI50 del conjugado aumentaba con el número de moléculas de fármaco acopladas, la actividad antitumoral *in vivo* no aumentaba al pasar de 4 fármacos por anticuerpo a 8 fármacos por anticuerpo. Además, los conjugados cargados con 8 fármacos fueron mal tolerados *in vivo*, y el número de conjugados que podían administrarse se redujo a la mitad, pasando de 4 a 8 fármacos cargados. Además, los conjugados cargados con 8 fármacos se depuraron del organismo el doble de rápido que los conjugados cargados con 4 fármacos. Hamblett descubrió que la carga con 4 fármacos de los anticuerpos es el máximo plausible para conseguir el mejor efecto clínico (al equilibrar la actividad tumoral, la tolerancia y la depuración). Esta observación ha sido corroborada por muchos otros [por ejemplo, Chari R.V. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2014, 53, 3796-3827].

Además, se sabe por Kim *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 2008, 7: 2486-2497, que los fragmentos de anticuerpo pueden acoplarse a un máximo de cuatro moléculas de fármaco antes de tener que recurrir a estrategias alternativas, tales como el uso de un polímero para el acoplamiento [documento US 2013/0101546].

Los documentos WO 2014/068443 A1, WO 2014/134457 A2, WO 2013/082254 A1, WO 2012/104344 A1 y US 2010/0136033 A1 describen fármacos conjugados con fragmentos de anticuerpos. Sin embargo, ninguno de estos documentos sugiere una forma de superar la agregación en los fragmentos de anticuerpos, lo que sería necesario para obtener altas proporciones de DAR en una proteína más pequeña que una IgG completa.

Por ejemplo, el documento WO 2014/068443 (Pfizer) describe la conjugación en residuos de lisina y un residuo específico de lisina-188 V-kappa. Indican unas DAR promedio en una IgG completa (150 kDa) de aproximadamente 2 a 4, con una DAR máxima para algunas cargas activas de 7,8. Este trabajo sugeriría que, para un fragmento scFv de 30 kDa (tamaño 1/5), una persona experta esperaría razonablemente una DAR no superior a 2.

El documento WO 2014/134457 (Immunogen) describe conjugaciones de lisina directas e indirectas para fabricar ADC basados en IgG con una DAR de aproximadamente 4 a 5. Aunque se proponen DAR de hasta 20 para anticuerpos completos, esto equivaldría a una DAR de aproximadamente 4 para un scFv con un tamaño de 1/5. El documento WO 2010/141566 divulga conjugados de anticuerpo-fármaco. En la página 66 (párr. 150, ej. 8) se divulga un conjugado de DM1/anticuerpo con una proporción de fármaco a anticuerpo superior a 5:1. En la página 67, en la tabla 1, se enumeran varios conjugados de anticuerpo/DM1 o DM4 con una proporción de fármaco a ab superior a 5:1.

El documento WO 2012/104344 (GenMab) describe un anticuerpo completo anti-CD74 (HuMab-CD74) y conjugados que utilizan enfoques directos e indirectos de lisina con una diversidad de cargas activas. Las DAR divulgadas oscilan entre 3,7 y 4,1, lo que puede equivaler, en el mejor de los casos, a una DAR de 1 para un fragmento de anticuerpo que tenga un tamaño de 1/5.

Un análisis reciente del campo de la terapia de ADC (Chari *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed., 2014, 53: 3796-3827) pone de manifiesto que los ADC actuales no son lo suficientemente eficaces como para ser utilizados de forma ordinaria en el ámbito clínico. La reciente autorización de comercialización por parte de la FDA de dos moléculas ADC demuestra que el principio de los ADC puede funcionar, pero con más de 30 años de investigación en este ámbito terapéutico, el hecho de que sólo se hayan aprobado dos fármacos para el entorno clínico demuestra que se tratan de excepciones, y no de la regla, debido a las dificultades para que los ADC actúen con eficacia.

En consecuencia, existe la necesidad de producir ADC mejorados que reduzcan o eliminen las limitaciones significativas de los enfoques de ADC actuales.

La presente invención proporciona ahora tales ADC mejorados que están optimizados para reducir las limitaciones de las terapias con ADC actuales, así como su uso y procesos para su fabricación.

En un primer aspecto de la invención se proporciona un compuesto que comprende un agente terapéutico acoplado a una molécula portadora, con una proporción de acoplamiento mínima de 5:1; en el que la molécula portadora es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre scFv, Fv, Fab, Fab-SH, dsFv, bs-scFv, di-scFv (también conocidos como bi-scFv), diacuerpos y TandAbs (diacuerpos en tándem), en el que el fragmento de anticuerpo no incluye todos los dominios de un anticuerpo completo; y en el que los agentes terapéuticos están acoplados a un residuo de aminoácido de lisina; y además, en el que el agente terapéutico no es un agente fotosensibilizante; y además, en el que el agente terapéutico se selecciona entre cemadotina, P5-C5, doxorubicina, elipticina, MMAE, maitansinas, MMAF, auristatinas, dolastatinas y un inhibidor de topoisomerasas.

La expresión "molécula portadora" incluye el significado de cualquier agente al que se acople el agente terapéutico. La molécula portadora comprende aminoácidos e incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. En concreto, la molécula portadora es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre scFv, Fv, Fab, Fab-SH, dsFv, bs-scFv, di-scFv (también conocidos como bi-scFv), diacuerpos y TandAbs.

Por "proporción de acoplamiento" se entiende el número de moléculas de agente terapéutico acopladas a una molécula portadora.

La expresión "agente fotosensibilizante" (fotosensibilizador, fármaco fotosensibilizante, se utilizan indistintamente) se refiere a un compuesto que pertenece a una clase de fármacos que requiere una intervención física secundaria para activar sus propiedades citotóxicas. El compuesto en su estado de singulete absorbe un fotón de luz a una longitud de onda específica. Esto da lugar a un estado de singulete excitado de corta duración. Éste puede convertirse mediante el cruce intersistémico en un estado de triplete de vida más larga. Este fotosensibilizador en estado de triplete puede tener propiedades citotóxicas debidas a la fotooxidación por radicales, oxígeno singulete y fotorreacción en la que no interviene el oxígeno. La potencia fotodependiente de un fotosensibilizante debe ser de al menos 1 μ M cuando se ilumina con una fuente de luz de al menos 0,1 julios utilizando procedimientos como los descritos por Savellano M.D. y Hasan T. [Clinical Cancer Res., 2005, 11:1658-1658]. Un fotosensibilizante también puede considerarse una clase de fármaco que requiere una intervención física secundaria para activar sus propiedades citotóxicas, u dichas propiedades son el mecanismo predominante de destrucción celular.

Por agente terapéutico que no es un agente fotosensibilizante se entiende cualquier agente terapéutico excepto un agente fotosensibilizante. Tales agentes terapéuticos no poseen ninguna de las propiedades fotofísicas de un fotosensibilizador, es decir, no absorben un fotón de luz para entrar en un estado excitado. La potencia fotodependiente de un no fotosensibilizante no debe ser superior a 1 μ M cuando se ilumina con una fuente de luz de al menos 0,1 julios, y es preferentemente de 0 μ M [Kostron *et al.* (2003), en Photodynamic Therapy: Methods and Protocols (Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences, Royal Society of Chemistry, editores)]

Los compuestos que comprenden fotosensibilizadores acoplados a moléculas portadoras, de forma similar a otros conjugados de agentes terapéuticos, han sido descritos previamente (por ejemplo, los documentos WO 2007/042775 y WO 2010/106341), aunque dichos conjugados presentan diferencias significativas con respecto a los conjugados de fármacos no fotosensibilizantes. Por ejemplo, existe una clara justificación para la separación espacial de los fotosensibilizadores con el fin de reducir y/o evitar la inactivación. La separación espacial de los fármacos no fotosensibilizadores se ha considerado tradicionalmente irrelevante a la hora de considerar la función terapéutica, ya que no pueden inactivarse (un fenómeno puramente relacionado con la luz) ni presentan ninguna propiedad de

autoinhibición que interactúe espacialmente, por lo que ahora resulta extremadamente sorprendente descubrir que espaciando óptimamente los no fotosensibilizadores se pueden producir moléculas de ADC mejoradas.

Los fotosensibilizantes, debido a su estructura planar-hidrófoba que provoca la unión a proteínas sanguíneas, son bien conocidos por tener una larga semivida en suero, lo que contribuye a su fotosensibilidad cutánea [Hopper C., *Lancet Oncol.*, 2000, 1 212-9; Korbélik M., *Photochem Photobiol.*, 1993, 57:846-850]. Su conjugación con anticuerpos hidrófilos acelera su depuración de la sangre, lo que reduce estos efectos secundarios [Bhatti M.P. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 2008, 122:1155-1163; Palumbo A. *et al.*, *Br. J. Cancer*, 2011, 104:1106-1115]. Por el contrario, la conjugación de fármacos de molécula pequeña no fotosensibilizantes ralentizará su depuración, ya que se depuran rápidamente de la circulación de forma natural [Pimm M.V. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1988, 41:886-891].

Las expresiones y los términos "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico", o "polinucleótido" u "oligonucleótido" se utilizan indistintamente y se refieren a un heteropolímero de nucleótidos o a la secuencia de estos nucleótidos. También se refieren al ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario y representar la cadena sentido o antisentido, y al ácido nucleico peptídico ("peptide nucleic acid", PNA) o a cualquier material similar al ADN o ARN. En las secuencias del presente documento, A es adenina, C es citosina, T es timina, G es guanina y N es A, C, G o T (U). Se contempla que cuando el polinucleótido sea ARN, la T (timina) en las secuencias proporcionadas en el presente documento se sustituya por U (uracilo). En general, los segmentos de ácido nucleico proporcionados por la presente invención pueden ensamblarse a partir de fragmentos del genoma y conectores oligonucleotídicos cortos, o a partir de una serie de oligonucleótidos, o de nucleótidos individuales, para proporcionar un ácido nucleico sintético que sea capaz de expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprenda elementos reguladores derivados de un operón microbiano o vírico, o de un gen eucariota.

Los términos y la expresión "polipéptido", "péptido" o "secuencia de aminoácidos" se refieren a un oligopéptido, un péptido, un polipéptido o una secuencia de proteína o un fragmento de los mismos y a moléculas naturales o sintéticas. Un "fragmento", "porción" o "segmento" de polipéptido es un tramo de residuos de aminoácidos de al menos aproximadamente 5 aminoácidos, preferentemente de al menos aproximadamente 7 aminoácidos, más preferentemente de al menos aproximadamente 9 aminoácidos y lo más preferentemente de al menos aproximadamente 17 o más aminoácidos. Para ser activo, cualquier polipéptido debe tener la longitud suficiente para presentar actividad biológica y/o inmunológica.

El término "purificado" o la expresión "sustancialmente purificado" utilizados en el presente documento indican que el ácido nucleico o polipéptido indicado está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, por ejemplo, polinucleótidos, proteínas y similares. En una realización, el polinucleótido o el polipéptido se purifica de forma que constituya al menos el 95 % en peso, más preferentemente al menos el 99 % en peso de las macromoléculas biológicas indicadas presentes (pero puede haber agua, tampones y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas con un peso molecular inferior a 1 kDa).

El término "aislado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico o un polipéptido separado de al menos otro componente (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) presente con el ácido nucleico o el polipéptido en su fuente natural. En una realización, el ácido nucleico o el polipéptido se encuentra en presencia (si acaso) de sólo un disolvente, tampón, ion u otro componente normalmente presente en una solución del mismo. Los términos "aislado" y "purificado" no engloban los ácidos nucleicos o los polipéptidos presentes en su fuente natural.

El término "recombinante", cuando se utiliza en el presente documento para referirse a un polipéptido o una proteína, significa que un polipéptido o una proteína se deriva de sistemas de expresión recombinantes (por ejemplo, microbianos, de insectos o de mamíferos). "Microbiano" se refiere a polipéptidos o proteínas recombinantes fabricados en sistemas de expresión bacterianos o fúngicos (por ejemplo, levadura). Como producto, "microbiano recombinante" define un polipéptido o una proteína prácticamente exenta de sustancias endógenas nativas y sin glucosilación nativa asociada. Los polipéptidos o las proteínas expresados en la mayoría de los cultivos bacterianos, por ejemplo, *E. coli*, estarán exentos de modificaciones de glucosilación; los polipéptidos o las proteínas expresados en levaduras tendrán un patrón de glucosilación en general diferente de los expresados en células de mamífero.

El término "OptiLink" u "OptiLinked" utilizado en el presente documento se refiere a la optimización de un fragmento de anticuerpo según la invención para maximizar la carga activa de conjugación, minimizando al mismo tiempo la agregación del conjugado *in vitro* o *in vivo* y conservando la función de unión del anticuerpo.

Las proporciones de acoplamiento mínimas alternativas para proporcionar una mayor carga de agente terapéutico en la molécula portadora incluyen al menos 6:1, al menos 7:1 y al menos 8:1 o más. El acoplamiento de moléculas de fármacos a residuos de aminoácidos puede producirse en diferentes aminoácidos. La tabla 1 enumera las estrategias de conjugación dirigidas a los residuos de lisina que muestran las químicas de acoplamiento que pueden utilizarse con este procedimiento de acoplamiento.

Tabla 1: Grupos funcionales para acoplar fármacos a aminoácidos de lisina

Residuo o residuos	Grupo funcional	Química de acoplamiento	Enlace resultante
Lisina	Amina	Éster activo	Amida
		Isotiocianato	Isotiourea
		Isocianatos	Isourea
		Acil azidas	Amida
		Cloruro de sulfonilo	Sulfonamida
		Carbonilo, reduc.	Base de Schiff, amina 2 ^a
		Epóxido	Amina 2 ^a
		Carbonatos	Carbamato
		Derivado de fluorobenceno	Arilamina
		Imidoésteres	Amidina
		Carbodiimidas	Amida
		Anhídridos	Amida

Los fragmentos e imitaciones de anticuerpos varían en la secuencia de aminoácidos y en el número y espaciado de los grupos funcionales a los que se acoplan los fármacos. El grupo funcional utilizado con más frecuencia para la conjugación es la amina primaria que se encuentra en el N-terminal y en los residuos de lisina. Un factor determinante de la eficacia de un determinado conjugado de fragmento de anticuerpo y agente terapéutico es la separación espacial de los residuos a los que se unen las moléculas del agente terapéutico. Estos residuos deben ser distintos y estar topológicamente separados en la superficie del anticuerpo para un acoplamiento eficaz y una farmacocinética óptima del conjugado resultante.

Los residuos conjugables se encuentran preferentemente en lugares que pueden tolerar modificaciones químicas sin volverse inestables o propensos a la agregación.

Generalmente, las proteínas se pliegan para formar un núcleo hidrófobo en el centro de la molécula con una superficie hidrófila para permitir la solubilidad en disolventes fisiológicos. Residuos básicos, tales como lisinas y argininas, residuos ácidos, tales como glutamatos y aspartatos, residuos polares, tales como serinas (y a veces tirosinas), cisteínas, glutaminas y asparaginas se encuentran habitualmente en la superficie de esa proteína. En muchos ejemplos, estos residuos intervienen en el mantenimiento de la estructura y la función de esa proteína. Los residuos de lisina son los aminoácidos de la superficie más frecuentes [Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, capítulo 1, pág. 30, Academic Press (2008)] y reaccionan preferentemente con ésteres de NHS a pH alcalinos.

En el ejemplo de los fragmentos de anticuerpos, tales como Fv monocatenarios, cada dominio se compone de un dominio variable pesado (VH) y un dominio variable ligero (VL). Pueden ser de cualquier familia de dominios VH y VL. En el caso de los bucles de unión al antígeno (regiones determinantes de la complementariedad, es decir, CDR, "complementarity determining regions"), estas secuencias son específicas de la capacidad de ese anticuerpo para reconocer su antígeno afín. Pueden manipularse para alterar la especificidad o la afinidad del anticuerpo, pero no por otros motivos. La mayor parte de la secuencia del dominio es la región marco. La figura 1 (modificada de Knappik *et al.*, J. Mol. Biol., 2000, 296: 57-86) indica qué residuos de un dominio variable humano tienden a estar presentes en la superficie del anticuerpo y qué zonas tienden a estar en el interior como parte del núcleo. Dado el alto grado de homología estructural y de secuencia entre los anticuerpos, estas regiones pueden aplicarse en general a todas las secuencias de anticuerpos. Las regiones marco de la superficie tienden a contener los residuos cargados o polares.

Es una ventaja si las propiedades funcionales y físicas del agente terapéutico y la molécula portadora estén sustancialmente inalteradas desde el punto de vista cualitativo en la forma acoplada, en comparación con las propiedades cuando están en una forma desacoplada.

- Sustancialmente inalteradas desde el punto de vista cualitativo significa que el agente terapéutico conserva su función terapéutica, pero que ésta puede ser cuantitativamente diferente cuando se conjuga (por ejemplo, la función terapéutica podría mejorarse en comparación con el fármaco no conjugado); y que la molécula portadora se une a la misma diana o dianas cuando se conjuga que cuando no se conjuga, pero esto puede ser cuantitativamente diferente (por ejemplo, la afinidad de unión podría ser mayor).
- La expresión "afinidad de unión" incluye el significado de la fuerza de unión entre una molécula portadora y su diana (tal como, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo y un antígeno).
- El compuesto de la invención debe poseer una CI50 de <100 nM, preferentemente <1 nM, más preferentemente <10 pM, y aún más preferentemente <0,1 pM.
- Es preferible que el compuesto tenga una CI50 hasta 10 veces menor (es decir, es 10 veces más potente) que el agente terapéutico cuando no está conjugado. La CI50 puede ser al menos 10 veces menor (lo que equivale al 10 % de la CI50 original) y preferentemente la potencia llegará al 100 % de la CI50 en estado no conjugado. Aún más preferentemente, la potencia es mayor, por lo que el porcentaje es preferentemente del 200 %, del 500 %, del 1000 % (es decir, 10 veces más potente) o superior. Un fármaco puede ser poco potente por sí solo (por ejemplo, no puede atravesar la membrana celular), pero ser muy potente en forma d ADC (por tanto, un 1000 % o más).
- La concentración inhibidora semimáxima (CI50) es una medida de la eficacia de una sustancia para inhibir una función biológica o bioquímica específica. Esta medida indica qué cantidad de un determinado fármaco u otra sustancia (inhibidor) se necesita para inhibir a la mitad un determinado proceso biológico (o componente del mismo). La determinación de la CI50 para un compuesto determinado es un procedimiento habitual, y normalmente se determina construyendo una curva de dosis-respuesta y examinando el efecto de diferentes concentraciones de antagonista en la reversión de la actividad agonista. El valor de CI50 se calcula determinando la concentración necesaria para inhibir la mitad de la respuesta biológica máxima del agonista.
- El compuesto debe poseer una semivida en suero murino de al menos 2 horas, preferentemente 4 horas, como alternativa 8, 16, 32, 64 o 128 horas. La semivida en suero también puede medirse en ratones o en seres humanos. El compuesto tiene preferentemente una semivida en suero hasta 5 veces superior a la molécula portadora cuando no está conjugado, preferentemente hasta 10 veces superior. El compuesto puede poseer una semivida reducida en comparación con la forma no conjugada. Una disminución del 50 % de la semivida, por ejemplo, de 4 a 2 horas, es farmacológicamente aceptable si se asocia con otras características ventajosas, tales como una agregación baja o reducida. La agregación conduciría a una rápida depuración <1 hora para un scFv o fragmentos de tamaño similar, reduciendo la biodisponibilidad y también induciendo potencialmente reacciones inmunitarias perjudiciales. Es preferible que la semivida de la molécula portadora se mantenga lo más próxima posible a la de la molécula portadora no conjugada, tolerándose un pequeño descenso. Es deseable un aumento de la semivida de hasta 10 veces (por ejemplo, de 4 a 20 horas en ratones).
- La semivida en suero es el tiempo calculado para que el nivel sérico de un compuesto se reduzca a la mitad de su valor inicial. La determinación de la semivida en suero de un compuesto determinado es un procedimiento habitual, y normalmente se determina midiendo las cantidades de fármaco en el suero a lo largo del tiempo tras la administración del compuesto a un organismo. La semivida en suero es importante desde el punto de vista clínico, ya que determinará la pauta posológica necesaria para alcanzar de forma constante un nivel sérico del fármaco dentro de un intervalo clínicamente eficaz.
- El compuesto de la invención debe poseer una solubilidad de al menos 1 mg/ml en un tampón fisiológicamente compatible a temperatura ambiente (por ejemplo, 20 °C) (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato o solución salina). Más preferentemente, será de 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml o 20 mg/ml. En una realización, el compuesto de la invención posee dichas solubilidades en ausencia de aditivos o excipientes. En una realización alternativa, el compuesto de la invención posee dichas solubilidades en presencia de uno o más aditivos o excipientes (por ejemplo, cuando están presentes como cantidades residuales o no extraíbles que son excipientes aceptables para los organismos reguladores).
- Las reacciones de conjugación que conducen al compuesto de la invención también pueden contener aditivos o excipientes para facilitar la reacción y la solubilidad del compuesto. Algunos ejemplos son polisorbato-20, Tween-80, glicina, maltosa, histidina, Pluronic F-68, ácido octanoico, N-acetiltriptófano, alcohol bencílico, ácido benzoico, propilenglicol, (cloro)butanol, isopropanol y glicerol [Hollander I. *et al.*, Bioconjugate Chem., 2008, 19:358-361; Patapoff T.W. y Esue O., Pharm. Dev. Technol., 2009, 14:659-664]. Normalmente se eliminan durante el procesamiento, pero a veces están presentes como cantidades residuales o no eliminables que son excipientes aceptables para los organismos reguladores [<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm>].
- Los compuestos de la invención poseen preferentemente una solubilidad descrita anteriormente en presencia de hasta un 0,5 % de polisorbato, un 1 % de glicerol, un 0,5 % de glicina, un 0,1 % de histidina, un 0,5 % de clorobutanol, un 5 % de propilenglicol, un 2 % de alcohol bencílico, un 0,05 % de ácido octanoico y/o un 0,1 % de N-acetiltriptófano.
- El compuesto de la invención debe presentar un nivel de agregación de <5 %, preferentemente <1 % en un tampón fisiológicamente compatible (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato o solución salina) a temperatura

ambiente (por ejemplo 20 °C). La agregación puede comprobarse mediante HPLC analítica de exclusión por tamaño, midiendo el porcentaje de material de alto peso molecular en comparación con el conjugado que eluye en un tiempo de retención característico de un conjugado monomérico.

- 5 El compuesto de la invención debe tener una proporción de fármaco a anticuerpo superior a la que se ha logrado para una proteína de masa similar, con la ventaja añadida de que los fármacos son favorablemente accesibles a la liberación a través de mecanismos enzimáticos, físicos o químicos dentro o fuera de una célula.

10 Los residuos de lisina se encuentran habitualmente en la superficie de los dominios de anticuerpos. En el caso de los miembros de la familia VH1 de la línea germinal humana, hay de 5 a 6 residuos de lisina, de los cuales sólo uno o dos están próximos entre sí. Un residuo cercano a otro puede definirse como uno que es adyacente en la secuencia primaria y, por tanto, adyacente en la estructura tridimensional. Como alternativa, un residuo puede estar separado según la secuencia primaria, pero estar adyacente en el espacio debido a la estructura del plegamiento del dominio del anticuerpo. Un residuo de aminoácido directamente adyacente puede definirse como una separación de 3 a 4 angstroms.

15 El acoplamiento de agentes terapéuticos a residuos de lisina que son directamente adyacentes dará lugar a efectos farmacocinéticos y terapéuticos peores (tales como el aumento de la agregación y una solubilidad peor). El acoplamiento es más eficaz cuando los residuos de lisina están más separados, preferentemente a dos aminoácidos de distancia (de 3,5 a 7,5 angstroms), más preferentemente a tres aminoácidos de distancia (de 7 a 12 angstroms), más preferentemente a cuatro aminoácidos de distancia (de 10 a 15 angstroms), aún más preferentemente a cinco aminoácidos de distancia (de 15 a 20 angstroms), aún más preferentemente a seis aminoácidos de distancia (de 20 a 25 angstroms) o más. Las moléculas portadoras deben elegirse, seleccionarse o diseñarse para que posean estas propiedades. Cuantos más residuos de lisina posea la molécula portadora, con una separación más óptima, mejor será esa molécula portadora para formar conjugados eficaces y potentes.

25 Los procedimientos para determinar si los residuos de aminoácidos para el acoplamiento terapéutico están próximos o adyacentes entre sí son bien conocidos en la técnica. La alineación de secuencias Clustal (utilizando recursos web como <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/> del Instituto Europeo de Bioinformática) es una herramienta bien establecida para comparar secuencias primarias de aminoácidos. Además, en ausencia de datos estructurales tridimensionales completos para una molécula portadora, es posible utilizar técnicas bien establecidas, tales como la modelización de la homología utilizando estructuras conocidas (por ejemplo, la de un scFv murino) para deducir la estructura probable de la molécula portadora y, de este modo, identificar si los residuos para el acoplamiento están próximos o adyacentes en el espacio. El alto grado de homología que presentan, por ejemplo, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos, permite aplicar estas técnicas con un alto grado de confianza. Existen recursos en la red para la modelización de homologías, tales como el Expert Bioinformatics Analysis System del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://expasy.org>), que también ofrece el programa de modelización de escritorio gratuito SwissPDB Viewer. También el servidor Phyre del Imperial College puede generar un modelo de homología (<http://www.sba.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) [Kelley L.A. y Sternberg M.J., Nat. Protoc., 2009, 4: 363-371].

40 Si la distribución de los residuos de lisina no es favorable para la conjugación y la farmacocinética óptima, la molécula portadora puede alterarse utilizando técnicas biológicas moleculares convencionales, tales como la mutagénesis dirigida a sitio, para eliminar los residuos poco espaciados (por ejemplo, situados demasiado cerca) o para introducir residuos bien espaciados.

Los agentes terapéuticos pueden acoplarse directamente a la molécula portadora en el aminoácido. Como alternativa, los agentes terapéuticos pueden acoplarse indirectamente a la molécula portadora.

45 Hay muchas formas de conjugar fármacos citotóxicos con anticuerpos y fragmentos de anticuerpos [Ducry, L. (ed.) (2013), Antibody-Drug Conjugates book, Methods in Molecular Biology, volumen 1045, capítulos 9-12, Humana Press; Hermanson, G. (2013), Bioconjugate Techniques book, capítulos 2-6, Academic Press]. Esto se resume en la tabla 2. Los residuos de lisina son favorables para la conjugación porque pueden estar presentes múltiples veces en la superficie de los anticuerpos sin causar efectos perjudiciales, tales como una reticulación no deseada. Por ejemplo, la conjugación sobre lisinas puede ser directa (tabla 2), utilizando fármacos o conectores de fármacos que posean un grupo reactivo de éster de N-hidroxisuccinamida o isotiocianato. Los procedimientos indirectos para la conjugación de la lisina incluyen la derivatización del grupo amino con un conector bifuncional (tales como los disponibles en Pierce Chemicals (Thermo) y Quanta Bioscience) para generar un grupo reactivo secundario, tal como 2-iminotiolano, para generar un tiol reactivo para la conjugación con fármacos o conectores de fármacos con grupos reactivos tiol o maleimida. Algunos residuos de lisina pueden ser especialmente propensos a la conjugación debido a una mayor nucleofilia debida al microambiente que rodea a ese residuo [Doppalapudi V.R. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, 107:22611-22616]. Se conocen otros procedimientos de conjugación, tales como el ligamiento químico nativo [Hackenberger C.P. y Schwarzer D., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2008, 47:10030-10074], la conjugación específica de sitio, incluido el uso de enzimas [Behrens C.R. y Liu B., MAbs, 2014, 6:46-53] y tecnologías de puentes disulfuro [Castañeda, L. *et al.*, Chem. Comm., 2013, 49, 8187-8189; Badescu G. *et al.*, Bioconjug Chem., 2014, 25:1124-1136]. Los procedimientos de conjugación más recientes incluyen el uso de conectores reactivos de metilsulfonilfeniloxadiazol para formar tioéteres [Barbas C.F.B. *et al.*, Bioconjugate Chemistry, 2014, 25, 1402-1407], marcaje selectivo de tirosina

mediante el uso de una reacción de click de tirosina [Barbas C.F.B. *et al.*, Bioconjugate Chemistry, 2013, 24, 520-532] y la reacción de Diels-Alder por demanda inversa de electrones ("Inverseelectron Demand Diels-Alder", leDDA) entre tetrazinas y alquinos tensionados [Fox, J.M., 2008, 130, 13518-13519; Chin J.W. y Lang K., Chemical reviews, 2014, 114, 4764-4806].

Tabla 2: Enlaces para unir grupos-Conjugación directa		
Grupo reactivo en la proteína	Grupo complementario en el fármaco	Grupo conector resultante
Aminas/Anilinas	Ésteres activados	Amidas
Aminas/Anilinas	Cianatos	Ureas
Aminas/Anilinas	Isotiocianatos	Tioureas
Aminas/Anilinas	Imidoéster	Amidinas
Aminas/Anilinas	Ácidos carboxílicos activados	Amidas
Aminas/Anilinas	Acil azidas	Amidas
Aminas/Anilinas	Haluro de acilo	Amidas
Aminas/Anilinas	Nitrilos de acilo	Amidas
Aminas/Anilinas	Haluros de arilo	Arilaminas
Aminas/Anilinas	Haluros de alquilo	Alquilaminas
Aminas/Anilinas	Anhídridos	Amidas/Imidas
Aminas/Anilinas	Aldehídos	Iminas
Aminas/Anilinas	Haluros de sulfonilo	Sulfonamidas
Aminas/Anilinas	Ésteres sulfonato	Alquilaminas
Aminas/Anilinas	Halotriazinas	Aminotriazinas
Aminas	Epóxidos	Alquilaminas
Tioles	Maleimidas	Tioéteres
Tioles	Haloacetamidas	Tioéteres
Tioles	Haluros de alquilo	Tioéteres
Tioles	Haluros de arilo	Aril tioéter
Tioles	Acrilamidas	Tioéteres
Tioles	Aziridinas	Tioéteres
Tioles	Epóxidos	Tioéteres

Tabla 2: Enlaces para unir grupos-Conjugación directa		
Grupo reactivo en la proteína	Grupo complementario en el fármaco	Grupo conector resultante
Tioles	Disulfuros	Disulfuros
Tioles	Vinilsulfonas	Tioéteres
Alcoholes/fenoles	Haluro de acilo	Ésteres
Alcoholes/fenoles	Nitrilos de acilo	Ésteres
Alcoholes/fenoles	Haluros de alquilo	Éteres
Alcoholes/fenoles	Anhídridos	Ésteres
Alcoholes/fenoles	Halotriazinas	Éteres de triazinilo
Alcoholes/fenoles	Isocianatos	Uretanos/Carbamatos
Alcoholes	Ácidos carboxílicos activados	Ésteres
Alcoholes	Fosforamiditas	Ésteres fosfito
Alcoholes	Haluros de sililo	Silil éteres
Alcoholes	Epóxidos	Éteres
Ácidos carboxílicos	Haluros de alquilo	Ésteres
Ácidos carboxílicos	Epóxidos	Ésteres
Ácidos carboxílicos	Diazoalcanos	Ésteres
Ácidos carboxílicos activados	Aminas/Anilinas	Amidas
Ácidos carboxílicos activados	Alcoholes	Ésteres
Ácidos carboxílicos activados	Hidracinas	Hidrazidas
Aldehídos/Cetonas	Hidracinas	Hidrazonas
Aldehídos/Cetonas	Hidroxiaminas	Oximas
Aldehídos/Cetonas	Aminas	Iminas
Cetona (aminoácidos no naturales)	Hidroxilaminas	Oximas
Azidas (aminoácidos no naturales)	Alquinos	1,2,3-triazoles
Azidas (aminoácidos no naturales)	Alquinos tensionados	1,2,3-triazoles
Aldehído (formilglicina)	Hidracinas	Azacarbolina

Una realización de la invención es la conjugación directa de fármacos que portan un éster N-hidroxisuccinimida a múltiples (n) residuos de lisina, siendo $n > 4$. Otra realización de la presente invención es la conjugación indirecta a n residuos de lisina en la que se utiliza el reticulante SMCC para modificar los residuos de lisina de la superficie, generando un tiol reducible para conjugar con fármacos o conectores de fármacos que porten un grupo tiol o maleimida.

Pueden utilizarse mezclas de fármacos con el mismo grupo reactivo en la reacción de conjugación química para generar conjugados con más de un tipo de fármaco terapéutico citotóxico o una combinación de fármaco terapéutico y agente de diagnóstico, tal como un colorante fluorescente [Fernández-Fernández A. *et al.*, Appl. Biochem. Biotechnol., 201, 165:1628-1651]. Estos conjugados podrían ser útiles para superar la resistencia a los fármacos o permitir la combinación de obtención de imágenes y tratamiento (teranóstica).

Una "molécula pequeña" significa moléculas, ya sean naturales o creadas artificialmente (por ejemplo, mediante síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente bajo. Las moléculas pequeñas preferidas son biológicamente activas en el sentido de que producen un efecto local o sistémico en animales, preferentemente mamíferos, más preferentemente seres humanos. En determinados ejemplos preferidos, la molécula pequeña es un fármaco y la molécula pequeña se denomina "molécula de fármaco" o "fármaco" o "agente terapéutico". En determinadas realizaciones, la molécula de fármaco tiene un peso molecular (Pm) menor o igual a aproximadamente 5 kDa. En otras realizaciones, la molécula de fármaco tiene un Pm inferior o igual a aproximadamente 1,5 kDa. En otras realizaciones, la molécula de fármaco se selecciona entre alcaloides de la vinca, dolostatinas, auristatinas, tubulinas, duocarmicinas, inhibidores de cinasas, elipticinas, inhibidores de MEK, inhibidores de KSP, agentes alquilantes del ADN, intercaladores del ADN e inhibidores de topoisomerasas y análogos de los mismos [Carmen Avendaño y J. Carlos Menéndez (2008), The medicinal chemistry of anti-cancer drugs, Elsevier Press; Cragg G.M. *et al.* (2012), Anti-cancer agents from natural products, 2ª ed., CRC press]. Preferentemente, aunque no necesariamente, el fármaco ya ha sido considerado seguro y eficaz para su uso por una agencia u organismo gubernamental apropiado, por ejemplo, la FDA. Por ejemplo, todos los medicamentos de uso humano que figuran en la lista de la FDA se consideran aptos para su uso con esta tecnología.

Los tipos de moléculas de fármacos que pueden utilizarse en la práctica incluyen, entre otros, sustancias anticancerígenas, radionúclidos, vitaminas, sustancias antisida, antibióticos, inmunosupresores, sustancias antivirales, inhibidores de enzimas, neurotoxinas, opiáceos, hipnóticos, antihistamínicos, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivos, relajantes musculares y sustancias antiparkinsonianas, antiespasmódicos y contractores musculares, incluidos los bloqueantes de canales, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparasitarios y/o antiprotozoarios, moduladores de las interacciones entre células y matriz extracelular, incluidos los inhibidores del crecimiento celular y las moléculas antiadhesión, agentes vasodilatadores, inhibidores de la síntesis de ADN, ARN o proteínas, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, factores antiangiogénicos, factores antiseoretos, agentes anticoagulantes y/o antitrombóticos, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, antieméticos, agentes de obtención de imágenes.

Se prefiere que la molécula portadora se una selectivamente a una diana. La diana puede ser una célula diana o una molécula diana extracelular. La célula diana es aquella a la que se va a transportar el agente terapéutico, o está situada en un tejido al que se va a transportar el agente terapéutico.

Las expresiones "unión selectiva" y "selectividad de unión" indican que las regiones variables de los anticuerpos de la invención reconocen y se unen a polipéptidos de la invención exclusivamente (es decir, son capaces de distinguir el polipéptido de la invención de otros polipéptidos similares a pesar de la identidad, homología o similitud de secuencia que aparece en la familia de polipéptidos), pero también pueden interactuar con otras proteínas (por ejemplo, la proteína A de *S. aureus* u otros anticuerpos en técnicas ELISA) a través de interacciones con secuencias fuera de la región variable de los anticuerpos y, en concreto, en la región constante de la molécula. Los ensayos de cribado para determinar la selectividad de unión de un anticuerpo de la invención son bien conocidos y se practican habitualmente en la técnica. Para un análisis exhaustivo de estos ensayos, véase Harlow *et al.* (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N.Y. (1988), capítulo 6.

La molécula portadora, al unirse a la célula diana, puede internalizarse en la célula para llevar el agente terapéutico a un sitio de acción dentro de la célula. Como alternativa, la molécula portadora, al unirse a la diana o célula diana, no se internaliza en la célula y, en lugar de ello, el agente terapéutico actúa fuera de la célula. Otra alternativa es cuando la molécula portadora, tras la unión de la diana, se desacopla del agente terapéutico. En otras palabras, el agente terapéutico se libera del portador para convertirse en moléculas libres. Estas moléculas libres pueden actuar fuera de la célula o ser captadas por ella por una vía no dependiente de anticuerpos.

La molécula portadora puede ser, en una realización, un fragmento de anticuerpo. Un "fragmento de anticuerpo" significa cualquier molécula basada en anticuerpos que no incluya todos los dominios de un anticuerpo completo. Se pretende abarcar fragmentos de anticuerpos de tipo salvaje, anticuerpos sintéticos, anticuerpos recombinantes o híbridos de anticuerpos.

Se prefiere que el fragmento de anticuerpo excluya la región Fc de un anticuerpo completo. En concreto, se prefiere que el fragmento de anticuerpo no incluya las regiones CH2 y CH3 de un anticuerpo completo.

El compuesto de la invención comprende una molécula portadora que es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre scFv, Fv, Fab, Fab-SH, dsFv, bs-scFv, di-scFv (también conocidos como bi-scFv), diacuerpos y TandAbs, en los que el fragmento de anticuerpo no incluye todos los dominios de un anticuerpo completo. Otros fragmentos de anticuerpos divulgados en el presente documento son: F(ab')₂, sdAb, Fcab, anticuerpos de dominio, nanocuerpos, dominios VHH y formatos biespecíficos, tales como los captadores biespecíficos de linfocitos T.

Los fragmentos de anticuerpos son porciones funcionales de inmunoglobulinas completas que poseen propiedades ventajosas sobre los anticuerpos completos, tales como una penetración más rápida en tumores densos o sólidos, una menor reactividad cruzada con tejidos normales y una depuración más rápida de la circulación, reduciendo así la exposición general del tejido normal. Es bien conocido en la técnica que los fragmentos de anticuerpos presentan una farmacocinética más rápida, dispersándose en los tejidos y eliminándose más rápidamente (propiedades ADME-adsorción, distribución, metabolismo y excreción). También son más fáciles de producir en sistemas más rentables, tales como los sistemas de expresión microbiana [de Marco A., *Microb Cell Fact.*, 2009, 8:26; Spadiut O. *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 2014, 32:54-60].

Los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por escisión química o enzimática, pero, más preferentemente, se producen utilizando la tecnología de ADN recombinante. Esta última permite la expresión indefinida de proteínas en líneas celulares procariotas o eucariotas y la modificación genética que da lugar a fragmentos con propiedades mejoradas o adicionales. Los fragmentos de anticuerpos poseen normalmente al menos un dominio variable (V), porque los dominios V contienen las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o bucles para la unión al antígeno [Carter P.J., *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, 6: 343-357]. Más recientemente, se han insertado bucles similares a CDR en dominios no variables (por ejemplo, dominios constantes de cadena pesada 3, CH3) que permiten a estos dominios unirse a dianas útiles o predeterminadas [Wozniak-Knopp, G. *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 2010, 23, 289-297].

Para que los fragmentos de anticuerpos se utilicen eficazmente como vehículos portadores de fármacos citotóxicos, deben poseer propiedades biofísicas que permitan una alta carga de fármaco mediante conjugación química (o interacciones no covalentes fuertes y específicas) sin afectar negativamente a la estabilidad de la proteína, la unión anticuerpo-antígeno y las propiedades favorables del fármaco, tales como la solubilidad, la agregación y la inmunogenicidad. Con muy poca frecuencia estas características son inherentes a los fragmentos de anticuerpos [Wörn A. y Plückthun A., *J. Mol. Biol.*, 2001, 305:989-1010], por lo que estas ventajas adicionales deben incorporarse a los fragmentos de anticuerpos para que resulten útiles en la práctica [Schaefer J.V. y Plückthun A., *Protein Eng. Des. Sel.*, 2012, 25:485-506]. Un ejemplo de tales características es la incorporación de residuos de lisina de la superficie adicionales o distribuidos de forma más óptima en fragmentos de anticuerpos, aumentando así su capacidad de conjugación a fármacos mediante una química dirigida a aminos. Podrían utilizarse otros aminoácidos, tales como cisteínas, tirosinas, glutamatos, aspartatos, argininas, asparaginas, histidinas y serinas distribuidas de forma óptima, pero las lisinas son más preferibles debido a los enfoques químicos bien establecidos y exitosos para la conjugación y la relativa falta de reactividad con respecto a la conjugación sin grupos activadores específicos [Ducry, L. (ed.) (2013), *Antibody-Drug Conjugates book, Methods in Molecular Biology*, volumen 1045, capítulo 10, Humana Press]. También pueden utilizarse aminoácidos no naturales, tales como la p-acetilfenilalanina y la formilgluticina [Behrens C.R. y Liu B., *MAbs*, 2014, 6:46-53]. La identificación de posiciones para la modificación de fragmentos de anticuerpos puede realizarse mediante el análisis directo de la estructura tridimensional del fragmento de anticuerpo (o del anticuerpo original completo), si se dispone de ella, o mediante la modelización de la homología utilizando una serie de recursos de programas informáticos, tales como Phyre [Kelley L.A. y Sternberg M.J., *Nat. Protoc.*, 2009, 4: 363-371]. Los criterios para la selección de posiciones incluyen: (1) el uso de aminoácidos ya favorecidos o conservados en esa posición (identificados a partir de bases de datos, tales como IMGT o Kabat [Patrick Chames (ed.), *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, 2ª edición, *Methods in Molecular Biology*, vol. 907, capítulo 1]) o a través de la demostración práctica fabricando y ensayando mutantes de fragmentos de anticuerpos; (2) distribución de los residuos lejos de las posiciones que podrían interferir con la unión del antígeno; y (3) separación de los residuos que participan en la conjugación para que no se obstaculicen estéricamente (o se prevé que vayan a obstaculizarse) entre sí durante las reacciones químicas o las reacciones de liberación del fármaco, o para que no formen parches altamente hidrófobos que conduzcan a la agregación.

La optimización de los residuos de lisina de la superficie de la proteína puede lograrse aumentando, disminuyendo o volviendo a espaciar (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio) para que sean más accesibles a la bioconjugación, permitiendo reacciones de conjugación más completas y, por lo tanto, más homogéneas, y al mismo tiempo que no afecten negativamente a la unión del antígeno, la estabilidad de la proteína, la solubilidad o las propiedades de agregación. Los residuos pueden manipularse individualmente, paso a paso o de forma múltiple.

La secuencia de nucleótidos que codifica el fragmento de anticuerpo o el fragmento de anticuerpo optimizado que debe expresarse puede obtenerse por mutagénesis de una secuencia génica existente o por síntesis génica, insertarse en un vector de clonación para confirmar la secuencia/estructura y volver a clonarse en un vector que contenga los elementos reguladores adecuados para la expresión de la proteína, utilizando procedimientos de biología molecular establecidos, tales como los descritos por Sambrook *et al.* [*Molecular Cloning book* (2000), 3ª ed., Cold Spring Harbour;

o Patrick Chames (ed.), *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, 2ª edición, *Methods in Molecular Biology*, vol. 907, capítulo 18-23]. Estos elementos incluyen promotores, potenciadores, terminadores, secuencias reguladoras de la traducción y genes marcadores para la selección de clones (por ejemplo, carbenicilina para *E. coli*, neomicina para células de mamífero).

- 5 Se pueden utilizar sistemas de expresión procariota que sean reprimibles, constitutivos o inducibles. Entre los promotores adecuados de *E. coli* se incluyen los promotores Lac, Tac, T7, T4, SP6, T3, Lambda PR/PL, Trp, RecA y de choque térmico. Otros hospedadores procariotas alternativos incluyen *Bacillus* y otras bacterias con los promotores correspondientes.

- 10 Puede utilizarse *E. coli* como hospedador [de Marco A., *Microb. Cell Fact.*, 2009, 8:26; Spadiut O. *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 2014, 32:54-60] y las cepas adecuadas incluyen K12 o derivados B, tales como JM109, TG1, HB2151, XL1, BL21, BL21(DE3), *E. coli* SHUFFLE®, *E. coli* Origami®, Rosetta® y otras de proveedores tales como New England Biolabs o Merck.

- 15 Los sistemas de expresión de vectores incluyen los que permiten la secreción periplásmica (utilizando una secuencia líder pelB u ompA añadida al gen o genes del fragmento de anticuerpo para permitir la formación de enlaces disulfuro [de Marco A., *Microb. Cell Fact.*, 2009, 8:26] o expresión citosólica en un hospedador modificado con redox para permitir la formación de enlaces disulfuro [Sonoda H. *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 2010, 70:248-253]. Pueden añadirse proteínas de fusión adicionales para facilitar el plegamiento y la purificación, tales como la tiorredoxina reductasa (trx) [Sonoda H. *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 2010, 70:248-253], que posteriormente se retiran por proteólisis mediante un marcador de escisión peptídica introducido específicamente (tal como TEV o factor-Xa) disponible en el mercado en
20 proveedores tales como Promega. Las realizaciones específicas de esta invención incluyen la expresión periplásmica utilizando un vector, tal como pET20b en *E. coli* BL21(DE3), y la expresión citosólica utilizando el vector pET32Xa/LIC en *E. coli* SHUFFLE® [Lobstein J. *et al.*, *Microb. Cell Fact.*, 2012, 11:56]. Los anticuerpos diseñados que no necesitan disulfuros intracatenarios deben ser secretados hacia el espacio periplásmico.

- 25 Los ácidos nucleicos también pueden expresarse en hospedadores eucariotas, tales como levaduras, insectos y células de mamíferos [Patrick Chames (ed.), *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, 2ª edición, *Methods in Molecular Biology*, vol. 907, capítulos 18-23]. Las células de levadura incluyen *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*, las células de insecto incluyen *Drosophila* y las células de mamífero incluyen células de roedores (CHO, ATCC-CCL61, SP2/0), de primates no humanos (COS-7, ATCC CRL1651) y humanas (HEK ATCC 85257). Deben utilizarse promotores y elementos reguladores adecuados, como los de la serie de vectores pPIC utilizados para la
30 expresión en *Pichia*, pBLUEBAC utilizado para la expresión en células de insecto y pCDNA1/2/3/4 utilizado para la expresión en células de mamífero. Algunos ejemplos de promotores de la expresión en células de mamífero son SV40, CMV, IgH con potenciadores apropiados, tales como el potenciador SV40, IgH o Kappa, etc. Para la expresión eucariota, debe añadirse al gen la señal de secreción adecuada para que atraviese el sistema secretor y permita el plegamiento de la proteína, la glucosilación (si es necesaria), la formación de enlaces disulfuro y la translocación extracelular. Un ejemplo de secuencia señal de secreción de mamíferos es la secuencia señal de inmunoglobulina.

- 35 Las proteínas expresadas en hospedadores heterólogos pueden aislarse y purificarse utilizando una serie de enfoques diferentes [Scopes (1993), *Protein Purification: Principles and Practice* (Springer Advanced Texts in Chemistry)]. El sobrenadante del cultivo puede recogerse por centrifugación, las células pueden lisarse (por ejemplo, con detergentes químicos) o disgregarse físicamente (por ejemplo, prensa francesa, sonicación) y conservarse las fracciones solubles
40 o insolubles. Si la proteína es soluble, pueden utilizarse cromatografía de intercambio iónico, de afinidad (utilizando marcadores prediseñados, tales como poli-HIS, FLAG, cMyc) y de exclusión por tamaño en condiciones nativas. Si la proteína es insoluble, puede utilizarse la desnaturalización química (por ejemplo, con urea), seguida de volver a plegar [Deonarain M.P. y Epenetos A.A., *Br. J. Cancer*, 1998, 77:537-546] o la purificación en condiciones desnaturalizantes (por ejemplo, cromatografía de afinidad de metales inmovilizados y poli-HIS, IMAC). La pureza final de la proteína se
45 evalúa mediante herramientas analíticas, tales como SDS-PAGE, SEC, análisis de aminoácidos o espectrometría de masas, y la función final de la proteína se evalúa mediante ELISA, citometría de flujo, inmunohistoquímica o ensayo biológico celular [Harlow y Lane (1998), *Using antibodies*, Cold Spring Harbour] o Biacore-SPR [Van Regenmortel M.H. *et al.*, *J. Mol. Recognit.*, 1998, 11:163-167].

- 50 Tal como se divulga en el presente documento, pero que no forma parte de la invención reivindicada, la molécula portadora puede ser un mimético de anticuerpo. La expresión "mimético de anticuerpo" se refiere a compuestos orgánicos que, al igual que los anticuerpos, pueden unirse específicamente a antígenos, pero que no están estructuralmente relacionados con los anticuerpos. Suelen ser péptidos artificiales o proteínas con una masa molar de entre aproximadamente 3 y 20 kDa. Los ácidos nucleicos y las moléculas pequeñas pueden considerarse miméticos de anticuerpos, pero los miméticos de anticuerpos no incluyen los anticuerpos artificiales, los fragmentos de
55 anticuerpos y las proteínas de fusión compuestas a partir de éstos. Algunos tipos de miméticos de anticuerpos tienen conformaciones peptídicas similares a las de los anticuerpos, tales como las láminas beta.

Los miméticos de anticuerpos [Wurch T. *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 2012, 30:575-582] adecuados para su uso en la invención son los DARPins, aficuerpos, afinas, anticalinas, avímeros, péptidos de dominio Kunitz, adnectinas, centirinas, finómeros, IgNAR y monocuerpos.

La molécula portadora puede estar humanizada o ser humana.

Los anticuerpos humanizados son adecuados para la administración a seres humanos sin suscitar una respuesta inmunitaria del ser humano contra la inmunoglobulina administrada. Las formas humanizadas de anticuerpos son inmunoglobulinas intactas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que se componen principalmente de la secuencia de una inmunoglobulina humana y contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. La humanización puede realizarse siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988)). En algunos casos, los residuos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden incluir residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos una, y normalmente dos regiones variables, en las que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. De forma óptima, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)).

Las dianas preferidas para la molécula portadora de los compuestos de la invención son los marcadores de la superficie celular o tumorales, incluidos, entre otros, 5T4, AOC3, C242, CA-125, CCL11, CCR 5, CD2, CD3, CD4, CD5, CD15, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD30, CD31, CD33, CD37, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD54, CD56, CD62E, CD62P, CD62L, CD70, CD74, CD80, CD125, CD138, CD141, CD147, CD152, CD 154, CD326, CEA, CTLA-4, EGFR, ErbB2, ErbB3, EpCAM, receptor de folato, FAP, variantes de corte y empalme de fibronectina (EDA, EDB, CSIII), GD2, GD3, GPNMB, HGF, HER2, ICAM, receptor de IGF-1, VEGFR1, EphA2, TRPV1, CFTR, gpNMB, CA9, Cripto, ACE, APP, receptor adrenérgico-beta2, claudina 3, mesotelina, lactadherina, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-13, integrinas (incluidas las integrinas $\alpha 4$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 5$, $\alpha \nu \beta 6$, $\alpha 1 \beta 4$, $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 7$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha 1 \beta 3$), IFN- α , IFN- γ , IgE, IgE, receptor de IGF-1, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-22, IL-4, IL-5, IL-6, receptor de interferón, ITGB2 (CD18), LFA-1 (CD11a), L-selectina (CD62L), mucina, MUC1, miostatina, NCA-90, NGF, PDGFR α , fosfatidilserina, célula de carcinoma prostático, *Pseudomonas aeruginosa*, rabia, RANKL, virus respiratorio sincitial, factor Rhesus, SLAMF7, esfingosina-1-fosfato, TAG-72, receptor de linfocitos T, tenascina C, TGF-1, TGF- $\beta 2$, TGF- β , TNF- α , TRAIL-R1, TRAIL-R2, antígeno tumoral CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR2, vimentina, receptores de matriz y dianas similares, marcadores apoptóticos como la fosfololina.

En concreto, se prefiere que la molécula portadora se una específicamente a HER2, EGFR, HER3, MUC1, EpCAM, CEA, fibronectina-EDB, CD19, CD20, CD22, LeY, CD30, CD33, CD79b, GPNMB, PSMA, CD56, CD37, receptor de folato, CA6, CD27L, MUC16, CD66e, CD74, Trop-2 o guanilato ciclasa.

Las moléculas portadoras de la invención pueden ser fragmentos de anticuerpos derivados de cualquiera de los siguientes anticuerpos completos o con una especificidad de unión equivalente a los mismos: 3F8, abagovomab, abciximab (REOPRO), adalimumab (HUMIRA), adecatumumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, ALD518, alemtuzumab (CAMPATH), altumomab, amatuximab, anatomomab, anrukinzumab, apolizumab, arcitumomab (CEA-SCAN), aselizumab, atlizumab (tocilizumab, Actemra, RoActemra), atorolimumab, bapineuzumab, basiliximab (Simulect), bavituximab, bectumomab (LYMPHOSCAN), belimumab (BENLYSTA), benralizumab, bertilimumab, besilesomab (SCINITIMUN), bevacizumab (AVASTIN), biciromab (FIBRISCINT), bivatzumab, blinatumomab, brentuximab, briakinumab, canakinumab (ILARIS), cantuzumab, capromab, catumaxomab (REMOVAB), CC49, cedelizumab, certolizumab, cetuximab (ERBITUX), citatzumab, cixutumumab, clenoliximab, clivatuzumab, conatumumab, CR6261, dacetuzumab, dacizumab (ZENAPAX), daratumumab, denosumab (PROLIA), detumomab, dorlimomab, dorlizumab, ecomeximab, eculizumab (SOLIRIS), edobacomab, edrecolomab (PANOREX), efalizumab (RAPTIVA), efungumab (MYCOGRAB), elotuzumab, elsilimumab, enlimomab, epitumomab, epratuzumab, erlizumab, ertumaxomab (REXOMUN), etaracizumab (ABEGRIN), exbivirumab, fanolesomab (NEUTROSPEC), faralimumab, farletuzumab, felvizumab, fezakinumab, figitumumab, fontolizumab (HuZAF), foravirumab, fresolimumab, galiximab, gantenerumab, gavilimumab, gemtuzumab girentuximab, glembatumumab, golimumab (SIMPONI), gomiliximab, ibalizumab, ibritumomab, igovomab (INDIMACIS-125), imciromab (MYOSCINT), infliximab (REMICADE), intetumumab, inolimumab, inotuzumab, ipilimumab, iratumumab, keliximab, labetuzumab (CEA-CIDE), lebrizumab, lemalesomab, lerdelimomab, lexatumumab, libivirumab, lintuzumab, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, maslimomab, matuzumab, mepolizumab (BOSATRIA), metelimomab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, morolimumab, motavizumab (NUMAX), muromonab-CD3 (ORTHOCLONE OKT3), nacolomab, naptumomab, natalizumab (TYSABRI), nebacumab, necitumumab, nerelimomab, nimotuzumab (THERACIM), nofetumomab, ocrelizumab, odulimumab, ofatumumab (ARZERRA), olaratumab, omalizumab (XOLAIR), ontecizumab, oportuzumab, oregovomab (OVAREX), otelixizumab, pagibaximab, palivizumab (SYNAGIS), panitumumab (VECTIBIX), panobacumab, pascolizumab, pemtumomab (THERAGYN), pertuzumab (OMNITARG), pexelizumab, pintumomab, priliximab, pritumomab, PRO140, rafivirumab, ramucirumab, ranibizumab (LUCENTIS), raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rilotumumab, rituximab (RITUXAN), robatumumab, rontalizumab, rovelizumab (LEUKARREST), ruplizumab (ANTOVA), satumomab pendetide, sevirumab, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, siplizumab, solanezumab, sonpimizumab, sontuzumab, stamulumab, sulesomab (LEUKOSCAN), tacatzumab (AFP-CIDE), tetraxetan, tadocizumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab paptox, tefibazumab (AUREXIS), telimumab,

tenatumomab, teneliximab, teplizumab, TGN1412, ticilimumab (tremelimumab), tigatuzumab, TNX-650, tocilizumab (atlizumab, ACTEMRA), toralizumab, tositumomab (BEXXAR), trastuzumab (HERCEPTIN), tremelimumab, tucotuzumab, tuvirumab, urtoxazumab, ustekinumab (STELERA), vapaliximab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimomab, visilizumab (NUVION), volociximab (HUMASPECT), votumumab, zalutumumab (HuMEX-EGFr), zanolimumab (HuMAX-CD4), ziralimumab y zolimomab.

El agente terapéutico es preferentemente un agente citotóxico o un agente citostático.

Por agente citotóxico se entiende un agente que es tóxico para las células, por lo general matándolas. La toxicidad puede provocar la muerte celular por necrosis o apoptosis.

Por agente citostático se entiende un agente que inhibe o detiene el crecimiento y/o la multiplicación celular.

- 10 El agente terapéutico del compuesto de la invención se selecciona entre cemadotina, P5-C5, doxorubicina, elipticina, MMAE, maitansinas, MMAF, auristatinas, dolastatinas y un inhibidor de topoisomerasas. Preferentemente, el agente terapéutico se selecciona entre las siguientes clases de agentes terapéuticos: un fármaco de unión al ADN, un agente desestabilizante de los microtúbulos y un inhibidor de topoisomerasas.

- 15 Tal como se divulga además en el presente documento, el agente terapéutico puede seleccionarse entre las siguientes clases de agentes terapéuticos: inhibidores del avance del ciclo celular, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la vía de transducción de señales MAPK, inhibidores de la vía PI3K/m-TOR/AKT, inhibidores de cinasas, inhibidores de RTK, inhibidores de HDAC, inhibidores de la chaperona proteica, inhibidores de PARP, inhibidores de la vía de transducción de señales Wnt/Hedgehog/Notch, inhibidores de la ARN polimerasa, fármacos de unión al ADN, fármacos que dañan el ADN, fármacos alquilantes del ADN, agentes estabilizantes de los microtúbulos, agentes desestabilizantes de los microtúbulos, compuestos de platino, inhibidores de cinasas, piridocarbazol y sus derivados, e inhibidores de la topoisomerasa I y II.
- 20

Algunos ejemplos de fármacos de unión al ADN o alquilantes incluyen CC-1065 y sus análogos, antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, daunorubicina) y sus análogos, elipticina y sus derivados, agentes alquilantes, tales como caliqueamicinas, dactinomomicinas, mitromicinas, pirrolobenzodiazepinas y derivados.

- 25 Algunos ejemplos de análogos de CC-1065 incluyen duocarmicina SA, duocarmicina C1, duocarmicina C2, duocarmicina B2, DU-86, KW-2189, bizelesina, secoadozelesina y sus derivados.

Algunos ejemplos de agentes estabilizantes y desestabilizantes de microtúbulos incluyen compuestos del taxano, tales como paclitaxel, docetaxel; maitansinoides, dolostatinas, cemadotinas, auristatinas y sus análogos, derivados de tubulisina A y B, derivados de alcaloides de vinca, epotilonas y criptoficinas.

- 30 Algunos ejemplos de maitansinoides o análogos de maitansinoides incluyen maitansinol y análogos del maitansinol, maitansina o DM-1 y DM-4. Algunos ejemplos de auristatinas son la auristatina E (un derivado de la dolastatina-10), la auristatina EB, la auristatina EFP, la monometil auristatina E (MMAE), la monometil auristatina F (MMAF), la auristatina F y la dolastatina. Algunos ejemplos de alcaloides de la vinca son la vincristina, la vinblastina, la vindesina y la navelbina (vinorelbina). Algunos ejemplos de compuestos de epotilona son la epotilona A, B, C, D, E y F, y sus derivados. Algunos ejemplos de compuestos del platino son el cisplatino (PLATINOL®), el carboplatino (PARAPLATIN®), el oxaliplatino (ELOXATINE®), el iproplatino, el onnaplatino y el tetraplatino. Entre los ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa I se incluyen la camptotecina, derivados de la camptotecina, análogos de la camptotecina y camptotecinas no naturales, tales como, por ejemplo, CPT-11 (irinotecán), SN-38, topotecán, 9-aminocamptotecina, 9-bromocamptotecina, diflomotecán, rubitecán, silatecán, lurtotecán, exatecán, belotecán, gimatecán, karenitecina, lurtotecán y S39625.
- 35
- 40

Algunos ejemplos de inhibidores de la angiogénesis incluyen inhibidores de VEGF, inhibidores de MetAP2, inhibidores de P1GF, inhibidores de VGFR, inhibidores de PDGFR. Algunos ejemplos de inhibidores de VGFR y PDGFR son sorafenib (Nexavar®), sunitinib (Sutent®) y vatalanib. Algunos ejemplos de inhibidores del avance del ciclo celular incluyen inhibidores de CDK, tales como, por ejemplo, BMS-387032 y PD0332991; inhibidores de Rho-cinasa, por ejemplo, GSK429286; inhibidores de cinasas de punto de control, tales como, por ejemplo, AZD7762; inhibidores de la aurora cinasa, tales como, por ejemplo, AZD1152, MLN8054 y MLN8237; inhibidores de PLK, tales como, por ejemplo, BI 2536, BI6727 (Volasertib), GSK461364, ON-01910 (Estybon); e inhibidores de KSP, tales como, por ejemplo, SB 743921, SB 715992 (ispinesib), MK-0731, AZD8477, AZ3146 y ARRY-520. Entre los ejemplos de inhibidores de la vía de transducción de señales PI3K/m-TOR/AKT se incluyen los inhibidores de la fosfoinositida 3-cinasa (PI3K), los inhibidores de GSK-3, los inhibidores de ATM, los inhibidores de DNA-PK y los inhibidores de PDK-1.

45

50

Algunos ejemplos de PI3 cinasas incluyen BEZ235, BGT226, BKM120, CAL101, CAL263, demetoxiviridina, GDC-0941, GSK615, IC87114, LY294002, Palomid 529, perifosina, PF-04691502, PX-866, SAR245408, SAR245409, SF1126, wortmanina, XL147 y XL765. Entre los ejemplos de inhibidores de AKT se incluye el AT7867. Algunos ejemplos de inhibidores de la vía de transducción de señales MAPK son los inhibidores de MAPK MEK, Ras, JNK, B-Raf y p38. Algunos ejemplos de inhibidores de MEK son GDC-0973, GSK1120212, MSC1936369B, AS703026,

55

RO5126766 y R04987655, PD0325901, AZD6244, AZD 8330 y GDC-0973. Algunos ejemplos de inhibidores de B-raf son CDC-0879, PLX-4032 y SB590885.

Algunos ejemplos de inhibidores de p38 MAPK incluyen BIRB 796, LY2228820 y SB 202190.

- 5 Algunos ejemplos de moduladores/inhibidores de receptores con actividad tirosina cinasas ("receptor tyrosine kinases", RTK) incluyen fármacos antirreceptor de ErbB2, tales como AEE788 (NVP-AEE 788), BIBW2992, (afatinib), lapatinib, erlotinib (Tarceva®) y gefitinib (Iressa®).

- 10 Algunos ejemplos de inhibidores de RTK multiespecíficos incluyen AP24534 (ponatinib) que se dirige a los receptores FGFR, FLT-3, VEGFR-PDGFR y Bcr-Abl; ABT-869 (linifanib) que se dirige a los receptores FLT-3 y VEGFR-PDGFR; AZD2171 que se dirige a los receptores VEGFR-PDGFR, Flt-1 y VEGF; CHR-258 (dovitinib) que se dirige a los receptores VEGFR-PDGFR, FGFR, Flt-3 y c-Kit; sunitinib (Sutent), que se dirige a los receptores VEGFR, PDGFR, KIT, FLT-3 y CSF-IR; sorafenib (Nexavar®) y vatalanib, que se dirigen a los receptores VEGFR, PDGFR, serina/treonina cinasas de la vía Raf/Mek/Erk y eliptinas.

- 15 Algunos ejemplos de inhibidores de chaperonas proteicas incluyen inhibidores de HSP90, tales como derivados de 17AAG, BIIB021, BIIB028, SNX-5422, NVP-AUY-922 y KW-2478. Algunos ejemplos de inhibidores de HDAC son belinostat (PXD101), CUDC-101, droxinostat, ITF2357 (givinostat, gavinostat), JNJ-26481585, LAQ824 (NVP-LAQ824, dacinostat), LBH-589 (panobinostat), MC1568, MGCD0103 (mocetinostat), MS-275 (entinostat), PCI-24781, piroxamida (NSC 696085), SB939, tricoastatina A y vorinostat (SAHA). Algunos ejemplos de inhibidores de PARP son iniparib (BSI 201), olaparib (AZD-2281), ABT-888 (veliparib), AG014699, CEP 9722, MK 4827, KU-0059436 (AZD2281), LT-673, 3-aminobenzamida, A-966492 y AZD2461. Algunos ejemplos de inhibidores de la vía de transducción de señales Wnt/Hedgehog son vismodegib (RG3616/GDC-0449), ciclopamina (11-desoxojervina) (inhibidores de la vía Hedgehog) y XAV-939 (inhibidor de la vía Wnt). Entre los ejemplos de inhibidores de la vía Notch se incluyen los inhibidores de la gamma-secretasa MK0752, RO4929097, PF-03084,014, LY450139, BMS-708163, los modificadores de la gamma-secretasa MPC-7869 y los compuestos dominantes-negativos de mastermind/CSL/notch.

- 25 Algunos ejemplos de inhibidores de la ARN polimerasa incluyen amatoxinas, tales como α -amanitinas, β -amanitinas, γ -amanitinas, ϵ -amanitinas, amanulina, ácido amanílico, amaninamida, amanina y proamanulina.

- 30 Las cargas activas de fármacos pueden modificarse sintéticamente para hacer que puedan conjugarse con biomoléculas, tales como anticuerpos, utilizando una diversidad de enfoques (tabla 2). Estas modificaciones químicas se describen en Chari R.V. *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2014, 53, 3796-3827. Algunos ejemplos son la derivación de maitansina, MMAE y MMAF, doxorubicina, cemaotina, SN38 y P5 un pentapéptido presente en la dolostatina-15 y los dímeros de pirrolobenzodiazepina (PBD).

- 35 Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y pueden prepararse sintéticamente derivados adecuados para la conjugación con agentes de unión a células de acuerdo con procedimientos conocidos divulgados a fondo en las patentes de EE. UU. n.º 5 208 020, 5 416 064, 7 276 497 y en Chari R.V. *et al.*, J. Med. Chem. 2006, 49, 4392 y Chari R.V. *et al.*, J. Med. Chem. 2011, 22, 717. La reacción de maitansinoides terminados en tiol con conectores heterobifuncionales da lugar a enlaces estables no reducibles terminados con ésteres NHS reactivos para la conjugación directa con agentes de unión a células, tal como se describe en el documento WO 2010/141566 y en Chari R.V. *et al.*, J. Med. Chem., 2011, 54, 3606. Los conectores heterobifuncionales contienen un grupo sulfonato cargado negativamente o un grupo PEG hidrófilo no cargado, además de un éster NHS de N-hidroxisuccinimida reactivo con amina y terminaciones reactivas con sulfhidrilo.

- 40 Las auristatinas, incluida la monometil auristatina E (MMAE), se describen en la patente de EE. UU. n.º 20060074008 y en Senter P.D. *et al.*, Nature Biotechnology, 2003, 21, 778, que divulgan un conector con un dipéptido de valina-citrulina sensible a las proteasas como sitio de corte para la catepsina B y un carbamato de p-aminobencilo autoinmolante. Los conjugados de monometil auristatina F (MMAF) con un conector no escindible se describen en la patente de EE. UU. n.º 20110070428.

- 45 El CC-1065 y los análogos de la familia de la duocarmicina de agentes de ciclopropilindol alquilantes del ADN se describen en Goldmacher V.S. *et al.*, Cancer Research, 1995, 55, 4079 y la patente de EE. UU. n.º 8680293.

- 50 Los dímeros y conjugados de pirrobenzodiazepinas (PBD) se han descrito en Senter P.D. *et al.*, Bioconjugate Chemistry, 2013, 24: 1256; McEarchern J.A. *et al.*, Blood, 2013, 122: 1455 y en la patente de EE. UU. n.º 2014234346 y el documento WO 2014 031566. Los análogos de daunorubicina/doxorubicina también son cargas activas adecuadas y se han divulgado en Firestone R.A. *et al.*, J. Controlled Release, 1996, 39: 251 y el documento WO2012024223 como fármacos terminados en maleimido. Se divulga una doxorubicina liberable por catepsina B en Dubowchik G.M. *et al.*, Bioconjugate Chemistry, 2002, 13, 855. Se divulgan derivados más potentes, doxorubicina-2-pirrolino y morfolinodoxorubicina, en Senter P.D. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006, 16: 358 y el documento WO2014124227. Los derivados y conjugados de la nemorubicina (un metabolito de la doxorubicina) con grupos éster reactivos se describen en la patente de EE. UU. n.º 2014227299. Los taxanos que pueden utilizarse se describen en Ojima I. *et al.*, J. Med. Chem., 2002, 45, 5620 y Ojima I., Acc. Chem. Res., 2008, 41, 108 y la patente de EE. UU. n.º 72766499.

El SN-38, el metabolito activo del inhibidor de topoisomerasas irinotecán (un derivado de la camptotecina) son cargas activas adecuadas, y los conjugados con conectores escindibles y con PEG incorporado se describen en Goldenberg D.M. *et al.*, J. Med. Chem., 2008, 51: 6916 y el documento WO2010/093395.

5 Las criptoficinas se encuentran entre los agentes antimitóticos más potentes y se divulgan conjugados formados a través de maleimidas y ésteres reactivos en el documento WO 2011/001052.

Las tubulisininas tienen similitud estructural con la dolastatina-10 y presentan una alta potencia como modificadores de la tubulina. Estas variantes de pretubulisinina y otras más sencillas se divulgan en el documento WO2014/0227295 y en Kazmaier U. *et al.*, Eur. J. Org. Chem., 2011, 3050.

10 Una clase de fármacos potentes recientemente investigados para su uso como cargas activas son los inhibidores de la ARN polimerasa II, tales como la alfa-amanitina, un componente octapéptido bicíclico de las amatoxinas. Los conjugados con residuos de lisina se forman activando la amanitina terminada en amina durante la noche con carbonato de disuccinimidilo, seguido de reacción con el agente de unión a células, tal como se divulga en el documento WO2012/041504.

15 Los agentes terapéuticos preferidos se seleccionan entre cemadotina, P5 (un precursor temprano de la cemadotina), P5-C₅ (P5 con un espaciador de 5 carbonos), doxorubicina, elipticina, MMAE, MMAF, paclitaxel, auristatinas, maitansinas, dolostatinas, camptotecina, SN-38 y dímeros de pirrolobenzodiazepina (PBD), PNU-159862 y dímeros de indolino-benzodiazepina (IGN).

Algunos ejemplos específicos de compuestos según la invención, entre otros, incluyen aquellos en los que:

- (i) la molécula portadora es un scFv y el agente terapéutico es cemadotina;
- 20 (ii) la molécula portadora es un scFv y el agente terapéutico es doxorubicina
- (iii) la molécula portadora es un scFv y el agente terapéutico es elipticina.
- (iv) la molécula portadora es un scFv y el agente terapéutico es MMAE.
- (v) la molécula portadora es un scFv y el agente terapéutico (P5)-C₅.
- (vi) la molécula portadora es un scFv y el agente terapéutico es una maitansina
- 25 (vii) la molécula portadora es un scFv y el agente terapéutico es MMAF.

Estos ejemplos específicos pueden utilizar cualquier scFv como molécula portadora, pero un ejemplo preferido de scFv es un scFv que se une a HER2, por ejemplo, scFv (C6.5) o su forma modificada, scFv (TCT) (SEQ ID NO: 2, véase el ejemplo 27). Otros ejemplos alternativos preferidos de scFv son los scFv que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO: 5.

30 En un segundo aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto del primer aspecto de la invención y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto o una composición del primer o segundo aspecto para su uso en el diagnóstico, el tratamiento y/o la prevención de enfermedades.

35 En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un compuesto o una composición del primer o segundo aspecto para su uso en el diagnóstico, el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad seleccionada entre cáncer, tumores benignos, enfermedades infecciosas, incluidas infecciones bacterianas, víricas, fúngicas, por tripanosomas, nematodos y priones, enfermedades cardiovasculares y enfermedades autoinmunitarias.

40 En un quinto aspecto de la invención, se proporciona un compuesto o una composición como se define en cualquiera de los aspectos primero y segundo para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad seleccionada entre cáncer, tumores benignos, enfermedades infecciosas, incluidas infecciones bacterianas, víricas, fúngicas, por tripanosomas, nematodos y priones, enfermedades cardiovasculares y enfermedades autoinmunitarias.

45 También se divulga en el presente documento un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada entre cáncer, tumores benignos, enfermedades infecciosas, incluidas infecciones bacterianas, víricas, fúngicas, por tripanosomas, nematodos y priones, enfermedades cardiovasculares y enfermedades autoinmunitarias.

En los aspectos tercero, cuarto y quinto de la invención, la enfermedad puede ser cáncer, tal como:

50 Tumores sólidos, incluidos, entre otros, sarcoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, coriocarcinoma, cordoma, angiosarcoma, tiroides, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer óseo, cáncer de mama, cáncer de ovario,

cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de estómago (por ejemplo, cáncer gastrointestinal), cáncer oral, cáncer nasal, cáncer de garganta, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer peritoneal, cáncer hepatocelular, hepatoma, cáncer salival, cáncer vulvar, cáncer de pene, cáncer anal, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, carcinoma anaplásico agudo macrocítico, carcinoma anaplásico cutáneo macrocítico, cáncer de útero, cáncer de testículo, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, cáncer de piel, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, cánceres hematológicos, incluidos, entre otros, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, leucemia mieloblástica aguda (LMA), leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroleucémica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia indiferenciada aguda, leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas, mieloma múltiple, leucemias agudas y crónicas, linfomas, tales como la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no hodgkiniano, el mieloma múltiple, la macroglobulinemia de Waldenström, la enfermedad de cadenas pesadas, la policitemia vera.

Como alternativa, la enfermedad puede ser una enfermedad autoinmunitaria, tal como hepatitis crónica activa, enfermedad de Addison, alveolitis alérgica, reacción alérgica, rinitis alérgica, síndrome de Alport, anafilaxia, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, artritis, ascariasis, aspergilosis, alergia atrofica, dermatitis atrofica, rinitis atrofica, enfermedad de Behcet, asma bronquial, síndrome de Caplan, cardiomiopatía, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, glomerulonefritis crónica, síndrome de Cogan, enfermedad de la aglutinina fría, infección por rubéola congénita, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, crioglobulinemia, síndrome de Cushing, dermatomiositis, lupus discoide, síndrome de Dressler, síndrome de Eaton-Lambert, infección por ecovirus, encefalomielitis, oftalmopatía endocrina, infección por el virus de Epstein-Barr, herpes equino, eritematosis, síndrome de Evan, síndrome de Felty, fibromialgia, ciclitis de Fuch, atrofia gástrica, alergia gastrointestinal, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad de Graves, enfermedad de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein, atrofia suprarrenal idiopática, fibritis pulmonar idiopática, nefropatía IgA, enfermedades inflamatorias intestinales, diabetes mellitus insulín dependiente, artritis juvenil, diabetes mellitus juvenil (de tipo I), síndrome de Lambert-Eaton, laminitis, liquen plano, hepatitis lupoide, linfopenia, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, síndromes poliglandulares, demencia presenil, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, aborto recurrente, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, síndrome de Sampter, esquistosomiasis, síndrome de Schmidt, esclerodermia, síndrome de Shulman, síndrome de Sjorgen, oftalmía simpática, lupus eritematoso sistémico, arteritis temporal, tiroiditis, trombocitopenia, tirotoxicosis, necrólisis epidérmica tóxica, resistencia a la insulina de tipo B, diabetes mellitus de tipo I, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo, granulomatosis de Wegener.

Preferentemente, la enfermedad se selecciona entre cáncer de colon, pulmón, mama, cabeza/cuello, próstata, piel, estómago/gastrointestinal, vejiga, glioma, renal, ovario, tiroides y hueso.

En un sexto aspecto de la invención, se proporciona un proceso de fabricación de un compuesto como se define en el primer o segundo aspectos, comprendiendo el proceso las siguientes etapas:

- (i) proporcionar un agente terapéutico;
- (ii) proporcionar una molécula portadora;
- (iii) conjugar el agente terapéutico y la molécula portadora en presencia de al menos un disolvente aprótico polar y un tampón acuoso.

La expresión "disolvente aprótico" significa un disolvente que no tiene grupos OH y que, por lo tanto, no puede donar un enlace de hidrógeno.

Los disolventes apróticos polares apropiados son, entre otros, el grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO); acetonitrilo; N,N-dimetilformamida (DMF); dimetilacetamida (DMA); HMPA; dioxano; tetrahidrofurano (THF); disulfuro de carbono; glima y diglima; 2-butanona (MEK); sulfolano; nitrometano; N-metilpirrolidona; piridina; y acetona. Los expertos en la materia conocen bien otros disolventes apróticos polares que pueden utilizarse.

La etapa de conjugar el agente terapéutico y la molécula portadora como parte de este proceso se lleva a cabo preferentemente utilizando uno cualquiera o una combinación de los siguientes parámetros:

- una temperatura comprendida entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 37 °C, preferentemente entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 30 °C.

- un pH comprendido entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 10,0, preferentemente entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 9.
- durante entre 0,1 y 48 horas.

5 El procedimiento de la invención también puede incluir una o más etapas adicionales seleccionadas entre las siguientes:

(iv) utilización de excipientes para facilitar la reacción

(v) preincubación de los componentes de disolventes y tampón para minimizar los efectos adversos del mezclado

(vi) adición controlada en el tiempo de los componentes de la reacción

10 (vii) mezcla del compuesto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica.

Ejemplos

A continuación, se describirán ejemplos que encarnan la invención con referencia a las siguientes figuras, en las que:

Figura 1. Accesibilidad a la superficie/disolventes de residuos de aminoácidos en dominios variables humanos

15 Modificado de Knappik *et al*, (2000), J. Mol. Biol., 296, 57-86. La escala de grises indica el porcentaje de accesibilidad a la superficie/disolventes, de oscuro (= alta) a claro (= baja). Esquema de numeración según Honegger A. y Pluckthun A. [J. Mol. Biol., 2001, 309:657-670]. Aproximadamente el 70 % se considera predominantemente expuesto a disolventes.

Figura 2. Purificación de scFv-TCT

20 Carril 1: Marcadores moleculares

Carril 2: Lisado aclarado después del 2º paso a través de la resina Ni-NTA

Carril 3: Lavado final con tampón de lavado 1

Carril 4: Primer lavado con tampón de lavado 2

Carril 5: Fracción de elución

25 Carril 6: Fracción de elución agrupada tras diálisis en tampón de escisión TEV. El rectángulo indica la fusión-TCT.

Carril 7: Dieciséis horas después del inicio de la escisión TEV. El cuadrado superior indica el scFv escindido (TCT). El cuadrado inferior indica el compañero de fusión de la tiorredoxina escindida.

Carril 8: Marcadores moleculares

30 Carril 9: TCT escindido

Carril 10: Proteínas que permanecen unidas al Ni-NTA

Carriles 11-18: Fracciones de la columna de exclusión por tamaño (35 kDa), de la figura 20

Figura 3. Purificación de scFv-TCT mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex-75 en tampón PBS

35 Pico 1: demasiado diluido para aparecer en el gel PAGE teñido con Coomassie, contaminantes de alto peso molecular

Pico 2: Agregados de alto peso molecular de scFv TCT.

Pico 3: TCT scFv monomérico puro, correspondiente a los carriles 11-18 del gel (figura 19)

Figura 4. SDS-PAGE de conjugados de ScFv (TCT)-elipticina

40 Conjugados de elipticina (compuesto 21). 1 = 32 equivalentes, DMSO al 14 %; 2 = 16 equivalentes, DMSO al 14 %; 3 = 16 equivalentes, DMSO al 6 %; D = dializado, Z = desalado en columna Zeba; CS = reacción bruta soluble; P = reacción bruta insoluble/precipitada. Carga de la muestra = 2,4 µg (ADC), 1,9 µg (scFv).

Marcadores de Pm (M), kDa de arriba a abajo: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10

Figura 5. UV-Vis de conjugados de scFv (TCT)-elipticina

Figura 6. SDS-PAGE que compara los conjugados de elipticina y PEG-elipticina scFv

5 Conjugados de elipticina (compuesto 21) y PEG-elipticina (compuesto 23). 1 = scFv (TCT)-PEG-elipticina, 20 equivalentes; 2 = scFv (TCT)-elipticina, 20 equivalentes; 3 = scFv (TCT)-PEG-elipticina, 32 equivalentes; 4 = scFv (TCT)-PEG-elipticina, 64 equivalentes; Z = desalado en columna Zeba; CS = reacción bruta soluble; P = reacción bruta insoluble/precipitada. Carga de la muestra = 1,8 µg.

Marcadores de Pm (M), kDa de arriba a abajo: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10

Figura 7. SDS-PAGE de la muestra 2: Conjugados de scFv (TCT)-elipticina

10 D = dializado; Z = desalado en columna Zeba; C = reacción bruta soluble; P = reacción bruta insoluble/precipitada. El = elipticina, carga de la muestra = 2,5 µg. Marcadores de Pm (M), kDa de arriba a abajo: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10

Figura 8. SDS-PAGE de la muestra 4: Conjugados de IgG-elipticina completos

15 D = dializado; Z = desalado con columna Zeba; C = reacción bruta soluble; P = reacción bruta insoluble/precipitada, El = Elipticina. Carga de la muestra = 2,5 µg. Marcadores de Pm (M), kDa de arriba a abajo: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10

Figura 9. SDS-PAGE de la conjugación en dos etapas de derivados de doxorubicina con C6.5 scFv

Panel superior, conjugados de HMFG1 IgG, panel inferior conjugados de C6.5 scFv.

20 HMFG1/C6 = anticuerpo libre, S = fracción soluble, P = precipitado, A = conjugados de doxorubicina-maleimida (compuesto 12), B = conjugados de doxorubicina-PEG-maleimida (compuesto 48).

Marcadores de Pm (M), kDa de arriba a abajo: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10

Figura 10. ELISA del antígeno HER2 de C6.5 scFv conjugado con el conector SPDP

Figura 11. Gel de SDS-PAGE de ADC DE ScFv (TCT)-cemadotina después de la purificación con HPLC-

25 Marcadores de Pm (M), kDa de arriba a abajo: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10. Conjugados de cemadotina (compuesto 2) (compuesto 69). 1 = 16 equivalentes de fármaco; 2 = 48 equivalentes de fármaco; 3 = 112 equivalentes de fármaco; S = purificación HPLC-SEC; Z = intercambio de tampón Zeba posterior.

Figura 12. ADC de scFv y scFv-cemadotina analizados por HPLC-SEC

a) Marcadores de calibración para la columna G2000SWxl SEC para confirmar los tamaños de las proteínas y conjugados eluidos. La columna se procesó a 1 ml/min en PBS/isopropanol al 20 %. Los valores fueron:

t_R (min)	Peso molecular (kDa)	Muestra
6,43	80	Alcohol deshidrogenasa
8,48	30	Anhidrasa carbónica
11,25	13	Lisozima
10,9	<1	Cemadotina

30 b) Trazado superior, scFv (TCT), trazado inferior, ADC de scFv (TCT)-cemadotina muestra-1 análisis por SEC-HPLC, La columna se procesó a 0,5 ml/min en PBS/isopropanol al 20 %. c) Trazado superior, ADC de scFv (TCT)-cemadotina muestra-2, trazado central, ADC de scFv (TCT)-cemadotina muestra-3 análisis por SEC-HPLC, trazado inferior-Espectro UV-vis que confirma el contenido de proteínas/péptidos. La columna se procesó a 0,5 ml/min en PBS/isopropanol al 20 %.

Figura 13. (a) TIC, (b) ESI-MS, (c) MS desconvolucionado, y DAR calculado de la muestra 2 de ADC de scFv (TCT)-cemadotina

Figura 14. (a) TIC, (b) ESI-MS, (c) MS desconvolucionado, y DAR calculado de la muestra 1 de ADC de scFv (TCT)-cemadotina

Figura 15. (a) TIC, (b) ESI-MS, (c) MS desconvolucionado, y DAR calculado de la muestra 3 de ADC de scFv (TCT)-cemadotina

5 Figura 16. (a) TIC, (b) ESI-MS, (c) MS desconvolucionado, y DAR calculado del ScFv (TCT) Figura 17. MALDI-MS de scFv (TCT)

Figura 18. MALDI-MS de ADC de scFv (TCT)-cemadotina muestra 1

Figura 19. MALDI-MS de ADC de scFv (TCT)-cemadotina muestra 2

Figura 20. MALDI-MS de ADC de scFv (TCT)-cemadotina muestra 3

10 Figura 21. ELISA de ADC de scFv (TCT)-cemadotina en HER2

Figura 22. SDS-PAGE de ADC de scFv (TCT)-cemadotina

15 Fármaco P5C5 (compuesto 6) y conjugados (compuesto 71). 1 = scFv (TCT)-P5C5, 30 equivalentes; 2 = scFv (TCT)-P5C5, 112 equivalentes; C = mezcla bruta de reacción; S = muestra tras purificación SEC y concentración; F = muestra final tras purificación SEC, concentración e intercambio tampón. Carga de la muestra = 2 µg.

Marcadores de Pm (M), kDa de arriba a abajo: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10

Figura 23. Trazados analíticos por HPLC de las muestras tras la purificación SEC - controladas a 280 nm

a) Trazado superior, scFv (TCT), trazado intermedio, ADC de scFv (TCT)-P5C5 (30 equiv), trazado inferior ADC de scFv (TCT)-P5C5 (112 equiv). La columna se procesó a 0,5 ml/min en PBS/isopropanol al 20 %.

20 b) Trazado izquierda, Comparación de scFv y ADC de scFv de (a), que muestra una retención más temprana debido a la carga de fármaco (15,7 y 15,9 min en comparación con la elución de scFv de 16,9 min), pero picos monoméricos no agregados, trazado derecho- UV-vis de uno de los ADC que muestra el espectro de proteínas/péptidos. La columna se procesó a 0,5 ml/min en PBS/isopropanol al 20 %.

Figura 24. SDS-PAGE de diversos ADC

25 Fármaco P5C5 (compuesto 6), fármaco cemadotinaC5 (compuesto 4) y conjugados (compuesto 71). 1 = scFv (TCT)-P5C5, 16 equivalentes; 2 = scFv (TCT)-P5C5, 30 equivalentes; 3 = scFv (TCT)-P5C5, 112 equivalentes; 4 = trastuzumab-P5C5, 16 equivalentes; 5 = trastuzumab-P5C5, 32 equivalentes; 6-7 = scFv (TCT)-cemadotinaC5; 8 = trastuzumab-cemadotina-C5; Z = muestra final desalada de Zeba; Sc = muestra tras HPLC-SEC y concentración; C = mezcla de reacción bruta. Carga de la muestra = 19 µg.

30 Marcadores de Pm (M), kDa de arriba a abajo: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10.

Figura 25. Trazados de purificación por HPLC de conjugados de trastuzumab (A280 nm) El trazado superior muestra la IgG sin trastuzumab, los 3 trazados inferiores muestran diversos ADC a diferentes equivalentes de reacción de conjugación. Las muestras se procesaron en una columna G3000SWxl calibrada con marcadores. La columna se procesó a 0,5 ml/min en PBS/isopropanol al 20 %. Los marcadores eluyeron de la siguiente manera:

Peso molecular (kDa)	Tiempo de retención (minutos)	Muestra
223,8	18,1	beta amilasa
146,8	18,9	alcohol deshidrogenasa
66,5	21,2	BSA
29	23,7	anhidrasa carbónica
14,5	29,7	lisozima

35 Las IgG (tiempo de retención = 11,7 min) y las IgG-ADC (tiempo de retención = 10,9-11,4 min) eluyen todas en torno a 150 kDa, lo que indica poca o ninguna agregación.

Figura 26. Trazados de purificación por HPLC de los conjugados de trastuzumab (A280 nm) de la figura 25 superpuestas para

comparación Pico 1 = trastuzumab, 2 = trastuzumab-P5C5 (reacción de conjugación de 16 equivalentes), 3 = 2 = trastuzumab-cemadotina (reacción de conjugación de 16 equivalentes), 2 = trastuzumab-P5C5 (reacción de conjugación de 32 equivalentes)

Figura 27. Trazados de purificación por HPLC de los conjugados de scFv (TCT)-P5C5 (A280 nm) Los ADC de scFv (TCT)-P5-C5 tuvieron tiempos de retención más rápidos (15,7 min, 15,6 min y 15,4 con el aumento de los equivalentes de conjugación y, por lo tanto, de DAR) que el scFv libre (tiempo de retención = 16,9 min). Los tiempos de retención de scFv (TCT)-cemadotina fueron de 16,1 min y 15,7 con el aumento de DAR). Todos permanecieron en el intervalo de scFv monomérico con poca o ninguna agregación. La columna se procesó a 0,5 ml/min en PBS/isopropanol al 20 %.

Figura 28. Espectro de absorción UV/vis de trastuzumab-P5C5 en PBS

Figura 29. Espectro de absorción UV/vis de los conjugados de scFv (TCT)-P5C5 en PBS

Figura 30. ELISA de ADC de scFv (TCT) P5-C5 en HER2

Figura 31. Actividad de destrucción celular por dosis-respuesta de ADC basados en P5C5 en células SKBr3 que expresan HER2

Figura 32. Actividad de destrucción celular por dosis-respuesta del fármaco P5C5 libre en células SKBr3 que expresan HER2 y células U87 negativas a HER2

Figura 33. Actividad de destrucción celular por dosis-respuesta de ADC basados en P5C5 en células U87 negativas a HER2

Figura 34. Pruebas ELISA de sueros de ratones candidatos inmunizados con ADC de scFv-cemadotina

Figura 35. ELISA de clones de hibridoma candidatos para MAb anti-scFv-cemadotina

Figura 36. Detección en sobrenadante de medio de hibridoma candidato de Mab murino por transferencia Western, utilizando un anticuerpo secundario antiperoxidasa de ratón

Figura 37. Medio condicionado de hibridoma candidato utilizado para detectar ADC de scFv-cemadotina por transferencia Western

Las transferencias 1-3 y 5-7, 10 y 11 se cargan de la siguiente manera: Marcador; ADC; TCT; y cemadotina libre.

Las transferencias 4 y 8 se cargan de la siguiente manera: Marcador; ADC; y cemadotina libre.

Figura 38. Eliminación sanguínea de conjugados de scFv (TCT)-cemadotina radiomarcados.

Conjugado de cemadotina (compuesto 69).

Figura 39. Captación por el bazo de conjugados de scFv (TCT)-cemadotina radiomarcados. Conjugado de cemadotina (compuesto 69).

Figura 40. Perfil farmacocinético que muestra la depuración sanguínea de scFv-TCT y scFv-TCT-ADC medida mediante ELISA de anticuerpos totales.

Conjugado de cemadotina (compuesto 69).

Figura 41. Perfil farmacocinético que muestra la depuración sanguínea de scFv-TCT-ADC medida mediante ELISA de ADC totales.

Conjugado de cemadotina (compuesto 69).

Figura 42. Perfil farmacocinético comparativo que muestra similitudes en la depuración sanguínea de scFv-TCT y scFv-TCT-ADC medida en ambos ensayos utilizados en figuras 40 y 41.

Figura 43. Estudios de regresión tumoral en ratones atímicos portadores de xenoinjertos tumorales SKBr3 tratados con dos DAR de ADC de scFv (TCT)-P5C5.

Conjugado de P5C5 (compuesto 71).

Figura 44. Trazados de HPLC SEC (A280 nm) para (A) conjugados purificados de scFv (TCT1067)-acetato y (B) conjugados purificados de scFv (TCT)-acetato procesados a 0,5 ml/min y comparados con los respectivos anticuerpos no conjugados.

Figura 45. Datos de LCMS para el conjugado de scFv (TCT)-acetato.

5 (A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B) es la masa desconvolucionada para el pico principal a los 10 min.

Figura 46. Datos de LCMS para el conjugado de scFv (TCT1067)-acetato.

(A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B) es la masa desconvolucionada para el pico principal a 10,3 min.

Figura 47. Trazados de HPLC SEC (A280 nm) para los conjugados purificados (A) ADC 1 scFv (TCT)-MMAF-C5 y (B) ADC 2 scFv (TCT)-MMAF-C5 procesados a 1 ml/min y comparados con el anticuerpo no conjugado.

10 Figura 48. Gel reductor de SDS-PAGE (al 12 %) que muestra ADC 2 scFv (TCT)-MMAF-C5 en comparación con el anticuerpo scFv (TCT) no conjugado. Se muestran los marcadores de tamaño utilizados.

Figura 49. Datos de LCMS para ADC 1 scFv (TCT)-MMAF-C5.

(A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B) es la masa desconvolucionada para el pico principal a 10,2 min.

Figura 50. Datos de LCMS para ADC 2 scFv (TCT)-MMAF-C5.

15 (A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B-E) muestran las masas desconvolucionadas para los picos principales a 10-12 min.

Figura 51. Trazados de HPLC SEC (A280 nm) para los conjugados purificados (A) ADC 1 scFv (TCT1067)-MMAF-C5 y (B) ADC 2 scFv (TCT1067)-MMAF-C5 a 1 ml/min y comparados con el anticuerpo no conjugado.

Figura 52. Datos de LCMS para ADC 1 y ADC 2 scFv (TCT1067)-MMAF-C5.

20 (A) y (B) son los datos de LCMS para ADC 1 scFv (TCT1067)-MMAF-C5, en los que (A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B) es la masa desconvolucionada para los picos principales entre 9,3-10,6 min. (C) y (D) son los datos de LCMS para ADC 2 scFv (TCT1067)-MMAF-C5, en los que (C) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (D) es la masa desconvolucionada para los picos principales entre 9,9-12 min.

25 Figura 53. Gel reductor de SDS-PAGE (al 12 %) que muestra los ADC 1 y 2 scFv (TCT1067)-MMAF-C5 comparación con scFv (TCT1067) anticuerpo no conjugado. Marcadores de tamaño como se muestra en la figura 48.

Figura 54. Trazados de HPLC SEC (A280 nm) para ADC 1 scFv (TCT1067)-P5-C5 procesado a 1 ml/min y comparados con el anticuerpo no conjugado.

30 Figura 55. Gel reductor de SDS-PAGE (al 12 %) que muestra el ADC 1 scFv (TCT1067)-P5-C5 en comparación con el anticuerpo scFv (TCT1067) no conjugado.

Marcadores de tamaño como se muestra en la figura 48.

Figura 56. Datos DE LCMS para ADC 1 scFv (TCT1067)-P5-C5.

(A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B) es la masa desconvolucionada para el pico principal a 8,2 min.

35 Figura 57. Trazados de HPLC SEC (A280 nm) para ADC 1 scFv (TCT)-AF-C5 procesado a 0,5 ml/min y comparados con el anticuerpo no conjugado.

Figura 58. Datos de LCMS para ADC 1 scFv (TCT)-AF-C5.

(A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B) es la masa desconvolucionada para el pico principal a los 9,5 min.

40 Figura 59. Trazados de HPLC SEC (A280 nm) para ADC 1, 2 y 3 scFv (TCT1067)-AF-C5 procesados a 1 ml/min y comparados con el anticuerpo no conjugado.

Figura 60. Datos de LCMS para ADC 1, 2 y 3 scFv (TCT)-AF-C5.

(A) y (B) son los datos de LCMS para ADC 1 scFv (TCT), en los que (A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B) es la masa desconvolucionada para el pico principal a 8,1 min. (C) y (D) son los datos de LCMS para ADC 2 scFv (TCT)-AF-C5, en los que (C) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (D) es la masa desconvolucionada

para el pico principal a 9,4 min. (E) y (F) son los datos de LCMS para ADC 3 scFv (TCT)-AF-C5, en los que (E) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (F) es la masa desconvolucionada para el pico principal a 9,9 min.

Figura 61. Gel reductor de SDS-PAGE (al 12 %) que muestra ADC 1, 2 y 3 scFv TCT-AF-C5 en comparación con el anticuerpo scFv (TCT1067) no conjugado.

5 Marcadores de tamaño como se muestra en la figura 48.

Figura 62. Trazados de HPLC SEC (A280 nm) para ADC 1 scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG9 procesado a 1 ml/min y comparados con el anticuerpo no conjugado.

Figura 63. Datos de LCMS para ADC 1 scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG9. (A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B-E) muestra las masas desconvolucionadas para los picos principales.

10 Figura 64. Gel reductor de SDS-PAGE (al 12 %) que muestra EL ADC 1 scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG9 ADC 1 en comparación con el anticuerpo scFv (TCT1067) no conjugado.

Marcadores de tamaño como se muestra en la figura 48.

Figura 65. Trazados de HPLC SEC (A280 nm) para ADC 1 scFv (TCT1067)-MMAF-C5-P5-C5 procesado a 1 ml/min y comparados con el anticuerpo no conjugado.

15 Figura 66. Datos DE LCMS para ADC 1 scFv (TCT1067)-MMAF-C5-P5-C5.

(A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B-F) muestran las masas desconvolucionadas para los picos principales.

Figura 67. Trazados de HPLC SEC (A280 nm) para ADC 1 y 2 scFv (TCT1067)-maitansina-PEG(12) DM1 procesados a 1 ml/min y comparadas con el anticuerpo no conjugado.

20 Figura 68. Datos de LCMS para ADC 1 y 2 scFv (TCT1067)-maitansina-PEG(12) DM1.

(A) y (B) son los datos de LCMS para ADC 1 scFv (TCT1067)-maitansina-(PEG12) DM1, en los que donde (A) es el trazado de LCMS (UV y TIC), y (B) muestra las masas desconvolucionadas para el pico principal. (C) y (D) son los datos de LCMS para ADC 2 scFv (TCT1067)-maitansina-PEG(12) DM1, en los que donde (C) es el trazado de LCMS UV y (D) es el trazado de LCMS TIC que indica la DAR de las especies presentes en la muestra.

25 Figura 69. Gel reductor de SDS-PAGE (al 12 %) que muestra ADC 1 y 2 scFv (TCT1067)-maitansina-PEG(12) DM1 en comparación con el anticuerpo scFv (TCT1067) no conjugado.

Los marcadores de tamaño son los indicados en (A)

30 Figura 70. Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie de las reacciones 1, 2, 4, 5 y 6 descritas en la tabla 45. La reacción 3 no produjo ninguna proteína soluble.

M = marcadores de peso molecular.

P = scFv no conjugado (panitumumab),

T = scFv no conjugado (TCT1067).

35 Las especies de mayor DAR migran más lentamente debido al aumento del peso molecular, mostrando los conjugados scFv (TCT1067) un aumento de la DAR. Marcadores de tamaño como se muestra en la figura 68.

Figura 71. Trazados de HPLC SEC (A280 nm) para (A) ADC de scFv (panitumumab)-AF-C5 y (B) scFv (TCT1067)-AF-C5 procesados a 1 ml/min y comparados con los anticuerpos no conjugados.

Figura 72. Datos de LCMS para ADC 1, 2 y 4-6 scFv (Pani-AF-C5).

40 (A) y (B) son los datos de LCMS para ADC 1 scFv (Pani-AF-C5), en los que (A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B) muestra las masas desconvolucionadas para los picos principales de la muestra 1. (C) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (D) muestra las masas desconvolucionadas para los picos principales de la muestra 2. (E)-(H) son los datos de LCMS para ADC 4-6 scFv (TCT1067-AF-C5), en los que (E) es el trazado de LCMS (UV y TIC) para la muestra 4, (F) muestra las masas desconvolucionadas para el pico principal de la muestra 4, (G) muestra las masas desconvolucionadas para la muestra 5 y (H) muestra las masas desconvolucionadas para la muestra 6.

45 Figura 73. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* del MMAF libre.

Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de la citotoxina MMAF libre en (A) células U87, (B) células SKBr3, (C) células BT474.

Figura 74. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de anticuerpos no conjugados.

5 Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de scFv(TCT1067) no conjugado y trastuzumab en (A) células U87, (B) células BT474, (C) células SKBr3.

Figura 75. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* del anticuerpo no conjugado.

Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de scFv(TCT) no conjugados en células BT474.

Figura 76. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de las ADC basados en MMAF.

10 Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de ADC de fragmentos de anticuerpos scFv (TCT)-MMAF-C5 DAR 6.6, scFv (TCT0167)-MMAF-C5 DAR 6.4, trastuzumab no conjugado y trastuzumab-MMAF-C5 en (A) células U87, (B) células BT474, (C) células SKBr3.

Figura 77. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de las ADC basados en MMAF.

15 Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de conjugados de fragmentos de anticuerpos scFv (TCT)-MMAF-C5 DAR 8, scFv (TCT0167)-MMAF-C5 DAR 8.7 y trastuzumab-MMAF-C5 en (A) células U87, (B) células BT474, (C) células SKBr3.

Figura 78. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de las ADC basados en P5-C5.

Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de (A) el fármaco P5-C5 libre y (B) los conjugados de fragmentos de anticuerpos scFv (TCT1067)-P5-C5 DAR 10.6 (H1) y DAR 12.5 (H2) en células U87.

Figura 79. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de las ADC basados en P5-C5.

20 Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de (A) el fármaco P5-C5 libre y (B) los conjugados de fragmentos de anticuerpos scFv (TCT1067)-P5-C5 DAR 10.6 (H1) y DAR 12.5 (H2) en células SKBr3.

Figura 80. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de las ADC basados en P5-C5.

Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de (A) el fármaco P5-C5 libre y (B) los conjugados de anticuerpos scFv (TCT1067)-P5-C5 DAR 10.6 (H1) y trastuzumab DAR6 en células BT474.

25 Figura 81. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de auristatina F libre.

Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de la citotoxina auristatina libre en (A) células U87, (B) células SKBr3, (C) células BT474.

Figura 82. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de ADC basados en auristatina F.

30 Perfil de dosis-respuesta de destrucción celular de los ADC de fragmentos de anticuerpos scFv (TCT1067)-AF-C5, DAR 2,7 (L), scFv (TCT1067)-AF-C5, DAR 6.2 (M), scFv (TCT1067)-AF-C5, DAR 11,8 (H) y trastuzumab-AF-C5, DAR 4,8 en (A) células U87, (B) células BT474, (C) células SKBr3, (D) células NCI-N87.

Figura 83. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* del fármaco DM1 libre.

Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de la citotoxina DM1-PEG9 libre en (A) células U87, (B) células SKBr3

35 Figura 84. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de ADC basados en DM1-(dPEG12).

Perfiles de dosis-respuesta de los ADC de fragmentos de anticuerpos scFv (TCT1067)-DM1-(dPEG12), DAR 3.5 (L), scFv (TCT1067)-DM1-(dPEG12) DAR 5.5 (M), scFv (TCT1067)-DM1-(dPEG12), DAR 8 (H) en (A) células U87, (B) células SKBr3.

Figura 85. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* del fármaco MMAE libre.

40 Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de la citotoxina MMAE libre en (A) células U87, (B) células SKBr3

Figura 86. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de las ADC basados en MMAE.

45 Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de los ADC de fragmentos de anticuerpos scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG9, DAR9 y Trastuzumab-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG9, DAR 4 en (A) células U87, (B) células BT474, (C) células SKBr3

Figura 87. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* del fármaco auristatina libre durante 4 y 96 horas.

Perfiles de dosis-respuesta de destrucción celular de la citotoxina auristatina libre en células SKBr3 para (A) 4 y (B) 96 horas de incubación

5 Figura 88. Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de los conjugados de trastuzumab y scFv (1067)-auristatina-C5 durante 4 y 96 horas.

Perfiles de muerte celular dosis-respuesta de trastuzumab-auristatina-C5 y scFv (1067)-auristatina-C5 en células SKBr3 durante (A) 4 y (B) 96 horas de incubación.

Figura 89. Imágenes fluorescentes de secciones de tumores BT474 después de 2 horas de administración de scFv e IgG-ADC.

10 (A) Conjugado de scFv de alta afinidad (TCT1067)-P5C5, (B) Conjugado de scFv de afinidad intermedia (TCT)-P5C5, (C) Conjugado de trastuzumab-P5C5 (D) Control administrado con solución salina.

Figura 90. Análisis farmacocinético de la depuración de scFv (TCT)-MMAF-C5 y controles (compuestos 118) en un modelo murino.

15 Se inyectó una única dosis intravenosa en ratones BALB/c hembra a 5 mg/kg. Se tomaron muestras de plasma en los puntos temporales indicados y se analizaron mediante ELISA con detección de antiproteínas (proteína total, indicada con líneas continuas, símbolos negros) y, cuando procedía, detección de antifármacos (ADC totales, indicado con líneas discontinuas, símbolos blancos). Se muestra el EE de la media de cada grupo y triplicados experimentales. ADC scFv (TCT)-MMAF-C5 (círculos) (n = 3), trastuzumab-MMAF-C5 (triángulos) (n = 3) y scFv (TCT) (cuadrados) (n = 4). Los valores de scFv de control (TCT) proceden de otro estudio de PK.

20 Figura 91. Análisis farmacocinético de la depuración de scFv (TCT1067)-MMAF-C5 y controles (compuestos 118) en un modelo murino.

25 Se inyectó una única dosis intravenosa en ratones BALB/c hembra a 5 mg/kg. Se tomaron muestras de plasma en los puntos temporales indicados y se analizaron mediante ELISA con detección de antiproteínas (proteína total, indicada con líneas continuas, símbolos negros) y, cuando procedía, detección de antifármacos (ADC totales, indicado con líneas discontinuas, símbolos blancos). Se muestra el EE de la media de cada grupo y triplicados experimentales. ADC scFv (TCT1067)-MMAF-C5 (círculos) (n = 3), trastuzumab-MMAF-C5 (triángulos) (n = 3) y scFv (TCT1067) (cuadrados) (n = 3).

30 Figura 92. Análisis farmacocinético de la depuración de scFv (TCT)-P5C5 y controles (compuestos 71) en un modelo murino.

35 Se inyectó una única dosis intravenosa en ratones BALB/c hembra a 5 mg/kg. Se tomaron muestras de plasma en los puntos temporales indicados y se analizaron mediante ELISA con detección de antiproteínas (proteína total, indicada con líneas continuas, símbolos negros) y, cuando procedía, detección de antifármacos (ADC totales, indicado con líneas discontinuas, símbolos blancos). Se muestra el EE de la media de cada grupo y triplicados experimentales. ADC scFv (TCT)-P5C5 (círculos) (n = 3), trastuzumab-P5C5 (triángulos) (n = 3) y scFv (TCT) (cuadrados) (n = 4). Los valores de scFv de control (TCT) y trastuzumab-P5C5 proceden de otro estudio de PK.

Figura 93. Análisis farmacocinético de la depuración de scFv (TCT1067)-AF-C5 y control (compuestos 122) en un modelo murino.

40 Se inyectó una sola dosis intravenosa en ratones BALB/c hembra a 2 mg/kg. Se tomaron muestras de plasma en los puntos temporales indicados y se analizaron mediante ELISA con detección de antiproteína (proteína total, indicada con líneas continuas, símbolos negros) y, cuando procedía, detección de antifármaco (ADC totales, indicado con líneas discontinuas, símbolos blancos). Se muestra el EE de la media de cada grupo y triplicados experimentales. ADC scFv (TCT1067)-AF-C5 (círculos) (n = 3) y scFv (TCT1067) (cuadrados) (n = 3).

45 Figura 94. Análisis farmacocinético de la depuración de scFv (TCT1067)-DM1 (dPEG₁₂) y control (compuestos 124) en un modelo murino.

50 Se inyectó una sola dosis intravenosa en ratones BALB/c hembra a 2 mg/kg. Se tomaron muestras de plasma en los puntos temporales indicados y se analizaron mediante ELISA con detección de antiproteína (proteína total, indicada con líneas continuas, símbolos negros) y, cuando procedía, detección de antifármaco (ADC totales, indicado con líneas discontinuas, símbolos blancos). Se muestra el EE de la media de cada grupo y triplicados experimentales. ADC scFv (TCT1067)-DM1 (dPEG₁₂) (círculos) (n = 3) y scFv (TCT1067) (cuadrados) (n = 3).

Figura 95. Análisis farmacocinético de la depuración de scFv (TCT1067)-P5-C5 y control (compuestos 124) en un modelo de rata.

(A) Se inyectó una sola dosis intravenosa en ratas macho Sprague-Dawley a 4 mg/kg. Se tomaron muestras de plasma en los puntos temporales indicados y se analizaron mediante ELISA con detección de antiproteína (proteína total, indicada con líneas continuas, símbolos negros) y, cuando procedía, detección de antifármaco (ADC totales, indicado con líneas discontinuas, símbolos blancos). Se muestra el EE de la media de cada grupo y triplicados experimentales. ADC scFv (TCT1067)-P5C5 (círculos) (n = 3) y scFv (TCT1067) (cuadrados) (n = 3). (B) Orina concentrada en 10 veces recogida durante 24 horas analizada en un chip SPR HER2-Biacore para las ratas inyectadas con scFv (TCT1067), 3 muestras de animales. Se muestra la referencia de scFv. Los cambios de volumen en las muestras de orina se deben a la concentración de los componentes de la orina. (C) Orina concentrada en 10 veces recogida durante 24 horas analizada en un chip SPR HER2-Biacore para el conjugado de scFv (TCT1067)-P5C5 inyectado en ratas, 3 muestras de animales. Se muestra la referencia de scFv (TCT1067)-P5C5. Los cambios de volumen en las muestras de orina se deben a la concentración de los componentes de la orina.

Figura 96. Inhibición o erradicación del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto BT474 con scFv (TCT1067)-MMAF-C5, conjugados de trastuzumab-MMAF-C5 (compuestos 118) y agentes terapéuticos de MMAF libre.

(A) El volumen tumoral frente al tiempo (días) se representa con 3 dosis de ADC de scFv (TCT1067)-MMAF-C5 (círculos), 2 dosis de conjugado de trastuzumab-MMAF-C5 (triángulos) y controles (cuadrados). Cada grupo consta de 6 animales y se muestra el EE de la media. Se muestra una vista ampliada de los primeros 30 días. El segundo gráfico es una ampliación de una parte del primero (la región recuadrada). (B) El cambio porcentual en el peso corporal desde el inicio del tratamiento de los mismos grupos en (A).

Figura 97. Inhibición o erradicación del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto BT474 con scFv (TCT)-MMAF-C5, conjugados de trastuzumab-MMAF-C5 (compuestos 118) y agentes terapéuticos de MMAF libre.

(A) El volumen tumoral frente al tiempo (días) se representa con 2 dosis de ADC de scFv (TCT1067)-MMAF-C5 (círculos), 2 dosis de ADC de scFv (TCT)-MMAF-C5 (cruces), 2 dosis de conjugado de trastuzumab-MMAF-C5 (triángulos) y controles (cuadrados). Cada grupo consta de 6 animales y se muestra el EE de la media. (B) El cambio porcentual en el peso corporal desde el inicio del tratamiento de los mismos grupos en (A).

Figura 98. Inhibición o erradicación del crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto BT474 con conjugados de scFv (TCT1067)-P5C5 y trastuzumab-P5C5 (compuestos 71).

(A) El volumen tumoral frente al tiempo (días) se representa con una pauta posológica de ADC de scFv (TCT1067)-P5-C5 (rombos), una pauta posológica de ADC scFv (TCT1067)-MMAF-C5 (círculos), una pauta posológica de conjugado DE trastuzumab-MMAF (triángulos), una pauta posológica de conjugado DE trastuzumab-P5-C5 (rombos) y controles (cuadrados). Cada grupo consta de 6 animales y se muestra el EE de la media. (B) El cambio porcentual en el peso corporal desde el inicio del tratamiento de los mismos grupos en (A).

Figura 99. Inhibición o erradicación del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano BT474 con conjugados DE scFv (TCT1067)-AF-C5 (121) a dos DAR diferentes.

(A) Se representa el volumen tumoral frente al tiempo (días) para dos agentes terapéuticos, scFv (TCT1067)-auristatinaF (L) con DAR baja, 2,7 y scFv (TCT1067)-auristatinaF (M) DAR intermedia, 5,7 y control con vehículo. Cada grupo consta de 6 animales y se muestra el EE de la media. (B) El cambio porcentual en el peso corporal desde el inicio del tratamiento de los mismos grupos en (A).

Figura 100. Inhibición o erradicación del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano BT474 con conjugados de scFv (TCT1067)-AF-C5 (121) a tres DAR diferentes.

Se representa el volumen tumoral frente al tiempo (días) para dos agentes terapéuticos, scFv (TCT1067)-auristatinaF (L) DAR baja, 2,7 y scFv (TCT1067)-auristatinaF (M) DAR intermedia, 5,7, scFv (TCT1067)-auristatinaF (H) DAR alto, 11 y control con vehículo. Cada grupo consta de 6 animales y se muestra el EE de la media.

Figura 101. SDS PAGE de conjugados scFv (TCT) con TCO-PEG4-NHS.

Los carriles 2-4 son el conjugado de fragmento de anticuerpo (scFv) purificado.

1 = disolución madre de scFv (TCT) no modificada;

2 = conjugado de scFv (TCT) con 4 equivalentes de fármaco;

3 = conjugado de TCT con 6 equivalentes de fármaco;

4 = conjugado de scFv (TCT) con 16 equivalentes de fármaco.

Los carriles 6-8 son conjugados de fragmentos de anticuerpos antes de la purificación.

6 = conjugado de scFv (TCT) con 4 fármaco;

5 7 = conjugado de scFv (TCT) con 6 equivalentes de fármaco;

8 = conjugado de scFv (TCT) con 16 equivalentes de fármaco.

Se muestran los marcadores de tamaño utilizados.

Figura 102. Datos de LCMS para scFv (TCT)-TCO-PEG4.

(A) es el trazado de LCMS (UV y TIC) y (B) es la masa desconvolucionada para el pico principal a 10,76 min.

10 Figura 103: Trazados de HPLC SEC para ADC 1, 2, 3, 4 scFv(TCT-1067)-SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG₅ procesados a 1 ml/min y comparados con el scFv no conjugado (TCT1067). (A) Perfil de absorbancia a 280 nm, (B) Perfil de absorbancia a 360 nm

Figura 104: Gel reductor de SDS-PAGE (al 4-20 %) que muestra los conjugados 1 y 2 scFv (TCT1067)-SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG₅ en comparación con el scFv no conjugado (TCT1067).

15 Figura 105: Gel reductor de SDS PAGE (al 4-20%) que muestra el diacuerpo (TCT)-AF-C5 y los conjugados de scFv (TCT)-AF-C5 frente a sus respectivos anticuerpos no conjugados, diacuerpo(TCT) y scFv (TCT).

Factores comunes a todos los ejemplos

Todos los geles SDS-PAGE son reductores.

Tabla 3. Coeficientes de extinción molar utilizados en los ejemplos

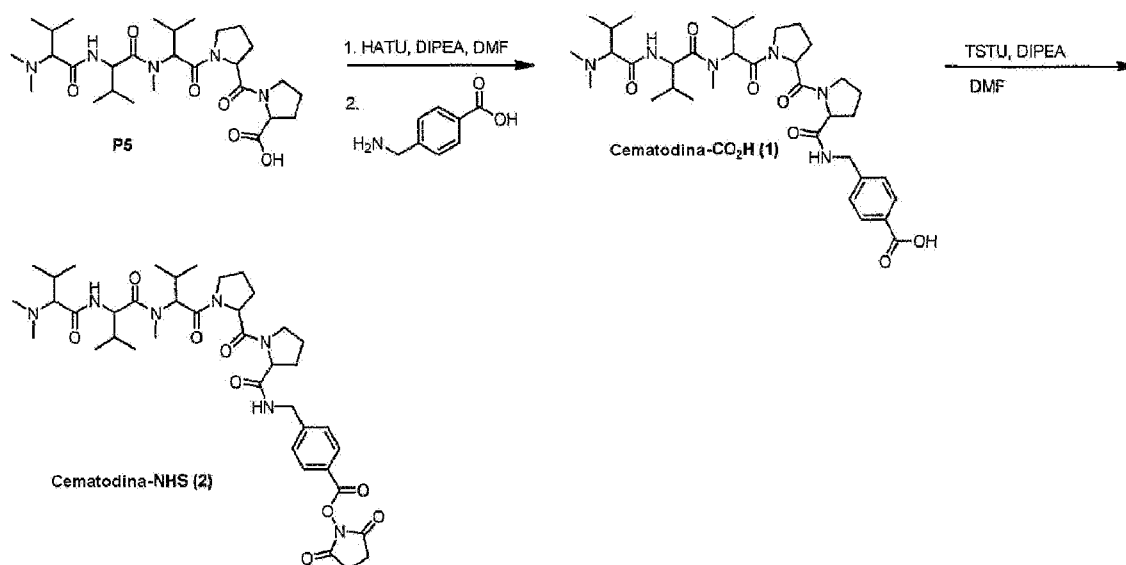
Artículo	Coeficiente de extinción molar
ε280 nm para C6.5 y scFv (TCT)	65422
ε280 nm para HMFG1 IgG	210000
ε343 nm tiona	8080
ε280 nm tiona	5100
εDoxorubicina 488 nm	11294
εDoxarubicina 280 nm	8487
εDoxorubicina-PEG 488 nm	10218
εDoxorubicina-PEG 280 nm	14021
εElíptica 429 nm	3603
εElíptica 280 nm	22990
εElíptica-PEG 429 nm	1810
εElíptica-PEG 280 nm	8838

20

Procedimientos experimentales sintéticos

Los experimentos se llevaron a cabo generalmente en una atmósfera inerte (nitrógeno), especialmente en los casos en que se emplearon reactivos o productos intermedios sensibles al oxígeno o a la humedad, a menos que se indique lo contrario. Los disolventes y reactivos comerciales eran de la mejor calidad disponible y se utilizaron sin más purificación. Los disolventes anhidros se obtuvieron de Acros o Sigma-Aldrich. Las reacciones se siguieron mediante cromatografía en capa fina (tlc), LCMS o HPLC y las purificaciones se llevaron a cabo mediante cromatografía automatizada Biotage utilizando soportes de fase normal o inversa o mediante HPLC de fase inversa. Las fracciones de fase inversa del Biotage o de la HPLC se concentraron mediante liofilización. Los datos de espectrometría de masas se presentan de la LCMS o por inyección directa utilizando electronebulización ("electro-spray", ES) como modo de ionización, a menos que se indique lo contrario. Los desplazamientos químicos de la resonancia magnética nuclear (RMN) de protón y carbono se expresan en partes por millón (ppm) con el disolvente deuterado como referencia interna.

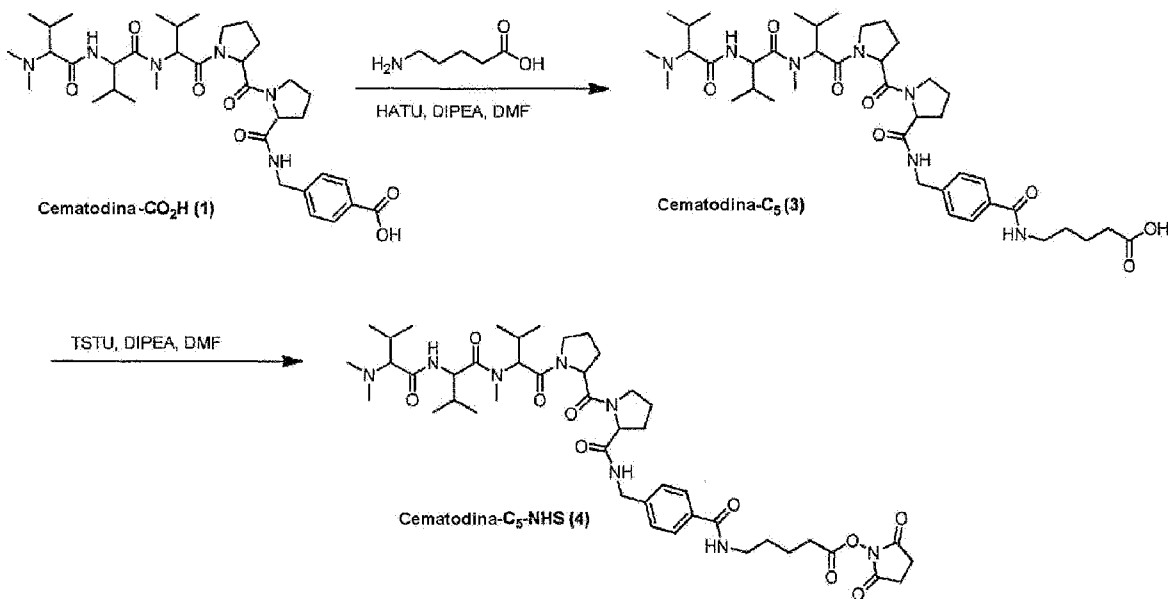
Ejemplo 1: Preparación de cemadotina-NHS (2)



A una disolución agitada de P5 (100 mg, 0,18 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió HATU (62 mg, 0,16 mmol), seguido de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) (63 μl , 0,36 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, la mezcla de reacción se añadió gota a gota durante 10 min a una suspensión de ácido 4-(aminometil)benzoico (30 mg, 0,20 mmol) en DMF (5 ml) y se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 30 min, se concentró a presión reducida y se purificó por HPLC preparativa (MeCN en H_2O [0,1 % TFA]; 4 ml/min; 4 min MeCN al 20 %, 20-23 % durante 2 min, 23-25 % durante 14 min, 25-30 % durante 2 min, 30-80 % durante 3 min, 5 min MeCN al 80 %) recogiendo t_R = 9,96 min para obtener el producto del título 1, 85 mg (69 %) en forma de un sólido blanco. HRMS (m/z) calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}$, 685,4289 [$\text{M} + \text{H}$] encontrado, 685,4307; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,86 (s a, 1H), 9,62 (s a, 1H), 8,92 (s a, 1H), 8,40 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 7,87 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 6,55 (s a, 1H), 4,99 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 4,61-4,51 (m, 2H), 4,42-4,24 (m, 3H), 3,77-3,63 (m, 3H), 3,60-3,51 (m, 2H), 3,09 (s, 3H), 2,78 (s, 3H), 2,75 (s, 3H), 2,32-2,22 (m, 1H), 2,20-1,87 (m, 8H), 1,86-1,69 (m, 3H), 1,00-0,93 (m, 6H), 0,88 (dd, J = 11,8, 6,6 Hz, 6H), 0,71 (d, J = 6,7 Hz, 3H) ppm.

A una solución agitada de ácido cemadotínico 1 (15 mg, 0,02 mmol) y DIPEA (16 μl , 0,09 mmol) en DMF (2 ml) se le añadió TSTU (12 mg, 0,04 mmol) y se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 1 h, se concentró a presión reducida y se purificó por HPLC preparativa (MeCN en H_2O [TFA al 0,1 %]; 4 ml/min; MeCN al 25-35 % durante 20 min, 35-80 % durante 5 min, 2 min a MeCN al 80 %) recogiendo t_R = 12,29 min para obtener el producto del título 2, 13 mg (76 %) en forma de un sólido blanco; HRMS (ES) (m/z) calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{N}_7\text{O}_9$ [$\text{M} + \text{H}$] 782,4453, encontrado: 784,4449; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9,64 (s a, 1H), 9,18-9,13 (m, 1H), 8,93 (s a, 1H), 8,39 (t, J = 6,3 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,85 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,58 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,35 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 6,55 (s a, 4H), 4,99 (d, J = 10,9 Hz, 1H), 4,61 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 4,58-4,52 (m, 2H), 4,42-4,22 (m, 3H), 3,77-3,63 (m, 3H), 3,60-3,51 (m, 2H), 3,08 (s, 3H), 2,89 (s, 3H), 2,81-2,72 (d a, 5H), 2,69-2,66 (m, 1H), 2,32-2,22 (m, 1H), 2,20-2,05 (m, 3H), 2,00-1,87 (m, 3H), 1,85-1,69 (m, 3H), 1,00-0,93 (m, 6H), 0,91-0,81 (m, 6H), 0,71 (d, J = 6,7 Hz, 3H) ppm.

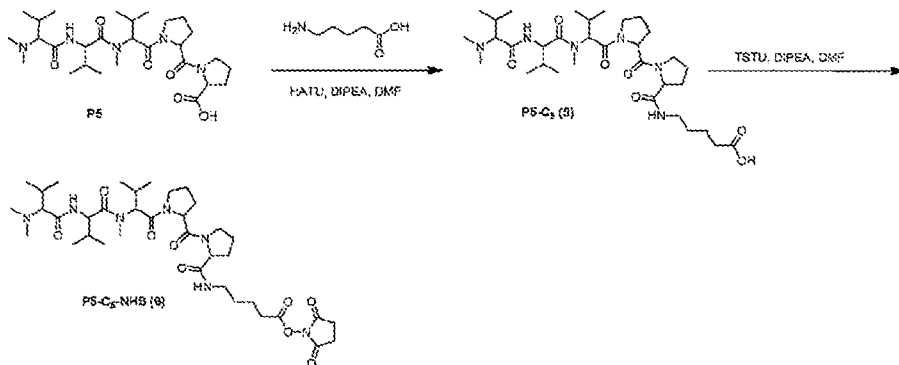
Ejemplo 2: Preparación de cemadotina C_5 -NHS (4)



A una disolución agitada de ácido cematotínico 1 (20 mg, 0,03 mmol) en DMF seca (1,5 ml) se le añadió HATU (10 mg, 0,03 mmol), seguido de DIPEA (10 μ l, 0,06 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 30 min. A continuación, la mezcla de reacción se añadió gota a gota durante 10 min a una suspensión de ácido 5-aminovalérico (3,8 mg, 0,03 mmol) en DMF seca (1,5 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, se concentró a presión reducida y se purificó por HPLC preparativa (MeCN en H₂O [TFA al 0,1 %]; 4 ml/min; 4 min MeCN al 20 %, 20-23 % durante 2 min, 23-25 % durante 14 min, 25-30 % durante 2 min, 30-80 % durante 3 min, 5 min MeCN al 80 %) recogiendo t_R = 12,18 min para obtener el producto del título 3, 20 mg (88 %) en forma de un sólido blanco; HRMS (m/z) calculado para C₄₁H₆₆N₇O₈ [M + H] 784,4973, encontrado: 784,4921; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,64 (s a, 1H), 8,93 (s a, 1H), 8,45 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 8,36 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H), 7,77 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,30 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 6,56 (s a, 2H), 4,99 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H), 4,60-4,51 (m, 2H), 4,42-4,30 (m, 2H), 4,28-4,20 (m, 1H), 3,77-3,62 (m, 1H), 3,60-3,52 (m, 2H), 3,28 (q, *J* = 6,4 Hz, 3H), 3,09 (s, 3H), 2,81 (s, 3H), 2,80-2,70 (m, 3H), 2,35-2,22 (m, 2H), 2,18-1,88 (m, 7H), 1,85-1,58 (m, 7H), 1,29-1,22 (m, 2H), 0,99-0,93 (m, 5H), 0,90-0,81 (m, 8H), 0,71 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H) ppm.

A una disolución agitada de cemarotina C5 3 (20 mg, 0,03 mmol) y DIPEA (10 μ l, 0,06 mmol) en DMF seca (2 ml) se le añadió TSTU (14 mg, 0,05 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 1 h, se concentró a presión reducida y se purificó por HPLC preparativa (MeCN en H₂O [TFA al 0,1 %]; 3 ml/min; MeCN al 25-35 % durante 20 min, 35-80 % durante 5 min, 8 min a MeCN al 80 %) recogiendo t_R = 12,13 min para obtener el producto del título 4, 15 mg (65 %) en forma de un sólido blanco; MS (m/z) 881,5 [$M + H$]; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,64 (s a, 1H), 8,93 (s a, 1H), 8,45 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 8,36 (t, J = 6,1 Hz, 1H), 7,77 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,30 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 6,56 (s a, 2H), 4,99 (d, J = 10,9 Hz, 1H), 4,60-4,51 (m, 2H), 4,42-4,30 (m, 2H), 4,28-4,20 (m, 1H), 3,77-3,62 (m, 3H), 3,60-3,52 (m, 2H), 3,28 (q, J = 6,4 Hz, 3H), 3,09 (s, 3H), 2,81 (s, 3H), 2,80-2,70 (m, 7H), 2,35-2,22 (m, 2H), 2,18-1,88 (m, 7H), 1,85-1,58 (m, 7H), 1,29-1,22 (m, 2H), 0,99-0,93 (m, 5H), 0,90-0,81 (m, 8H), 0,71 (d, J = 6,9 Hz, 2H) ppm.

Ejemplo 3: Preparación de P₅-C₅-NHS (6)

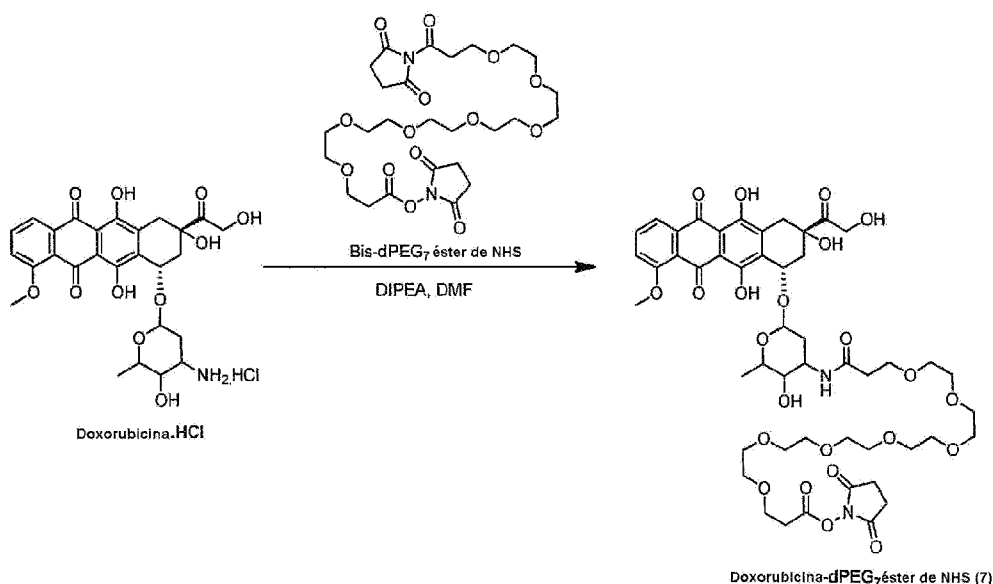


A una solución agitada de P5 (100 mg, 0,18 mmol) en DMF seca (5 ml) se le añadió HATU (62 mg, 0,16 mmol), seguido de DIPEA (63 µl, 0,36 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 30 min. A continuación, la mezcla de reacción se añadió gota a gota durante 10 min a una suspensión de ácido 5-aminovalérico

(23 mg, 0,20 mmol) en DMF seca (5 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, se concentró a presión reducida y se purificó por HPLC preparativa (MeCN en H₂O [TFA al 0,1 %]; 4 ml/min; 4 min MeCN al 10 %, 10-20 % durante 4 min, 20-30 % durante 8 min, 2 min MeCN al 30 %) recogiendo $t_R = 13,58$ min para obtener el producto del título 5, 93 mg (79 %) en forma de un sólido blanco; MS (m/z) 651,4 [M + H]; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,59 (s a, 1H), 8,92 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,78 (t, J = 5,8 Hz, 0,6H), 7,73 (t, J = 5,8 Hz, 0,4H), 4,97 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 4,57 (t, J = 8,2 Hz, 1H), 4,51 (dd, J = 8,4, 5,2 Hz, 1H), 4,23 (dd, J = 8,4, 3,7 Hz, 1H), 3,75-3,68 (m, 3H), 3,66-3,59 (m, 1H), 3,57-3,50 (m, 2H), 3,25-3,11 (m, 1H), 3,08 (s, 3H), 3,01-2,89 (m, 1H), 2,77 (dd, J = 14,2, 4,2 Hz, 6H), 2,67 (t, J = 7,3 Hz, 1H), 2,60 (s, 1H), 2,32-2,24 (m, 1H), 2,22-2,09 (m, 3H), 2,06-1,99 (m, 2H), 1,96-1,86 (m, 3H), 1,84-1,68 (m, 3H), 1,64-1,56 (m, 2H), 1,50-1,43 (m, 2H), 0,96 (dd, J = 9,4, 6,6 Hz, 6H), 0,88-0,82 (m, 9H), 0,71 (d, J = 6,6 Hz, 3H) ppm.

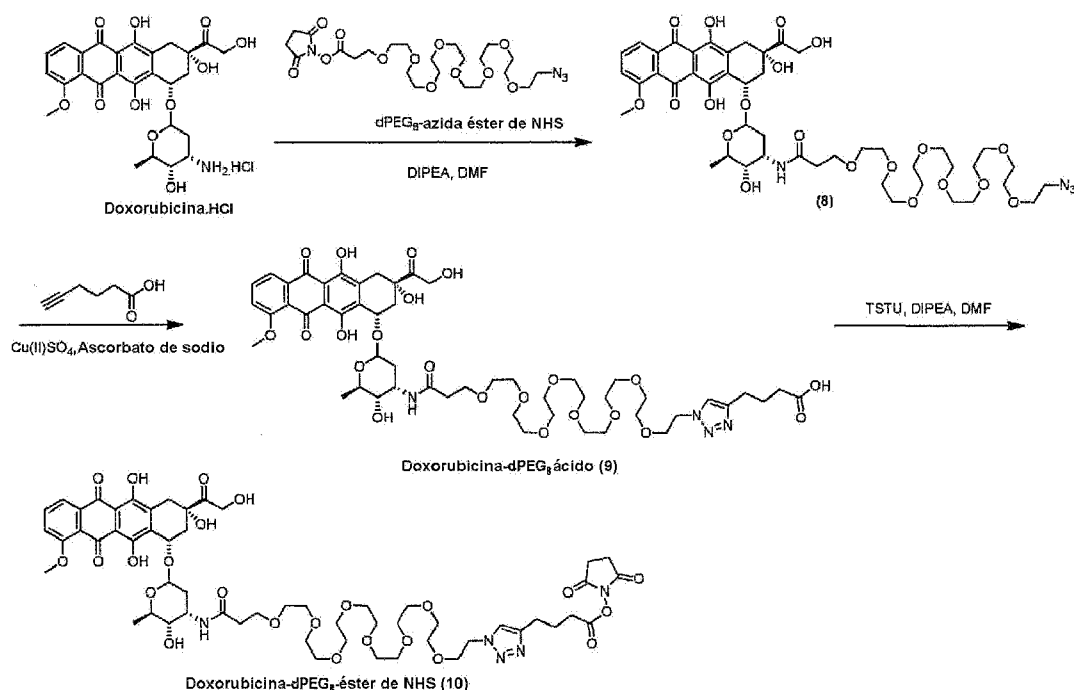
A una solución agitada de P5C5 5 (93 mg, 0,14 mmol) y DIPEA (58 µl, 0,33 mmol) en DMF seca (10 ml) se le añadió TSTU (76 mg, 0,25 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 1 h, se concentró a presión reducida, y se purificó por HPLC preparativa (MeCN en H₂O [TFA al 0,1 %]; 4 ml/min; 4 min MeCN al 15 %, 15-30 % durante 8 min, 5 min al 30 %, 30-40 % durante 2 min, 3 min a MeCN al 40 %) recogiendo $t_R = 13,29$ min para obtener el producto del título 6, 78 mg (73 %) en forma de un sólido blanco; MS (m/z) 748,4 [M + H]; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,59 (s a, 1H), 8,92 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,78 (t, J = 5,8 Hz, 0,6H), 7,73 (t, J = 5,8 Hz, 0,4H), 4,97 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 4,57 (t, J = 8,2 Hz, 1H), 4,51 (dd, J = 8,4, 5,2 Hz, 1H), 4,23 (dd, J = 8,4, 3,7 Hz, 1H), 3,75-3,68 (m, 3H), 3,66-3,59 (m, 1H), 3,57-3,50 (m, 2H), 3,25-3,11 (m, 1H), 3,08 (s, 3H), 3,01-2,89 (m, 1H), 2,82 (s, 3H), 2,77 (dd, J = 14,2, 4,2 Hz, 6H), 2,67 (t, J = 7,3 Hz, 1H), 2,60 (s, 1H), 2,32-2,24 (m, 1H), 2,22-2,09 (m, 3H), 2,06-1,99 (m, 2H), 1,96-1,86 (m, 3H), 1,84-1,68 (m, 3H), 1,64-1,56 (m, 2H), 1,50-1,43 (m, 2H), 0,96 (dd, J = 9,4, 6,6 Hz, 6H), 0,88-0,82 (m, 9H), 0,71 (d, J = 6,6 Hz, 3H) ppm.

Ejemplo 4: Preparación de doxorubicina-dPEG₇-NHS: (7)



A una suspensión agitada de doxorubicina.HCl (15 mg, 0,026 mmol) en DMF seca (2 ml) se le añadió DIPEA (22,5 µl, 0,013 mmol) y se agitó en nitrógeno durante 30 min, dando lugar a una solución transparente de color rojo oscuro. Ésta se recogió con una jeringa de 5 ml y se añadió gota a gota durante 20 min a una solución agitada de bis-dPEG₇-NHS (24,1 mg, 0,039 mmol) y DIPEA (22,5 µl, 0,13 mmol) en DMF seca (2 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 3 h y se evaporó a alto vacío para obtener un aceite rojo anaranjado oscuro. Éste se purificó mediante cromatografía en columna rápida [gel de sílice: MeOH al 10 %/DCM] y las fracciones apropiadas (R_f 0,38) se recogieron, se reunieron y se evaporaron para obtener el producto del título 7, 10,4 mg (39 %) en forma de un aceite viscoso rojo anaranjado; MS (m/z) calculado para C₄₉H₆₄N₂O₂₃Na 1071,3798 (M+Na), encontrado 1071,3805.

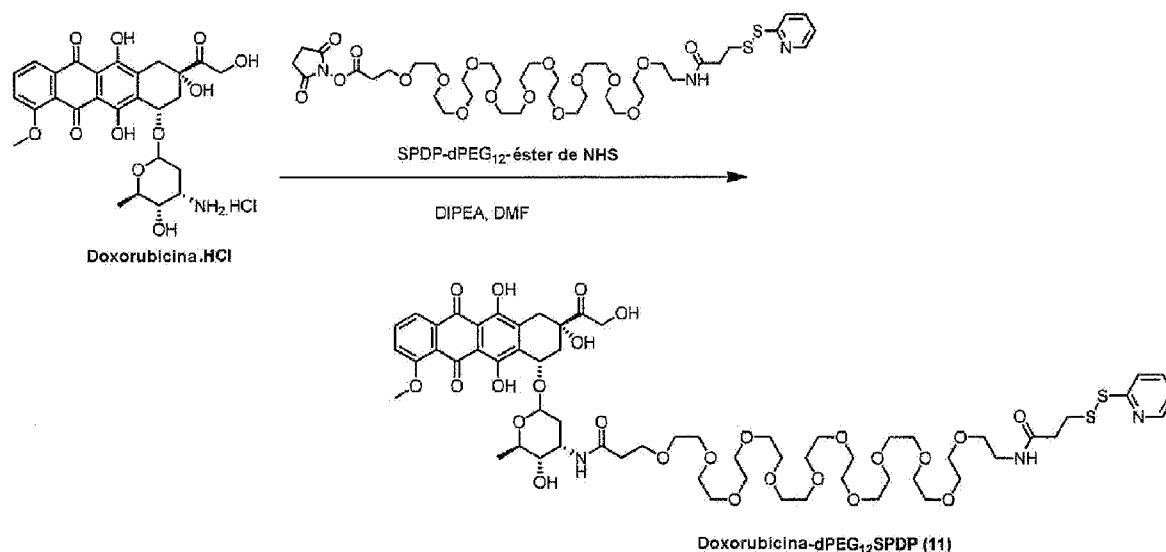
Ejemplo 5: Preparación de doxorubicina-dPEG₈-éster de NHS (10)



Se disolvió clorhidrato de doxorubicina (94 mg, 0,161 mmol) en DMF anhidra (10 ml) y se añadió DIPEA (89 µl, 0,483 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min, tras lo cual se añadió NHS-PEG₈-N₃ (100 mg, 0,177 mmol) y se agitó durante 18 h a temperatura ambiente en nitrógeno en la oscuridad. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y se purificó mediante cromatografía en columna rápida [gel de sílice: MeOH al 5 %/DCM] para obtener la Dox-dPEG₈-azida 8 deseada en forma de un aceite rojo 121 mg (76 %). 0,395, MeOH al 5 %/DCM; MS (m/z): 1010,44 [M⁺+NH₄], 1015,39 [M⁺+Na], 1031,37 [M⁺+K], RMN de ¹H (CDCl₃): δ 14,00 (1H, s, 6-OH), 13,31 (1H, s, 11-OH), 8,08 (1H, d, J = 8 Hz, 3-H), 7,84 (1H, t, J = 8 Hz, 2-H), 7,43 (1H, d, J = 8 Hz, 1-H), 5,53 (1H, d, J = 4 Hz, c-OH), 5,33 (1H, s, 1'-OH), 4,79 (2H, s, 14-H), 4,19-4,11 (5H, m, CH₃-O-, 5'-H, 7-H), 3,71-3,64 (33H, m, 3'-H, -CH₂-O-(CH₂-CH₂-O)₇-CH₂-), 3,42 (2H, t, J = 8 Hz, -CH₂-N₃), 3,34-3,05 (2H, q, J = 20 Hz, 10-H), 2,46-2,16 (3H, m, 4'-H, b-H, d-H), 1,94-1,77 (4H, m, 2'-H, 8'-H), 1,31 (3H, d, J = 8 Hz, 6'-H).

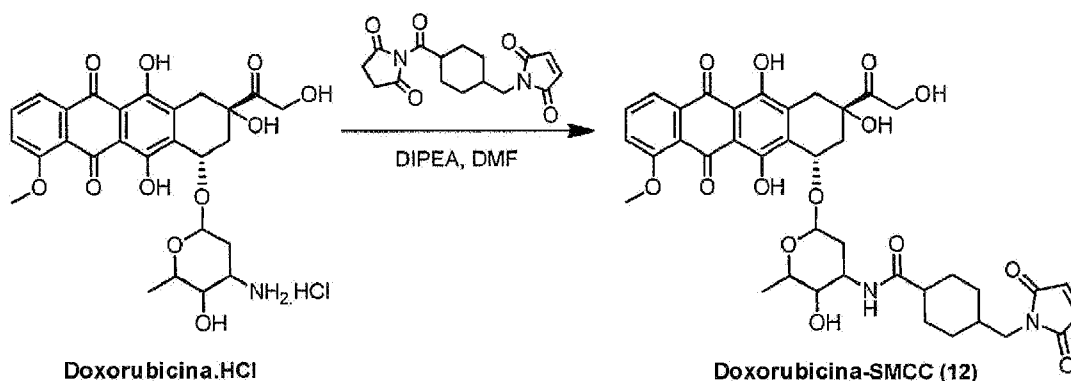
A una solución de dox-dPEG₈-azida 8 (120 mg, 0,121 mmol) en 2,5 ml de terc-butanol/agua (1:1 v: v) se le añadió una solución de ácido 5-hexinoico (14 mg, 0,121 mmol) en 2,5 ml de terc-butanol/agua (1:1). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, seguida de la adición de sulfato de cobre (II) (2 mg, 0,012 mmol) y (+)-L-ascorbato de sodio (5 mg, 0,024 mmol). La reacción se calentó hasta 40 °C y se agitó durante 24 h. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con DCM (15 ml) y se añadió una solución de ácido cítrico hasta alcanzar pH 4. La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 10 ml) y las capas acuosas se reunieron y se volvieron a extraer con DCM (4 x 10 ml). Las fracciones orgánicas se reunieron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para obtener un residuo rojo oscuro. Éste se purificó mediante cromatografía en columna rápida [gel de sílice: DCM aumentando hasta MeOH al 20 %/DCM] para obtener el producto 9 en forma de un sólido rojo, 53,4 mg (40 %). (R_f 0,20, MeOH al 10 %/DCM); MS (m/z): 1106,05 [M⁺+H], 1128,00 [M⁺+Na]; RMN de ¹H (CDCl₃): δ 14,01 (1H, s, 6-OH), 13,33 (1H, s, 11-OH), 8,08 (1H, d, J = 8 Hz, 3-H), 7,82 (1H, t, J = 8 Hz, 2-H), 7,64 (1H, s, -N-CH=CN-), 7,44 (1H, d, J = 8 Hz, 1-H), 5,55 (1H, d, J = 4 Hz, c-OH), 5,33 (1H, s, 1'-OH), 4,81 (2H, s, 14-H), 4,55 (2H, t, J = 4 Hz, -CH=CN-CH₂-), 4,16-4,11 (5H, m, CH₃-O-, 5'-H, 7-H), 3,86 (2H, t, J = 8 Hz, -O-CH₂-CH₂-CN-), 3,70-3,62 (33H, m, 3'-H, -(CH₂-CH₂-O)₅-CH₂-), 3,35-3,06 (2H, q, J = 20 Hz, 10-H), 2,83 (2H, t, J = 4 Hz, -CH₂-COOH), 2,47-2,16 (2H, m, b-H, d-H), 2,07-2,02 (3H, m, 2'-H, 4'-H), 1,83-1,79 (2H, m, 8-H), 1,36-1,28 (5H, m, 6'-H, -CH₂-CH₂-CH₂-COOH)]. Una solución del ácido dox-dPEG₈ se agita en DMF seca con TSTU y DIPEA durante 1 h. El disolvente se elimina utilizando alto vacío y el residuo se purifica mediante HPLC de fase inversa para obtener el derivado del éster de NHS 10.

Ejemplo 6: Preparación de doxorubicina-dPEG₁₂-SPDP (11)



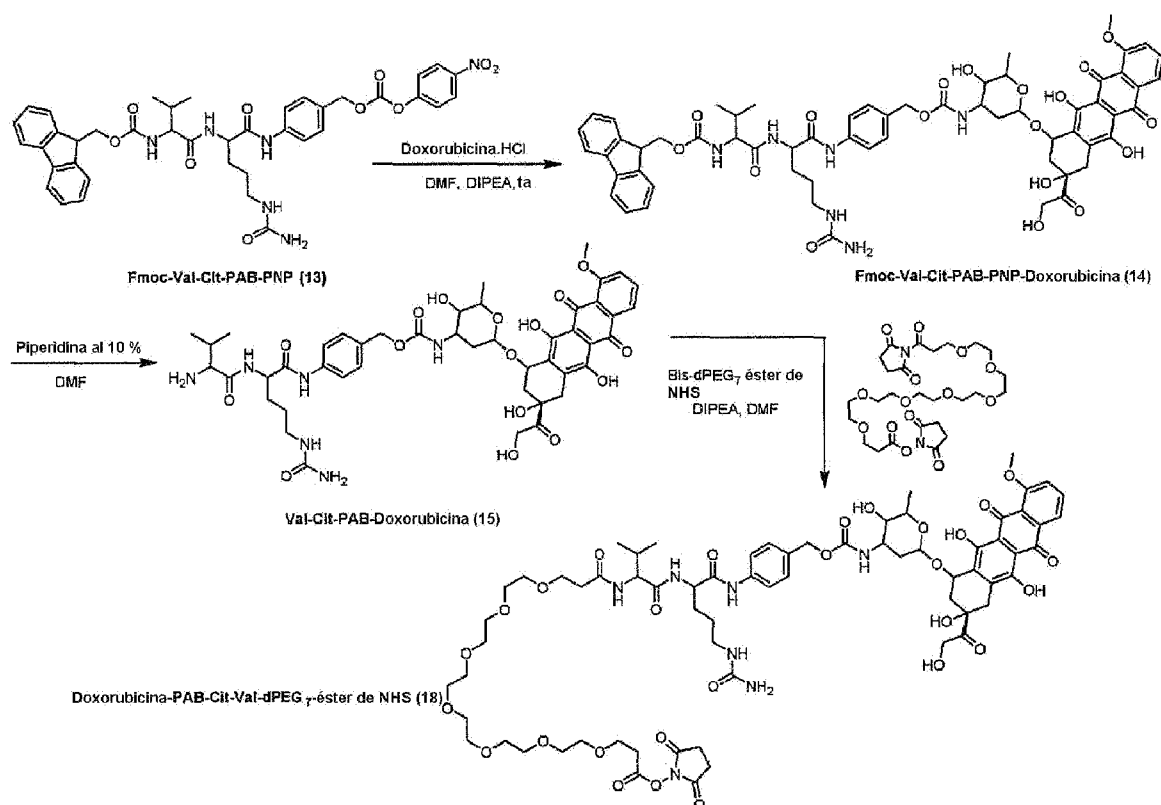
5 A una suspensión agitada de dox.HCl (10 mg, 0,0172 mmol) en DMF seca (2 ml) se le añadió DIPEA (7,7 µl) y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min en nitrógeno para obtener una solución roja transparente. A esto se añadió SPDP-dPEG₁₂-éster de NHS (17,3 mg, 0,044 mmol) disuelto en DMF seca (1 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno y protegida de la luz durante toda la noche. La DMF se eliminó mediante alto vacío y el aceite rojo oscuro se purificó mediante cromatografía en columna rápida [gel de sílice: MeOH al 10 %/DCM, R_f 0,36] para obtener el producto deseado 11, 16,2 mg (70 %) en forma de un aceite viscoso rojo; HRMS (m/z) calculado para C₆₂H₈₅N₈O₂₁S₂ [M + H]⁺ 1341,5271, encontrado: 1341,5380.

Ejemplo 7: Preparación de doxorubicina-SMCC (12)



10
15 A una suspensión de dox.HCl (0,05 g, 0,086 mmol) en DMF seca (10 ml) se le añadieron el reticulante SMCC (0,0346 g, 0,104 mmol) y DIPEA (22,5 µl, 0,129 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h en nitrógeno protegida de la luz. La suspensión se disuelve en 1 h. El disolvente se eliminó a 35 °C a alto vacío para obtener un residuo de color rojo oscuro. Éste se suspendió en DCM (50 ml), se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó para obtener un sólido rojo oscuro. Se purificó mediante cromatografía en columna rápida [gel de sílice: MeOH al 1-5 %/DCM, R_f 0,25] para obtener 12 en forma de un sólido rojo anaranjado, 0,053 g (78 %). MS (m/z) encontrado 785,25 (M+ Na), calculado para C₃₉H₄₂N₂O₁₄N₈.

Ejemplo 8: Preparación de doxorubicina-PAB-Cit-Val-dPEG₇-éster de NHS(16)

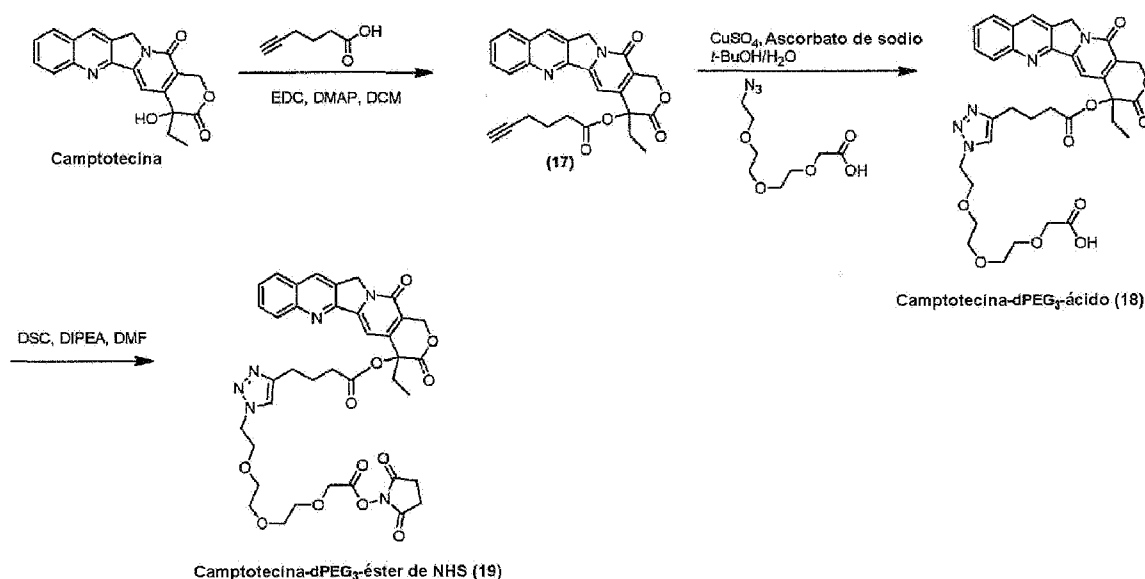


5 A una suspensión de dox.HCl (25 mg, 0,043 mmol) y Fmoc-Val-Cit-PNP 13 (30 mg, 0,039 mmol) en DMF seca (1 ml) se le añadió DIPEA (7,5 μ l, 0,043 mmol), obteniéndose una solución de color rojo oscuro. Se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 24 h, tras lo cual se evaporó el disolvente a alto vacío y el residuo se trituró con éter dietílico seco para obtener un sólido rojo, R_f 0,22 [gel de sílice: MeOH al 10 %/DCM]. La purificación por cromatografía en columna rápida [gel de sílice: MeOH al 5 %/DCM] produjo el producto deseado 14 en forma de un sólido rojo, 25,2 mg (55 %); HRMS (m/z) calculado para $C_{61}H_{67}N_6O_{18}$ [M + H] 1171,4512, encontrado: 1171,4534.

10 A una solución agitada de 14 (20 mg, 0,017 mmol) en DCM seco (5 ml) se le añadió piperidina (al 10 % en moles). El rojo brillante predominante en la mezcla en solución se convirtió inmediatamente en una solución transparente de color marrón oscuro y se agitó durante 10 min, tras lo cual se eliminó todo el disolvente para obtener el compuesto 15 deseado en forma de un sólido pegajoso de color rojo. HRMS (m/z) calculado para $C_{46}H_{57}N_6O_{16}$ [M + H] 949,3831, encontrado: 949,3874. Se utilizó sin más purificación en la preparación de 16.

15 Una solución del compuesto 15 en DMF seca se añade gota a gota durante 20 min a una solución agitada de bis-dPEG₇-NHS y DIPEA (22,5 μ l, 0,13 mmol) en DMF seca. La solución resultante se agita a temperatura ambiente en nitrógeno durante 3 h y se evapora a alto vacío para obtener un aceite rojo anaranjado oscuro. Se purifica mediante cromatografía en columna rápida [gel de sílice: MeOH al 10 %/DCM] y las fracciones apropiadas se recogieron, se reunieron y se evaporaron para obtener el producto del título 16 en forma de un aceite viscoso rojo anaranjado.

Ejemplo 9: Preparación de camptotecina-dPEG₃-éster de NHS (19)



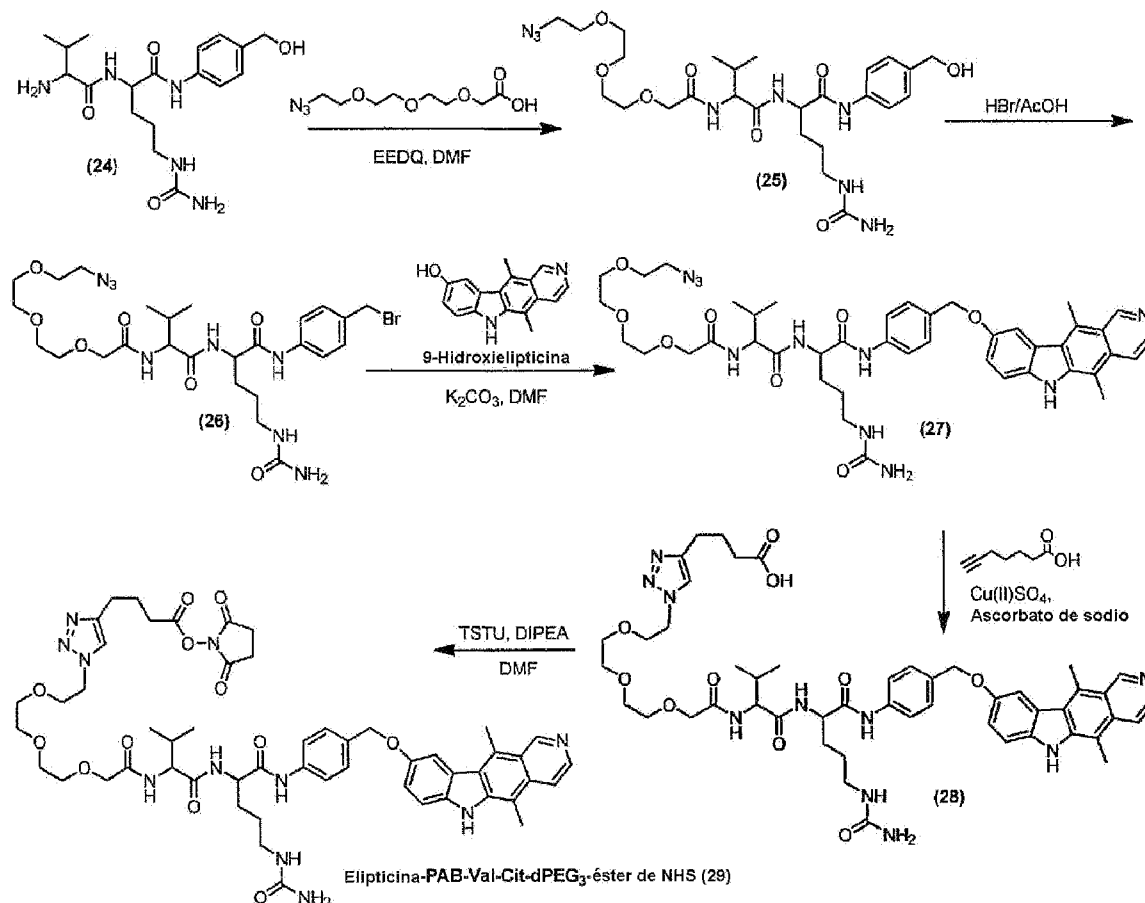
A una solución agitada de camptotecina (400,0 mg, 1,1 mmol) en DCM seco (100 ml) se le añadieron posteriormente ácido 5-hexinoico (319,8 mg, 2,9 mmol), EDC (437,1 mg, 2,28 mmol) y DMAP (139,4 mg, 1,14 mmol). La suspensión amarilla se dejó en agitación a temperatura ambiente en N₂ y en la oscuridad durante 16 horas. La solución marrón claro resultante se lavó con H₂O (120 ml) y se extrajo con DCM (100 ml). Las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna rápida [gel de sílice: con un gradiente de MeOH del 1-3 %/DCM] para obtener el alquino de camptotecina 17 en forma de un polvo blanquecino/amarillo, 471,1 mg (91,6 %); HRMS (m/z): calculado para C₂₆H₂₂N₂O₅ 443,1623 [M+H] encontrado 443,1607.; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,43 (s, 1H), 8,25 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,97 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,86 (ddd, J = 8,5, 6,8, 1,5 Hz, 1H), 7,70 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,28 (s, 1H), 5,71 (d, J = 17,3 Hz, 1H), 5,43 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 5,32 (s, 2H), 2,78-2,59 (m, 2H), 2,35-2,28 (m, 3H), 2,18 (dq, J = 13,6, 7,5 Hz, 1H), 2,05 (t, J = 2,6 Hz, 1H), 1,90 (p, 7,2 Hz, 2H), 1,01 (t, J = 7,5 Hz, 3H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 172,1, 167,5, 157,4, 152,4, 148,9, 146,2, 146,0, 131,2, 130,70, 129,6, 128,5, 128,2, 128,1, 120,3, 96,0, 83,0, 75,9, 69,5, 67,1, 49,9, 32,4, 31,9, 23,2, 17,7, 7,6; IR λ_{máx}: 3302,5, 2984,3, 2943,6, 1753,6, 1737,3, 1669,3, 1624,3, 1564,1, 1446,8, 1405,6, 1365,6, 1351,3, 1296,6, 1234,1, 1205,3, 1166,5, 1131,8, 1088,4, 1045,3, 1011,2, 976,5, 946,6, 909,3, 825,4, 786,2, 762,2, 722,4, 652,0.

A una solución agitada del alquino de camptotecina 17 (60 mg, 0,136 mmol) en 15 ml de H₂O:terc-butanol 1:2 se le añadieron 63,2 mg de azido-PEG-ácido (0,271 mmol, 2 eq), 2,7 mg de ascorbato de Na (0,0136 mmol, 0,1 eq) y 2,2 mg de CuSO₄ (0,0136 mmol, 0,1 eq). La suspensión blanca se agitó a 80 °C en N₂ y en la oscuridad durante 5 h. Tras enfriar la solución transparente hasta la temperatura ambiente, se añadieron 15 ml de DCM y 15 ml de H₂O destilada y se separó la capa orgánica. Las fases orgánicas obtenidas se lavaron con 25 ml de HCl 0,5 M y 25 ml de HCl 1 M:salmuera 1:1 (la capa orgánica se vuelve amarillo fluorescente), se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna rápida [gradiente de gel de sílice: MeOH al 10-15 %/DCM, seguido de ácido fórmico al 0,1%, MeOH al 10 %/DCM. Las fracciones adecuadas se reunieron, se concentraron al vacío y se lavaron con éter caliente a reflujo durante 1 hora. Se obtuvo un sólido amarillo y pegajoso como el producto deseado 18, 71mg (78,4 %); HRMS (m/z): 676,2644 [M+H], masa calculada 676,2669. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,44 (s, 1H, 5-CH-aromático), 8,28 (d, J = 8,6 Hz, 1H, 4-CH-aromático), 7,97 (d, J = 8,2 Hz, 1H, 1-CH-aromático), 7,87 (t, J = 7,7 Hz, 1H, 3-CH-aromático), 7,70 (t, J = 7,6 Hz, 1H, 2-CH-aromático), 7,30 (s, 1H, 7-CH-aromático), 5,71 (d, J = 17,2 Hz, 1H, 8-CH₂-O), 5,44 (d, J = 17,2 Hz, 1H, 8-CH₂-O), 5,33 (s, 2H, 6-CH₂-N), 4,52 (td, J = 4,8, 1,9 Hz, 2H), 4,18 (s, 2H), 3,86 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,75 (dd, J = 5,8, 3,1 Hz, 2H), 3,68-3,57 (m, 6H), 2,82 (t, J = 7,4 Hz, 3H), 2,68-2,49 (m, 3H), 2,31 (dq, J = 14,8, 7,4 Hz, 1H), 2,18 (dq, J = 14,7, 7,4 Hz, 1H), 2,06 (p, J = 7,4 Hz, 2H), 1,01 (t, J = 7,5 Hz, 3H, 10-CH₃); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 172,39, 167,73, 157,40, 152,23, 146,08, 131,52, 130,86, 129,36, 128,56, 128,23, 122,57, 120,29, 96,37, 75,82, 70,39, 69,50, 67,13, 50,12, 49,99, 32,84, 31,81, 24,43, 24,24, 7,59; IR cm⁻¹: 3422,20, 2913,21, 1745,90, 1664,85, 1616,45, 1562,85, 1501,82, 1457,03, 1404,63, 1352,03, 1299,22, 1231,80, 1132,95, 1088,07, 1048,25, 994,41, 947,36, 815,25, 787,33, 763,06, 724,93.

A una solución agitada del ácido de camptotecina 18 (10 mg) se le añadieron 160,3 mg de carbonato de disuccinimídilo (DSC) (0,64 mmoles) y 24 mg de trietilamina (0,24 mmoles) en DMF seca (3 ml). La solución amarilla se dejó en agitación a temperatura ambiente en N₂ y en la oscuridad. Después de 16 horas se añadieron 160,4 mg de DSC (43 eq) y 24,1 mg de trietilamina. Tras 6 horas más, se detuvo la reacción y se concentró al vacío para obtener un aceite anaranjado. Se redisolvió en 15 ml de DCM, se lavó con 15 ml de HCl 0,5 M y 15 ml de salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. Este procedimiento se repitió dos veces y se realizó un último lavado con 2 x 5 ml de H₂O y 5 ml de salmuera. Las fases orgánicas secas se filtraron, se concentraron al vacío y se liofilizaron para obtener el compuesto deseado 19 en forma de un polvo blanco higroscópico de 9 mg. MS (m/z) 773,2832 (M+1), 796,2639 (M+Na)

El elipticina-PEG₄-ácido 22 (0,0143 g, 0,00256 mmol) se disolvió en DMSO seco (1 ml) y se agitó en nitrógeno. A esto se le añadió TSTU (0,0136 g, 0,00451 mmol), seguido de DIPEA (18,5 µl, 0,105 mmol) y la solución de color amarillo brillante se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 1 h. El disolvente se llevó a alto vacío y el residuo pegajoso se trituró con éter seco y, tras decantar el éter, se secó a alto vacío para obtener 23 en forma de un sólido pegajoso amarillo, 11,4 mg (66 %); HRMS (m/z) calculado para C₃₂H₃₈N₃O (M-Br) 592,2659, encontrado 592,2643.

Ejemplo 12: Preparación de elipticina-PAB-Cit-Val-dPEG₃-éster de NHS (29)



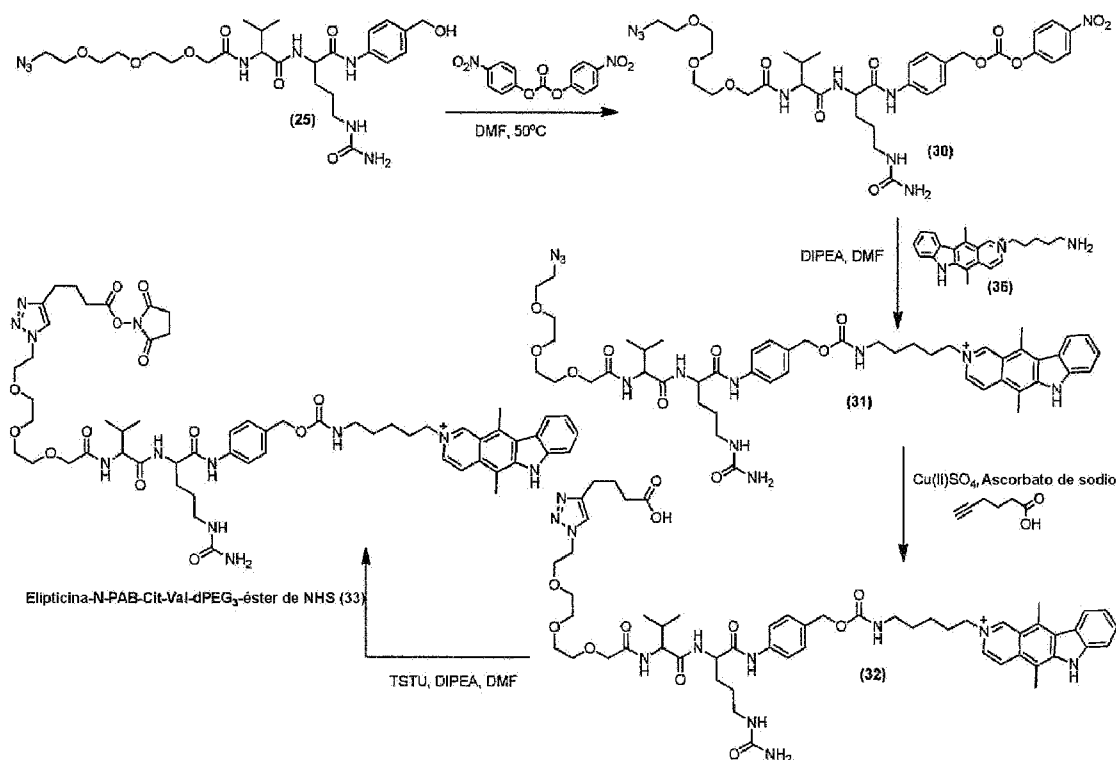
A una solución agitada de Cit-Val-PAB-OH (24) (0,10 g, 0,43 mmol) en DMF seca (8 ml) se le añadió ácido 11-azido-3,6,9-trioxaundecanoico (0,16 g, 0,43 mmol) en DMF seca (1 ml). A continuación, se añadió EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinoleína (100 mg, 0,5 mmol) y la solución se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante toda la noche. El disolvente se eliminó al vacío y se purificó mediante cromatografía en columna rápida [gel de sílice: MeOH al 10 %/DCM] para obtener el producto 25 (0,21 g (82 %)) en forma de un sólido blanco. p.f. 139 °C; HRMS (m/z) calculado para C₂₆H₄₂N₃O₈ 617,3023 [M+Na]. Encontrado 617,2999, IR 3270, 2925, 2103, 1629, 1538, 1272, 1094, 799 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) δ 7,54 (m, 2H), 7,29 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 4,43-4,52 (m, 2H), 4,30 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 4,05 (s, 2H), 3,59-3,77 (m, 10H), 3,30 (m, 2H), 3,04-3,25 (m, 2H), 2,04-2,17 (m, 1H), 1,67-1,95 (m, 2H), 1,57 (m, 2H), 0,97 (m, 6H); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 17,9, 19,2, 26,8, 29,3, 31,1, 39,6, 49,9, 53,2, 56,5, 62,6, 69,2, 69,6, 69,6, 69,7, 69,8, 70,3, 118,8, 126,9, 17,5, 158,9, 170,3, 170,7.

A una solución agitada del conector azida PEG₃ 25 en CH₂Cl₂ seco (60 mg en 2 ml) se le añadió HBr (al 33 % en AcOH, 1 M, 0,04 ml) gota a gota. Tras 10 minutos, el matraz se situó puso en hielo, se añadió lentamente NaHCO₃ y la solución se agitó durante 30 minutos. Después de agitar, la solución se filtró, se lavó con agua y éter dietílico y se secó al vacío para obtener el derivado 26 de bromuro de bencilo (20 mg (33 %)) en forma de un sólido cremoso; HRMS (m/z) calculado para C₂₆H₄₂N₃O₇Br 657,2360 (M+1). Encontrado 657,2357. RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) δ 7,63-7,50 (m, 2H), 7,43-7,21 (m, 2H), 4,60-4,47 (m, 2H), 4,33-4,24 (m, 1H), 4,06 (s, 2H), 3,88-3,60 (m, 10H), 3,52 (s, 2H), 3,30-3,1 (m, 2H), 2,20-2,07 (m, 1H), 2,00-1,72 (m, 2H), 1,72-1,54 (m, 2H), 1,09-0,90 (m, 6H); Se disolvieron 9-hidroxielipticina (10 mg, 0,04 mmol) y K₂CO₃ (0,12 g, 0,08 mmol) en DMF seca (4 ml) y se agitaron durante 5 min. El conector bromado 26 (30 mg, 0,04 mmol) se añadió como solución en DMF seca y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. Tras la concentración al vacío se obtuvo un sólido negro, que se disolvió en CHCl₃:MeOH 9:1, se lavó con agua, se secó y se concentró para obtener el derivado alquilado de elipticina 27, 24 mg (76 %) en forma de un sólido marrón oscuro; MS (m/z) 840 [M]⁺; HRMS (m/z) calculado para C₄₃H₅₅N₁₀O₈ 839,4204. Encontrado 839,4202. IR 3272, 2937, 2107, 1646, 1526, 1462, 1415, 1254, 1103, 807 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) δ 8,38-8,10 (m, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,99-7,81 (m, 1H), 7,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,68-7,48 (m, 2H), 7,48-7,32 (m, 1H), 7,30-6,98

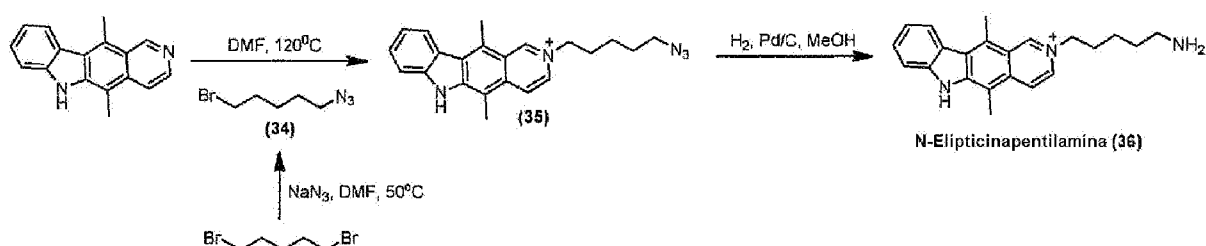
(m, 1H), 5,84 (s, 0H), 4,54 (dd, $J = 1,5, 8,9$ Hz, 1H), 4,31 (q, $J = 7,8$ Hz, 1H), 4,08 (d, $J = 9,3$ Hz, 2H), 3,92-3,46 (m, 9H), 3,35 (d, $J = 17,3$ Hz, 12H), 3,17 (d, $J = 18,8$ Hz, 3H), 3,02 (s, 3H), 2,89 (s, 3H), 2,70 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,90 (s, 1H), 1,78 (s, 1H), 1,60 (s, 2H), 1,06-0,86 (m, 6H);

- 5 El derivado de azida de elipticina 28 se sometió a una cicloadición 1,3 con ácido hexanoico en condiciones de "click" usando Cu(II)SO_4 y ácido ascórbico para obtener el derivado con un ácido carboxílico 28. La activación de este ácido carboxílico terminal del derivado 28 con TSTU y DIPEA en DMF seca produjo el derivado de éster succinimídico activado 29.

Ejemplo 13: Preparación de elipticina-N-PAB-Cit-Val-dPEG₃-éster de NHS (33)



- 10 Ejemplo 14: Preparación de N-elipticinapentilamina (36)



- 15 Se disolvió azida de sodio (0,6 g, 9,6 mmol) en DMF (20 ml) y se añadió 1,5-dibromopentano (1,2 ml, 8,7 mmol). La mezcla se calentó hasta 50 °C durante la noche con una pantalla antiexplosión. La solución se enfrió hasta 0 °C y se añadió agua (20 ml). A continuación, la mezcla se extrajo con EtOAc (3 × 20 ml), se lavó con agua (20 ml) y salmuera (20 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para formar un aceite que se purificó mediante cromatografía en columna con *n*-hexano para obtener 34 (1,5 g, 90 %) en forma de un aceite transparente. El reactivo de tinción de azida se utilizó para seguir a la azida, y la visualización de yodo se utilizó para teñir el dibromopentano inicial, el primer compuesto de la columna. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,44 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,32 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 1,92 (p, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,69-1,61 (m, 2H), 1,61-1,51 (m, 2H).
- 20 Se añadió elipticina (50 mg g, 0,2 mmol) a 1-azido-5-bromopentano 34 (80 mg, 0,4 mmol) en DMF (10 ml) y se calentó hasta 120 °C durante 4 horas, seguido de agitación a temperatura ambiente durante tres días. La suspensión naranja se trató con éter (10 ml) y se filtró para obtener el derivado de elipticina cuaternizado 35, 64 mg (90 %) en forma de un sólido amarillo. p.f. descompuesto sin fusión >150 °C; IR 3065, 2088, 1598, 1578, 1463, 1420, 1401, 1154, 744, 716, 606 cm^{-1} ; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12,16 (s, 1H), 10,09 (s, 1H), 8,62-8,52 (m, 1H), 8,44 (dd, $J = 11,7, 7,6$ Hz, 2H), 7,71-7,57 (m, 2H), 7,37 (s, 1H), 4,72 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 3,37 (m, 4H), 3,30 (s, 3H), 2,84 (s, 3H), 1,62 (p, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,51-1,28 (m, 2H); RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) δ 206,5, 146,5, 144,3, 142,6, 13,3, 12,5, 10,8,
- 25

128,7, 125,6, 124,4, 122,1, 120,8, 120,2, 111,6, 110,45, 59,2, 50,4, 30,4, 27,7, 22,9, 15,1, 12,1; MS (ES+) m/z 358 [M]⁺; HRMS (m/z) masa calculada para C₂₂H₂₄N₅ 358,2032. Encontrado 358,2036.

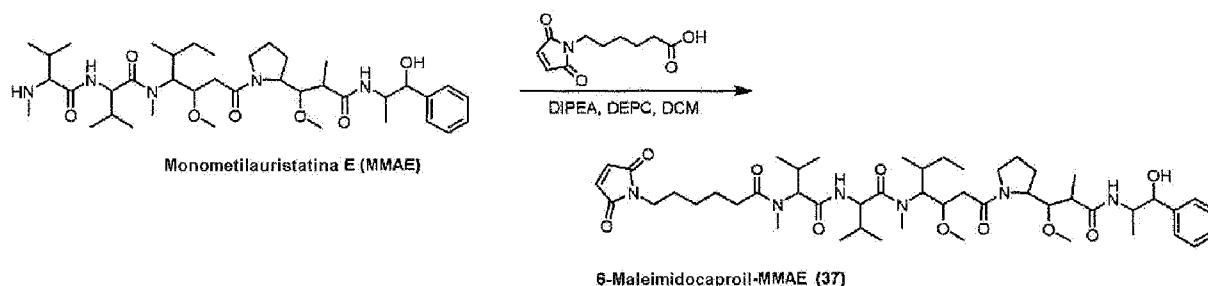
- 5 La azida de elipticina 35 (10 mg, 0,036 mmol) se disolvió en metanol (2 ml). Se añadió Pd/C y se acopló un globo de hidrógeno a la solución en agitación. Tras 6,5 horas, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite y se concentró al vacío para obtener la amina de elipticina 36 (7,0 mg, 58 %) en forma de cristales de color naranja brillante. Es importante destacar que puede producirse una reducción del anillo de piridina si se deja en hidrógeno durante la noche, por lo que se requiere un control cuidadoso mediante TLC (MeCN:H₂O:KNO₃ 8:1:1). p.f. descompuesto sin fusión >150 °C; IR 2934, 1598, 1578, 1419, 1244, 1176, 747, 628 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) δ 9,86 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 8,38-8,27 (m, 3H), 7,64-7,54 (m, 2H), 7,36 (ddd, J = 8,0, 6,5, 1,7 Hz, 1H), 4,81-4,71 (m, 2H), 3,25 (s, 3H), 3,00-2,92 (m, 2H), 2,78 (s, 3H), 2,18 (ddd, J = 12,2, 10,2, 6,8 Hz, 2H), 1,83-1,72 (m, 2H), 1,59 (m, 2H); RMN de ¹³C (100 MHz, MeOD) δ 146,5, 144,3, 142,6, 133,3, 132,5, 130,8, 128,7, 125,9, 124,4, 122,1, 120,8, 120,5, 120,1, 111,6, 110,4, 59,2, 48,5, 40,1, 39,9, 39,7, 39,4, 39,2, 39,0, 38,8, 30,3, 26,9, 22,6, 15,2, 15,1, 12,0; MS (m/z) 332 [M]⁺; HRMS (m/z) calculado para C₂₂H₂₆N₃ 322,2127. Encontrado 332,2123.

- 15 El conector de azida PEG₃ 25 (20 mg, 0,03 mmol) y el carbonato de bisnitrofenilo (30 mg, 0,10 mmol) se disolvieron en DMF (2 ml). Se añadió DIPEA (0,1 ml, 0,07 mmol) y la solución se calentó hasta 50 °C durante 3 horas. El DMF se eliminó al vacío, se añadió agua y el producto se extrajo con CH₂Cl₂:MeOH 9:1 antes de secarse y concentrarse para obtener el derivado de p-nitrofenilo activado 30, 20 mg (74 %) en forma de un aceite amarillo oscuro. IR 1652, 1590, 1516, 1498, 134, 1288, 1216, 1109, 850, 753, 629 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) 8,30-8,39 (m, 2H), 7,61-7,71 (m, 2H), 7,40-7,53 (m, 4H), 5,28 (s, 2H), 4,50-4,61 (m, 1H), 4,33 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 4,09 (s, 2H), 3,64-3,79 (m, 10H), 3,22-3,14 (m, 1H), 2,16 (h, J = 6,9 Hz, 1H), 1,79-1,92 (m, 2H), 8,6 Hz, 2H), 1,60 (m, 6H); MS (ES+) 782 [M+Na]⁺; RMN de ¹³C (100 MHz, MeOD) δ 172,0, 171,3, 171,0, 163,8, 163,8, 161,1, 155,8, 152,6, 145,3, 140,4, 130,6, 129,2, 125,7, 121,9, 119,8, 115,1, 70,8, 70,3, 70,2, 70,1, 69,7, 50,4, 48,3, 48,1, 47,8, 47,6, 47,4, 47,2, 47,1, 30,9, 18,4, 17,4; HRMS (m/z) calculado para C₃₃H₄₅N₉O₁₂ 782,3170 [M+Na]⁺. Encontrado 782,3173.

- 25 La amina de elipticina 36 (11 mg, 0,03 mmol) y el conector activado 30 (24 mg, 0,03 mmol) se disolvieron en DMF seca. Se añadió DIPEA (6 µl, añadido mediante pipeta Gilson, 0,035 mmol) y la mezcla de reacción se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 horas. El producto se precipitó por adición de éter dietílico y se centrifugó. Se eliminó el sobrenadante y el sólido resultante se lavó con éter dietílico y se secó para obtener el derivado del conector de elipticina 31, 10 mg (36 %) en forma de un sólido amarillo. MS (ES+) m/z 952 [M]⁺; HRMS calculado para C₄₉H₆₆N₁₁ 952,5045. Encontrado 952,4993.

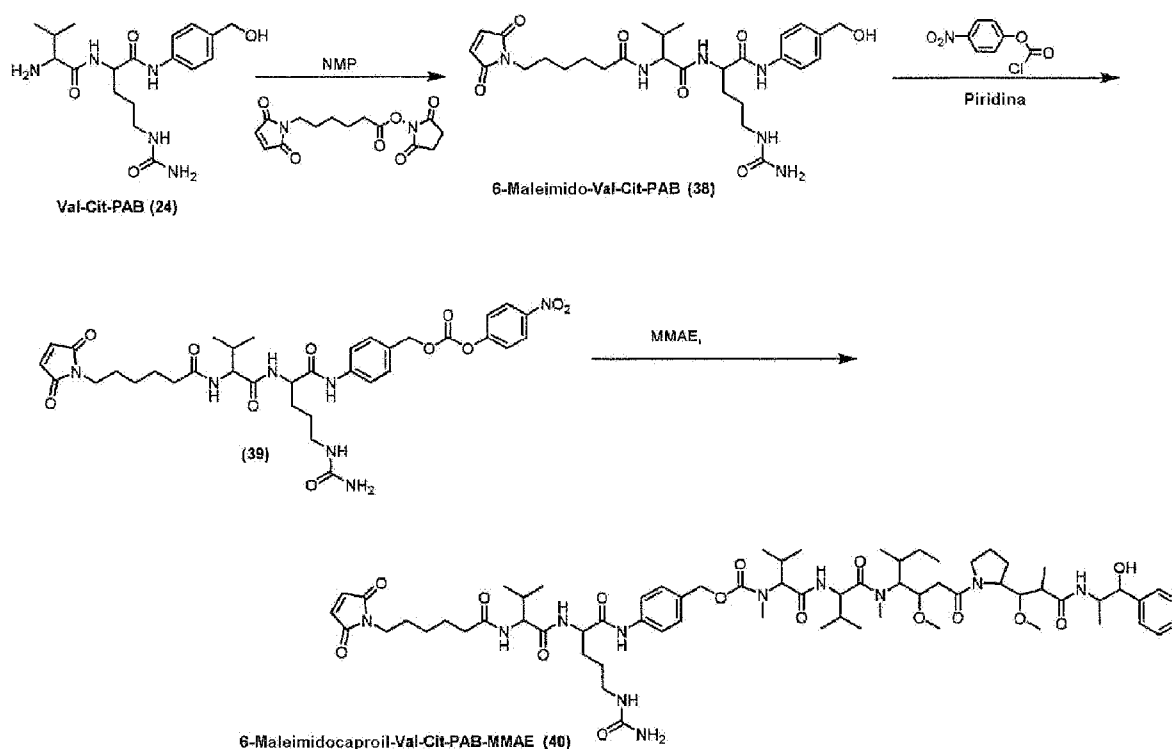
- 30 El derivado de azida de elipticina 31 se sometió a una cicloadición 1,3 con ácido hexinoico en condiciones de "click" utilizando Cu(II)SO₄ y ácido ascórbico para obtener el derivado 32. Con la activación del ácido carboxílico terminal del derivado 32 con TSTU y DIPEA en DMF seca se obtiene el derivado de éster succinimidílico 33.

Ejemplo 15: Preparación de 6-maleimidocaproil-MMAE (37)



- 35 A una suspensión de MMAE (0,05 g, 0,0694 mmol) en DCM seco recién destilado (2 ml) se le añadió ácido 6-maleimidocaproico (0,0221 g, 0,104 mmol), seguido de dietilcianofosfonato (21 µl, 0,139 mmol) y DIPEA (37 µl, 0,208 mmol). Al añadir DIPEA, la mezcla de reacción se volvió transparente y se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 12 h, TLC [gel de sílice: MeOH al 5 %/DCM, R_f 0,31]. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (30 ml) y se lavó con ácido cítrico al 10 % (2 x 20 ml), agua (20 ml), salmuera (20 ml) y se concentró hasta la sequedad. El producto
- 40 bruto se purificó mediante cromatografía en columna rápida [gel de sílice: MeOH al 5 %/DCM] para obtener 6-maleimidocaproil-MMAE 37 en forma de un sólido blanco, 0,023 g (36 %). MS (m/z) encontrado 911,58 (M+1), calculado para C₄₉H₇₉N₆O₁₀.

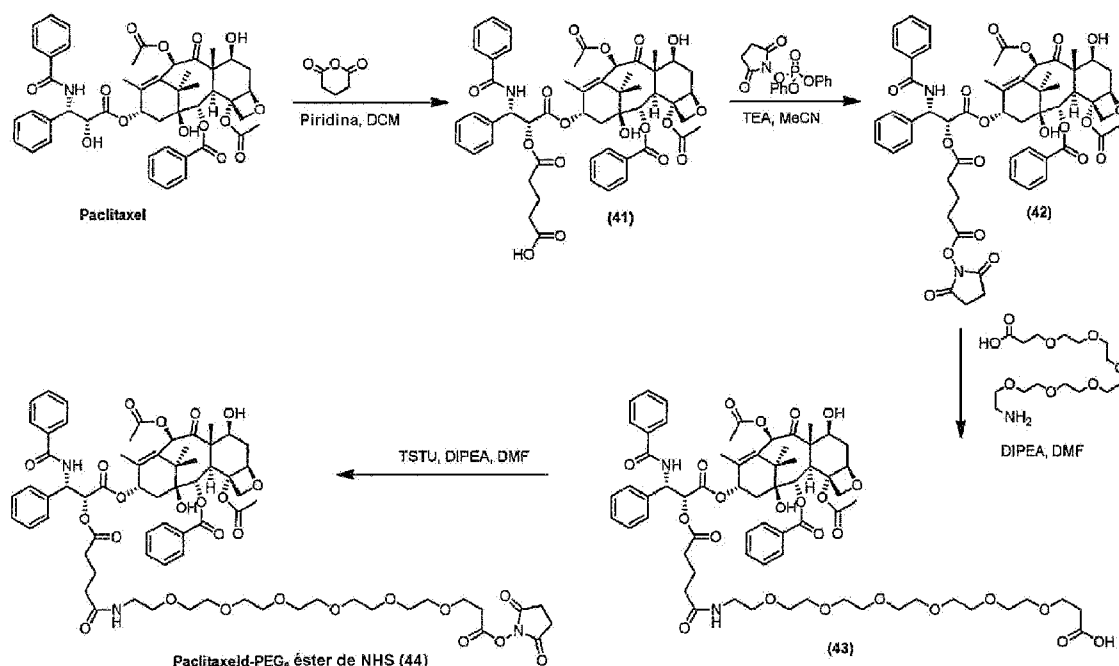
Ejemplo 16: Preparación de 6-maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MMAE (40)



A una solución agitada de val-cit-PAB 24 (0,11 g, 0,29 mmol) en N-metilpirrolidinona, NMP (5 ml) seca en nitrógeno, se le añadió N-succinimidil-6-maleimido-hexanoato (0,0983 g, 0,318 mmol) y la solución resultante de color marrón claro se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El NMP se eliminó mediante alto vacío a <40 °C. El residuo aceitoso espeso resultante se trituró con éter seco (20 ml), el sólido se recogió por filtración y se lavó varias veces con éter seco y se secó al aire para obtener el producto deseado 38 en forma de un polvo blanquecino, 0,16 g (98 %). TLC [gel de sílice: MeOH al 10 %/DCM, R_f 0,21]. MS (m/z) 572,653 (M+1) calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_7$.

A una solución agitada de 6-maleimidocaproil-val-cit-PAB 38 en DMF seca en nitrógeno se le añadió bis-(p-nitrofenil)carbonato, seguido de DIPEA, lo que produjo un cambio de color de incoloro a amarillo brillante. La solución se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 1 h, tras lo cual se eliminó la DMF mediante alto vacío para obtener un residuo aceitoso. Éste se trituró con acetato de etilo durante 15 minutos, lo que produjo una precipitación que se completó con la adición de éter. El sólido se recogió, se lavó bien con éter y se secó al aire para obtener un sólido blanquecino. TLC [gel de sílice: MeOH al 10 %/DCM, R_f 0,46]. Se purificó por cromatografía [gel de sílice: elución en gradiente de MeOH al 5-10 %/DCM] para obtener el conector activado 39 en forma de un sólido blanco, 0,006 g (46 %). MS (m/z) 738,3091 (M+H), HRMS (m/z) calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{Na}$ M+Na 760,2918, encontrado 760,2922. El conector activado 39 (50 mg, 0,068 mmol), MMAE (32,6 mg, 0,045 mmol) y N-hidroxibenzotriazol (1,4 mg, 0,0091 mmol) se agitaron en DMF seca (1 ml) durante 2 min, tras lo cual se añadió una gota de piridina y la reacción se agitó durante 24 h. A continuación, se eliminó el disolvente mediante alto vacío y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa en fase inversa para obtener el producto deseado 40, después de la liofilización, en forma de un polvo blanco; MS (m/z) 1316,7 (M+H).

Ejemplo 17: Preparación de paclitaxel-dPEG₆-éster de NHS (44)

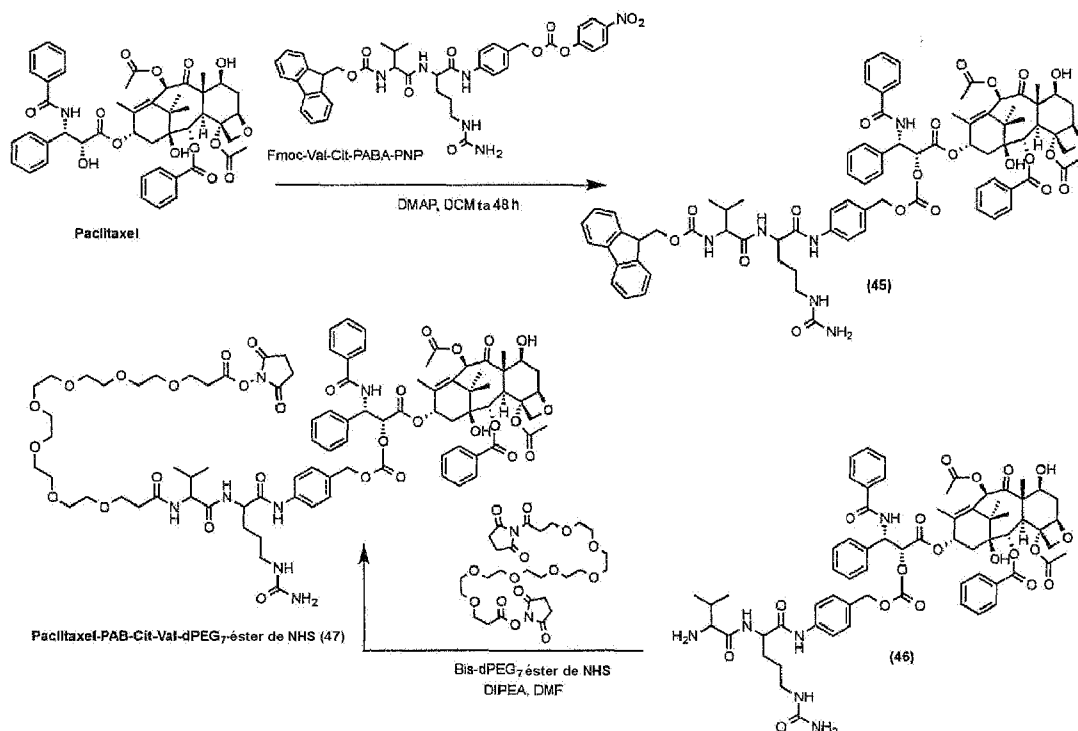


Se disolvieron paclitaxel (100 mg, 0,12 mmol) y anhídrido glutárico (17 mg, 0,14 mmol) en DCM seco (10 ml) y se agitaron durante 10 min, seguido de la adición de piridina seca (100 μ l, 0,0013 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 días a temperatura ambiente y se evaporó al vacío. El residuo obtenido se recrystalizó en DCM para obtener el paclitaxel ácido 41 en forma de un sólido blanco, 60,7 mg (52,3 %). (R_f 0,26, MeOH al 3 %/DCM). RMN de ^1H (CDCl_3): δ 8,16 (2H, d, J = 4 Hz, 23-H, 27-H), 7,78 (2H, d, J = 4 Hz, 39-H, 43-H), 7,66-7,36 (11H, CH, Ar), 6,28 (2H, m, 10-H, 13-H), 6,01 (1H, q, J = 4 Hz, 3'-H), 5,71 (1H, d, J = 7,2 Hz, 2-H), 5,52 (1H, d, J = 3,2 Hz, 2'-H), 5,00 (1H, d, J = 8 Hz, 5-H), 4,47 (1H, q, J = 6,4 Hz, 7-H), 4,29 (2H, d, J = 8,4 Hz, 20-H), 3,83 (1H, d, J = 6,8 Hz, 3-H), 2,53-2,16 (15H, m, 7-OH, 6-H, 14-H, g2-H, g4-H, 29-H, 31-H), 2,06-1,70 (7H, m, 1-OH, g3-H, 6-H, 18-H, 19-H), 1,28-1,16 (6H, m, 16-H, 17-H). MS (m/z): 968,36 [M^+], 985,39 [$M^+ + \text{NH}_4$], 990,35 [$M^+ + \text{Na}$] (teórico: $\text{C}_{52}\text{H}_{57}\text{NO}_{17}$ 968,01).

A una solución agitada de paclitaxel ácido 41 (26 mg, 0,027 mmol) y SDPP (20 mg, 0,058 mmol) en acetonitrilo seco (5 ml) se le añadió TEA (20 μ l, 0,143 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente en nitrógeno, seguido de evaporación y purificación por cromatografía en gel de sílice (MeOH/DCM = 3:97) para obtener el éster de NHS de paclitaxel 42 en forma de un sólido blanco 38 mg (76 %). (R_f 0,48). RMN de ^1H (CDCl_3): δ 8,15 (2H, d, J = 7,6 Hz, 23-H, 27-H), 7,72 (2H, d, J = 7,6 Hz, 39-H, 43-H), 7,64-7,37 (11H, CH, Ar), 6,28 (2H, m, 10-H, 13-H), 6,01 (1H, q, J = 4 Hz, 3'-H), 5,71 (1H, d, J = 7,2 Hz, 2-H), 5,52 (1H, d, J = 3,2 Hz, 2'-H), 5,00 (1H, d, J = 8 Hz, 5-H), 4,47 (1H, q, J = 6,4 Hz, 7-H), 4,29 (2H, d, J = 8,4 Hz, 20-H), 3,83 (1H, d, J = 6,8 Hz, 3-H), 2,99-2,36 (15H, m, 7-OH, 6-H, 14-H, g2-H, g4-H, 29-H, 31-H), 2,29-1,82 (15H, m, 1-OH, g3-H, 6-H, 18-H, 19-H, n3-H, n4-H), 1,28-1,16 (6H, m, 16-H, 17-H). MS (m/z): 1065,38 [M^+], 1087,36 [$M^+ + \text{Na}$] (teórico: $\text{C}_{56}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_{19}$ 1065,08).

A una solución del éster de NHS de paclitaxel 42 (32 mg, 0,03 mmol) en DCM seco (5 ml) se le añadieron $\text{H}_2\text{N-PEG}_6\text{-COOH}$ (10,6 mg, 0,03 mmol) y TEA (5 μ l, 0,03 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche en nitrógeno y se lavó con HCl (2 \times 10 ml, 0,1 M) y salmuera (2 \times 10 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para obtener 43 en forma de un aceite transparente, 25 mg (64 %) [gel de sílice: MeOH al 5 %/DCM, R_f 0,16]. RMN de ^1H (CDCl_3): δ 8,16 (2H, d, J = 7,6 Hz, 23-H, 27-H), 7,86 (2H, d, J = 7,6 Hz, 39-H, 43-H), 7,65-7,30 (11H, CH, Ar), 6,28 (2H, m, 10-H, 13-H), 6,01 (1H, q, J = 4 Hz, 3'-H), 5,71 (1H, d, J = 7,2 Hz, 2-H), 5,50 (1H, d, J = 3,2 Hz, 2'-H), 5,00 (1H, d, J = 8 Hz, 5-H), 4,47 (1H, q, J = 6,4 Hz, 7-H), 4,29 (2H, d, J = 8,4 Hz, 20-H), 3,83 (1H, d, J = 6,8 Hz, 3-H), 3,73-3,47 (24H, m, -CO-NH-(CH₂-CH₂-O)₆-CH₂-), 2,62-1,87 (24H, m, 7-OH, 6-H, 14-H, 18-H, g2-H, g4-H, 29-H, 31-H, 1-OH, g3-H, 6-H, 19-H), 1,28-1,16 (6H, m, 16-H, 17-H). MS (m/z): 1303,56 [M^+], 1325,56 [$M^+ + \text{Na}$], 1341,55 [$M^+ + \text{K}$] (teórico: $\text{C}_{67}\text{H}_{86}\text{N}_2\text{O}_{23}$ 1303,40).

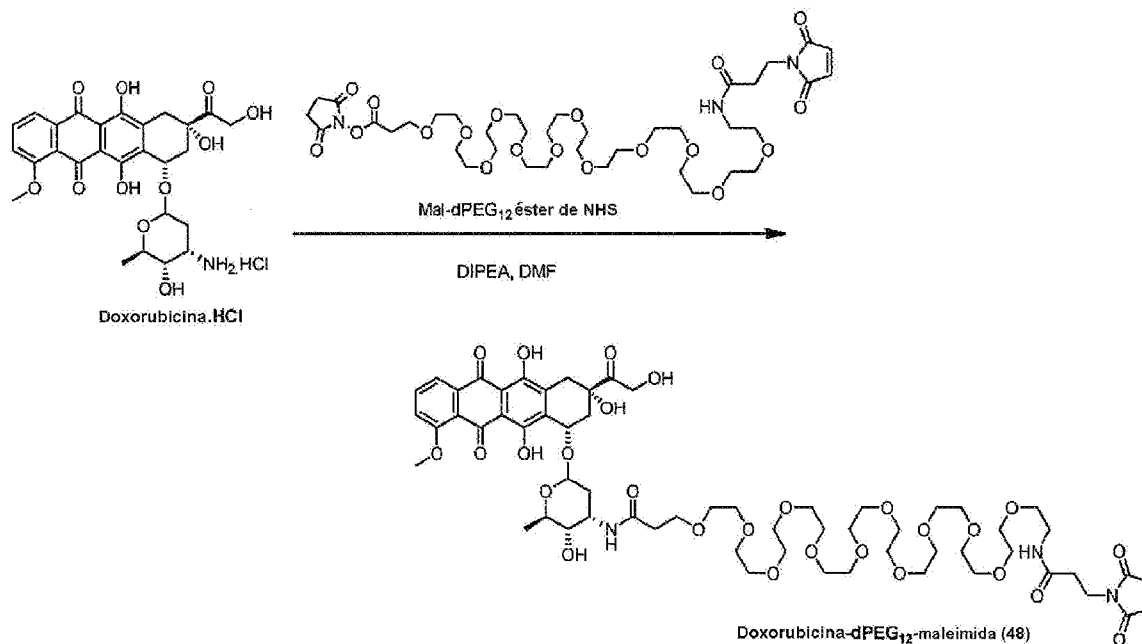
A una solución agitada de paclitaxel-PEG₆-ácido 43 (22 mg, 0,017 mmol) en DMF anhidra (2 ml) se le añadieron TSTU (11 mg, 0,034 mmol) y DIPEA (15 μ l, 0,085 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente en nitrógeno y se concentró para obtener el producto bruto en forma de un aceite amarillo. Se purificó por cromatografía en columna rápida [gel de sílice, MeOH al 3-5 %/DCM] para obtener el éster de NHS 44, 15,2 mg (64 %) [gel de sílice, MeOH al 3 %/DCM, R_f 0,18]. RMN de ^1H (CDCl_3): δ 8,16 (2H, d, J = 7,6 Hz, 23-H, 27-H), 7,86 (2H, d, J = 7,6 Hz, 39-H, 43-H), 7,65-7,30 (11H, CH, Ar), 6,28 (2H, m, 10-H, 13-H), 6,01 (1H, q, J = 4 Hz, 3'-H), 5,71 (1H, d, J = 7,2 Hz, 2-H), 5,50 (1H, d, J = 3,2 Hz, 2'-H), 5,00 (1H, d, J = 8 Hz, 5-H), 4,47 (1H, q, J = 6,4 Hz, 7-H), 4,29 (2H, d, J = 8,4 Hz, 20-H), 3,83 (1H, d, J = 6,8 Hz, 3-H), 3,73-3,47 (24H, m, -CO-NH-(CH₂-CH₂-O)₆-CH₂-), 2,62-1,87 (28H, m, 7-OH, 6-H, 14-H, 18-H, g2-H, g4-H, 29-H, 31-H, 1-OH, g3-H, 6-H, 19-H, n3-H, n4-H), 1,28-1,16 (6H, m, 16-H, 17-H). MS (m/z): 1400,60 [M^+], 1417,62 [$M^+ + \text{NH}_4$], 1422,58 [$M^+ + \text{Na}$], 1338,60 [$M^+ + \text{K}$] (teórico: $\text{C}_{71}\text{H}_{89}\text{N}_3\text{O}_{26}$ 1400,47).

Ejemplo 18: Preparación de paclitaxel-PAB-Val-Cit-dPEG₇ éster de NHS (47)

5 A una mezcla agitada de paclitaxel (100 mg, 0,117 mmol) y Fmoc-Val-Cit-PAB (74,8 mg, 0,00976 mmol) en DCM seco (10 ml) se le añade DMAP (14,3 mg, 0,117 mmol) y se agita a temperatura ambiente en nitrógeno durante 48 h. El disolvente se evapora para obtener un sólido cristalino amarillo claro que se purifica por cromatografía en columna rápida [gel de sílice: MeOH al 3-5 %/cloroformo] produciendo el compuesto deseado 45.

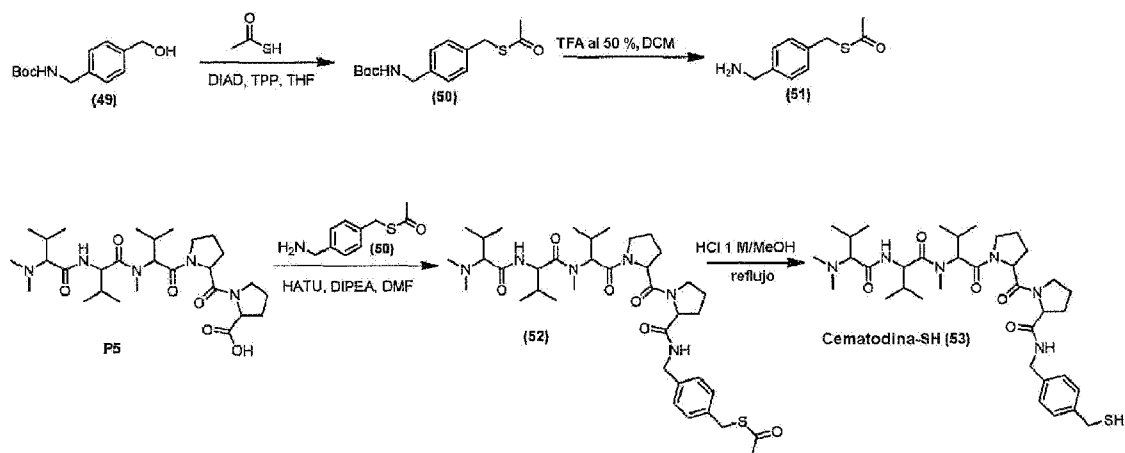
A una solución agitada de 45 en THF seco se le añade DBU y se agita durante 10 min, después de lo cual se elimina el disolvente para obtener el derivado desprotegido 46 que se utiliza sin más purificación.

10 Una solución de 46 en DCM seco se añade gota a gota durante 20-30 min a una solución agitada de bis-dPEG₇ éster de NHS en DCM seco en nitrógeno, después de lo cual se agita durante 2 h, se inactiva mediante la adición de agua, se vuelve a extraer con DCM y los extractos orgánicos reunidos se secan y se evaporan para obtener 47 bruto.

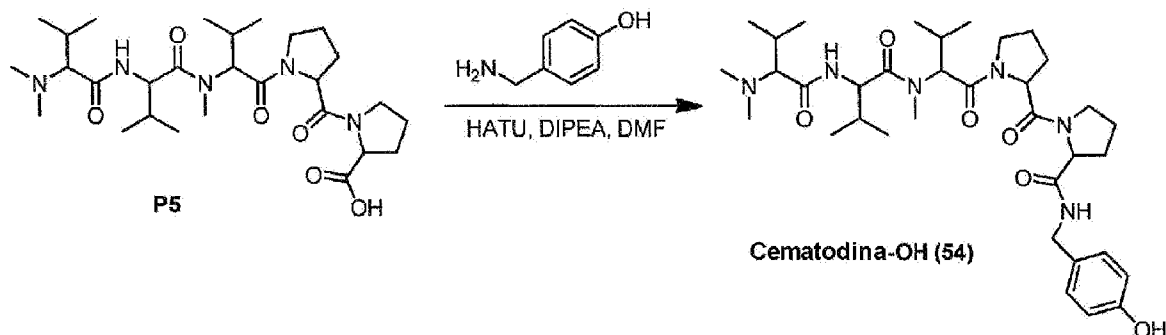
Ejemplo 19: Preparación de doxorubicina-dPEG₁₂-maleimida (48)

5 A una suspensión agitada de dox.HCl (10 mg, 0,017 mmol) en DMF seca (2 ml) se le añadió DIPEA (7,7 µl) y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min en nitrógeno para obtener una solución roja transparente. A esto se le añadió maleimida-dPEG₁₂ éster de NHS (16,4 mg, 0,019 mmol) disuelto en DMF seca (1 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente, en nitrógeno y protegida de la luz durante toda la noche. La DMF se eliminó mediante alto vacío y el aceite rojo oscuro se purificó mediante cromatografía en columna rápida [gel de sílice: MeOH al 10 %/DCM, R_f 0,5] para obtener el producto deseado 48, 17,8 mg (80 %) en forma de un aceite viscoso rojo; HRMS (m/z) calculado para C₆₁H₈₇N₃O₂₇Na [M + Na] 1316,5424, encontrado: 1316,5601.

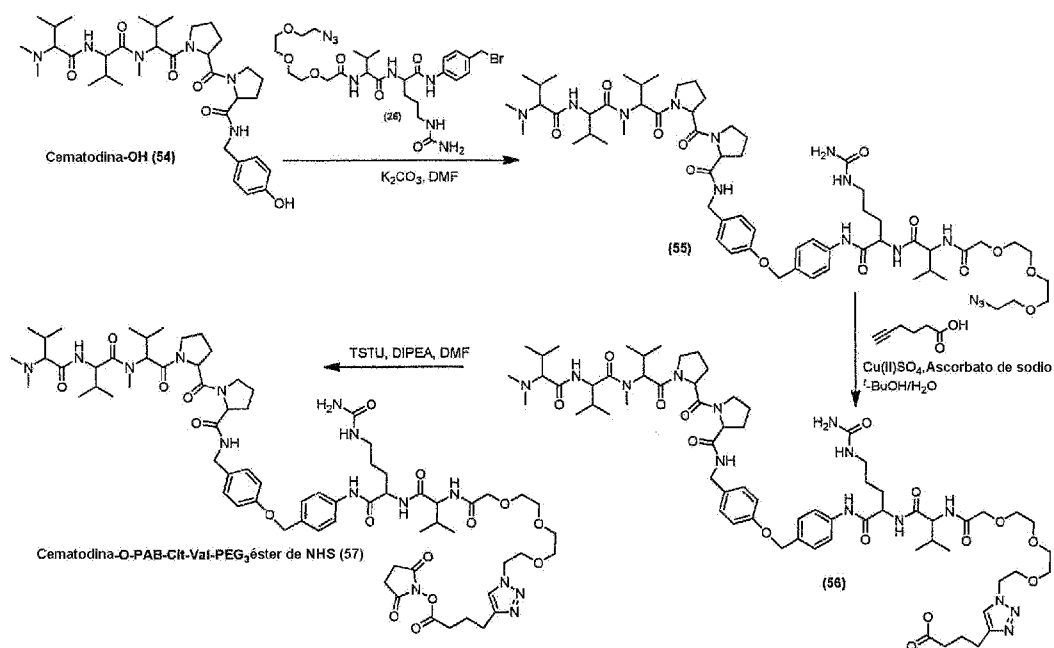
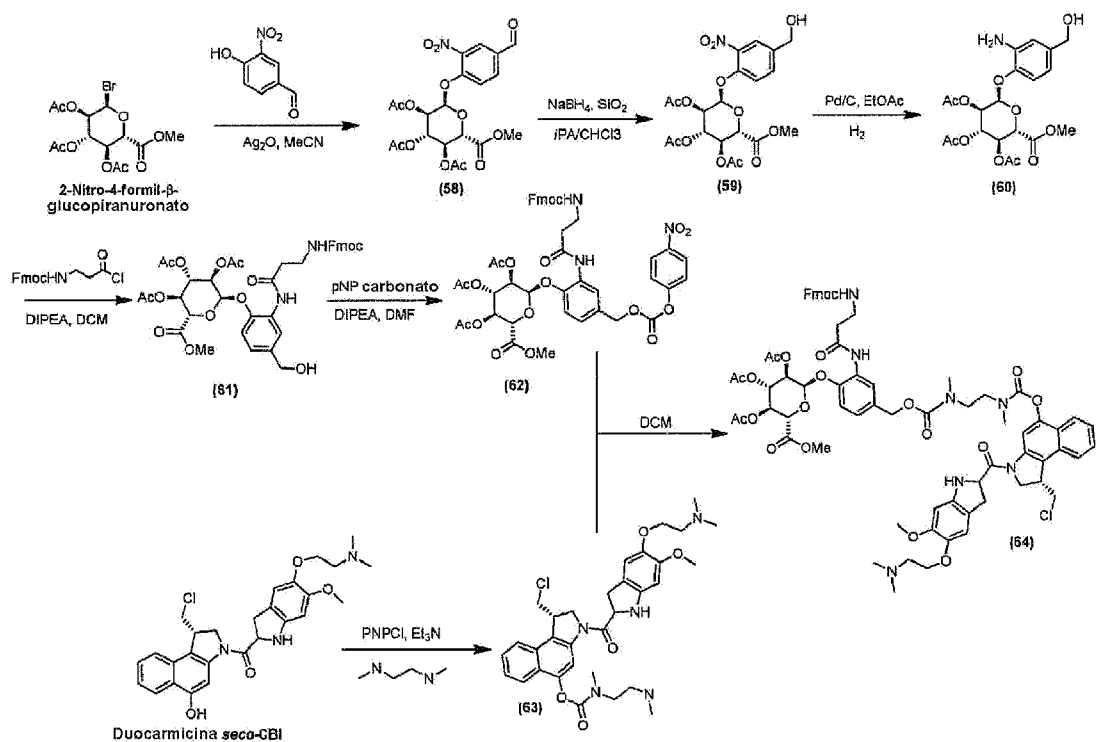
Ejemplo 20: Preparación de cematodina-SH (53)

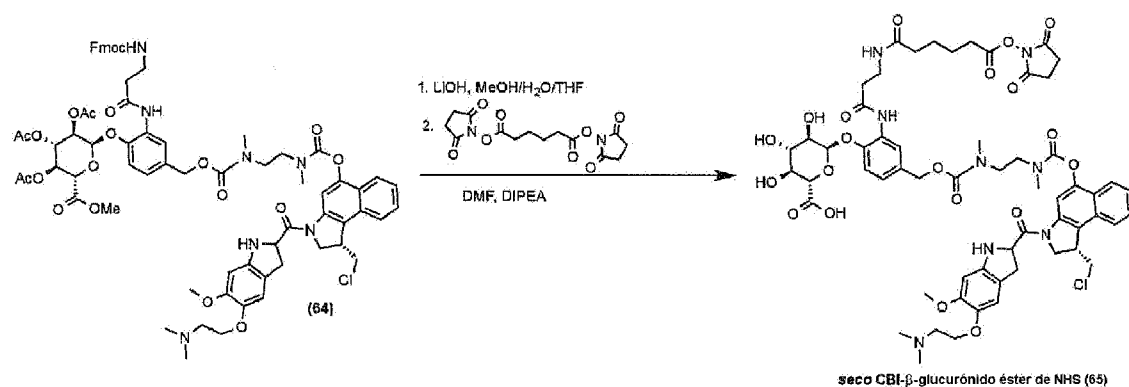


10 Ejemplo 21: Preparación de cematodina-OH (54)

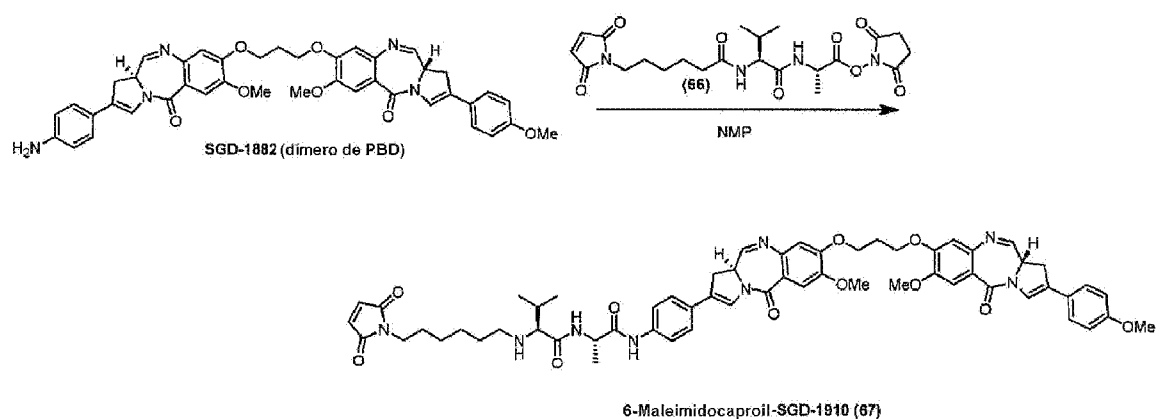
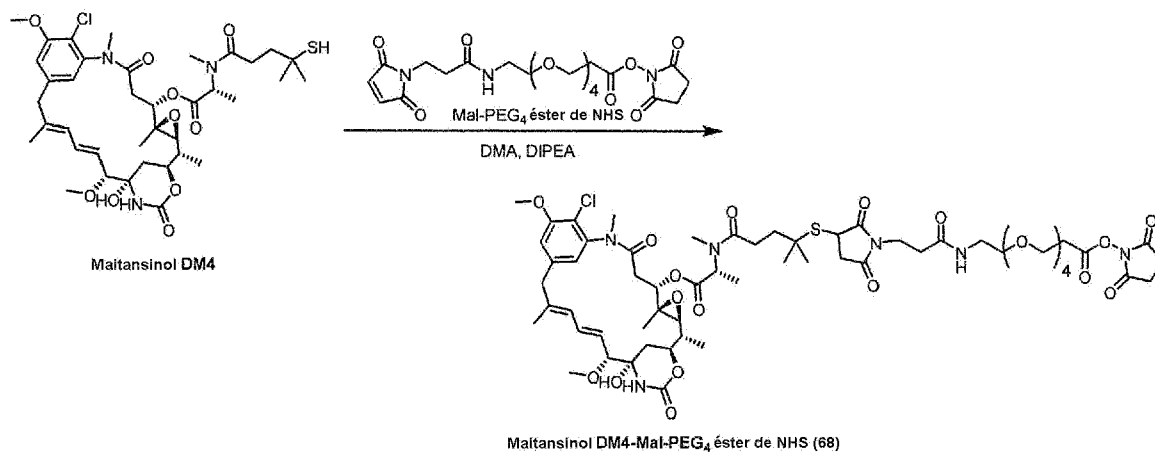


Ejemplo 22: Preparación de cematodina-O-PAB-Cit-Val-PEG₃-éster de NHS (57)

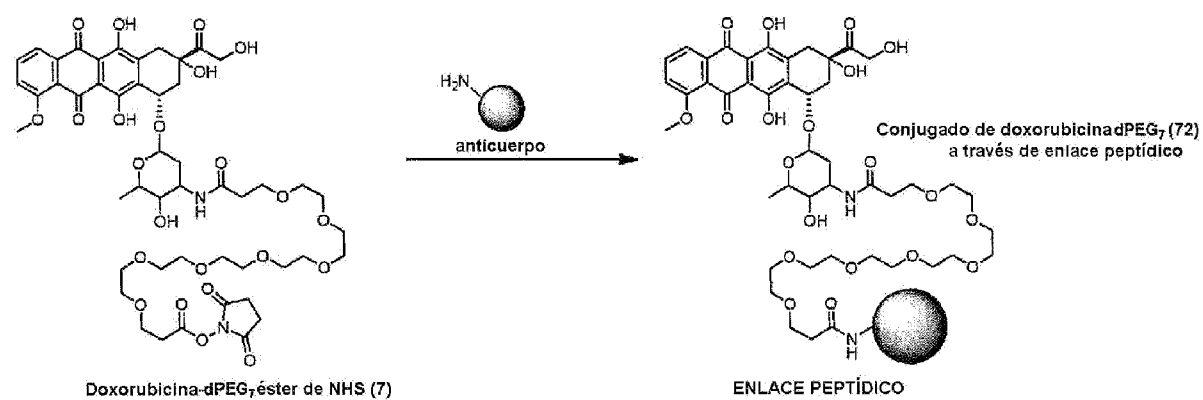
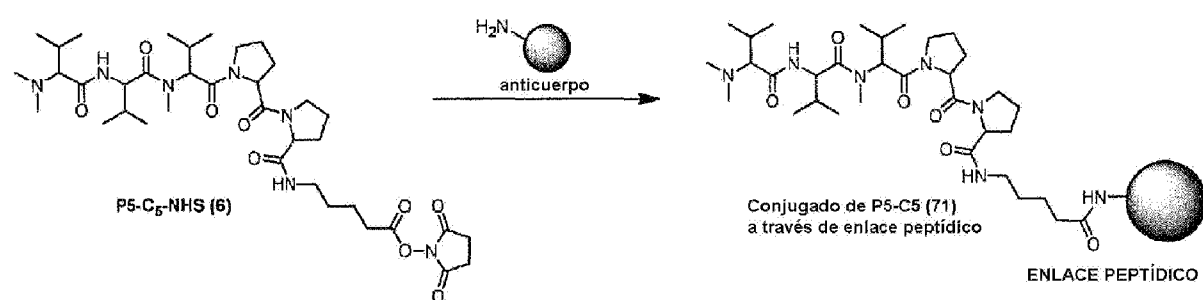
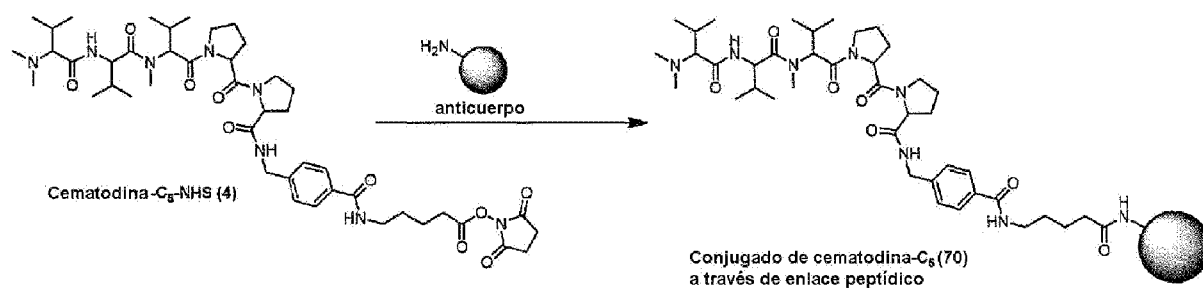
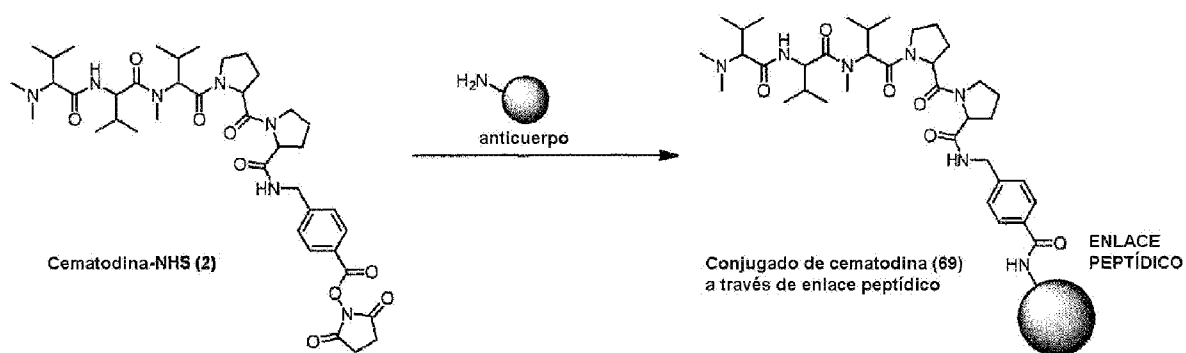
Ejemplo 23: Preparación de seco CBI- β -glucurónido-éster de NHS (65)

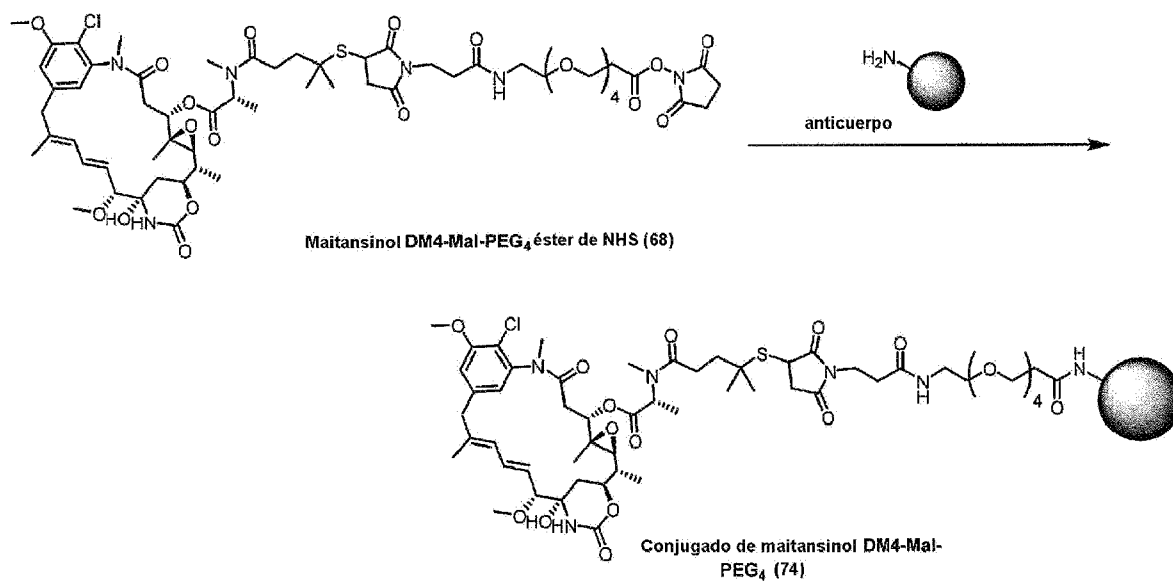
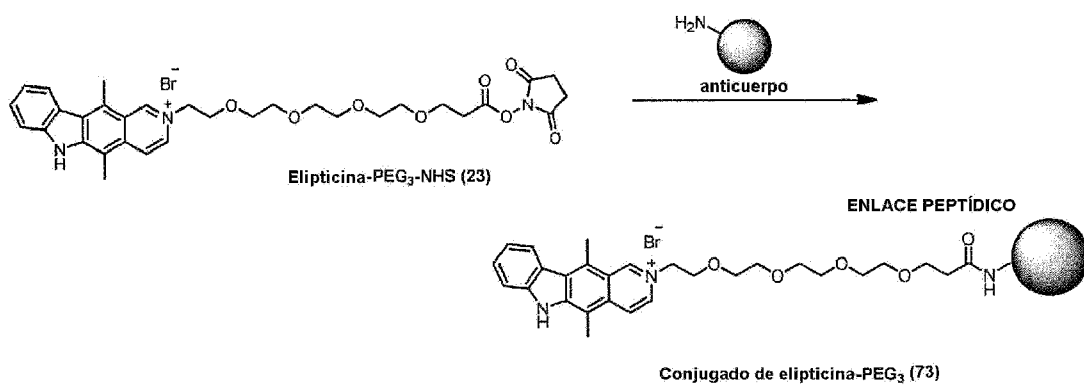


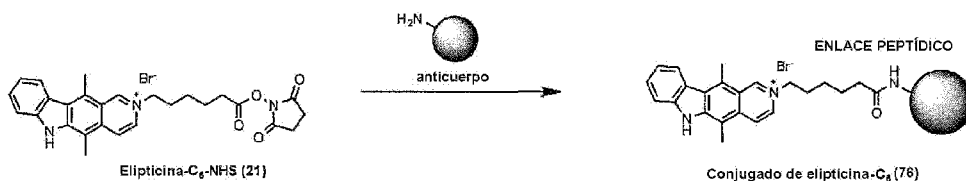
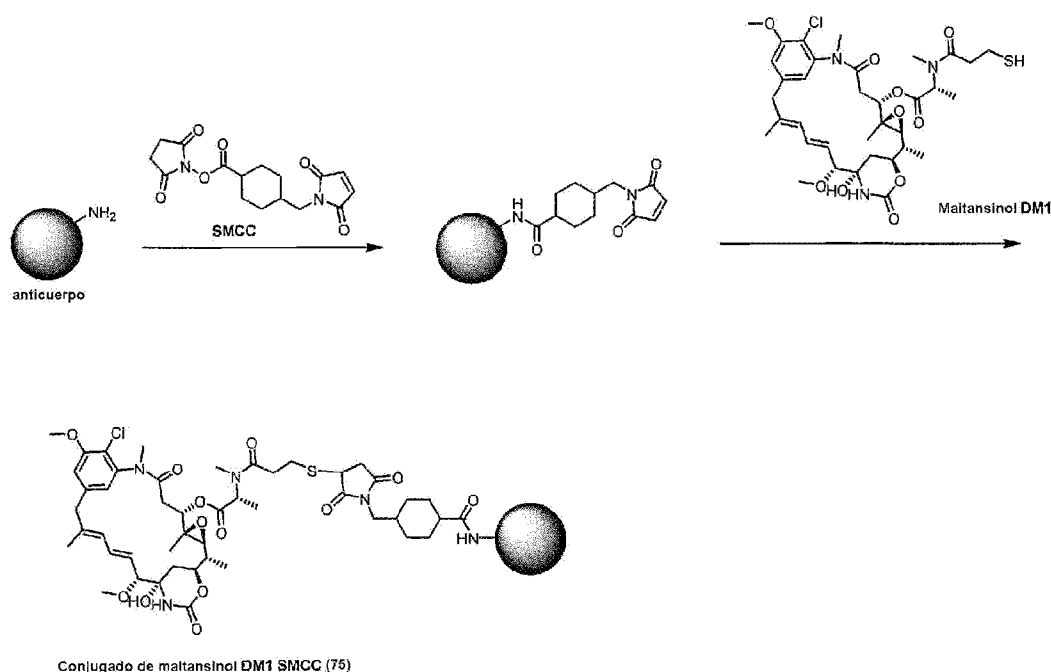
Ejemplo 24: Preparación de 6-maleimidocaproil-SGD-1910 (67)

5 Ejemplo 25: Preparación de maitansinol DM4 Mal-PEG₄-éster de NHS (68)

Ejemplo 26: Esquema para la síntesis de conjugados







Ejemplo 27: Expresión y purificación de un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

Construcción del clon scFv anti-HER2 de expresión citoplasmática, TCT

- 5 El marco de lectura abierto ("open reading frame", ORF) del scFv C6.5 [Adams G.P. *et al.*, Cancer Res., 2001, 61:4750-4755], que se sabe que tiene múltiples residuos de lisina en la superficie bien espaciados, se clonó en el vector de expresión pET32 Xa/LIC (Novagen) que porta el ORF de la tiorredoxina como marcador de fusión para permitir la expresión citoplasmática de la proteína. Para facilitar la escisión del marcador de fusión a bajo coste y la detección y seguimiento eficaces del scFv resultante, se introdujeron en el vector las siguientes características:
- 10 a) Sitio de escisión de la proteasa TEV, cadena abajo del sitio de escisión del factor Xa
- b) Región conectora entre el sitio de escisión de la proteasa TEV y el ORF C6.5. Sin esto, la proteasa TEV no se escinde, probablemente debido al hecho de que la estructura del scFv C6.5 obstaculiza estéricamente el acceso a su sitio de escisión.
- 15 c) Secuencia de marcaje T7 en el extremo C-terminal del C6.5. Se eligió este marcador porque carece de residuos de lisina.

La proteína resultante se denominó scFv (TCT) (sitio de escisión de Tev, C6.5, marcador T7). La secuencia de ADN se encuentra a continuación:

CLAVE:

Negrita = Ser residual tras la escisión de TEV

20 Subrayado = Región conectora (GSGGSG)

Sin formato = secuencia de C6

Negrita cursiva = secuencia del marcador T7

Secuencia de ADN del TCT escindido

AGCGGTAGCGGAGGTAGCGGACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGA
GGTGAAAAAGCCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATA
CAGCTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAG
GCCTGGAGTACATGGGGCTCATCTATCCTGGTGACTCTGACACCAAATACA
GCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGTCGACAAGTCCGTCAGCA
CTGCCTACTTGCAATGGAGCAGTCTGAAGCCCTCGGACAGCGCCGTGTATT
TTTGTGCGAGACATGACGTGGGATATTGCAGTAGTTCCAAGTGGCAGCGT
GGCCTGAATACTTCCAGCATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCT
CAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCA
GTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGG
TCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATC
CTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTCA
CACCAATCGGCCCCGAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG
CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGTTCGGTCCGAGGATGAGGCTGA
TTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTGTTCCGGCGG
AGGGACCAAGCTGACCGTCCTAATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAA
TGGGT [SEQ ID NO:1]

Secuencia de aminoácidos del TCT escindido

S G S G G S G Q V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S
Y W I A W V R Q M P G K G L E Y M G L I Y P G D S D T K Y S P S F Q G Q V T
I S V D K S V S T A Y L Q W S S L K P S D S A V Y F C A R H D V G Y C S S S
N C A A W P E Y F Q H W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G G S G G G G
S Q S V L T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C S G S S S N I G N N Y V S W Y
Q Q L P G T A P K L L I Y G H T N R P A G V P D R F S G S K S G T S A S L A I
S G F R S E D E A D Y Y C A A W D D S L S G W V F G G G T K L T V L M A S
M T G G Q Q M G [SEQ ID NO: 2]

5

Número de aminoácidos: 272

Peso molecular: 28 160 Da

PI teórico: 7,54

Coefficiente de extinción: 65 235

Expresión bacteriana en biorreactor de 15 l del clon scFv anti-HER2 de expresión citoplasmática, scFv (TCT)

10

La TCT se produjo en *E. coli* T7 competente SHUFFLE® (NEB). De cuatro a cinco colonias individuales de células transformadas cultivadas durante la noche en placa de agar selectivo se inocularon en primer lugar en 5 ml de medio selectivo 2TY+ glucosa al 1 %. Se transfirió 1 µl del cultivo que se observó que crecía más rápidamente a cultivos selectivos frescos de 5 ml de 2YT+ glucosa al 1% y se dejó crecer a 30 °C durante aproximadamente 10 horas. Estas etapas se realizaron para garantizar que el crecimiento celular no entrase en la fase de latencia durante demasiado tiempo y, por lo tanto, garantizar la estabilidad del plásmido dentro de las células en crecimiento.

15

Al día siguiente, se inoculó un precultivo selectivo de 0.5 L + glucosa al 1 % con uno de los dos cultivos de 5 ml. Medio utilizado, cultivo Supercharged Terrific Broth [triptona 12 g/l, extracto de levadura 24 g/l, Na₂HPO₄ 9 g/l, KH₂PO₄ 2,2 g/l, NH₄Cl 2,6 g/l, Na₂SO₄ 0,7 g/l, NaCl 1 g/l, glicerol 5 g/l]. Se ajustó el pH a 7,4, se sometió a autoclave y se añadió MgSO₄ 2 mM.

Después de 3,5 h, el precultivo (DO_{600} 0,8-1,2) se transfirió a un fermentador de 15 l (Applikon P1000) que contenía 14,5 l de caldo Supercharged Terrific Broth selectivo (carbenicilina 100 ug/l) + glucosa al 0,5 % y antiespumante PPG 2025 0,05 ml/l. La velocidad de las palas del agitador se ajustó entre 200-500 rpm para garantizar una disolución adecuada del oxígeno en el medio. Normalmente se aplicaron 200 rpm al principio y 400-500 después de la inducción. La temperatura inicial era de 37 °C o de 30 °C en función del tiempo de duplicación del cultivo (tiempos habituales de duplicación del cultivo (Td), 35-55 minutos).

Cuando la DO_{600} del cultivo era de aproximadamente 1,0, se ajustó el control de temperatura del cultivo a 26 °C y se dejó estabilizar durante aproximadamente 30 minutos. La inducción se llevó a cabo normalmente 3,5-5 horas después de la inoculación con 15 ml de IPTG 50 mM. Concentración final de cultivo IPTGm 50 uM. Es muy importante que las células estén bien ajustadas a 26 °C antes de la inducción con una concentración baja de IPTG, de lo contrario la cantidad de proteína soluble producida disminuye significativamente. El fermentador se acopló a un dispensador automático de antiespumante que se activa cuando se forma espuma.

Se dejó crecer el cultivo durante aproximadamente 16 horas y se recolectó utilizando Beckman JLA8.1000 durante 15 s a 5K rpm. La DO_{600} final = 35,7.

3) Purificación de proteínas

Las células se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 40 mM, pH 8, NaCl 750 mM, imidazol 2 mM) y se congelaron en nitrógeno líquido. El día de la lisis, las células congeladas se descongelaron completamente y el tampón de lisis se ajustó para obtener una concentración final de urea 2 M. Se empleó urea y una alta concentración de NaCl para garantizar una mejor purificación de IMAC. El scFv tratado con urea 2 M fue sondeado con RMN 1D para asegurar que la estructura del scFv (TCT) no se veía afectada.

Se añadieron comprimidos completos sin EDTA (Roche Diagnostics, 1/100 ml de solución de lisis) y benzonasa (Novagen >99 pureza, 5 ul/100 ml de solución de lisis). La lisis se realizó con un sistema de ruptura celular constante (modelo TS5) acoplado a un refrigerador que mantenía la cámara de ruptura celular a 4 °C. La ruptura celular se logró tres veces a una presión de 186158,45 kPa (27 kpsi). El volumen total del lisado ascendió a 2 l.

El lisado se centrifugó inicialmente con una centrifugadora Eppendorf 5810 R a 4000 rpm durante 40 minutos para eliminar la mayor parte de los restos celulares y después dos veces con una Sorvall RC 6+, rotor F21-8x50 a 17 000 rpm durante 40 minutos. A continuación, el sobrenadante aclarado se filtró a través de un filtro PES de 0,22 um (Corning) al vacío.

A continuación se realizó la IMAC utilizando la resina HisPur Ni-NTA de Thermo Scientific con flujo gravitatorio en columnas. La columna se equilibró con tampón de lisis que contenía urea 2 M. El sobrenadante aclarado se hizo pasar dos veces por la columna, seguido de un lavado de 10 volúmenes de lecho con el tampón de lisis. A continuación, la resina se lavó con 10 volúmenes de tampón de lavado 1 (Tris-HCl 40 mM, pH 8, NaCl 750 mM, urea 2 M, imidazol 10 mM) y después con tampón de lavado 2 (Tris-HCl 40 mM, pH 8, NaCl 750 mM, urea 2 M, imidazol 30 mM) hasta que no se observó ninguna absorbancia significativa a una DO de 280nm.

A continuación, se eluyó la proteína (Tris-HCl 40 mM, pH 8, NaCl 750 mM, imidazol 250 mM) hasta que no hubo lectura en DO 280 nm. A continuación, el eluido se dializó exhaustivamente en tampón de escisión de TEV (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM). A continuación, se ajustó la solución de proteína a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml y se añadió glutatión reducido hasta una concentración final de 3 mM. La proteasa TEV de producción propia, fusionada con un marcador de polihistidina, se añadió a 0,15 mg/100 mg de fusión descFv (TCT)(fFCT) y se dejó que la escisión se desarrollase durante 14-18 horas en una estufa de incubación con agitación rotatoria a 4 °C.

La solución de proteína escindida se hizo pasar 3 veces a través de la resina Ni-NTA. El scFv escindido (TCT) fluyó a través de ella, mientras que el marcador de fusión de tioredoxina, la proteasa TEV y otras proteínas permanecieron unidas a la resina. Un resumen del SDS-PAGE de la purificación se muestra en la figura 2

El scFv TCT se dializó en tampón de almacenamiento (acetato de sodio 20 mM, pH 5, NaCl 150 mM) y luego se realizó la SEC para eliminar los contaminantes de alto peso molecular y los agregados solubles de scFv (TCT) (figura 3). Se seleccionó este tampón en lugar de otros que no contienen grupos amino porque se demostró que el Fvc (TCT) era estable en él tras ser sometido a múltiples ciclos de congelación-descongelación.

Ejemplo 28: Diseño de proteínas, expresión y purificación de un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario para que porte múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

Un fragmento de anticuerpo que no posea suficientes residuos de lisina bien espaciados y que presente propiedades de conjugación deficientes (DAR habituales < 5) puede modificarse mediante mutagénesis dirigida para que tenga una configuración similar a la del Fv (TCT). Utilizando conceptos estructurales de anticuerpos y proteínas generales y aceptados de la bibliografía [Alzari P.M. *et al.*, Annual Rev. Immunol., 1988, 6:555-580; Davies D.R. y Metzger H., Annual Rev. Immunol., 1983, 1:87-117; Mariuzza R.A. *et al.*, Annual Review Biophys. & Biophysical Chem., 1987, 16:139-159] junto con software de modelización molecular tridimensional (por ejemplo, PyMOL, <http://www.pymol.org>, Schrodinger KK, Japón) y herramientas de alineación, tales como Clustal, pueden

identificarse posiciones dentro de la secuencia primaria de la proteína que pueden mutarse a residuos de lisina, cuando se sabe que los residuos de lisina son bien tolerados en esa posición (utilizando bases de datos, tales como IMGT o Kabat) o se sabe (a partir de una estructura tridimensional resuelta) o se predice (utilizando software, tal como Phyre) que están en la superficie de la proteína (figura 1). La estructura bien conservada del plegamiento de la inmunoglobulina puede aplicarse a los anticuerpos y a los dominios similares a los anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos modificados con residuos de lisina recién introducidos, eliminados o sustituidos pueden expresarse y purificarse como se describe en el ejemplo 27 y someterse a pruebas de termoestabilidad y estabilidad química, así como de función de unión, antes de aceptar la modificación como satisfactoria.

Ejemplo 29: Bioconjugación de derivados de elipticina en un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

Elipticina

Se conjugó elipticina-Cs-NHS (compuesto 21) con scFv-TCT en PBS a pH 8,0 en MeCN al 6 % con cantidades variables de DMSO (ya sea al 14 % o al 6 %) y dos conjuntos diferentes de equivalentes de fármaco en exceso. El NHS se añadió en 5 porciones equivalentes para la reacción 1 y en 2,7 porciones equivalentes para las reacciones 2 y 3. Más detalladamente, la elipticina-NHS se disolvió en DMSO anhidro para obtener una solución madre 50 mM de color amarillo/naranja claro. Una solución madre de scFv (TCT) en PBS pH 8,0, almacenada a 4 °C, se diluyó en PBS desgasificado, pH 8,0, preequilibrado con MeCN al 6 % y DMSO al 14 % o al 6 %. El NHS se añadió en porciones de 5 o 2,7 equivalentes cada 75 min mientras se mezclaba en un mezclador vorticial a temperatura ambiente. Transcurridas 4 h desde la finalización de la adición, las muestras se recuperaron por centrifugación (2,5 min, 11 krpm). El sobrenadante se recuperó y purificó mediante columnas Zeba (Pierce) preequilibradas con el mismo tampón que la mezcla de reacción de cada muestra. A continuación, las muestras se dializaron 4000x en MeCN al 6 %/PBS, pH 7,3, durante una noche a 4 °C y luego 8000x. Las muestras se recuperaron y analizaron mediante SDS-PAGE (figura 4), espectroscopia de UV/vis (figura 5) y densitometría.

Los conjugados se volvieron insolubles y precipitaron de la solución una vez que se obtuvo una determinada DAR. Como ejemplo, la muestra 1 anterior contenía pequeñas cantidades de proteína/conjugado tras la centrifugación y aún menos una vez que se intentó la purificación mediante columnas Zeba, lo que indica que el conjugado soluble residual era muy hidrófobo y se adhirió a la columna. Había una cantidad significativa de proteína/conjugado en la muestra de sedimentos de esta reacción, como se observa principalmente en el gel fluorescente, es decir, la recuperación de conjugado soluble era baja. Los datos de UV/vis también corroboran esta afirmación. La precipitación fue mucho menos pronunciada en las muestras 2 y 3, que tenían 16 equivalentes de fármaco frente a los 32 de la reacción 1. Las muestras de sedimentos eran menos intensas y el material soluble más destacado tanto en la detección de Coomassie como en la de fluorescencia. Hay una indicación de que la muestra 2 migró menos lejos en el gel que la muestra 3, lo que apoya el razonamiento de que una mayor cantidad de DMSO puede conducir a una mayor solubilidad del fármaco, aumentando así la eficiencia de la reacción y dando lugar a mayores DAR. En general, la reacción 2 tenía menos equivalentes de NHS que la 1, lo que conduce a una menor DAR que parece ser más soluble, pero al mismo tiempo tiene el mismo número de equivalentes que la 3, apoyando así el argumento del disolvente orgánico.

Las DAR fueron calculadas para estas reacciones usando sus espectros de absorción de UV/vis en tampón (figura 5) y el coeficiente de extinción obtenido experimentalmente para el ácido de elipticina. La proporción obtenida espectrofotométricamente se corrigió utilizando los datos de densitometría del gel fluorescente (porcentaje de fármaco conjugado frente al porcentaje de fármaco no reaccionado/no unido covalentemente, tabla 4). Se obtuvo una proporción fármaco:anticuerpo superior a 5 en las mejores condiciones de reacción, a pesar de la escasa solubilidad del fármaco. La recuperación global de proteínas fue aceptable.

Cuantificación de la carga de fármaco a anticuerpo de un conjugado de scFv-elipticina

Tabla 4. DAR finales para ADC de scFv (TCT)-elipticina.

n.º	Reacción	DAR final
1	32 equivalentes, DMSO al 14 %	5,4
2	16 equivalentes, DMSO al 14 %	5,1
3	16 equivalentes, DMSO al 6 %	3,9

PEG-elipticina

Se conjugó scFv-TCT con otro derivado de elipticina-NHS con una cadena corta de PEG para aumentar la solubilidad en agua (compuesto 23). La conjugación se realizó en paralelo con elipticina-NHS como control, utilizando las mejores

condiciones para la elipticina con el fin de obtener una DAR de 5, que fue el máximo obtenido en la fase soluble. Las reacciones se prepararon como se ha descrito anteriormente, utilizando scFv con una pureza del 99 %. El scFv en PBS pH 8,0 se diluyó en PBS, pH 8,0, se preequilibró con DMSO (al 14 %) y MeCN (al 6 %), y luego se incubó durante 5 min en un mezclador vortical, agitando suavemente a temperatura ambiente. Los fármacos de NHS brutos se disolvieron en DMSO anhidro hasta obtener una solución madre 50 mM y se añadieron en dos porciones a lo largo de 15 min y se incubaron durante 2 h más a temperatura ambiente. Las muestras se recuperaron por centrifugación y se almacenaron a 4 °C antes de ser purificadas utilizando columnas Zeba preequilibradas con DMSO al 14 %/MeCN al 6 %/PBS, pH 7,3. Los sedimentos se resuspendieron en tampón y tampón de carga de gel y todas las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE (Coomassie y fluorescencia, figura 6) y espectroscopia de UV/vis. El precipitado de 2 no pudo volver a disolverse.

Comparando la elipticina con PEG-elipticina, es evidente que, bajo las mismas condiciones de reacción (1 y 2), el derivado de PEG conduce a una mayor recuperación de conjugado/proteína soluble (compuesto 73). Las bandas para 2 son muy débiles en comparación con 1 tanto en la detección de Coomassie como en la de fluorescencia. Al comparar las tres condiciones de reacción en las que se investigó el número de equivalentes para elevar la DAR, se produjo un desplazamiento en el gel que indica que quizás 4 tiene una DAR mayor que 3 y 1. La recuperación de proteínas es menor para 4Z que para las otras dos, lo que indica que, de nuevo, se ha alcanzado la carga máxima, momento en el que los conjugados de mayor DAR precipitan fuera de la solución.

Usando el UV/vis junto con los datos de densitometría (para calcular el porcentaje de unión no covalente), se calcularon los valores DAR como sigue: (1): 4,1 (2): 2,0 (3): 5,1 y (4): 4,3 (tabla 5). Esto confirmó que el PEG elipticina dio lugar a una recuperación de proteínas dos veces superior y a una DAR hasta dos veces superior en comparación con la elipticina. La precipitación del conjugado parece haber mejorado.

Tabla 5. DAR finales para ADC de scFv (TCT)-PEG-elipticina (compuesto 73)

n.º	Reacción	DAR final
1	20 equivalentes, DMSO al 14 %, MeCN al 6 %	4,1
2	20 equivalentes, DMSO al 14 %, MeCN al 6 %	2,0
3	32 equivalentes, DMSO al 14 %, MeCN al 6 %	5,1
4	64 equivalentes, DMSO al 14 %, MeCN al 6 %	4,3

La conjugación con elipticina se llevó a cabo en una IgG completa como comparación con el scFv (TCT) en condiciones idénticas. Los geles de SDS-PAGE indican una fluorescencia de conjugación al menos equivalente (figuras 7 y 8), por lo que las DAR son similares.

Elipticina lisosómicamente liberable

Se conjugó un dipéptido escindible de elipticina-NHS (compuesto 29) con scFv (TCT) para obtener conjugados con diversas DAR. La reacción se controló para obtener productos con DAR baja, intermedia y alta. En un principio, se determinó la velocidad de hidrólisis del dipéptido escindible aislado puro elipticina-NHS en diversas condiciones de tampón. Las condiciones producían una velocidad de hidrólisis razonable, es decir, no demasiado rápida para que el NHS se hidrolizara al ácido antes de reaccionar con las lisinas y no demasiado lenta para que la reacción tardara demasiado en completarse. Otros factores que se tuvieron en cuenta fueron la estabilidad del anticuerpo en el tampón/pH/disolvente orgánico, la estabilidad del fármaco y la concentración del fármaco en el tampón. Este último es un parámetro crucial; cuanto más concentrado esté el fármaco en la solución, más disminuirá la velocidad de hidrólisis. Por lo tanto, es necesario controlar la concentración para que la hidrólisis sea eficaz. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

- Tampón: tampón bicarbonato con NaCl a pH 8,8 con DMSO al 20 % y glicerol al 30 %;
- Temperatura: 25 °C;
- Condiciones de mezclado: Thermomixer 1000 rpm;
- Anticuerpo a 1 mg/ml,
- Dipéptido escindible elipticina-NHS: porciones de adición de 8 equivalentes; y,

- Tasa de adición de NHS-fármaco (cada 70-90 minutos).

Por lo general, el scFv (TCT) se descongeló en el termomezclador a 4 °C, luego la temperatura de la parte alícuota se elevó lentamente hasta 20 °C. Cualquier precipitado se centrifugó antes de usar.

5 Se preparó una solución madre 100 mM del dipéptido escindible elipticina-NHS (compuesto 29) en DMSO anhidro filtrado. Cualquier precipitado se recogió por centrifugación. Se mezcló tampón bicarbonato, pH 8,8, con DMSO filtrado y glicerol en microtubos Eppendorf y se equilibró el tampón en el termomezclador a 4 °C, después se elevó la temperatura de la parte alícuota hasta 20 °C mientras se mezclaba a 1000 rpm. Se añadió el anticuerpo y se equilibró (20 °C, 1000 rpm) durante 10 min antes de comenzar la adición del dipéptido escindible elipticina-NHS. Esto se llevó a cabo añadiendo 8 equivalentes del fármaco NHS en DMSO e invirtiendo para mezclar cada 70 minutos, antes de volver a encender el termomezclador y mezclar a 25 °C, 1000 rpm. El número total de equivalentes utilizados dependía de la DAR requerida. Las muestras se dejaron en el termomezclador durante otras 2 horas después de la última adición. A continuación, las muestras se recogieron por centrifugación (2,5 min, 11 krpm). La única precipitación visible se produjo en la muestra con el mayor número de equivalentes de fármaco y fue muy baja.

15 Todas las muestras se hicieron pasar inicialmente por una columna Zeba (Pierce) preequilibrada con IPA al 10 %/PBS antes de purificarse en la HPLC-SEC con IPA al 20 %/IPA/PBS, pH 7, 25 °C, y analizarse por SDS-PAGE, HPLC-SEC, espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente.

20 Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño por HPLC utilizando una columna Tosoh TSKGel G2000Wxl. El ScFv tiene un tiempo de retención correspondiente a un Pm de aproximadamente 30 KDa. Todos los conjugados eluyeron antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de picos principalmente monoméricos, lo que indica poca o ninguna agregación.

El análisis de espectrometría de masas fue realizado por SGS M-Scan. Los conjugados, así como el ScFv-TCT (control), se analizaron tanto por MALDI-MS como por LC-MS. Todas las muestras produjeron picos bien resueltos.

25 Ejemplo 30: Bioconjugación de derivados de doxorubicina a un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

(a) Conjugación en una sola etapa con el derivado de doxorubicina-NHS

30 Se conjugaron derivados de doxorubicina (compuestos 7, 10, 16) con un grupo reactivo NHS a scFv (TCT) para obtener conjugados con diversas DAR. La reacción se controló para obtener productos con DAR baja, intermedia y alta. Inicialmente, se determinó la velocidad de hidrólisis de los derivados de doxorubicina-NHS puros aislados en diversas condiciones de tampón. Las condiciones producían una velocidad de hidrólisis razonable, es decir, no demasiado rápida para que el NHS se hidrolizara al ácido antes de reaccionar con las lisinas y no demasiado lenta para que la reacción tardara demasiado en completarse. Otros factores que se tuvieron en cuenta fueron la estabilidad del anticuerpo en el tampón/pH/disolvente orgánico, la estabilidad del fármaco y la concentración del fármaco en el tampón. Este último es un parámetro crucial; cuanto más concentrado esté el fármaco en la solución, más disminuirá la velocidad de hidrólisis. Por lo tanto, es necesario controlar la concentración para que la hidrólisis sea eficaz. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

- Tampón: tampón bicarbonato con NaCl a pH 7,8 con DMSO al 20 %, glicerol al 30 % y Tween al 1 %;
- Temperatura: 25 °C;
- Condiciones de mezclado: Thermomixer 1000 rpm;
- 40 • Anticuerpo a 1 mg/ml;
- Derivados de doxorubicina-NHS: porciones de adición de 2 equivalentes; y,
- Tasa de adición de fármaco-NHS: cada 70-90 minutos.

45 Por lo general, el scFv (TCT) se descongeló en el termomezclador a 4 °C, luego la temperatura de la parte alícuota del anticuerpo se elevó lentamente hasta 20 °C. Las partes alícuotas se centrifugaron para recoger cualquier precipitado antes de su uso.

50 Se preparó una disolución madre de 100 mM de los derivados de doxorubicina-NHS en DMSO anhidro filtrado. Cualquier precipitado se recogió por centrifugación. Se mezcló tampón bicarbonato, pH 8,8, con DMSO filtrado y glicerol en microtubos Eppendorf y se equilibró el tampón en el termomezclador a 4 °C, después se elevó la temperatura de la parte alícuota hasta 20 °C mientras se mezclaba a 1000 rpm. Se añadió el anticuerpo y se equilibró (20 °C, 1000 rpm) durante 10 min antes de comenzar la adición de los derivados de doxorubicina-NHS.

Esto se llevó a cabo añadiendo 4 equivalentes de la disolución madre en DMSO de fármaco-NHS e invirtiendo para mezclar cada 70 min, antes de volver a introducir en el termomezclador y mezclar a 25 °C, 1000 rpm. El número total de equivalentes utilizados dependía de la DAR requerida. Las muestras se dejaron en el termomezclador durante otras 2 horas después de la última adición. A continuación, las muestras se recogieron por centrifugación (2,5 min, 11 krpm). La única precipitación visible se produjo en la muestra con el mayor número de equivalentes de fármaco y fue muy baja.

Todas las muestras se hicieron pasar inicialmente por una columna Zeba (Pierce) preequilibrada con IPA al 10 %/PBS antes de purificarse en la HPLC-SEC con IPA al 20 %/PBS, pH 7, 25 °C y analizarse después por SDS-PAGE, HPLC-SEC, espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente.

Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño por HPLC utilizando una columna Tosoh TSKGel G2000Wxl. El ScFv tiene un tiempo de retención correspondiente a un Pm de aproximadamente 30 KDa. Todos los conjugados eluyeron antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de picos principalmente monoméricos, lo que indica poca o ninguna agregación.

El análisis de espectrometría de masas fue realizado por SGS M-Scan. Los conjugados, así como el ScFv-TCT (control), se analizaron tanto por MALDI-MS como por LC-MS. Todas las muestras produjeron picos bien resueltos. La DAR se determinó utilizando el coeficiente de extinción para el fármaco doxorubicina y el anticuerpo

(b) Conjugación en dos etapas a un derivado de doxorubicina-maleimida

Para conjugar los derivados de maleimida de doxorubicina (compuestos 48, 12) al anticuerpo, en primer lugar, las lisinas nativas del anticuerpo se convirtieron químicamente en un tiol protegido que posteriormente se redujo para obtener el tiol libre. Los tioles libres podían entonces reaccionar con derivados de maleimida de la doxorubicina para obtener conjugados que contuvieran enlaces tioéter.

Se optimizó la primera etapa de introducción de los tioles en el anticuerpo. Esto implicaba la conjugación del conector SPDP al anticuerpo para formar un enlace amida entre el grupo conector y el anticuerpo. Un scFv optimizado para la lisina facilitó la producción de conjugados altamente sustituidos con SPDP para la posterior conjugación de un fármaco derivado de la maleimida.

En general, el SPDP se conjugó bien incluso a pH más bajos (7 u 8). Cuando se redujo con suficiente TCEP (exceso molar de 115) se produjo una proporción SH:scFv de hasta 12. La conjugación de SPDP se llevó a cabo para introducir diversas proporciones de conector SPDP por anticuerpo.

Los anticuerpos, C6.5 y HMFG1, ambos a 1 mg/ml, se diluyeron en PBS desgasificado, pH 8, que contenía EDTA 1 mM, DMSO al 3 % y MeCN al 6 %. Se preparó una solución fresca e incolora de SPDP en DMSO anhidro y se añadió la cantidad necesaria a la solución de anticuerpos. Las muestras se incubaron en una estufa de incubación con agitación rotatoria durante 3 h a temperatura ambiente y a 4 °C durante la noche. Las muestras se recogieron por centrifugación cuando se observó una precipitación mínima. El conector SPDP sobrante/no conjugado se eliminó utilizando columnas de centrifugación Zeba (ThermoScientific) e intercambiando el tampón en PBS desgasificado, pH 8, con EDTA 1 mM. Se registraron los espectros UV/vis de las muestras.

Para la reducción del conector para liberar el tiol libre del anticuerpo y, al mismo tiempo, la piridin-2-tiona, se realizó lo siguiente. En primer lugar, el TCEP se disolvió (fresco) en agua para obtener una solución madre 500 mM. Las muestras unidas a SPDP se incubaron con 115 equivalentes de TCEP durante 20 min a 37 °C. Las muestras se recogieron por centrifugación y se enfriaron inmediatamente en hielo. Los espectros de UV/vis de las muestras brutas se registraron antes de eliminar el exceso de TCEP y piridin-2-tiona utilizando columnas de desalación Zeba con DMSO al 3 %/MeCN al 6 % en PBS desgasificado, pH 7, con EDTA 1 mM como eluyente.

En este momento, se determinó la eficacia de la conjugación de SPDP. La cantidad de piridin-2-tiona liberada en la muestra bruta reducida se determinó utilizando los datos espectrofotométricos. La Amáx para la piridin-2-tiona es de 343 nm y el coeficiente de extinción de 8080 M⁻¹cm⁻¹. El coeficiente de extinción a 280 nm es de 5100M⁻¹cm⁻¹ y se utilizó para corregir la absorción a 280 nm. La concentración de la tiona en la solución reducida bruta se calculó utilizando la A343 nm y utilizando esta concentración se corrigió la absorción a 280 nm para tener en cuenta la absorción de la tiona. Se calculó la concentración de anticuerpos y se determinó la proporción SPDP:Ab. Se repitió el mismo proceso para la muestra anterior a la reducción y esta DAR se restó de la DAR de la muestra reducida para obtener la proporción SPDP:Ab real.

Después de la purificación de la muestra reducida, se obtuvieron los siguientes conjugados (tabla 6), demostrándose que hasta 9 conectores podían ser conjugados al scFv (TCT).

Tabla 6. Proporción del conector SPDP conjugado con un scFv optimizado para lisina y una IgG de control

	C6.5 scFv		HMFG1 IgG	
Proporción de reacción del conector SPDP	Proporción conector a Ab	Recuperación de Ab	Proporción conector a Ab	Recuperación de Ab
5	0,9	71 %	4,4	93 %
8	1,8	71 %	6,3	81 %
16	4	65 %	8,2	80 %
32	9	38 %	13	44 %

En otro ejemplo, el procedimiento anterior se llevó a cabo de manera similar utilizando 32 equivalentes de SPDP y posteriormente reduciendo las muestras con 115 equivalentes de TCEP. La recuperación de anticuerpos en este caso fue mucho mayor (92 %). A continuación, las muestras reducidas, purificadas y cuantificadas se conjugaron con doxorubicina. Se añadieron doxorubicina maleimida y doxorubicina-PEG-maleimida a las muestras de anticuerpos (en PBS desgasificado, pH7/EDTA 1 mM/DMSO al 3 %/MeCN al 6 %) a 2 equivalentes cada uno. Las muestras se incubaron en una estufa de incubación con agitación rotatoria a temperatura ambiente durante 3 h y luego a 4 °C durante la noche. Las muestras se recuperaron por centrifugación y se analizaron mediante gel SDS-PAGE (figura 9) y espectroscopia UV/vis.

La DAR para los conjugados de Dox se calculó a partir de las muestras brutas utilizando espectroscopia UV/vis y densitometría de gel. A partir de los datos espectroscópicos, se calculó la DAR utilizando la ϵ de la Doxorubicina a 488 nm y 280 nm y la ϵ del anticuerpo a 280 nm (tabla 7).

Tabla 7. Proporción de conector SPDP conjugado con un scFv optimizado para lisina y una IgG de control, seguido de conjugaciones con derivados de doxorubicina

	C6.5 scFv				HMFG1 IgG			
Proporción de reacción del conector SPDP	Proporción conector a Ab	Recuperación de Ab	Dox: DAR Ab	Dox-PEG: DAR Ab	Proporción conector a Ab	Recuperación de Ab	Dox: DAR Ab	Dox-PEG: DAR Ab
32	7,5	92 %	3,5	1,6	6,5	50 %	N/A	2,5

La DAR se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar determinado experimentalmente para los fármacos doxorubicina (tabla 7) y anticuerpo y se confirmó por espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente.

Unión de conjugados de scFv con alta proporción de SPDP

El scFv C6.5 se conjugó con SPDP como en el ejemplo 30(b) con 16 equivalentes de reactivo en exceso, seguido de reducción con 115 equivalentes molares de TCEP para obtener una proporción de conector a anticuerpo de 5,4 (SPDP:scFv). Se utilizó esta muestra, así como un control no modificado y un control no modificado con SPDP pero reducido.

Se recubrieron placas ELISA Immunosorb de noventa y seis pocillos con HER2-Fc 10 µg/ml en PBS, seguido de las muestras de ensayo, IgG anti-myc (Sigma) y conjugado de peroxidasa antirratón (Sigma). Se realizaron lavados exhaustivos con PBS entre cada capa y la detección se realizó con sustrato BM-Blue. El gráfico (figura 10) demuestra que el anticuerpo no modificado con una K_d de 25 nM presentó una afinidad ligeramente reducida por HER2 a 42 nM tras la reducción, pero ésta se recuperó cuando el anticuerpo se conjugó primero con SPDP para introducir más tioles y luego se redujo, K_d = 24,9 nM.

Ejemplo 31: Bioconjugación de P5 y derivados de cemadotina a un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

(A). ScFv (TCT)-cemadotina

La cemadotina-NHS (compuesto 2) se conjugó con scFv (TCT) para obtener conjugados (compuesto 69) con diversas DAR. La reacción se controló para obtener productos con DAR baja, intermedio y alta. Inicialmente, se determinó la velocidad de hidrólisis de la cemadotina-NHS pura y aislada en diversas condiciones de tampón. Las condiciones producían una velocidad de hidrólisis razonable, es decir, no demasiado rápida para que el NHS se hidrolizara al ácido antes de reaccionar con las lisinas y no demasiado lenta para que la reacción tardara demasiado en completarse. Otros factores que se tuvieron en cuenta fueron la estabilidad del anticuerpo en el tampón/pH/disolvente orgánico, la estabilidad del fármaco y la concentración del fármaco en el tampón. Este último es un parámetro crucial: cuanto más concentrado esté el fármaco en la solución, más disminuirá la velocidad de hidrólisis. Por lo tanto, es necesario controlar la concentración para que la hidrólisis sea eficaz. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

- 10 • Tampón: tampón de bicarbonato con NaCl a pH 8,8 con DMSO al 20 %;
- Temperatura: 20 °C;
- Condiciones de mezclado: Thermomixer 1000 rpm;
- Anticuerpo a 1 mg/ml;
- Cemadotina/cemadotina-C5 y P5C5, todos NHS (porciones de adición de 16 equivalentes); y,
- 15 • Tasa de adición de fármaco- NHS (cada 70-90 min).

Por lo general, el scFv (TCT) fue descongelado en el Thermomixer a 4 °C, luego la temperatura de la parte alícuota aumentó lentamente hasta 20 °C. Las partes alícuotas se centrifugaron para recoger cualquier precipitado antes de su uso.

- 20 Se preparó una solución madre de cemadotina-NHS 100 mM en DMSO anhidro filtrado. Cualquier precipitado se recogió por centrifugación. Se mezcló tampón bicarbonato, pH 8,8, con DMSO filtrado en microtubos Eppendorf y se equilibró el tampón en un Thermomixer (aumentando la temperatura de 4 °C a 20 °C, mientras se mezclaba a 1000 rpm). Se añadió el anticuerpo y se equilibró (20 °C, 1000 rpm) durante 10 min antes de añadir la cemadotina-NHS. Para ello, se añadieron 16 equivalentes de la solución madre en DMSO de NHS-fármaco y se invirtió para mezclar cada 70 min, antes de volver a introducirlo en el Thermomixer y mezclar a 20 °C, 1000 rpm. El número total de equivalentes utilizados dependió de la DAR requerida. Las muestras se dejaron en el Thermomixer durante 2 horas más después de la última adición. A continuación, las muestras se recogieron por centrifugación (2,5 min, 11 krpm). La única precipitación visible se produjo en la muestra con el mayor número de equivalentes de fármaco y fue muy baja.

- 30 Todas las muestras se purificaron a partir del producto bruto en la HPLC-SEC con IPA al 10 %/PBS, pH 7, 20 °C y se analizaron por SDS-PAGE (figura 11), HPLC-SEC (figura 12), análisis de aminoácidos (tabla 8A-8C), espectrometría de masas (figuras 13A-C, 14A-C, 15A-C, 16A-C, 17, 18, 19, 20, tablas 9 y 10) y ELISA de unión (figura 21). En este ejemplo, la configuración era:

Reacción 1: scFv-TCT-cemadotina 16 equivalentes;

Reacción 2: scFv-TCT-cemadotina 48 equivalentes; y

- 35 **Reacción 3: scFv-TCT-cemadotina 112 equivalentes.**

Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño HPLC utilizando una columna Tosoh TSKGel G2000Wxl. El ScFv tiene un tiempo de retención de 15,5-16 min, lo que corresponde a un Pm de aproximadamente 30k Da. Los tres conjugados eluyeron ligera y progresivamente antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de un pico único, nítido y monomérico, lo que indica que no hay agregación (figura 12A-C).

- 45 La DAR se determinó con precisión mediante análisis de aminoácidos (AAA) en la Instalación de Química de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Cambridge. A partir del AAA (tabla 7A-C), se puede deducir la cantidad en moles tanto de la proteína como del fármaco (debido a la liberación de la huella de ácido 4-aminometilbenzoico desde el fármaco) y calcular la DAR ($n.^{\circ}$ de moles de fármaco/ $n.^{\circ}$ de moles de proteína). La concentración de la proteína en la solución puede calcularse calculando, en primer lugar, el peso molecular de los conjugados en función de la DAR, y convirtiendo posteriormente la concentración obtenida de AAA a mg/ml de proteína. Por ejemplo, en la muestra 1: scFv (TCT) es 28162 (MS), DAR es 3,9, y cada molécula de cemadotina añade 667 al anticuerpo. Por tanto, Pm del conjugado = $28162 + (3,9 \times 667) = 30763$. La concentración es de 9,02 nmol/ml, lo que equivale a 277 µg/ml de proteína.

Muestra:	1	Tabla 8A	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Cys	6	excluido	-
Asp	15	15,35	mejor que el 5 %
Thr	14	13,67	mejor que el 5 %
Ser	46	44,48	mejor que el 5 %
Glu	22	21,72	mejor que el 5 %
Gly	44	43,97	mejor que el 5 %
Ala	17	17,21	mejor que el 5 %
Val	18	19,74	dentro del 5-10 %
Met	5	excluido	-
Ile	8	7,87	mejor que el 5 %
Leu	15	14,84	mejor que el 5 %
Patrón de Norleu			-
Tyr	14	13,42	mejor que el 5 %
Phe	7	6,86	mejor que el 5 %
His	3	2,98	mejor que el 5 %
Lys	12	12,72	dentro del 5-10 %
Arg	5	5,17	mejor que el 5 %
Pro	0	excluido	-
Trp	8	8,00	(no determinado)
Total	259	residuos	
			Promedio de 2 ejecuciones
Muestra total	0,726	nmoles	0,72
	20,43	ug	20,32

Muestra:	1	Tabla 8A	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Concentración	9,07	nmoles/ml	9,02
	255,42	ug/ml	254,00
Cemadotina nmoles	2,82	2,81	2,81
DAR =	3,90		

Muestra:	2	Tabla 8B	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Cys	6	excluido	-
Asp	15	15,38	mejor que el 5 %
Thr	14	13,69	mejor que el 5 %
Ser	46	44,17	mejor que el 5 %
Glu	22	21,61	mejor que el 5 %
Gly	44	44,25	mejor que el 5 %
Ala	17	16,91	mejor que el 5 %
Val	18	20,00	dentro del 5-10 %
Met	5	excluido	-
Ile	8	8,04	mejor que el 5 %
Leu	15	14,93	mejor que el 5 %
Patrón de Norleu			
Tyr	14	13,24	dentro del 5-10 %
Phe	7	7,07	mejor que el 5 %

Muestra:	2	Tabla 8B	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
His	3	3,03	mejor que el 5 %
Lys	12	12,62	mejor que el 5 %
Arg	5	5,05	mejor que el 5 %
Pro	0	0,00	-
Trp	8	8,00	(no determinado)
Total	259	residuos	
			Promedio de 2 ejecuciones
Muestra total	0,806	nmoles	0,80
	22,69	ug	22,64
Concentración	6,20	nmoles/ml	6,18
	174,54	ug/ml	174,19
Cemadotina nmoles	6,66	6,54	6,60
DAR =	8,21		

Tablas 8A-C. Resumen de los resultados de AAA que muestran las DAR de 3,9, 8,2 y 11 de las tres reacciones de conjugación 1-3

Muestra:	3	Tabla 8C	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Cys	6	excluido	-
Asp	15	15,76	mejor que el 5 %
Thr	14	13,78	mejor que el 5 %
Ser	46	44,47	mejor que el 5 %
Glu	22	21,92	mejor que el 5 %

Muestra:	3	Tabla 8C	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Gly	44	44,59	mejor que el 5 %
Ala	17	17,20	mejor que el 5 %
Val	18	excluido	-
Met	5	excluido	-
Ile	8	7,66	mejor que el 5 %
Leu	15	15,09	mejor que el 5 %
Patrón de Norleu			-
Tyr	14	13,71	mejor que el 5 %
Phe	7	6,81	mejor que el 5 %
His	3	3,06	mejor que el 5 %
Lys	12	12,81	dentro del 5-10 %
Arg	5	5,14	mejor que el 5 %
Pro	0	0,00	-
Trp	8	8,00	(no determinado)
Total	259	residuos	
			Promedio de 2 ejecuciones
Muestra total	0,796	nmoles	0,79
	22,42	ug	22,21
Concentración	7,24	nmoles/ml	7,17
	203,78	ug/ml	201,88
Cemadotina nmoles	8,83	8,46	8,65
DAR =	10,96		

El análisis de espectrometría de masas fue realizado por SGS M-Scan. Las muestras 1-3, así como ScFv-TCT (control), se analizaron por MALDI-MS y posteriormente por LC-MS. Todas las muestras produjeron picos bien resueltos, que se resumen a continuación.

Ionización por electronebulización, espectrometría de masas (ESI-MS)

5 Equipo: Los análisis se realizaron con un espectrómetro de masas Waters Xevo Q-TOF (cuadrupolo-tiempo de vuelo ["Quadrupole-Time of Flight", Q-TOF]) acoplado a un sistema Dionex Ultimate 3000 MDLC (PNT MS900 a MS905 y HPLC012 y HPLC019).

10 Intercambio de tampón: Las muestras se sometieron a intercambio de tampón y se concentraron, utilizando unidades de filtración centrífuga Millipore Amicon (10 kDa MWCO ["molecular weight cut-off", valor corte de peso molecular] hacia ácido fórmico al 0,05 % (v/v).

Análisis ESI-MS en línea: se analizaron partes alícuotas de las muestras de TCT-cemadotina mediante análisis HPLC/ES-MS en línea para obtener datos relativos a la masa intacta de los constituyentes de la siguiente manera:

15 Instrumento: Espectrómetro de masas Waters Xevo Q-ToF (2Quadrupole-Time of Flight") G1 equipado con un sistema Dionex Ultimate 3000 MDLC. Columna: Columna PLRP-S, Temperatura: 60 °C, Caudal: 0,2 ml/minuto, detección UV: 214 nm y 280 nm, Disolvente A: ácido fórmico al 0,05 % (v/v), Disolvente B: acetonitrilo al 90 % (ac.) que contenía ácido fórmico al 0,05 % (v/v).

Gradiente:

Tiempo (min)	% de B
0	20
5	55
65	75
73	75
73,1	98
83	98
83,1	20
111	20

20 El espectrómetro de masas se calibró externamente utilizando Glu-Fibrinopeptide B, que también se utilizó como calibrador interno LockSpray. El espectrómetro de masas realizó la exploración de m/z 200 a 4000.

ESI-MS de muestras de TCT-cemadotina 2

25 Se analizaron partes alícuotas de muestras de TCT-cemadotina 2 mediante análisis HPLC/ES-MS en línea para obtener datos relativos a la masa intacta de los constituyentes. A continuación, se muestran los cromatogramas de corriente iónica total ("Total Ion Current", TIC), los espectros y los datos transformados de las muestras TCT-cemadotina 2 (figura 13A-C).

Se observó un pico principal en el TIC de la muestra de TCT-cemadotina 2 que eluía a 35,9 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo una serie de picos principales a m/z 32,164, 32,831 y 33,498, lo que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula de scFv (TCT), junto con 6-8 adiciones de la molécula de cemadotina. Esto se correlacionó bien con la determinación AAA de la DAR de 8,21

30 *ESI-MS de las muestras 1, 3 y TCT*

Se analizaron alícuotas de las muestras TCT-cemadotina 1, TCT-cemadotina 3 y de control scFv (TCT) mediante análisis HPLC/ES-MS en línea para obtener datos relativos a la masa intacta de los constituyentes. A continuación, se muestran los cromatogramas de corriente iónica total (TIC), los espectros y los datos transformados de las muestras (figuras 14 y 15).

Se observó un pico principal en el TIC de la muestra de control de scFv (TCT) que eluía a 33,2 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produce un único componente principal a m/z 28162, lo que era coherente con la masa teórica de la molécula de scFv (TCT) (figura 16A-C).

5 Se observó un pico principal en el TIC de la TCT-cemadotina 1 que eluía a 33,5 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produce una serie de picos principales a m/z 29495, 30162 y 30829, lo que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula scFv (TCT), junto con 2-4 adiciones de la molécula de cemadotina (figura 14A-C; tabla 9).

10 Se observó un pico principal en el TIC de la muestra de TCT-cemadotina 3 que eluía a 37,1 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produce una serie de picos principales a m/z 33496, 34163 y 34830, lo que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula scFv (TCT), junto con 8-10 adiciones de la molécula de cemadotina (figura 15A-C; tabla 9).

Tabla 9. Resumen de los análisis de ESI-MS de los ADC de ScFv (TCT)-cemadotina

Muestra	Masa del pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada
ScFv (TCT)	28162	0	0
ADC 1 TCT-Cem	29495	1335	2
	30162	2002	3
	30829	2669	4
ADC 1 TCT-Cem	32164	4004	6
	32831	4671	7
	33498	5338	8
ADC 1 TCT-Cem	33496	5336	8
	34163	6303	9
	34830	6670	10
Peso molecular de scFv (TCT) = 28160 (secuencia de proteína) Da			
Peso molecular del fármaco cemadotina = 667 Da			

Espectrometría de masas MALDI

15 Equipo: Los análisis se realizaron con el siguiente equipo: Espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF AXIMA Performance de Shimadzu Scientific Instruments.

20 Análisis MALDI MS lineal: se utilizó una muestra de mioglobina para calibrar externamente el instrumento en modo lineal de alta masa de iones positivos y negativos. Las muestras de conjugado de TCT-cemadotina 3, conjugado de TCT-cemadotina 1, conjugado de TCT-cemadotina 2, TCT-control se diluyeron 1:1 (v/v) en acetonitrilo al 50 % (acuoso) y se depositaron en forma de puntos en partes alícuotas de 1 μ l sobre una placa MALDI de acero sin recubrimiento de 384 puntos. Se hicieron réplicas de los puntos para cada matriz MALDI: norharmano, 2',4',6'-trihidroxiacetofenona monohidrato (THAP), norharmano:THAP (4:1, v/v), y soluciones de matriz de ácido sinapínico. También se aplicaron puntos utilizando muestras sin diluir, para el ácido sinapínico. Cada punto se cubrió con partes alícuotas de 1 μ l de la matriz MALDI correspondiente y se dejó cocristalizar y secar bajo una suave corriente de aire. El ácido sinapínico se preparó en forma de una solución saturada de ácido trifluoroacético (TFA) ac. al 0,1 %:acetonitrilo 1:1 (v/v). El norharmano se preparó en forma de una solución de 10 mg/ml en ácido trifluoroacético (TFA) ac. al 0,1 %:acetonitrilo 1:1 (v/v).

Se preparó la 2',4',6'-trihidroxiacetofenona monohidrato (THAP) en forma de una solución saturada de ácido trifluoroacético (TFA) ac. al 0,1 %:acetonitrilo 1:1 (v/v). Los puntos que contenían norharmano, 2',4',6'-trihidroxiacetofenona monohidrato (THAP) y norharmano:THAP (4:1, v/v) se analizaron en modo de iones negativos lineal de alta masa, y los puntos que contenían ácido sinapínico se analizaron en modo de iones positivos lineal de alta masa. Se recogieron espectros de masas en un intervalo de masas adecuado y se varió la potencia del láser para obtener resultados óptimos.

MALDI-MS de scFv (TCT) (muestra de control) en ácido sinapínico

Los datos de MALDI-MS se obtuvieron del análisis lineal en modo de iones positivos de scFv (TCT) sin diluir. El control en la matriz de ácido sinapínico se muestra en la figura 17. Se observó un pico significativo a m/z 28251, que coincidía con la masa esperada de scFv (TCT) (28160 Da), dentro del error asociado al instrumento.

MALDI-MS del conjugado de TCT-cemadotina 1 en ácido sinapínico

Los datos de MALDI-MS obtenidos del análisis lineal en modo de iones positivos del conjugado TCT-cemadotina 1 en matriz de ácido sinapínico se muestran en la figura 18. Se observaron picos resueltos a m/z 29559, 30223, 30884 y 31531, en razonable concordancia con el control de scFv (TCT) suministrado, con masas conjugadas adicionales de aproximadamente 2, 3, 4 y 5 moléculas de cemadotina, respectivamente (utilizando la masa incremental suministrada de 667 Da), tabla 10.

MALDI-MS del conjugado de TCT-cemadotina 2 en ácido sinapínico

Los datos MALDI-MS obtenidos del análisis lineal en modo de iones positivos del conjugado TCT-cemadotina 2 en la matriz de ácido sinapínico se muestran en la figura 19. Se observaron picos resueltos a m/z 32293, 32948 y 33588, en razonable concordancia con el control de scFv (TCT) suministrado, con masas conjugadas adicionales de aproximadamente 6, 7 y 8 moléculas de cemadotina, respectivamente (utilizando la masa incremental suministrada de 667 Da), tabla 10.

MALDI-MS del conjugado de TCT-cemadotina 3 en ácido sinapínico

Los datos de MALDI-MS obtenidos del análisis lineal en modo de iones positivos del conjugado TCT-cemadotina 3 en matriz de ácido sinapínico se muestran en la figura 20. Se observaron picos resueltos a m/z 33809, 34415 y 35057, en razonable concordancia con el control de scFv (TCT) suministrado, con masas conjugadas adicionales de aproximadamente 8, 9 y 10 moléculas de cemadotina, respectivamente (utilizando la masa incremental suministrada de 667 Da), tabla 10.

Tabla 10. Resumen de los análisis MALDI de los ADC de ScFv (TCT)-cemadotina

Muestra	Masa del pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada
ScFv (TCT)	28251	0	0
ADC 1 TCT-Cem	29559	1308	2
	30223	1972	3
	30884	2633	3,9
	31531	3280	4,9
ADC 1 TCT-Cem	32293	4042	6,1
	32948	4697	7
	33588	5337	8
ADC 1 TCT-Cem	33809	5558	8,3
	34415	6164	9,2

35057	6806	10,2
Peso molecular del fármaco cemadotina = 667 Da		

ELISA de unión de conjugados de scFv (TCT)-cemadotina

Los ADC de scFv (TCT)-cemadotina (compuesto 69) fueron fabricados y caracterizados como se describió anteriormente. Su afinidad de unión frente al antígeno diana HER2 inmovilizado se determinó mediante ELISA en comparación con el scFv no modificado (figura 21). Todas las proteínas se detectaron utilizando el marcador T7 C-terminal que no se esperaba que estuviera modificado químicamente (sin lisinas presentes). Se recubrieron placas ELISA inmunoabsorbentes de 96 pocillos con HER2-Fc 10 µg/ml en PBS, seguido de las muestras de ensayo, conjugado de peroxidasa anti-T7. Se realizaron lavados exhaustivos con PBS entre cada capa y la detección se realizó con sustrato BM-Blue. El gráfico (figura 21) demuestra que el ADC con 3,9 fármacos (DAR promedio) cargados, conservó sustancialmente su afinidad de unión (K_d disminuye ligeramente de 2,5 nM a 3,3 nM) y que el ADC con 8,2 fármacos cargados conservó sustancialmente su afinidad de unión (K_d disminuye ligeramente de 2,5 nM a 15,5 nM). Si la reacción de conjugación se lleva más lejos, conjugándose con todos los residuos de lisina de la superficie menos uno (11/12), la unión del scFv se reduce pero no se pierde (K_d = 27,5 nM). Esto demuestra que el scFv optimizado puede transportar una elevada carga de fármaco al tiempo que conserva la función de unión.

Conclusiones generales del TCT-cemadotina, datos biofísicos

Las condiciones de conjugación se optimizaron como se ha detallado anteriormente. Esta optimización permitió controlar las reacciones de conjugación con un rendimiento muy elevado de conjugados con DAR baja, intermedia y alta. No se observó precipitación del anticuerpo/conjugado en ninguno de los conjugados, por lo que la recuperación fue muy alta. Tras la purificación por HPLC SEC, los conjugados resultantes se concentraron hasta aproximadamente 500 µg/ml y se mantuvieron estables en el tampón durante varias semanas. Antes de utilizarlos para pruebas *in vitro* o *in vivo*, estos conjugados se intercambiaron en tampón en PBS y se esterilizaron por filtración. De nuevo, la recuperación fue muy alta.

Los productos se analizaron exhaustivamente mediante SDS-PAGE reductor, SEC-HPLC, AAA, MS y ELISA.

Las técnicas utilizadas para el análisis están de acuerdo y apoyan el argumento de que una estructura scFv optimizada, ilustrada por TCT, puede ser cargada con múltiples fármacos utilizando residuos de lisina en el anticuerpo y la conjugación puede ser controlada para obtener conjugados monoméricos (tal como se muestra por SEC-HPLC) con la DAR deseada, al mismo tiempo que se conserva la afinidad de unión. Los conjugados purificados con DAR baja (muestra 1) se desplazaron más cerca del scFv de control (TCT) en el gel y estaban menos polidispersos que los que tenían una DAR intermedia (muestra 2), que se desplazaron ligeramente más arriba y estaban más polidispersos, mientras que en el caso de los conjugados con DAR alta (muestra 3) se produjo un claro desplazamiento de la migración en el gel, en el que la muestra era claramente de mayor tamaño que el control, el TCT no modificado. Estas observaciones fueron corroboradas por la HPLC, en la que las muestras tenían tiempos de retención progresivamente más cortos que el TCT, eluyendo más rápidamente de la columna SEC debido a su tamaño cada vez mayor. El análisis de aminoácidos fue una herramienta extremadamente útil para el análisis cuantitativo posterior y complementó los datos de MS. La espectrometría de masas identificó tanto la DAR alta como la baja dentro de la misma muestra, mientras que el AAA ofreció un promedio.

Para la muestra 1, la DAR fue de 3,9 por AAA y de 3,4 y 3 por MS (ES y MALDI)

Para la muestra 2, la DAR fue de 8,2 por AAA y de 7 y 7 por MS (ES y MALDI)

Para la muestra 3, la DAR fue de 10,9 por AAA y de 9,2 y 9 por MS (ES y MALDI)

(B) ScFv (TCT)-P5C5

El ScFv-TCT se conjugó con P5C5-NHS (compuesto 6) usando el mismo procedimiento empleado para cemadotina-NHS. El P5C5-NHS purificado por HPLC se disolvió en DMSO anhidro filtrado para obtener una solución madre 100 mM y se centrifugó. Se almacenó a -20 °C cuando no se estaba utilizando. En este ejemplo, la configuración era:

Reacción 1: scFv-TCT-P5C5 30 equivalentes

Reacción 2: scFv-TCT-P5C5 112 equivalentes

El anticuerpo se descongeló a 4 °C y la temperatura del anticuerpo se elevó lentamente hasta 20 °C en el termomezclador. Cualquier precipitado se recogió por centrifugación. La solución tampón bicarbonato, pH 8,8, se combinó con DMSO anhidro filtrado en un tubo Eppendorf de 1 o 5 ml y se equilibró en el Thermomixer, 20 °C, 10 min, 1000 rpm antes de añadir el anticuerpo y equilibrar durante 10 min más. El P5C5-NHS se añadió en porciones de 16

equivalentes para la reacción 2 y de 10 equivalentes para la reacción 1, añadiendo la solución, invirtiendo para mezclar y volviendo a colocar en el Thermomixer.

Las adiciones se realizaron cada 90 min, tras lo cual las muestras se dejaron toda la noche a 4 °C a 1000 rpm en el Thermomixer. Las muestras se recuperaron por centrifugación (2,5 min, 10 krpm) para obtener soluciones transparentes. Se observó una precipitación mínima en la muestra 2.

Las muestras se purificaron a partir del producto bruto en la HPLC por SEC usando el Tosoh TSKGel G2000, eluyendo con IPA al 10 %/PBS, pH 7,3, 20 °C (el mismo procedimiento que anteriormente, cargando aproximadamente 300 µg por inyección) y se analizaron por SDS-PAGE (figura 22), HPLC-SEC (figura 23) y AAA (tabla 11). Las muestras se recogieron, se reunieron y se concentraron en un Vivaspin 20, 10k MWCO (VS2002, 10 °C, 4000 rpm). Las muestras se dejaron reposar durante 1 hora antes de transferirlas a un microtubo Eppendorf, enjuagando el concentrador con 200 µl de PBS. Las muestras se sometieron a intercambio de tampón en PBS, pH 7,3, utilizando una columna Zeba y se volvieron a cuantificar utilizando un espectrómetro Nanodrop. Las lecturas fueron:

Muestra 1 A280 = 1,46 (promedio de 3), 650 µg/ml

Muestra 2 A280 = 1,32 (promedio de 3), 590 µg/ml

Los ADC (compuesto 71) eluyeron con un tiempo de retención más rápido que el anticuerpo no modificado, lo que indica un peso molecular más alto, pero en forma de conjugados monoméricos solubles sin agregación visible.

(C) scFv (TCT)-P5C5, scFv (TCT)-cemadotina-C5, trastuzumab-P5C5 y trastuzumab-cemadotina-C5

Las siguientes reacciones se llevaron a cabo siguiendo el mismo proceso descrito previamente para los fármacos cemadotina (4) y P5C5 (6). En resumen, los anticuerpos se equilibraron en tampón/DMSO mediante incubación a 20 °C/1000 rpm, y el fármaco se añadió en porciones de 16 equivalentes cada 90 min. Las muestras se recuperaron por centrifugación y se purificaron por SEC-HPLC (G2000SWxl para scFv (TCT) y G3000SWxl para trastuzumab) (IPA al 10 %/PBS isocrático). A continuación, las fracciones purificadas se concentraron en 5 veces utilizando concentradores de centrifugación Vivaspin 20 y se sometieron a intercambio de tampón en PBS utilizando columnas de centrifugación Zeba (Pierce). Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE (figura 24), HPLC-SEC (figuras 25-27) y espectroscopia UV/vis (figuras 28 y 29).

Tras la síntesis de estos conjugados, fue evidente que los tres derivados basados en P5 se comportaban de forma muy similar a los derivados de cemadotina-NHS (70), dando lugar a conjugados muy solubles, monoméricos y altamente cargados (compuesto 71). Éstos no han sido cuantificados para DAR, pero cuando se comparan con muestras anteriores (que fueron cuantificadas por AAA y MS) en SDS-PAGE, y se comparan con el control de scFv (TCT), es evidente que se pueden formar DAR bajas, intermedias y altas con scFv (TCT) y cemadotina, P5C5 y cemadotina-C5. El trastuzumab IgG también se conjugó con P5C5 y cemadotina-C5, con desplazamientos observados en el gel (aunque menores que TCT). Estas observaciones fueron respaldadas por los trazados de HPLC-SEC, en los que las muestras produjeron unos tiempos de retención similares para conjugados de DAR baja, intermedia y alta con cemadotina, P5C5 y cemadotina-C5.

(D) Afinidad de unión de ADC de scFv (TCT)-P5C5

Se fabricaron y caracterizaron ADC de ScFv (TCT)-P5C5 como se describe en los ejemplos anteriores. La DAR se determinó mediante AAA como antes (tabla 11A y B), esta vez tras la liberación del fragmento de diprolina para identificar y cuantificar el fármaco basado en P5. Su afinidad de unión por el antígeno diana HER2 inmovilizado se determinó mediante ELISA en comparación con el scFv no modificado. Todas las proteínas se detectaron utilizando el marcador T7 C-terminal que no se esperaba que estuviera modificado químicamente (sin lisinas presentes). Se recubrieron placas ELISA inmunoabsorbentes de 96 pocillos con HER2-Fc 10 µg/ml en PBS, seguido de las muestras de ensayo, conjugado anti-T7-peroxidasa. Entre cada capa se realizaron lavados exhaustivos con PBS/tween-20 y PBS y la detección se realizó con sustrato BM-Blue. El gráfico (figura 30) demuestra que el ADC de (scFv TCT-P5C5(1)) con 8 fármacos cargados conservó sustancialmente su afinidad de unión (Kd disminuye ligeramente de 7 nM a 13 nM). Si la reacción de conjugación se lleva al límite máximo (scFv TCT-P5C5(2)), conjugándose prácticamente con todos los residuos de lisina de la superficie (12), la unión del scFv se pierde significativamente debido a que un residuo de lisina crítico enterrado en el sitio de unión se modifica con el fármaco. Las DAR fueron verificados por AAA (tablas 11A y 11B). Esto demuestra que el scFv optimizado puede transportar una elevada carga de fármaco al tiempo que conserva la función de unión.

Muestra:	TCT-P5C5(1)	Tabla 11A	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado

Muestra:	TCT-P5C5(1)	Tabla 11A	
<i>Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados</i>			
Cys	6	excluido	-
Asp	15	15,76	mejor que el 5 %
Thr	14	13,90	mejor que el 5 %
Ser	46	43,51	dentro del 5-10 %
Glu	22	21,87	mejor que el 5 %
Gly	44	45,32	mejor que el 5 %
Ala	17	16,46	mejor que el 5 %
Val	18	excluido	-
Met	5	4,69	dentro del 5-10 %
Ile	8	8,22	mejor que el 5 %
Leu	15	15,79	dentro del 5-10 %
Patrón de Norleu	0		-
Tyr	14	14,64	mejor que el 5 %
Phe	7	6,89	mejor que el 5 %
His	3	3,07	mejor que el 5 %
Lys	12	12,00	mejor que el 5 %
Arg	5	4,89	mejor que el 5 %
Pro	0	excluido	-
Trp	8	8	(no determinado)
Total	259	residuos	
Promedio de 2 ejecuciones			
Muestra total	0,271	nmoles	0,27
	7,65	ug	7,62
Concentración	18,10	nmoles/ml	18,03
	509,69	ug/ml	507,70

Muestra:	TCT-P5C5(1)	Tabla 11A	
<i>Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados</i>			
P5C5			
nmoles	2,1980	2,2211	2,21
DAR	8,17		

Tabla 11A y B. DAR por AAA de scFv (TCT)-P5C5 (compuesto 71) utilizado en el ejemplo 31D.

Muestra:	TCT-P5C5(2)	Tabla 11B	
<i>Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados</i>			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Cys	6	excluido	-
Asp	15	15,99	dentro del 5-10 %
Thr	14	14,20	mejor que el 5 %
Ser	46	43,55	dentro del 5-10 %
Glu	22	21,79	mejor que el 5 %
Gly	44	45,11	mejor que el 5 %
Ala	17	16,58	mejor que el 5 %
Val	18	excluido	-
Met	5	excluido	-
Ile	8	8,15	mejor que el 5 %
Leu	15	15,74	mejor que el 5 %
Patrón de Norleu	0		-
Tyr	14	14,16	mejor que el 5 %
Phe	7	6,74	mejor que el 5 %
His	3	3,20	dentro del 5-10 %
Lys	12	11,91	mejor que el 5 %
Arg	5	4,88	mejor que el 5 %

Muestra:	TCT-P5C5(2)	Tabla 118	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Pro	0	0,00	-
Trp	8	8	(no determinado)
Total	259	residuos	
			Promedio de 2 ejecuciones
Muestra total	0,225	nmoles	0,23
	6,33	ug	6,54
Concentración	14,98	nmoles/ml	15,49
	421,82	ug/ml	436,14
P5C5			
nmoles	2,7742	2,6534	2,71
DAR	11,68		

(E) Potencia de destrucción celular de los ADC de scFv (TCT)-P5C5 en comparación con los ADC basados en IgG

- Se fabricaron y caracterizaron ADC de ScFv (TCT)-P5C5 y trastuzumab-P5C5 como se describió anteriormente (ejemplos 31B y 31C), que tuvieron unas DAR similares a las anteriores. Se cultivó SKBr3, una línea celular de cáncer de mama humano, con altos niveles de expresión de HER2, con hasta 1 000 000 de receptores por célula [Lazar G.A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103:4005-4010] en DMEM, a 37 °C, 5 % de CO₂ en atmósfera humidificada. Cuando la confluencia fue del 70-80 %, las células se lavaron con PBS (2 × 10 ml) y se incubaron con tripsina durante 5-7 min. Se añadió medio completo y se resuspendieron las células mediante pipeteo. Las células se recuperaron por centrifugación (2 min, 2000 rpm), se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en DMEM completo (5 ml). A continuación, se contaron las células con un hemocitómetro y se diluyeron en consecuencia. Se sembraron a 4500 células/pocillo (200 µl) utilizando factor de fijación y se incubaron durante la noche a 37 °C, 5 % de CO₂ en atmósfera humidificada. U87 es una línea celular de glioblastoma que no expresa HER2 y se cultivó de forma similar, en placas de 1000 células/pocillo.
- Las células fueron expuestas a los diversos ADC diluidos en medios completos por 96 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. La viabilidad celular se midió utilizando el kit de proliferación celular con una solución acuosa Promega Aqueous Cell-titre-96™ según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se retiró el medio y se añadieron a las células 1001 µl de medio completo sin rojo de fenol, previamente combinado con reactivo MTS (20 µl de reactivo por 100 µl de medio). Las placas se leyeron en un lector de placas ELISA a 490 nm tras una incubación de 2 horas en la oscuridad (5 % de CO₂, 37 °C).
- Los datos (unidades de absorción) fueron convertidos a porcentaje de supervivencia celular utilizando los controles no tratados como el 100 % de supervivencia celular y los controles con Triton X-100 como el 100 % de muerte celular. El valor medio de absorción de este último se restó del resto de los datos para obtener una línea de base adecuada. Los promedios se convirtieron en supervivencia y se obtuvieron valores de error estándar para cada valor n (en forma de porcentaje de supervivencia celular). Los datos se representaron gráficamente y se ajustaron a una curva sigmoideal logística de 3 parámetros de dosis-respuesta utilizando la ecuación $y = y_0 + a/(1+(x/x_0)^b)$, en la que $x_0 = \text{CI50}$ y $x_0 > 0$ y $a = 100$ utilizando SigmaPlot 11.0. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces para cada compuesto ensayado y se representó gráficamente y se ajustó un conjunto o un promedio de los datos para obtener una curva de dosis-respuesta.

Los datos (figuras 31-33, tabla 12) demuestran que los ADC de scFv (TCT) son específicamente citotóxicos para las células que expresan HER2 con potencias con un resultado en nM intermedio. El fármaco libre tiene baja potencia por sí solo debido a la escasa permeabilidad celular. Los ADC de mayor DAR son más potentes, hasta el punto en que se pierde la actividad de unión.

Tabla 12. Resumen de la potencia de destrucción celular de los ADC de scFv (TCT) y trastuzumab P5C5 (compuestos 5 y 71)

Muestra	Células SKBr3 (HER2+++)		Células U87 (HER2 -)	
	CI50 µg/ml	CI50 nM	CI50 µg/ml	CI50 nM
scFv (TCT)-P5C5, DAR = 5	1,33 ± 0,1	47,5 ± 0,36	-	-
scFv (TCT)-P5C5, DAR = 8	0,8 ± 0,1	28 ± 0,36	-	-
scFv (TCT)-P5C5, DAR = 12	5,01 ± 1,9	178,6 ± 68	100	3570
Trastuzumab-P5C5, DAR = 5	0,07 ± 0,01	2,5 ± 0,4	-	-
Trastuzumab-P5C5, DAR = 6	0,02 ± 0,004	0,7 ± 0,14	-	-
Fármaco P5C5 libre (ácido)	N/A	2200 ± 400	N/A	7300 ± 900

5

Ejemplo 32. Bioconjugación de otras cargas activas (derivados de camptotecina, paclitaxel, MMAE, maitansina) a un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

Camptotecina

10 Un derivado hidrosoluble de camptotecina-éster de NHS (compuesto 19) se conjugó con toscFv (TCT) para obtener conjugados con diversas DAR. La reacción se controló para obtener productos con DAR baja, intermedia y alta. Inicialmente, se determinó la velocidad de hidrólisis de la camptotecina-NHS pura aislada en diversas condiciones de tampón. Las condiciones producían una velocidad de hidrólisis razonable, es decir, no demasiado rápida para que el NHS se hidrolizara al ácido antes de reaccionar con las lisinas y no demasiado lenta para que la reacción tardara demasiado en completarse. Otros factores que se tuvieron en cuenta fueron la estabilidad del anticuerpo en el

15 tampón/pH/disolvente orgánico, la estabilidad del fármaco y la concentración del fármaco en el tampón. Este último es un parámetro crucial; cuanto más concentrado esté el fármaco en la solución, más disminuirá la velocidad de hidrólisis. Por lo tanto, es necesario controlar la concentración para que la hidrólisis sea eficaz. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

- Tampón: tampón bicarbonato con NaCl a pH 8,8 con DMSO al 20 % y glicerol al 30 %;
- Temperatura: 25 °C)
- Condiciones de mezclado: Thermomixer 1000 rpm;
- Anticuerpo a 1 mg/ml;
- Camptotecina-NHS: porciones de adición de 8 equivalentes; y,
- Tasa de adición de fármaco-NHS: cada 70-90 minutos.

25 Por lo general, el scFv (TCT) fue descongelado en el termomezclador a 4 °C, luego la temperatura de la parte alícuota de anticuerpo aumentó lentamente hasta 20 °C. Las partes alícuotas se centrifugaron para recoger cualquier precipitado antes de su uso.

30 Se preparó una solución madre de camptotecina-NHS (compuesto 19) 100 mM en DMSO anhidro filtrado. Cualquier precipitado se recogió por centrifugación. Se mezcló tampón bicarbonato, pH 8,8, con DMSO filtrado y glicerol en microtubos Eppendorf y se equilibró el tampón en el termomezclador a 4 °C, y después se elevó la temperatura hasta 20 °C mientras se mezclaba a 1000 rpm. Se añadió el anticuerpo y se equilibró (20 °C, 1000 rpm) durante 10 min antes de iniciar la adición de la camptotecina-NHS.

Esto se llevó a cabo añadiendo 8 equivalentes de la disolución madre en DMSO de fármaco-NHS e invirtiendo para mezclar cada 70 min, antes de volver a introducir en el termomezclador y mezclar a 25 °C, 1000 rpm. El número total de equivalentes utilizados dependía de la DAR requerida. Las muestras se dejaron en el termomezclador durante otras 2 horas después de la última adición. A continuación, las muestras se recogieron por centrifugación (2,5 min, 11 krpm).

5 La única precipitación visible se produjo en la muestra con el mayor número de equivalentes de fármaco y fue muy baja.

Todas las muestras se hicieron pasar inicialmente por una columna Zeba (Pierce) preequilibrada con IPA al 10 %/PBS antes de purificarse en la HPLC-SEC con IPA al 20 %/PBS, pH7 , 25 °C, y analizarse por SDS-PAGE, HPLC-SEC, espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente.

10 Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño HPLC utilizando una columna Tosoh TSKGel G2000Wxl. El ScFv tiene un tiempo de retención correspondiente a un Pm de aproximadamente 30 KDa. Todos los conjugados eluyeron antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de picos principalmente monoméricos, lo que indica poca o ninguna agregación.

15 El análisis de espectrometría de masas fue realizado por SGS M-Scan. Los conjugados, así como el ScFv-TCT (control), se analizaron tanto por MALDI-MS como por LC-MS. Todas las muestras produjeron picos bien resueltos.

Paclitaxel

Un derivado hidrosoluble de paclitaxel-éster de NHS (compuesto 44) se conjugó con scFv (TCT) para obtener conjugados con diversas DAR. La reacción se controló para obtener productos con DAR baja, intermedia y alta.

20 Inicialmente, se determinó la velocidad de hidrólisis del paclitaxel-NHS puro aislado en diversas condiciones de tampón. Las condiciones producían una velocidad de hidrólisis razonable, es decir, no demasiado rápida para que el NHS se hidrolizara al ácido antes de reaccionar con las lisinas y no demasiado lenta para que la reacción tardara demasiado en completarse. Otros factores que se tuvieron en cuenta fueron la estabilidad del anticuerpo en el tampón/pH/disolvente orgánico, la estabilidad del fármaco y la concentración del fármaco en el tampón. Este último es un parámetro crucial; cuanto más concentrado esté el fármaco en la solución, más disminuirá la velocidad de hidrólisis.

25 Por lo tanto, es necesario controlar la concentración para que la hidrólisis sea eficaz. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

- Tampón: tampón bicarbonato con NaCl a pH 8,8 con DMSO al 20 % y glicerol al 30 %;
- Temperatura: 25 °C;
- 30 • Condiciones de mezclado: Thermomixer 1000 rpm;
- Anticuerpo a 1 mg/ml;
- Paclitaxel-NHS: porciones de adición de 8 equivalentes; y,
- Tasa de adición de fármaco-NHS: cada 70-90 minutos.

35 Por lo general, el scFv (TCT) fue descongelado en el termomezclador a 4 °C, luego la temperatura de la parte alícuota de anticuerpo aumentó lentamente hasta 20 °C. Las partes alícuotas se centrifugaron para recoger cualquier precipitado antes de su uso.

Se preparó una solución madre de paclitaxel-NHS 100 mM en DMSO anhidro filtrado. Cualquier precipitado se recogió por centrifugación. Se mezcló tampón bicarbonato, pH 8,8, con DMSO filtrado y glicerol en microtubos Eppendorf y se equilibró el tampón en el termomezclador a 4 °C, y después se elevó la temperatura hasta 20 °C mientras se mezclaba a 1000 rpm. Se añadió el anticuerpo y se equilibró (20 °C, 1000 rpm) durante 10 min antes de iniciar la adición del paclitaxel-NHS.

40

Esto se llevó a cabo añadiendo 8 equivalentes de la disolución madre en DMSO de fármaco-NHS e invirtiendo para mezclar cada 70 min, antes de volver a introducir en el termomezclador y mezclar a 25 °C, 1000 rpm. El número total de equivalentes utilizados dependía de la DAR requerida. Las muestras se dejaron en el termomezclador durante otras 2 horas después de la última adición. A continuación, las muestras se recogieron por centrifugación (2,5 min, 11 krpm).

45 La única precipitación visible se produjo en la muestra con el mayor número de equivalentes de fármaco y fue muy baja.

Todas las muestras se hicieron pasar inicialmente por una columna Zeba (Pierce) preequilibrada con IPA al 10 %/PBS antes de purificarse en la HPLC-SEC con IPA al 20 %IPA/PBS, pH 7, 25 °C, y analizarse por SDS-PAGE, HPLC-SEC, espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente.

50

Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño por HPLC utilizando una columna Tosoh TSKGel G2000Wxl. El ScFv tiene un tiempo de retención correspondiente a un Pm de

aproximadamente 30 KDa. Todos los conjugados eluyeron antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de picos principalmente monoméricos, lo que indica poca o ninguna agregación.

5 El análisis de espectrometría de masas fue realizado por SGS M-Scan. Los conjugados, así como el ScFv-TCT (control), se analizaron tanto por MALDI-MS como por LC-MS. Todas las muestras produjeron picos bien resueltos.

MMAE

10 Un derivado hidrosoluble de MMAE-éster de NHS se conjuga con scFv (TCT) para obtener conjugados con diversas DAR. La reacción se controla para obtener productos con DAR bajas, intermedias y altas. Inicialmente, se determina la velocidad de hidrólisis del MMAE-NHS puro aislado en diversas condiciones de tampón. Las condiciones producían una velocidad de hidrólisis razonable, es decir, no demasiado rápida para que el NHS se hidrolizara al ácido antes de reaccionar con las lisinas y no demasiado lenta para que la reacción tardara demasiado en completarse. Otros factores que se tuvieron en cuenta fueron la estabilidad del anticuerpo en el tampón/pH/disolvente orgánico, la estabilidad del fármaco y la concentración del fármaco en el tampón. Este último es un parámetro crucial; cuanto más concentrado esté el fármaco en la solución, más disminuirá la velocidad de hidrólisis. Por lo tanto, es necesario controlar la

15 concentración para que la hidrólisis sea eficaz. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

- Tampón: tampón bicarbonato con NaCl a pH 8,8 con DMSO al 20 % y glicerol al 30 %;
- Temperatura: 25 °C;
- Condiciones de mezclado: Thermomixer 1000 rpm;
- Anticuerpo a 1 mg/ml;
- 20 • MMAE-NHS: porciones de adición de 8 equivalentes; y,
- Tasa de adición de fármaco-NHS: cada 70-90 minutos.

Por lo general, el scFv (TCT) se descongela en el termomezclador a 4 °C, luego la temperatura de la parte alícuota de anticuerpo se eleva lentamente hasta 20 °C. Las partes alícuotas se centrifugan para recoger cualquier precipitado antes de su uso.

25 Se prepara una solución madre de MMAE-NHS 100 mM en DMSO anhidro filtrado. Cualquier precipitado se recogió por centrifugación. Se mezcló tampón bicarbonato, pH 8,8, con DMSO filtrado y glicerol en microtubos Eppendorf y el tampón se equilibra en el termomezclador a 4 °C, y luego se eleva la temperatura hasta 20 °C mientras se mezcla a 1000 rpm. Se añade el anticuerpo y se equilibra (20 °C, 1000 rpm) durante 10 minutos antes de empezar a añadir el MMAE-NHS.

30 Esto se lleva a cabo añadiendo 8 equivalentes de la disolución madre en DMSO del fármaco-NHS e invirtiendo para mezclar cada 70 min, antes de volver a introducir en el termomezclador y mezclar a 25 °C, 1000 rpm. El número total de equivalentes utilizados dependía de la DAR requerida. Las muestras se dejan en el termomezclador durante 2 horas más después de la última adición. A continuación, las muestras se recogen por centrifugación (2,5 min, 11 krpm). La única precipitación visible se produce en la muestra con el mayor número de equivalentes de fármacos y era muy

35 baja.

Todas las muestras se hacen pasar inicialmente por una columna Zeba (Pierce) preequilibrada con IPA al 10 %/PBS antes de purificarse en la HPLC-SEC con IPA al 20 %/PBS, pH 7, 25 °C y analizarse por SDS-PAGE, HPLC-SEC, espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente.

40 Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaño por HPLC utilizando una columna Tosoh TSKGel G2000Wxl. El ScFv tiene un tiempo de retención correspondiente a un Pm de aproximadamente 30 KDa. Todos los conjugados eluyen antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de picos principalmente monoméricos, lo que indica poca o ninguna agregación.

45 Los análisis de espectrometría de masas son realizados por SGS M-Scan. Los conjugados, así como el ScFv-TCT (control), se analizan tanto por MALDI-MS como por LC-MS. Todas las muestras generan picos bien resueltos.

Maitansina (DM4)

50 Un derivado hidrosoluble de maitansinaDM4-éster de NHS (compuesto 68) se conjuga con scFv (TCT) para obtener conjugados con diversas DAR (compuesto 74). La reacción se controla para obtener productos con DAR bajas, intermedias y altas. Inicialmente, se determina la velocidad de hidrólisis de maitansinaDM4-NHS pura aislada en diversas condiciones de tampón. Las condiciones producían una velocidad de hidrólisis razonable, es decir, no demasiado rápida para que el NHS se hidrolizara al ácido antes de reaccionar con las lisinas y no demasiado lenta

para que la reacción tardara demasiado en completarse. Otros factores que se tuvieron en cuenta fueron la estabilidad del anticuerpo en el tampón/pH/disolvente orgánico, la estabilidad del fármaco y la concentración del fármaco en el tampón. Este último es un parámetro crucial; cuanto más concentrado esté el fármaco en la solución, más disminuirá la velocidad de hidrólisis. Por lo tanto, es necesario controlar la concentración para que la hidrólisis sea eficaz. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

5 Tampón (tampón de bicarbonato con NaCl a pH 8,8 con DMSO al 20 % y glicerol al 30 %), temperatura (25 °C), condiciones de mezclado (Thermomixer 1000 rpm), anticuerpo a 1 mg/ml, maitansinaDM4-NHS (porciones de adición de 8 equivalentes), tasa de adición del fármaco-NHS (cada 70-90 minutos).

10 Por lo general, el scFv (TCT) se descongela en el termomezclador a 4 °C, luego se eleva lentamente la temperatura de la parte alícuota del anticuerpo hasta 20 °C. Se centrifuga para recoger cualquier precipitado antes de usar.

15 Se prepara una solución madre de maitansinaDM4-NHS 100 mM en DMSO anhidro filtrado. Cualquier precipitado se recogió por centrifugación. Se mezcló tampón bicarbonato, pH 8,8, con DMSO filtrado y glicerol en microtubos Eppendorf y el tampón se equilibró en el termomezclador a 4 °C, y después se elevó la temperatura a 20 °C mientras se mezclaba a 1000 rpm. Se añade el anticuerpo y se equilibra (20 °C, 1000 rpm) durante 10 min antes de iniciar la adición de la maitansinaDM4-NHS.

20 Esto se lleva a cabo añadiendo 8 equivalentes de la disolución madre en DMSO del fármaco-NHS e invirtiendo para mezclar cada 70 min, antes de volver a introducir en el termomezclador y mezclar a 25 °C, 1000 rpm. El número total de equivalentes utilizados dependía de la DAR requerida. Las muestras se dejan en el termomezclador durante 2 horas más después de la última adición. A continuación, las muestras se recogen por centrifugación (2,5 min, 11 krpm). La única precipitación visible se produce en la muestra con el mayor número de equivalentes de fármacos y era muy baja.

Todas las muestras se hacen pasar inicialmente por una columna Zeba (Pierce) preequilibrada con IPA al 10 %/PBS antes de purificarse en la HPLC-SEC con IPA al 20 %/PBS, pH 7, 25 °C y analizarse por SDS-PAGE, HPLC-SEC, espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente.

25 Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaño por HPLC utilizando una columna Tosoh TSKGel G2000Wxl. El ScFv tiene un tiempo de retención correspondiente a un Pm de aproximadamente 30 KDa. Todos los conjugados eluyen antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de picos principalmente monoméricos, lo que indica poca o ninguna agregación.

30 Los análisis de espectrometría de masas son realizados por SGS M-Scan. Los conjugados, así como el ScFv-TCT (control), se analizan tanto por MALDI-MS como por LC-MS. Todas las muestras generan picos bien resueltos.

Maitansina (DM1), procedimiento de 2 etapas

35 El fármaco DM1 se conjuga con scFv (TCT) para obtener conjugados con diversas DAR (compuesto 75). La reacción se controló para obtener productos con DAR baja, intermedia y alta. El procedimiento se lleva a cabo tratando el scFv (TCT) con 32 equivalentes de SPDP y reduciendo posteriormente las muestras con 115 equivalentes de TCEP. A continuación, las muestras reducidas, purificadas y cuantificadas se conjugan con DM1. Se añadió DM1 a las muestras de anticuerpos (en PBS desgasificado pH 7/EDTA 1 mM/DMSO al 20 %/propilenglicol al 10 %) a 2 equivalentes cada una. Las muestras se incuban en el termomezclador (25 °C, 1000 rpm), seguido de 4 °C (1000 rpm) durante toda la noche. Las muestras se recuperan por centrifugación y se analizan por gel SDS-PAGE y espectroscopia UV/vis.

40 Todas las muestras se hicieron pasar inicialmente por una columna Zeba (Pierce) preequilibrada con IPA al 10 %/PBS antes de purificarse en la HPLC-SEC con IPA al 20 %/IPA/PBS, pH 7, 25 °C, y analizarse por SDS-PAGE, HPLC-SEC, espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente.

45 Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaño por HPLC utilizando una columna Tosoh TSKGel G2000Wxl. El ScFv tiene un tiempo de retención correspondiente a un Pm de aproximadamente 30 KDa. Todos los conjugados eluyen antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de picos principalmente monoméricos, lo que indica poca o ninguna agregación.

Conjugación de pirrolobenzodiazepina, procedimiento de 2 etapas

50 Un derivado de PBD, 6-maleimidocaproil-SGD-1910 (compuesto 67) se conjuga con scFv (TCT) para obtener conjugados con diversas DAR. La reacción se controla para obtener productos con DAR bajas, intermedias y altas. El procedimiento se lleva a cabo tratando el scFv (TCT) con 32 equivalentes de SPDP y reduciendo posteriormente las muestras con 115 equivalentes de TCEP. A continuación, las muestras reducidas, purificadas y cuantificadas se conjugan con 6-maleimidocaproil-SGD-1910. Se añadió 6-maleimidocaproil-SGD-1910 a las muestras de anticuerpos (en PBS desgasificado pH 7/EDTA 1 mM/DMSO al 20 %/propilenglicol al 20 %) a 2 equivalentes cada una. Las

muestras se incuban en el termomezclador durante 3 horas (25 °C, 1000 rpm), seguido de una noche a 4 °C (1000 rpm). Las muestras se recuperan por centrifugación y se analizan por gel SDS-PAGE y espectroscopia UV/vis.

Todas las muestras se hicieron pasar inicialmente por una columna Zeba (Pierce) preequilibrada con IPA al 10 %/PBS antes de purificarse en la HPLC-SEC con IPA al 20 %/IPA/PBS, pH 7, 25 °C, y analizarse por SDS-PAGE, HPLC-SEC, espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente.

Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaño por HPLC utilizando una columna Tosoh TSKGel G2000Wxl. El ScFv tiene un tiempo de retención correspondiente a un Pm de aproximadamente 30 KDa. Todos los conjugados eluyen antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de picos principalmente monoméricos, lo que indica poca o ninguna agregación.

Conjugación de MMAE, procedimiento en 2 etapas

Un derivado de MMAE, 6-maleimidocaproil-MMAE (compuesto 37) se conjugaba con scFv (TCT) para obtener conjugados con diversas DAR. La reacción se controla para obtener productos con DAR bajas, intermedias y altas. El procedimiento se llevó a cabo tratando el scFv (TCT) con 32 equivalentes de SPDP y reduciendo posteriormente las muestras con 115 equivalentes de TCEP. A continuación, las muestras reducidas, purificadas y cuantificadas se conjugaron con 6-maleimidocaproil-MMAE. Se añade 6-maleimidocaproil-MMAE a las muestras de anticuerpos (en PBS desgasificado pH 7/EDTA 1 mM/DMSO al 20 %) a 2 equivalentes cada una. Las muestras se incuban en el termomezclador durante 3 horas (25 °C, 1000 rpm), seguido de una noche a 4 °C (1000 rpm). Las muestras se recuperan por centrifugación y se analizan por gel SDS-PAGE y espectroscopia UV/vis.

Todas las muestras se hacen pasar inicialmente por una columna Zeba (Pierce) preequilibrada con IPA al 10 %/PBS antes de purificarse en la HPLC-SEC con IPA al 20 %/PBS, pH 7, 25 °C y analizarse por SDS-PAGE, HPLC-SEC, espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente.

Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaño por HPLC utilizando una columna Tosoh TSKGel G2000Wxl. El ScFv tiene un tiempo de retención correspondiente a un Pm de aproximadamente 30 KDa. Todos los conjugados eluyeron antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de picos principalmente monoméricos, lo que indica poca o ninguna agregación.

Conjugados de duocarmicina

Un derivado hidrosoluble de seco CBI-β-glucurónido-éster de NHS (compuesto 65) se conjugaba con scFv (TCT) para obtener conjugados con diversas DAR. La reacción se controla para obtener productos con DAR bajas, intermedias y altas. Inicialmente, se determinó la velocidad de hidrólisis de seco CBI-β-glucurónido-éster de NHS aislado puro en diversas condiciones de tampón. Las condiciones producían una velocidad de hidrólisis razonable, es decir, no demasiado rápida para que el NHS se hidrolizara al ácido antes de reaccionar con las lisinas y no demasiado lenta para que la reacción tardara demasiado en completarse. Otros factores que se tuvieron en cuenta fueron la estabilidad del anticuerpo en el tampón/pH/disolvente orgánico, la estabilidad del fármaco y la concentración del fármaco en el tampón. Este último es un parámetro crucial; cuanto más concentrado esté el fármaco en la solución, más disminuirá la velocidad de hidrólisis. Por lo tanto, es necesario controlar la concentración para que la hidrólisis sea eficaz. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

Tampón (tampón de bicarbonato con NaCl a pH 8,8 con DMSO al 20 % y glicerol al 30 %), temperatura (25 °C), condiciones de mezclado (Thermomixer 1000 rpm), anticuerpo a 1 mg/ml, seco CBI-β-glucurónido-éster de NHS (porciones de adición de 8 equivalentes), tasa de adición del fármaco-NHS (cada 70-90 minutos).

Por lo general, el scFv (TCT) se descongela en el termomezclador a 4 °C, luego se eleva lentamente la temperatura de la parte alícuota del anticuerpo hasta 20 °C. Se centrifuga para recoger cualquier precipitado antes de usar.

Se prepara una solución madre 100 mM de seco CBI-β-glucurónido-éster de NHS en DMSO anhidro filtrado. Cualquier precipitado se recogió por centrifugación. Se mezcló tampón bicarbonato, pH 8,8, con DMSO filtrado y glicerol en microtubos Eppendorf y el tampón se equilibró en el termomezclador a 4 °C, y después se elevó la temperatura hasta 20 °C mientras se mezclaba a 1000 rpm. Se añade el anticuerpo y se equilibra (20 °C, 1000 rpm) durante 10 min antes de iniciar la adición del seco CBI-β-glucurónido-éster de NHS.

Esto se lleva a cabo añadiendo 8 equivalentes de la disolución madre en DMSO del fármaco-NHS e invirtiendo para mezclar cada 70 min, antes de volver a introducir en el termomezclador y mezclar a 25 °C, 1000 rpm. El número total de equivalentes utilizados dependía de la DAR requerida. Las muestras se dejan en el termomezclador durante 2 horas más después de la última adición. A continuación, las muestras se recogieron por centrifugación (2,5 min, 11 krpm). La única precipitación visible se produjo en la muestra con el mayor número de equivalentes de fármaco y fue muy baja.

Todas las muestras se hacen pasar inicialmente por una columna Zeba (Pierce) preequilibrada con IPA al 10 %/PBS antes de purificarse en la HPLC-SEC con IPA al 20 %/PBS, pH 7, 25 °C y analizarse por SDS-PAGE, HPLC-SEC, espectroscopia UV/vis y espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente.

5 Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaño por HPLC utilizando una columna Tosoh TSKGel G2000Wxl. El ScFv tiene un tiempo de retención correspondiente a un Pm de aproximadamente 30 KDa. Todos los conjugados eluyeron antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de picos principalmente monoméricos, lo que indica poca o ninguna agregación.

10 Ejemplo 33: Generación de anticuerpos monoclonales anticemadotina y uso en la detección de ADC de scFv-cemadotina

Se produjo el conjugado de KLH ("Keyhole Limpet Haemocyanin", hemocianina de lapa californiana)-cemadotina conjugando cemadotina-NHS (compuesto 2) con KLH 1 mg/ml en un exceso molar y se purificó por desalación.

15 Cuatro ratones fueron inmunizados utilizando una pauta convencional [ref: Lane Immunology book] por la organización de investigación por contrato Generon Ltd. El antisuero se ensayó mediante ELISA con scFv (TCT)-cemadotina y scFv (TCT) no conjugado y los cuatro respondieron de forma similar (figura 34).

Se utilizó Mouse-4 para crear un panel de hibridomas, de los cuales 11 clones fueron identificados como ligantes fuertes. Estos 11 clones se clasificaron por ELISA y también se analizaron por transferencia Western para comprobar su capacidad de unirse a conjugados scFv (TCT)-cemadotina y no a los componentes libres.

20 Por ELISA, el clon-11 (GA6) pareció ser el mejor ligante, mientras que el clon-9 (1E11) también obtuvo buenos resultados. Los clones 5, 3 y 6 también mostraron una actividad detectable pero más débil. Los clones 7 y 8 eran muy débiles y los clones 1, 2, 4 y 10 parecían no reactivos (figura 35).

Los medios acondicionados de los hibridomas fueron analizados para determinar los niveles de expresión (figura 36) y la inmunorreactividad contra scFv-cemadotina (figura 37) por transferencia Western. Los clones 3,9,11 eran todos buenos expresadores, mientras que los clones 2,4,5,6,7,10 eran poco expresadores.

25 Se observó una unión fuerte en los clones 5, 9 y 11, captando especies de mayor Pm no visibles a simple vista. Los clones 3 y 6 fueron los siguientes más fuertes, captando un posible producto de degradación, y los clones 7 y 8 fueron más débiles. En los clones 1, 2, 4 y 10 se observó una unión muy débil o nula

Se seleccionó el clon-9 (1E11). El hibridoma se expandió, se cultivó y se preparó Mab puro mediante cromatografía de proteína A.

30 Ejemplo 34: Medición del perfil farmacocinético y de la depuración sanguínea de un conjugado de scFv-cemadotina (A) Ensayo radiactivo

35 Se preparó un scFv, optimizado para la conjugación con lisina como se describe en el ejemplo 27 o 28 y se conjugó (como se describe en el ejemplo 31) con el fármaco cemadotina derivado con NHS (compuesto 2). La DAR media fue de 5 para el scFv-TCT-Cem-1 y de 4 para el scFv-TCT-Cem-2, según se determinó mediante geles SDS-PAGE e IEF. Se marcó radiactivamente con yodo-125 utilizando yoduro de sodio-125 (MP Biologicals) y tubos Iodogen™ (Thermo) según las instrucciones del fabricante.

40 Se inyectaron diez microgramos de scFv radiomarcado o conjugado por vía intravenosa en la vena de la cola de un grupo de 4 ratones hembra BALB/c (Harlan UK) por punto temporal. En cada punto temporal se extrajo sangre por punción cardíaca con anestesia terminal de 4 ratones y se extrajo el bazo por disección. La radiactividad de la sangre y los tejidos del bazo se midió con un contador gamma y se comparó con la dosis inyectada, corrigiendo para el peso del tejido. La dosis porcentual inyectada por gramo de tejido se representó gráficamente a lo largo del tiempo y los parámetros farmacocinéticos se determinaron ajustándolos a un modelo de depuración biexponencial. Para estudiar la farmacocinética de la depuración sanguínea *in vivo*, los valores de los datos se ajustaron mediante SigmaPlot a ecuaciones que se ajustan al modelo intravenoso bicompartimental de depuración, que tiene en cuenta las fases de depuración biexponencial, la fase de distribución y la fase de eliminación, de dosis intravenosas únicas. Esto se describe mediante la ecuación doble de cuatro parámetros de decaimiento exponencial $y = ae^{-bx} + ce^{-dx}$, en la que la tasa de depuración de la fase de distribución ($t_{1/2}$ alfa) puede determinarse mediante $\ln 2/b$, y la tasa de depuración de eliminación ($t_{1/2\beta}$) puede determinarse mediante $\ln 2/d$.

50 La depuración sanguínea de los conjugados de scFv-fármaco (figura 38) fue similar al del scFv no modificado (tabla 13). La captación en el bazo de los conjugados de scFv-fármaco no fue significativamente diferente de la de los scFv no modificados (figura 39). Ambos datos demuestran que la tecnología de conjugación descrita en el presente documento no produce ninguna agregación perjudicial.

Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos, depuración sanguínea en ratones de conjugados basados en cemadotina (compuesto 69).

Tabla 13	Nivel de proteínas total por marcaje con 125-I	
	t _{1/2} (alfa) horas	t _{1/2} (beta) horas
ScFv (TCT)	0,4	4,3
ScFv (TCT)-Cem 1 (DAR alta)	0,3	6,6
ScFv (TCT)-Cem 2 (DAR intermedia)	0,3	5,5

(B) Ensayo de detección directa de ADC/scFv

Se generó un MAb anticemadotina (ejemplo 33) y se usó para seguir el ADC en sangre de ratón, para determinar las propiedades farmacocinéticas. Se mantuvieron a ratones BALB/c normales, de 6-8 semanas de edad, en jaulas filtradas hasta su utilización. Se preparó un único lote de material (scFv-TCT, scFv (TCT)-cemadotina, DAR = 5 u 8) como se indicó anteriormente (ejemplo 31) y se inyectaron 0,1 mg en grupos de 20 ratones que se sacrificaron en 4 puntos temporales (5 ratones analizados por punto temporal). Se extrajeron aproximadamente 0,5 ml de sangre total mediante punción cardíaca hacia tubos con EDTA y se recogió el suero por centrifugación. El suero se diluyó de modo adecuado en PBS y se analizó mediante ELISA en placas de microvaloración recubiertas de HER2 (ejemplo 11D), realizando la detección mediante marcador anti-T7 (anticuerpo total) o anticemadotina (ADC totales). Se utilizaron muestras de referencia no inyectadas para crear una curva de calibración para una lectura directa de la concentración sanguínea de ADC/ScFv.

Los resultados se muestran para scFv funcional total (figura 40) y ADC funcional total (figura 41). En la figura 42 se muestra un gráfico comparativo.

Cuando se midió directamente, el scFv libre mostró fases alfa (distribución) y beta (eliminación) típicas de depuración sanguínea biexponencial (tabla 14; Constantinou A. *et al.* (2009), Bioconjugate Chem., 20:924-931), lo que supuso una depuración sanguínea rápida debido a su pequeño tamaño. El ADC de DAR intermedia (5 cargas de fármaco unidas) presentó una depuración sanguínea más lenta tanto en términos de distribución tisular como de eliminación. Esto sugería que la masa molecular ligeramente mayor conducía a una depuración más lenta en lugar de una agregación que condujera a una depuración rápida a través del sistema retículoendotelial. Este efecto fue aún más pronunciado con el conjugado de mayor DAR (8 cargas activas de fármaco).

Cuando se midió el ADC total, se observó un patrón similar con parámetros farmacocinéticos similares (tabla 14). Un gráfico comparativo lo ilustra (figura 42). Estos datos sugieren que los ADC basados en scFv, con la carga alta, tienen una depuración sanguínea retenida o incluso más lento, lo que es una indicación de la baja/ninguna agregación y solubilidad favorable. La residencia en la sangre es lo suficientemente larga como para permitir un efecto terapéutico. Además, las similitudes entre el contenido total de scFv y el contenido total de ADC sugieren que el ADC es estable y no se degrada más rápidamente que el componente de scFv [Lin y Tibbitts, Pharm. Res. (2012), 29:2354-2366; Kaur *et al.*, Bioanálisis (2013), 5:201-226].

Tabla 14. Resumen de los datos farmacocinéticos

	Anticuerpo total medido por unión a anti-HER2		Niveles de ADC medidos mediante ELISA anticemadotina (fármaco)	
	t _{1/2} (alfa) horas	t _{1/2} (beta) horas	t _{1/2} (alfa) horas	t _{1/2} (beta) horas
ScFv (TCT)	0,4	5,25	N/A	N/A
ScFv (TCT)-CEM (DAR alta = 8)	0,96	6,87	0,53	5,43
ScFv (TCT)-CEM (DAR intermedia = 5)	0,55	6,65	0,51	3,91

Ejemplo 35: Medición del perfil farmacocinético y de la depuración sanguínea de un conjugado de scFv-elipticina

Se generó un MAb antielipticina como se indicó anteriormente (por ejemplo, ejemplo 33) y se usó para seguir el ADC en sangre de ratón, para determinar las propiedades farmacocinéticas. Se mantuvieron a ratones BALB/c normales, de 6-8 semanas de edad, en jaulas filtradas hasta su utilización. Se prepara un único lote de material (scFv-TCT, scFv (TCT)-elipticina, DAR = 5 u 8) como se indicó anteriormente (compuesto 21, ejemplo 29) y se inyectaron 0,1 mg en grupos de 20 ratones que se sacrificaron en 4 puntos temporales (5 ratones analizados por punto temporal). Se extraen aproximadamente 0,5 ml de sangre total por punción cardíaca hacia tubos con EDTA y se recoge el suero por centrifugación. El suero se diluye de modo adecuado en PBS y se analiza mediante ELISA en placas de microvaloración recubiertas de HER2 (ejemplo 31D), realizando la detección mediante marcador anti-T7 (anticuerpo total) o antielipticina (ADC total). Se utilizaron muestras de referencia no inyectadas para crear una curva de calibración para una lectura directa de la concentración sanguínea de ADC/ScFv.

Cuando se mide directamente, el scFv libre muestra las fases alfa (distribución) y beta (eliminación) típicas de la depuración sanguínea biexponencial (Constantinou A. *et al.* (2009), Bioconjugate Chem., 20:924-931), que es una depuración sanguínea rápida debido a su pequeño tamaño. El ADC de DAR intermedia (5 cargas farmacológicas unidas) tiene una depuración sanguínea más lenta tanto en términos de distribución tisular como de eliminación. Esto sugería que la masa molecular ligeramente mayor conducía a una depuración más lenta en lugar de una agregación que condujera a una depuración rápida a través del sistema retículoendotelial. Este efecto es aún más pronunciado con el conjugado de mayor DAR (8 cargas activas de fármacos).

Ejemplo 36: Medición del perfil farmacocinético y de la depuración sanguínea de un conjugado de scFv-doxorubicina

Un MAb antidoxorubicina está disponible en el mercado y se utiliza para seguir el ADC en sangre de ratón, para determinar las propiedades farmacocinéticas. Se mantuvieron a ratones BALB/c normales, de 6-8 semanas de edad, en jaulas filtradas hasta su utilización. Se prepara un único lote de material (scFv-TCT, scFv (TCT)-doxorubicina, DAR = 5 u 8) como se ha indicado anteriormente (compuesto 72) y se inyectan 0,1 mg en grupos de 20 ratones que se sacrifican en 4 puntos temporales (5 ratones analizados por punto temporal). Se extraen aproximadamente 0,5 ml de sangre total por punción cardíaca hacia tubos con EDTA y se recoge el suero por centrifugación. El suero se diluye de modo adecuado en PBS y se analiza mediante ELISA en placas de microvaloración recubiertas de HER2 (ejemplo 31D), realizando la detección mediante marcador anti-T7 (anticuerpo total) o antidoxorubicina (ADC total). Se utilizaron muestras de referencia no inyectadas para crear una curva de calibración para una lectura directa de la concentración sanguínea de ADC/ScFv.

Cuando se mide directamente, el scFv libre muestra las fases alfa (distribución) y beta (eliminación) típicas de la depuración sanguínea biexponencial (Constantinou A. *et al.* (2009), Bioconjugate Chem., 20:924-931), que es una depuración sanguínea rápida debido a su pequeño tamaño. El ADC de DAR intermedia (5 cargas farmacológicas unidas) tiene una depuración sanguínea más lenta tanto en términos de distribución tisular como de eliminación. Esto sugería que la masa molecular ligeramente mayor conducía a una depuración más lenta en lugar de una agregación que condujera a una depuración rápida a través del sistema retículoendotelial. Este efecto es aún más pronunciado con el conjugado de mayor DAR (8 cargas activas de fármacos).

Ejemplo 37: Medición del perfil farmacocinético y de la depuración sanguínea de un conjugado de scFv-MMAE

Un MAb anti-MMAE está disponible en el mercado y se utiliza para seguir el ADC en sangre de ratón, para determinar las propiedades farmacocinéticas. Se mantuvieron a ratones BALB/c normales, de 6-8 semanas de edad, en jaulas filtradas hasta su utilización. Se prepara un único lote de material (scFv-TCT, scFv (TCT)-MMAE, DAR = 5 u 8) como se describió anteriormente (ejemplo 32) y se inyectan 0,1 mg en grupos de 20 ratones que se sacrifican en 4 puntos temporales (5 ratones analizados por punto temporal). Se extraen aproximadamente 0,5 ml de sangre total por punción cardíaca hacia tubos con EDTA y se recoge el suero por centrifugación. El suero se diluye de modo adecuado en PBS y se analiza mediante ELISA en placas de microvaloración recubiertas de HER2 (ejemplo 31D), y se realizó la detección mediante marcador anti-T7 (anticuerpo total) o anti-MMAE (ADC total). Se utilizaron muestras de referencia no inyectadas para crear una curva de calibración para una lectura directa de la concentración sanguínea de ADC/ScFv.

Cuando se mide directamente, el scFv libre muestra las fases alfa (distribución) y beta (eliminación) típicas de la depuración sanguínea biexponencial (Constantinou A. *et al.* (2009), Bioconjugate Chem., 20:924-931), que es una depuración sanguínea rápida debido a su pequeño tamaño. El ADC de DAR intermedia (5 cargas farmacológicas unidas) tiene una depuración sanguínea más lenta tanto en términos de distribución tisular como de eliminación. Esto sugería que la masa molecular ligeramente mayor conducía a una depuración más lenta en lugar de una agregación que condujera a una depuración rápida a través del sistema retículoendotelial. Este efecto es aún más pronunciado con el conjugado de mayor DAR (8 cargas activas de fármacos).

Ejemplo 38: Medición de la captación tumoral y de la proporción tumor/tejido normal de un conjugado de scFv-cemadotina

Un scFv, optimizado para la conjugación con lisina, se prepara como se describe en el ejemplo 27 o 28 y se conjuga (como se describe en el ejemplo 31) con un fármaco de cemadotina derivado con NHS (compuestos 2, 69). La DAR

promedio oscila entre 6 y 10. Se marcó radiactivamente con yodo-125 utilizando yoduro de sodio-125 (MP Biologicals) y tubos lodogen™ (Thermo) según las instrucciones del fabricante.

- 5 Diez microgramos de scFv radiomarcado o conjugado se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola de un grupo de 4 ratones hembra BALB/c atímicos (Harlan UK) que portaban tumores subcutáneos con la expresión diana apropiada (por ejemplo, SKOV3 para la expresión de HER2) por punto temporal. En cada punto temporal, se extrae sangre por punción cardíaca con anestesia terminal de 4 ratones y se diseccionan los tumores y los órganos normales. La radiactividad de la sangre y los tejidos se mide con un contador gamma y se compara con la dosis inyectada, corrigiendo en función del peso del tejido. El porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido se representa gráficamente en función del tiempo.
- 10 Ejemplo 39: Medición de la captación tumoral y de la proporción tumor/tejido normal de un conjugado de scFv-elipticina
- Un scFv, optimizado para la conjugación con lisina, se prepara como se describe en el ejemplo 27 o 28 y se conjuga (como se describe en el ejemplo 29) con un fármaco de elipticina derivado con NHS (compuestos 23, 73). La DAR promedio oscila entre 6 y 10. Se marcó radiactivamente con yodo-125 utilizando yoduro de sodio-125 (MP Biologicals) y tubos lodogen™ (Thermo) según las instrucciones del fabricante.
- 15 Diez microgramos de scFv radiomarcado o conjugado se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola de un grupo de 4 ratones hembra BALB/c atímicos (Harlan UK) que portaban tumores subcutáneos con la expresión diana apropiada (por ejemplo, SKOV3 para la expresión de HER2) por punto temporal. En cada punto temporal, se extrae sangre por punción cardíaca con anestesia terminal de 4 ratones y se diseccionan los tumores y los órganos normales. La radiactividad de la sangre y los tejidos se mide con un contador gamma y se compara con la dosis inyectada, corrigiendo en función del peso del tejido. El porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido se representa gráficamente en función del tiempo.
- 20 Ejemplo 40. Medición de la captación tumoral y de la proporción tumor/tejido normal de un conjugado de scFv-doxorubicina
- Un scFv, optimizado para la conjugación con lisina, se prepara como se describe en el ejemplo 27 o 28 y se conjuga (como se describe en el ejemplo 30) con un fármaco de doxorubicina derivado con NHS (compuestos 7, 72). La DAR promedio oscila entre 6 y 8. Se marcó radiactivamente con yodo-125 utilizando yoduro de sodio-125 (MP Biologicals) y tubos lodogen™ (Thermo) según las instrucciones del fabricante.
- 30 Diez microgramos de scFv radiomarcado o conjugado se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola de un grupo de 4 ratones hembra BALB/c atímicos (Harlan UK) que portaban tumores subcutáneos con la expresión diana apropiada (por ejemplo, SKOV3 para la expresión de HER2) por punto temporal. En cada punto temporal, se extrae sangre por punción cardíaca con anestesia terminal de 4 ratones y se diseccionan los tumores y los órganos normales. La radiactividad de la sangre y los tejidos se mide con un contador gamma y se compara con la dosis inyectada, corrigiendo en función del peso del tejido. El porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido se representa gráficamente en función del tiempo.
- 35 Ejemplo 41: Medición de la captación tumoral y de la proporción tumor/tejido normal de un conjugado de scFv-MMAE
- Un scFv, optimizado para la conjugación con lisina, se prepara como se describe en el ejemplo 27 o 28 y se conjuga (como se describe en el ejemplo 32) con un fármaco MMAE derivado con NHS. La DAR promedio oscila entre 6 y 10. Se marcó radiactivamente con yodo-125 utilizando yoduro de sodio-125 (MP Biologicals) y tubos lodogen™ (Thermo) según las instrucciones del fabricante.
- 40 Diez microgramos de scFv radiomarcado o conjugado se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola de un grupo de 4 ratones hembra BALB/c atímicos (Harlan UK) que portaban tumores subcutáneos con la expresión diana apropiada (por ejemplo, SKOV3 para la expresión de HER2) por punto temporal. En cada punto temporal, se extrae sangre por punción cardíaca con anestesia terminal de 4 ratones y se diseccionan los tumores y los órganos normales. La radiactividad de la sangre y los tejidos se mide con un contador gamma y se compara con la dosis inyectada, corrigiendo en función del peso del tejido. El porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido se representa gráficamente en función del tiempo.
- 45 Ejemplo 42: Estudios de regresión tumoral en ratones atímicos portadores de xenoinjertos de tumores SKBr3 tratados con dos DAR de ADC de scFv (TCT)-P5C5
- 50 Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratones BALB/c hembra atímicos, de 6-8 semanas de edad (Harlan UK). Toda la investigación *in vivo* se llevó a cabo con una licencia de proyecto del Ministerio del Interior del Reino Unido PPL 70/5833. Se crearon xenoinjertos tumorales humanos inyectando a los ratones por vía subcutánea en el flanco izquierdo 0,1 ml que contenían hasta 5 millones de células SKBr3 en Matrigel al 50 %. Se controló el crecimiento del tumor, que tardó de 2 a 3 semanas en alcanzar el diámetro de 3-5 mm requerido para las pruebas posteriores. Cuando los tumores tenían aproximadamente 100 mm³, se inyectaron 10 mg/kg (dosis total de 0,25 mg) por vía intravenosa
- 55 de un conjugado de scFv (TCT)-P5C5 (como se preparó en el ejemplo 31, compuesto 71) en 5 días consecutivos (dosis total de ADC = 1,25 mg por animal) y se controló el tamaño de los tumores. El volumen tumoral se representa

gráficamente en comparación con el volumen inicial (figura 43), que muestra aproximadamente 10 días de regresión hasta que el tumor empieza a crecer de nuevo. Esto equivale a un retraso del crecimiento tumoral de aproximadamente 1 mes y confirma que los ADC de scFv (TCT) tienen función terapéutica en un modelo animal preclínico.

Ejemplo 43: Terapia tumoral de un conjugado de scFv-MMAE

- 5 Para los estudios *in vivo* se utilizan ratones BALB/c hembra atímicos, de 6-8 semanas de edad (Harlan UK). Toda la investigación *in vivo* se lleva a cabo con una licencia de proyecto del Ministerio del Interior británico. Se crean xenoinjertos tumorales humanos inyectando a los ratones por vía subcutánea en el flanco izquierdo 0,1 ml que contienen hasta 5 millones de células SKOV3 en Matrigel al 50 %. Se controla el crecimiento del tumor, que tarda de 2 a 3 semanas en alcanzar el diámetro de 3 a 5 mm necesario para las pruebas posteriores. Cuando los tumores
- 10 tienen aproximadamente 100 mm³, se inyectan 10 mg/kg (dosis total de 0,25 mg) por vía intravenosa de un conjugado de scFv (TCT)-MMAE (como se preparó en el ejemplo 32) en 5 días secuenciales (dosis total de ADC = 1,25 mg por animal) y se controla el tamaño de los tumores. El volumen tumoral se representa gráficamente en comparación con el volumen inicial.

Ejemplo 44: Formulaciones farmacéuticas y administración

- 15 Otro aspecto de la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto según el primer aspecto de la invención en mezcla con un adyuvante, un diluyente o un vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

Preferentemente, la formulación es una dosis unitaria que contiene una dosis o unidad diaria, una subdosis diaria o una fracción apropiada de las mismas, del principio activo.

- 20 Los compuestos de la invención se administrarán normalmente por vía oral o por cualquier vía parenteral, en forma de una formulación farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente en forma de una sal de adición de bases o ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxica, en una forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable. En función del trastorno y del paciente a tratar, así como de la vía de administración, las composiciones pueden administrarse a dosis variables.

- 25 En terapia humana, los compuestos de la invención pueden administrarse solos, pero generalmente se administrarán en mezcla con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico adecuado, seleccionado teniendo en cuenta la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional.

- Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden administrarse por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Los compuestos de la invención también
- 30 pueden administrarse mediante inyección intracavernosa.

- Dichos comprimidos pueden contener excipientes, tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes, tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón glicolato sódico, croscarmelosa sodio y determinados silicatos complejos, y
- 35 aglutinantes de granulación, tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además, pueden incluirse agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

- Las composiciones sólidas de tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para las suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de la invención pueden combinarse
- 40 con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, colorantes o tintes, con agentes emulsionantes y/o suspensores y con diluyentes, tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

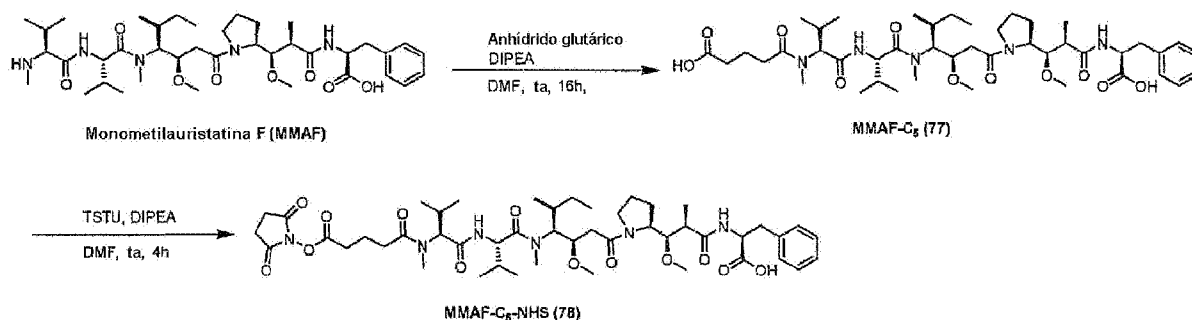
- Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o
- 45 pueden administrarse mediante técnicas de infusión. Se utilizan mejor en forma de solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o glucosa suficientes para que la solución sea isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben estar convenientemente tamponadas (preferentemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se realiza fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

- Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir
- 50 agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases unidos o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse liofilizadas, requiriendo únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Pueden
- 55

prepararse soluciones y suspensiones inyectables improvisadas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

- 5 Para la administración oral y parenteral a pacientes humanos, el nivel de dosis diaria de los compuestos de la invención será generalmente de 1 mg/kg a 30 mg/kg. Así, por ejemplo, los comprimidos o cápsulas del compuesto de la invención pueden contener una dosis de compuesto activo para su administración individual o dos o más a la vez, según proceda. En cualquier caso, el médico determinará la dosis real más adecuada para cada paciente, que variará en función de la edad, el peso y la respuesta del paciente. Las dosis anteriores son ilustrativas del caso medio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se justifiquen intervalos de dosis más altos o más bajos y que estén dentro del alcance de esta invención.
- 10 Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía intranasal o por inhalación y se suministran convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación en aerosol desde un recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano, tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3 o 1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado.
- 15 En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad controlada. El recipiente presurizado, la bomba, el pulverizador o el nebulizador pueden contener una solución o suspensión del compuesto activo, por ejemplo, utilizando una mezcla de etanol y el propulsor como disolvente, que puede contener además un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitán. Las cápsulas y cartuchos (fabricados, por ejemplo, con gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para
- 20 contener una mezcla en polvo de un compuesto de la invención y una base de polvos adecuada, tal como lactosa o almidón.
- Las formulaciones en aerosol o en polvo seco se disponen preferentemente de modo que cada dosis medida o "descarga" suministre una dosis apropiada de un compuesto de la invención para su administración al paciente. Se apreciará que la dosis diaria total con un aerosol variará de un paciente a otro, y puede administrarse en una dosis
- 25 única o, más habitualmente, en dosis divididas a lo largo del día.
- Como alternativa, los compuestos de la invención pueden administrarse en forma de supositorio o pesario, o pueden aplicarse por vía tópica en forma de loción, solución, crema, pomada o polvo corporales. Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche cutáneo. También pueden administrarse por vía ocular, en concreto para tratar enfermedades oculares.
- 30 Para un uso oftálmico, los compuestos de la invención pueden formularse en forma de suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica con pH ajustado o, preferentemente, en forma de soluciones en solución salina estéril isotónica con pH ajustado, opcionalmente en combinación con un conservante, tal como un cloruro de bencilalconio. Como alternativa, pueden formularse en una pomada, tal como la vaselina.
- 35 Para su aplicación tópica en la piel, los compuestos de la invención pueden formularse en forma de una pomada adecuada que contenga el compuesto activo suspendido o disuelto, por ejemplo, en una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno y polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, pueden formularse en forma de una loción o crema adecuada, suspendida o disuelta, por ejemplo, en una mezcla de una o más de las siguientes sustancias: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo,
- 40 alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.
- Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, generalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.
- 45 Generalmente, en seres humanos, la administración oral o tópica de los compuestos de la invención es la vía preferida, ya que son las más cómodas. En circunstancias en las que el receptor sufra un trastorno de la deglución o una alteración de la absorción del fármaco tras la administración oral, el fármaco puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo, sublingual o bucal.
- 50 Para el uso veterinario, un compuesto de la invención se administra en forma de una formulación adecuadamente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal, y el cirujano veterinario determinará la pauta posológica y la vía de administración que será más apropiada para un animal concreto.

Ejemplo 45: Preparación de MMAF-C₅-éster de NHS (78)

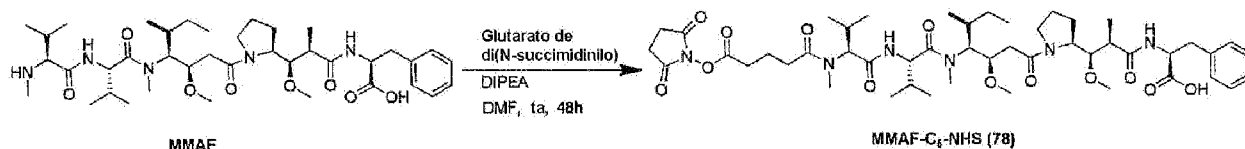


A una solución de MMAF (0,1 g, 0,177 mmol) en DMF (4 ml) se le añadió DIPEA (0,12 ml) y anhídrido glutárico (50,5 mg, 0,44 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N₂ durante 16 h. Los disolventes se evaporaron al vacío y el compuesto bruto obtenido se purificó en HPLC preparativa utilizando la columna Phenomenex Synergi Polar-RP (eluyentes: A = TFA al 0,1 % en agua, B = MeCN), gradiente: de 0 a 11 min: B del 15 al 40 %, de 11 a 24 min: B del 40 al 55 %, de 24 a 35 min: B del 55 al 85 %, compuesto recogido a t_R 16,4 min y liofilizado para obtener un sólido blanco (81 %). HRMS: ESI *m/z* Encontrado 846,5200 [M+H]⁺, calculado 846,5228 para C₄₄H₇₂N₅O₁₁

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,22 (s, 1H), 7,46-6,98 (m, 5H), 4,93-4,38 (m, 3H), 4,04 (dd, J = 13,7, 9,9 Hz, 2H), 3,66 (dq, J = 12,8, 6,4 Hz, 4H), 3,50-3,37 (m, 6H), 3,29-3,15 (m, 9H), 3,15-3,00 (m, 4H), 2,94-2,65 (m, 12H), 2,30 (t, J = 7,4 Hz, 12H), 1,94 (p, J = 6,6 Hz, 3H), 1,76 (p, J = 7,4 Hz, 9H), 1,51-1,22 (m, 28H), 1,13 (dt, J = 19,1, 6,8 Hz, 6H), 1,04-0,69 (m, 20H).

A una solución de MMAF-C₅ (50 mg, 0,05 mmol) en DMF (1 ml) se le añadió DIPEA (15 μl) y TSTU (18 mg, 0,05 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N₂ durante 4 h. Los disolventes se evaporaron al vacío y el compuesto bruto obtenido se purificó en HPLC preparativa utilizando la columna Phenomenex Synergi Polar-RP (eluyentes: A = TFA al 0,1 % en agua, B = MeCN), gradiente: de 0 a 11 min: B del 15 al 40 %, de 11 a 24 min: B del 40 al 55 %, de 24 a 35 min: B del 55 al 85 %. El compuesto deseado se recogió a t_R 20,4 min y se liofilizó para obtener un sólido blanco (22 mg, 40 %). HRMS: ESI *m/z* Encontrado 943,5416 [M+H]⁺, calculado 943,5392 para C₄₈H₇₅N₆O₁₃

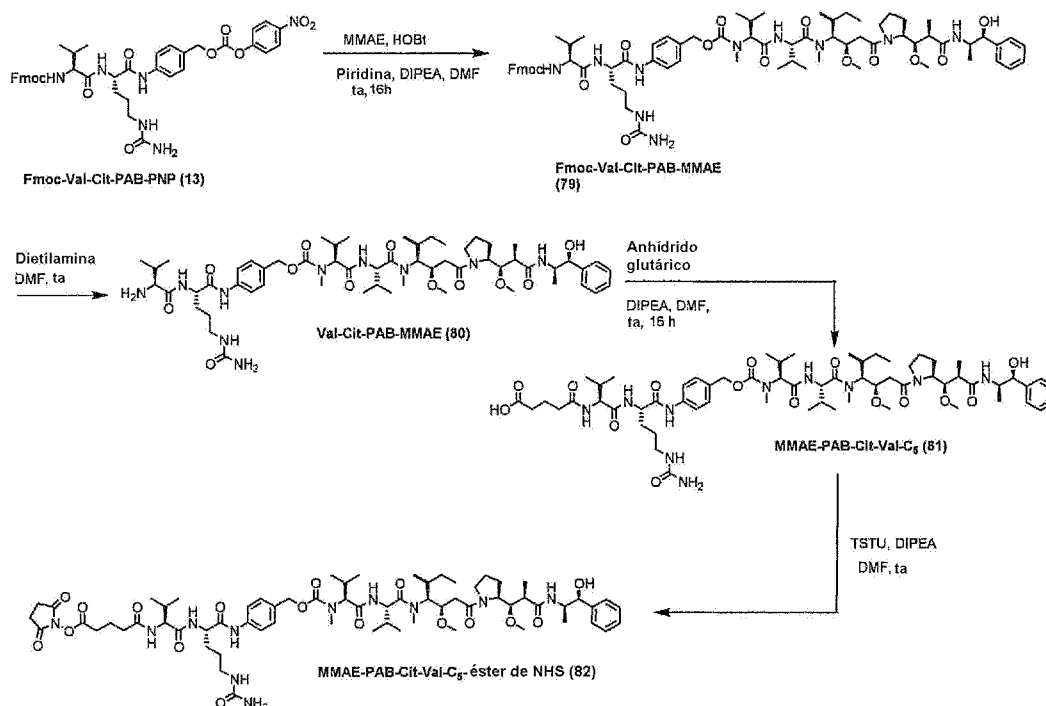
Ejemplo 46: Preparación de MMAF-C₅-éster de NHS por activación directa



A una solución de MMAF (50 mg, 0,06 mmol) en acetonitrilo (5 ml) se le añadió DIPEA (0,1 ml) y glutarato de di(N-succinimidilo) (193 mg, 0,6 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N₂ durante 72 h. Los disolventes se evaporaron al vacío y el compuesto bruto obtenido se purificó en HPLC preparativa utilizando la columna Phenomenex Synergi Polar-RP (eluyentes: A = TFA al 0,1 % en agua, B = MeCN), gradiente: de 0 a 11 min: B del 15 al 40 %, de 11 a 24 min: B del 40 al 55 %, de 24 a 35 min: B del 55 al 85 %. El compuesto deseado se recogió a t_R 20,4 min y se liofilizó para obtener un sólido blanco (10 mg, 18 %).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,34 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,14-6,90 (m, 5H), 4,41 (dt, J = 11,3, 4,8 Hz, 1H), 4,22 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 3,74 (dd, J = 10,0, 4,4 Hz, 1H), 3,10-2,90 (m, 8H), 2,88-2,66 (m, 6H), 2,54-2,41 (m, 2H), 2,28 (p, J = 1,8 Hz, 38H), 2,07-1,90 (m, 3H), 1,74-1,31 (m, 5H), 1,14 (d, J = 48,5 Hz, 3H), 0,88-0,77 (m, 3H), 0,77-0,47 (m, 20H).

Ejemplo 47: Preparación de MMAE-PAB-Cit-Val-C₅-NHS (82)



A una solución de MMAE (0,15 g, 0,18 mmol) y Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP 13 (0,152 g, 0,19 mmol) en DMF (1,5 ml) se le añadió HOBt (58 mg, 0,36 mmol), piridina (0,12 ml) y DIPEA (31 µl). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N₂ a temperatura ambiente durante 24 h. Los disolventes se evaporaron al vacío y el residuo se trituró con acetato de etilo. El sólido resultante se filtró, se lavó con acetato de etilo y se secó para obtener 79. LC-MS ESI *m/z* 1367,7 [M+Na]⁺. Esto se utilizó directamente sin más purificación.

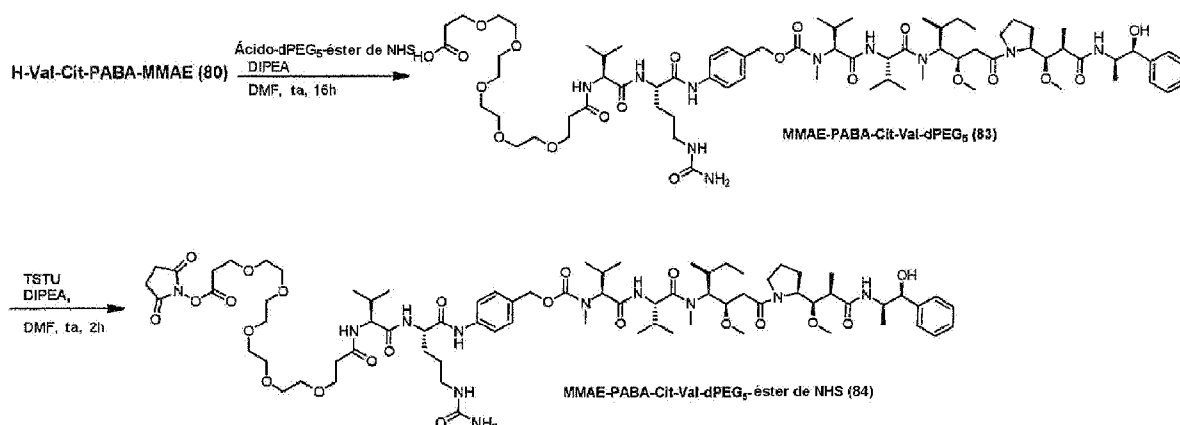
Una solución Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE 79 (0,3 g, 0,22 mmol) en DMF (1,5 ml) y dietilamina (1,12 ml) se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El producto precipitó en éter dietílico y se filtró, obteniéndose 0,15 g de 80 en forma de un polvo blanquecino que se utilizó sin más purificación. LC-MS ESI *m/z* 1145,6 [M+Na]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,20 (d, J = 6,5 Hz, 1H), 8,70 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 4,9 Hz, 4H), 7,61 (dd, J = 26,0, 8,3 Hz, 2H), 7,45-7,21 (m, 7H), 7,18 (dd, J = 8,9, 6,3 Hz, 1H), 6,04 (s, 1H), 5,48 (s, 2H), 5,21-4,88 (m, 2H), 4,63-4,37 (m, 4H), 4,26 (t, J = 11,7 Hz, 1H), 3,98 (m, 3H), 3,33-3,08 (m, 12H), 3,10-2,69 (m, 8H), 2,27-1,88 (m, 5H), 1,90-1,66 (m, 5H), 1,64-1,19 (m, 7H), 1,15-0,52 (m, 36H).

A una solución del compuesto H-Val-Cit-PAB-MMAE 80 (0,1 g, 0,177 mmol) en DMF (4 ml) se le añadió DIPEA (0,12 ml) y anhídrido glutárico (50,5 mg, 0,44 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N₂ durante 16 h. Los disolventes se evaporaron al vacío, el compuesto 81 bruto obtenido se lavó con éter dietílico y se utilizó directamente para la siguiente etapa. HRMS: ESI *m/z* Encontrado 1237,7526 [M+Na]⁺, calculado 1237,7448 para C₆₃H₁₀₁N₁₀O₁₅

A una solución de MMAE-PAB-Cit-Val-C₅ 81 (0,1 g, 0,08 mmol) en DMF (2 ml) se le añadió DIPEA (29 µl) y TSTU (38 mg, 0,12 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N₂ durante 3 h. Los disolventes se evaporaron al vacío y el producto obtenido se purificó en una HPLC preparativa utilizando la columna Phenomenex Synergi Polar-RP (eluyentes: A = TFA al 0,1 % en agua, B = MeCN), gradiente: de 0 a 14 min: B del 15 al 85 %, el compuesto deseado se recogió a t_R 10,1 min y se liofilizó para obtener un polvo blanco (40 %). HRMS: ESI *m/z* Encontrado 1356,7623 [M+Na]⁺, calculado 1356,7431 para C₆₇H₁₀₃N₁₁O₁₇Na

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,79 (s, 1H), 8,05-7,79 (m, 2H), 7,68 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,37 (d, J = 8,0 Hz, 3H), 7,25-7,00 (m, 7H), 6,96 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 4,85 (d, J = 15,3 Hz, 4H), 4,55-4,09 (m, 10H), 4,00-3,56 (m, 12H), 3,13-2,85 (m, 12H), 2,75 (s, 5H), 2,67-2,58 (m, 7H), 2,54-2,36 (m, 4H), 2,28 (p, J = 1,8 Hz, 88H), 2,14-1,99 (m, 4H), 1,95-1,67 (m, 5H), 1,68-1,40 (m, 8H), 1,39-0,93 (m, 7H), 0,90-0,31 (m, 40H).

Ejemplo 48: Preparación de MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₅-éster de NHS (84)

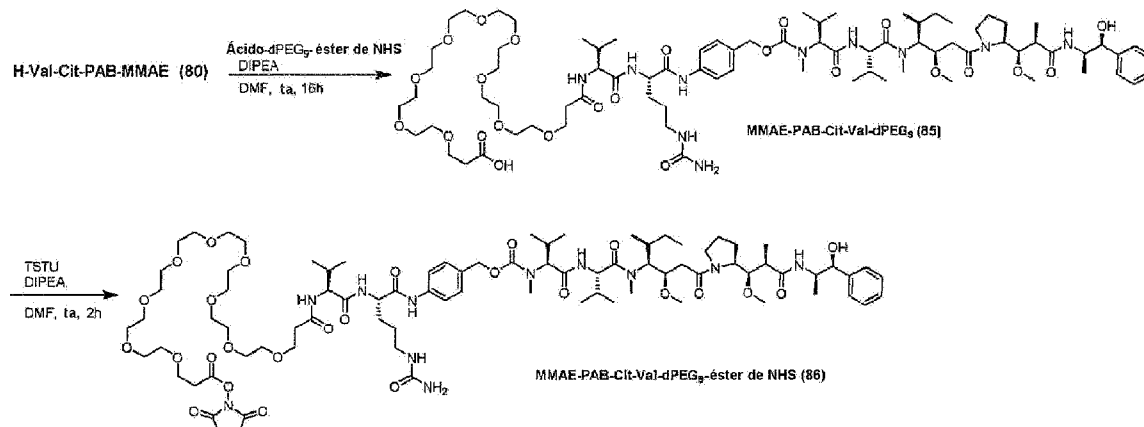


A una solución del compuesto H-Val-Cit-PAB-MMAE 80 (0,2 g, 0,177 mmol) en DMF (7 ml) se le añadió DIPEA (0,1 ml) y ácido-dPEG₅-NHS (50,5 mg, 0,21 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N₂ durante 16 h. Los disolventes se evaporaron al vacío, el compuesto 83 bruto obtenido se lavó con éter dietílico y se utilizó directamente para la siguiente etapa. LC-MS ESI m/z 1466,6 [M+Na]⁺

A una solución de ácido-dPEG₅-Val-Cit-PAB-MMAE 83 (0,25 g, 0,17 mmol) en DMF (7 ml) se le añadió DIPEA (0,15 ml) y TSTU (120 mg, 0,39 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N₂ durante 3 h. Los disolventes se evaporaron al vacío y el producto bruto se purificó en el sistema de purificación rápido Biotage utilizando una columna C18 para obtener el compuesto NHS-PEG₅-Val-Cit-PAB-MMAE 84 en forma de un sólido blanco tras la liofilización, MS: ESI m/z 1562,9 [M+Na]⁺

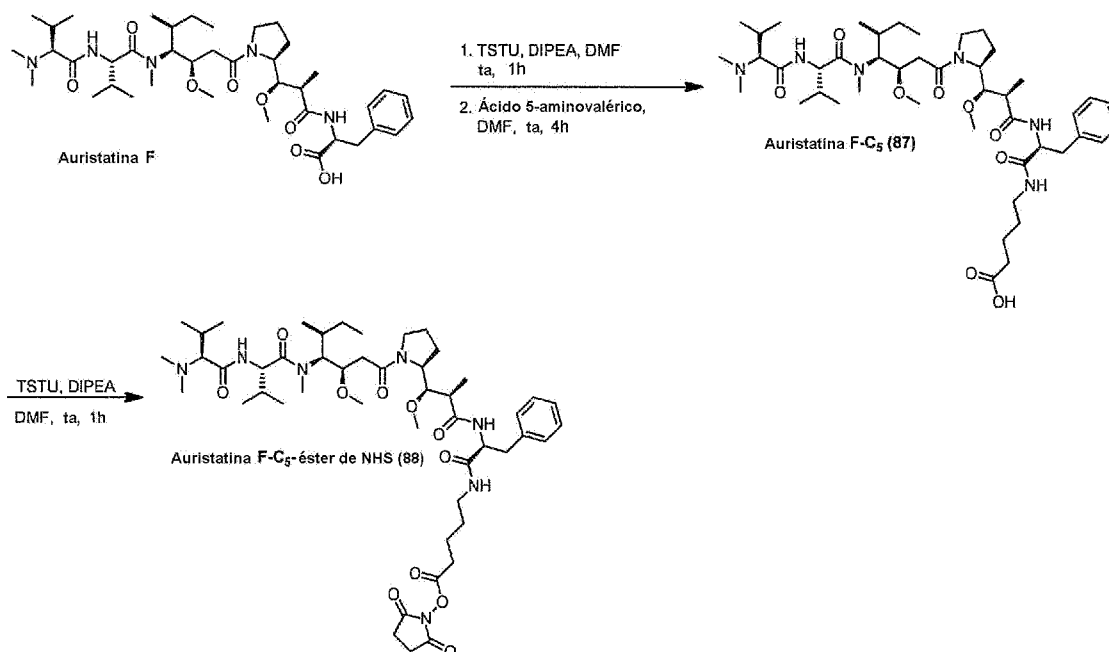
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,03-9,96 (m, 1H), 8,12 (dd, J = 19,3, 7,8 Hz, 1H), 7,90 (t, J = 8,9 Hz, 1H), 7,69-7,55 (m, 2H), 7,38-7,23 (m, 5H), 7,23-7,13 (m, 1H), 5,11-4,93 (m, 2H), 4,52-4,33 (m, 3H), 4,32-4,19 (m, 2H), 3,99 (m, 2H), 3,83-3,68 (m, 2H), 3,65-3,41 (m, 17H), 3,22 (dd, J = 19,9, 8,6 Hz, 6H), 3,12 (s, 1H), 3,10-2,74 (m, 12H), 2,42 (m, 12H), 2,26 (dd, J = 15,9, 9,2 Hz, 1H), 2,19-1,90 (m, 4H), 1,79-1,65 (m, 3H), 1,65-1,52 (m, 2H), 1,52-1,31 (m, 3H), 1,08-0,96 (m, 6H), 0,96-0,71 (m, 23H).

Ejemplo 49: Preparación de MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉-éster de NHS (86)



El éster 86 de MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉-NHS se preparó como en el ejemplo 47 haciendo reaccionar H-Val-Cit-PAB-MMAE 80 con ácido-dPEG₉-NHS, seguido de activación con TSTU. El producto bruto, obtenido tras la evaporación, se purificó en el sistema de purificación rápido Biotage utilizando una columna C18 para obtener el compuesto MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉-NHS 86 en forma de un sólido blanco tras la liofilización, MS: ESI m/z 1718,3093 [M+H]⁺

Ejemplo 50: Preparación del auristatina F-Cs-éster de NHS (88)

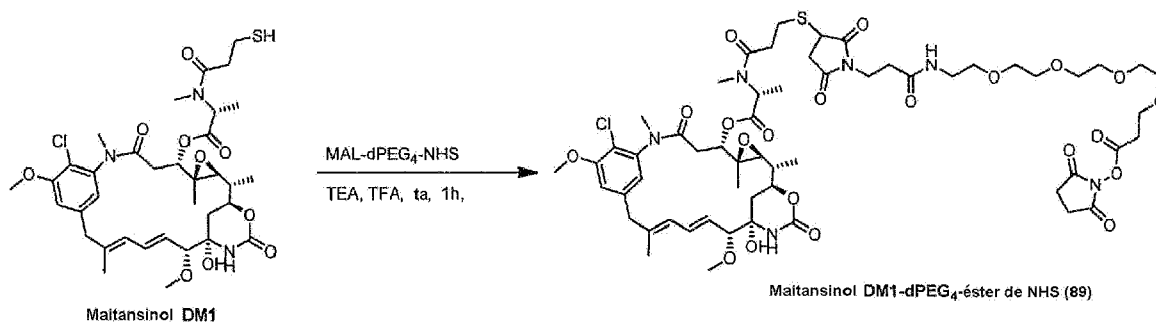


Se disolvieron auristatina F (0,1 g, 0,116 mmol) y HATU (40 mg, 0,104 mmol) en DMF (3 ml) y se les añadió DIPEA (40 μ l). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min y después se añadió gota a gota a una solución de ácido 5-aminovalérico (15 mg, 0,127 mmol) en DMF (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y se evaporó al vacío. El producto bruto se purificó en el sistema de purificación rápido Biotage utilizando columna C18 para obtener el compuesto auristatina F-C₅ ácido 87 en forma de un sólido blanco (85 mg, 84 %). LC-MS ESI m/z 867,5 $[M+Na]^+$

A una solución de auristatina F-C₅ ácido 87 (70 mg, 0,08 mmol) en DIPEA (72 μ l) y DMF (3 ml) se le añadió TSTU (57 mg, 0,19 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Los disolventes se evaporaron al vacío y el compuesto bruto se purificó en el sistema de purificación rápido Biotage utilizando una columna C18 para obtener el compuesto auristatina F-C₅-éster de NHS 88 en forma de un sólido blanco tras la liofilización (46 mg, 59 %). LC-MS ESI m/z 964,5 $[M+Na]^+$

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,57 (s, 1H), 8,94 (q, J = 7,9, 7,2 Hz, 1H), 8,05-7,84 (m, 1H), 7,31-7,10 (m, 5H), 4,60 (m, 2H), 3,99 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 3,84-3,73 (m, 2H), 3,70 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 3,50 (td, J = 14,0, 7,5 Hz, 1H), 3,32-3,10 (m, 9H), 2,99 (m, 6H), 2,84-2,58 (m, 14H), 2,45 (dd, J = 14,9, 5,0 Hz, 4H), 2,37-2,22 (m, 3H), 2,01 (dd, J = 12,8, 5,7 Hz, 1H), 1,94-1,73 (m, 3H), 1,59-1,36 (m, 5H), 1,08-0,71 (m, 25H).

Ejemplo 51. Preparación de maitansinol DM1-dPEG₄-éster de NHS (89)

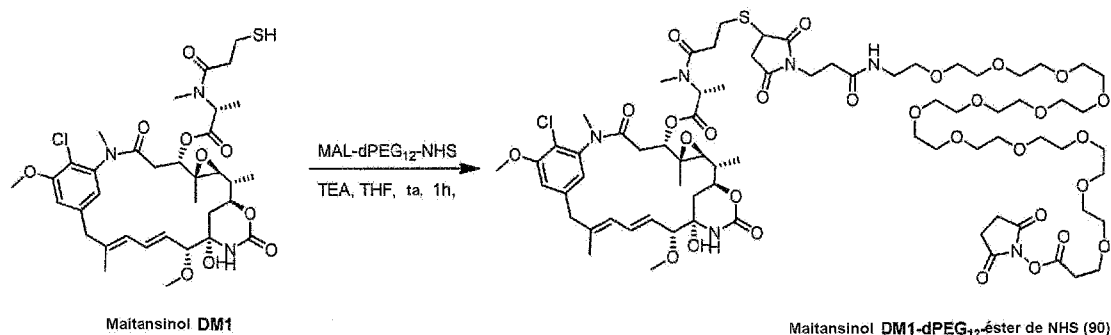


A una solución de DM1 (0,1 g, 0,135 mmol) en THF se le añadió Et₃N (18,9 μ l), seguido de la adición de Mal-dPEG₄-NHS (77 mg, 0,15 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de N₂ durante 1 h y los disolventes se eliminaron al vacío. El producto bruto se purificó en el sistema de purificación rápido Biotage utilizando una columna C18 para obtener el compuesto DM1-dPEG₅-NHS en forma de un sólido blanco tras la liofilización (105 mg, 75 %). LC-MS ESI m/z 1274,60 $[M+Na]^+$

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,01 (q, J = 5,6 Hz, 1H), 7,17 (dd, J = 8,1, 1,8 Hz, 1H), 6,90 (s, 1H), 6,68-6,46 (m, 3H), 5,55 (dd, J = 12,8, 8,9 Hz, 1H), 5,31 (q, J = 6,7 Hz, 1H), 4,52 (dd, J = 12,1, 2,9 Hz, 1H), 4,07 (t, J = 10,8 Hz, 2H), 3,93 (d, J = 1,5 Hz, 4H), 3,85 (dd, J = 9,0, 4,0 Hz, 1H), 3,71 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,63-3,41 (m, 18H), 3,37 (t, J = 5,9 Hz,

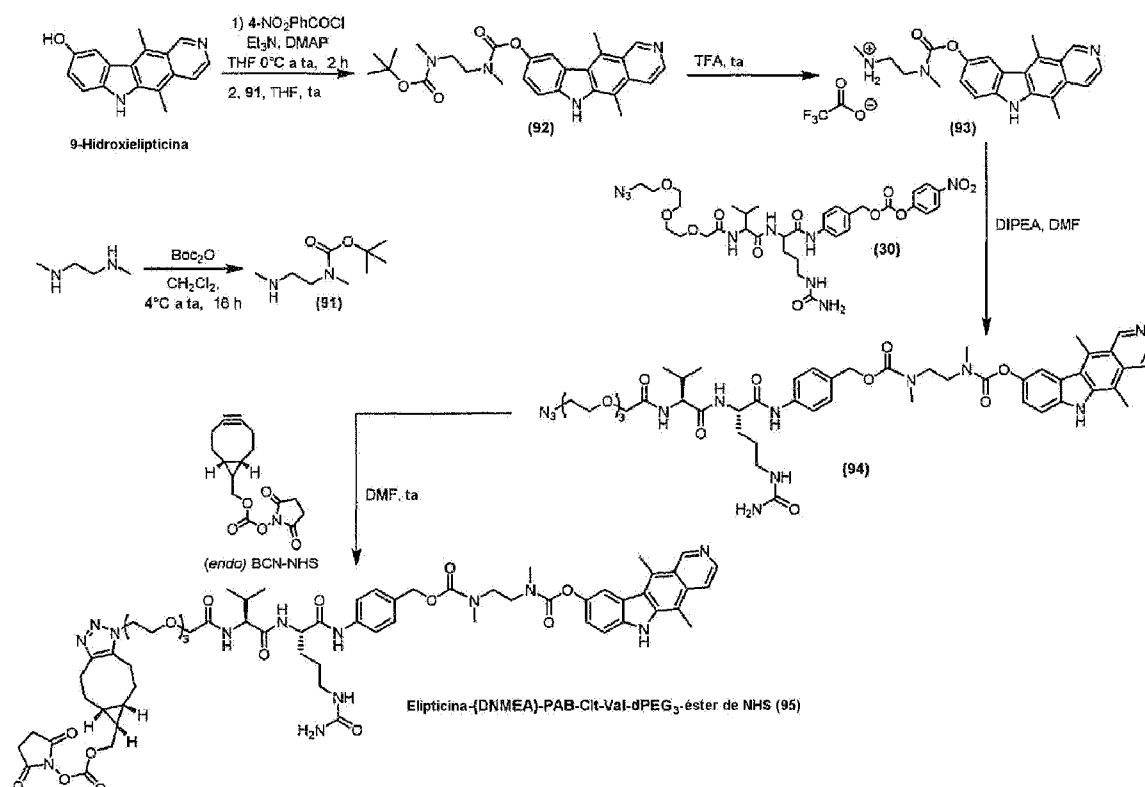
3H), 3,32-3,07 (m, 11H), 3,07-2,86 (m, 6H), 2,79 (d, $J = 11,6$ Hz, 7H), 2,71 (s, 4H), 2,25 (m, 4H), 2,04 (d, $J = 14,4$ Hz, 1H), 1,59 (s, 4H), 1,55-1,34 (m, 3H), 1,33-1,03 (m, 8H), 0,78 (d, $J = 2,1$ Hz, 3H).

Ejemplo 52: Preparación de maitansinol DM1-dPEG₁₂-éster de NHS (90)



5 A una solución agitada y desgasificada de DM1 (0,05 g, 0,1678 mmol) en THF (3 ml) se le añadió Et₃N (9,45 μ l), seguido de la adición de Mal-dPEG₉-NHS (58,7 mg, 0,1678 mmol) disuelto en THF (4 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de N₂ durante 3 h y los disolventes se eliminaron al vacío. El producto bruto se purificó en el sistema de purificación rápido Biotage utilizando una columna C18 para obtener el compuesto DM1-dPEG₁₂-NHS 90 en forma de un sólido blanco tras la liofilización (31 mg, 28 %). LC-MS ESI m/z 1625,9 [M+Na]⁺

10 Ejemplo 53: Preparación de elipticina-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG₃-éster de NHS (95)



A una solución agitada de *N,N'*-dimetiletenodiamina (3,66 ml, 34 mmol) en diclorometano (40 ml) a 0 °C se le añadió gota a gota una solución de dicarbonato de di-*tert*-butilo (2,4 g, 11 mmol) en diclorometano (20 ml) y se dejó que se calentase hasta la temperatura ambiente durante la noche, se concentró a presión reducida, se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó con agua (2 \times 100 ml), salmuera (100 ml), se secó y se concentró a presión reducida para obtener el producto 91 en forma de un aceite incoloro (1,54 g, 74 % de rendimiento). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,26 (t, $J = 6,15$ Hz, 2H), 2,81 (s, 3H), 2,66 (t, $J = 6,57$ Hz, 2H), 2,38 (s, 3H), 9,28 (s, 9H) ppm.

A una disolución agitada de 9-hidroxielipticina (80 mg, 0,27 mmol), DMAP (32 mg, 0,27 mmol) y trietilamina (261 μ l, 1,88 mmol) en THF (2 ml) a 0 °C se le añadió una disolución de 4-nitrofenilcloroformato (81 mg, 0,40 mmol) en THF (1,5 ml), se calentó hasta la temperatura ambiente durante 2 h, se añadió una solución de BOC-diamina 91 (151 mg, 0,80 mmol) en THF (0,5 ml), se agitó toda la noche a temperatura ambiente, se concentró a presión reducida y se cromatografió (MeOH al 0-20 % en CH₂Cl₂) para obtener BOC-amina-elíptica 92 en forma de un sólido amarillo (92

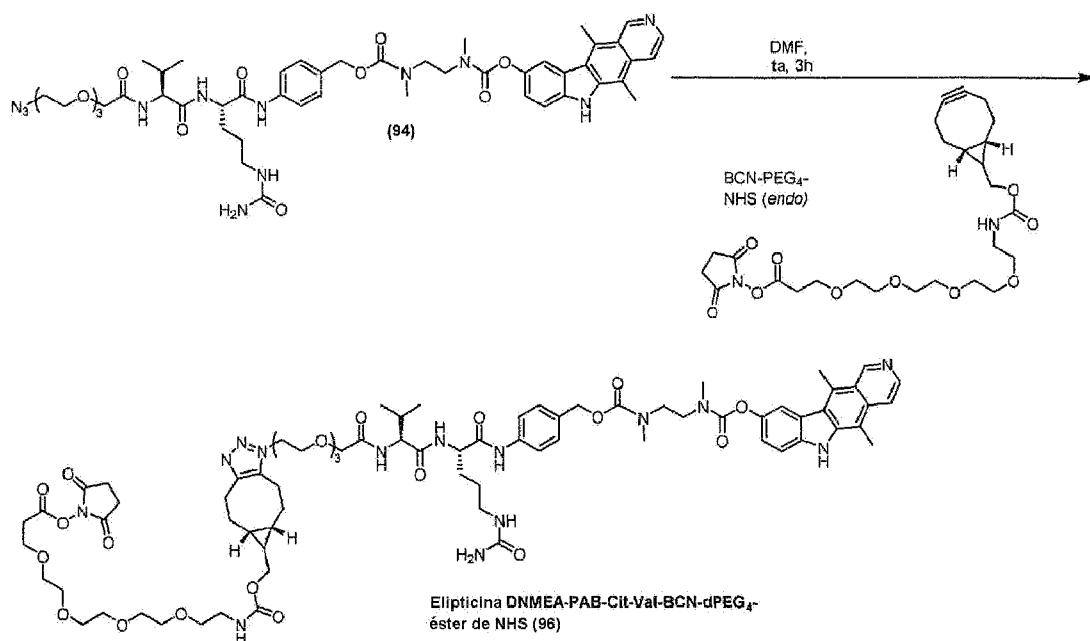
mg, 72 % de rendimiento). $R_f = 0,47$ (MeOH al 10 % en CH_2Cl_2); IR $\nu_{\text{máx}}$ 3377, 2976, 2088, 1701, 1674, 1601, 1462, 1397, 1191, 1144, 1030, 816, 790, 721 cm^{-1} ; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,78 (s, 1H), 9,88-9,75 (dd, $J = 5,4$ Hz, 1H), 8,48-8,35 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,64-7,54 (dd, $J = 8,7, 3,9$ Hz, 1H), 7,42-7,25 (m, 1H), 3,45 (s, 6H), 2,85-2,82 (m, 4H), 2,84 (s, 6H), 1,41 (s, 9H) ppm; RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 226,28, 224,53, 209,31, 162,06, 142,18, 133,59, 121,52, 117,90, 116,45, 111,46, 109,63, 79,16, 55,12, 46,90, 46,13, 46,13, 28,56, 14,98, 12,47, 9,03 ppm; MS (EI $^+$) m/z 477 [M + H] $^+$; HRMS (EI $^+$) m/z calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_4$ [M + H] $^+$ 477,2502, encontrado 477,2503.

Una solución de BOC-amina-elíptica 92 (93 mg, 0,19 mmol) en ácido trifluoroacético (2,5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se concentró a presión reducida para obtener el producto desprotegido deseado 93 en forma de un sólido amarillo (105 mg, 90 % de rendimiento). $R_f = 0,14$ (MeOH al 20 % en CH_2Cl_2); IR $\nu_{\text{máx}}$ 2995, 2821, 1670, 1473, 1397, 1174, 1127, 1021, 813, 795, 721 cm^{-1} ; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,03-8,72 (d, $J = 48,5$ Hz, 2H), 8,58-8,36 (m, 2H), 8,86-8,69 (m, 1H), 12,57-11,95 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 10,18-9,85 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 8,31-8,08 (dd, $J = 11,3, 2,2$ Hz, 1H), 7,87-7,58 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,54-7,37 (dt, $J = 8,8, 2,3$ Hz, 1H), 3,35-3,26 (d, $J = 5,1$ Hz, 3H), 3,17 (s, 6H), 3,15-3,06 (qd, $J = 7,3, 4,7$ Hz, 4H), 2,87 (s, 3H) ppm; RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 159,01, 158,68, 157,26, 155,79, 144,77, 134,42, 134,14, 128,46, 125,98, 122,68, 120,29, 120,07, 112,01, 110,91, 49,06, 35,16, 34,96, 33,16, 15,35, 12,48 ppm; MS (EI $^+$) m/z 377 [M] $^+$; HRMS (EI $^+$) m/z calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2$ [M] $^+$ 377,1978, encontrado 377,1974.

A una solución agitada del conector activado 30 (60,7 mg, 0,08 mmol) en DMF (3 ml) se le añadió a temperatura ambiente una solución de la elíptica amina 93 (48 mg, 0,10 mmol) y DIPEA (40 μl , 0,23 mmol) en DMF (1 ml), se agitó durante la noche, se concentró a presión reducida y se cromatografió (MeOH al 0-20 % en CH_2Cl_2) para obtener el producto del título 94 (19 mg, 26 % de rendimiento). $R_f = 0,30$ (MeOH al 10 % en CH_2Cl_2); IR $\nu_{\text{máx}}$ 3310, 2935, 2103, 1650, 1541, 1466, 1402, 1202, 1130, 1027, 823, 800, 756, 720 cm^{-1} ; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,79 (s, 1H), 10,01 (s, 1H), 9,82 (s, 1H), 8,44 (s, 2H), 8,39-8,30 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 8,23-8,16 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H), 8,15-8,11 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 7,63-7,54 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,05-1,96 (m, 1H), 7,48-7,42 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,32-7,27 (d, $J = 8,1$ Hz, 3H), 5,42 (s, 2H), 5,10-5,00 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 4,46-4,28 (q, $J = 8,0, 7,3$ Hz, 1H), 3,95 (s, 2H), 3,64-3,55 (m, 14H), 6,03 (s, 1H), 3,18-3,11 (ddd, $J = 10,8, 7,3, 3,7$ Hz, 4H), 3,05-2,88 (m, 2H), 2,85 (s, 2H), 2,10-1,91 (dt, $J = 13,5, 7,2$ Hz, 1H), 1,75-1,53 (m, 2H), 1,48-1,32 (m, 2H), 1,27 (s, 6H), 0,96-0,72 (ddd, $J = 22,7, 6,3, 3,2$ Hz, 6H) ppm; RMN de ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 171,21, 170,95, 169,44, 162,80, 159,37, 158,36, 158,12, 155,46, 147,76, 145,15, 143,25, 140,41, 139,01, 133,58, 129,03, 128,77, 124,65, 123,33, 122,68, 121,45, 119,41, 117,59, 111,50, 109,74, 70,87, 70,07, 69,90, 69,69, 57,03, 53,98, 50,51, 49,13, 47,01, 42,24, 35,24, 31,60, 29,65, 27,39, 19,64, 18,51, 17,18, 15,01, 12,88 ppm; MS m/z 1019 [M + Na] $^+$; HRMS m/z calc. para $\text{C}_{49}\text{H}_{64}\text{N}_{12}\text{O}_{11}\text{Na}$ [M + Na] $^+$ 1019,4715, encontrado 1019,4722.

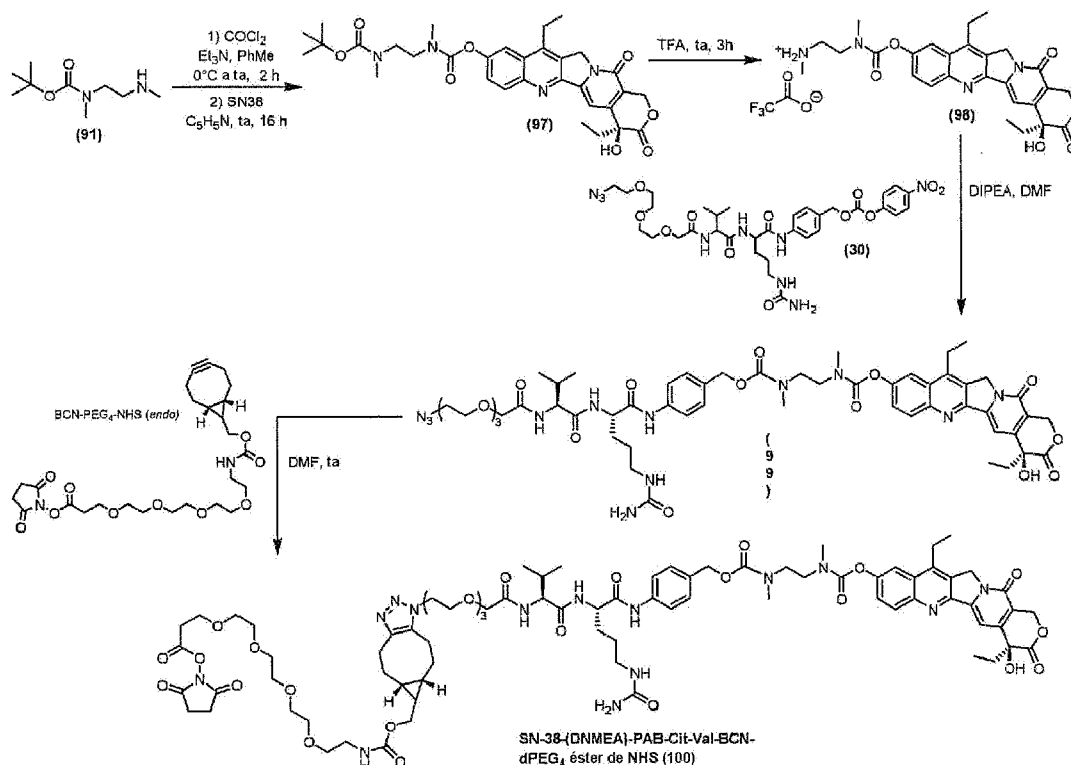
A una solución agitada de la azida 94 (2,5 mg, 0,003 mmol) en DMF (1 ml) se le añadió carbonato de (1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-*in*-9-*il*metil-*N*-succinimidilo (0,7 mg, 0,003 mmol), se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se concentró a presión reducida para obtener el producto del título en forma de un sólido amarillo (3 mg, 93 % de rendimiento). IR $\nu_{\text{máx}}$ 3323, 2924, 1811, 1786, 1740, 1664, 1604, 1537, 1402, 1199, 1126, 828, 799, 718 cm^{-1} ; RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,02 (s, 1H), 10,10-9,97 (m, 1H), 9,94-9,84 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 8,49-8,41 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H), 8,36-8,30 (dd, $J = 7,2, 3,4$ Hz, 1H), 7,64-7,51 (td, $J = 12,0, 9,0, 4,7$ Hz, 1H), 7,56-7,51 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,45-7,40 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,38-7,21 (m, 3H), 6,09-5,89 (q, $J = 5,5, 5,0$ Hz, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,11-4,97 (m, 2H), 4,53-4,45 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 4,39-4,32 (t, $J = 5,4$ Hz, 2H), 3,96-3,91 (d, $J = 3,8$ Hz, 2H), 3,71-3,66 (q, $J = 5,7, 4,2$ Hz, 2H), 3,65-3,55 (dt, $J = 20,5, 9,9, 4,7$ Hz, 10H), 3,51-3,43 (m, 4H), 3,18-3,08 (qd, $J = 7,3, 4,1$ Hz, 4H), 2,91-2,87 (s, 4H), 2,86-2,85 (s, 2H), 2,292,18 (m, 2H), 2,19-2,11 (m, 2H), 2,00-1,93 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H), 0,90-0,70 (ddd, $J = 29,9, 6,9, 4,3$ Hz, 6H), 2,32-1,89 (m, 6H), 2,10-2,02 (m, 2H) ppm; RMN de ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172,75, 170,73, 170,48, 169,94, 168,96, 162,29, 158,90, 154,87, 151,30, 144,85, 143,09, 139,99, 138,62, 133,72, 133,47, 128,53, 128,30, 122,61, 118,91, 117,16, 111,25, 109,72, 99,50, 98,90, 70,33, 70,29, 69,69, 69,65, 69,53, 69,31, 57,37, 56,55, 53,50, 53,20, 47,13, 46,54, 41,76, 40,15, 40,09, 40,00, 39,93, 39,84, 39,76, 39,67, 39,60, 39,50, 39,34, 39,17, 39,00, 38,51, 35,77, 34,82, 34,51, 31,05, 30,76, 29,17, 28,41, 26,85, 25,49, 25,34, 25,29, 25,21, 22,33, 22,04, 21,80, 21,22, 20,74, 20,69, 20,19, 19,89, 19,54, 19,15, 18,85, 18,04, 17,90, 16,92, 16,71, 16,67, 14,68, 12,41, 12,03 ppm; MS m/z 1288 [M + H] $^+$; HRMS m/z calc. para $\text{C}_{64}\text{H}_{82}\text{N}_{13}\text{O}_{16}$ [M + H] $^+$ 1288,5995, encontrado 1288,5625.

Ejemplo 54: Preparación de elíptica-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-BCN-dPEG₄-éster de NHS (96)



A una solución agitada de la azida 94 (2,5 mg, 0,003 mmol) en DMF (1 ml) se le añadió BCN-PEG₄-NHS (ConjuProbe) (0,7 mg, 0,003 mmol), se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se concentró a presión reducida para obtener el producto deseado 96 en forma de un sólido amarillo (3 mg, 93 % de rendimiento).

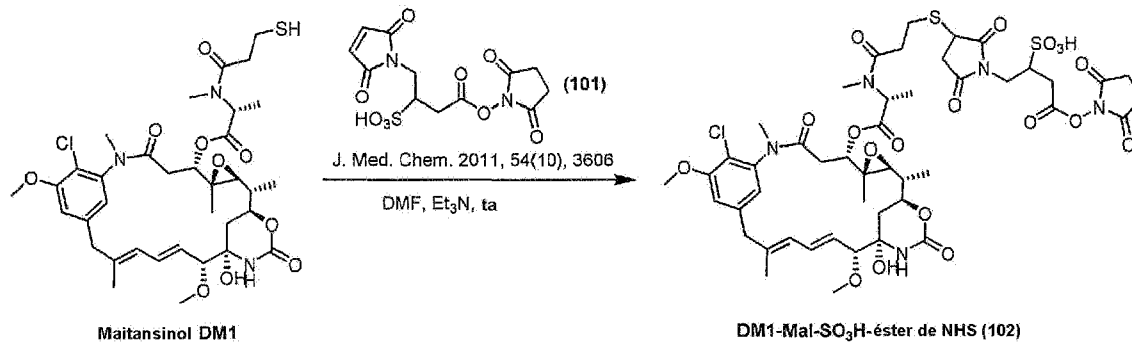
5 Ejemplo 55: Preparación de SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-BCN-dPEG₄-éster de NHS (100)



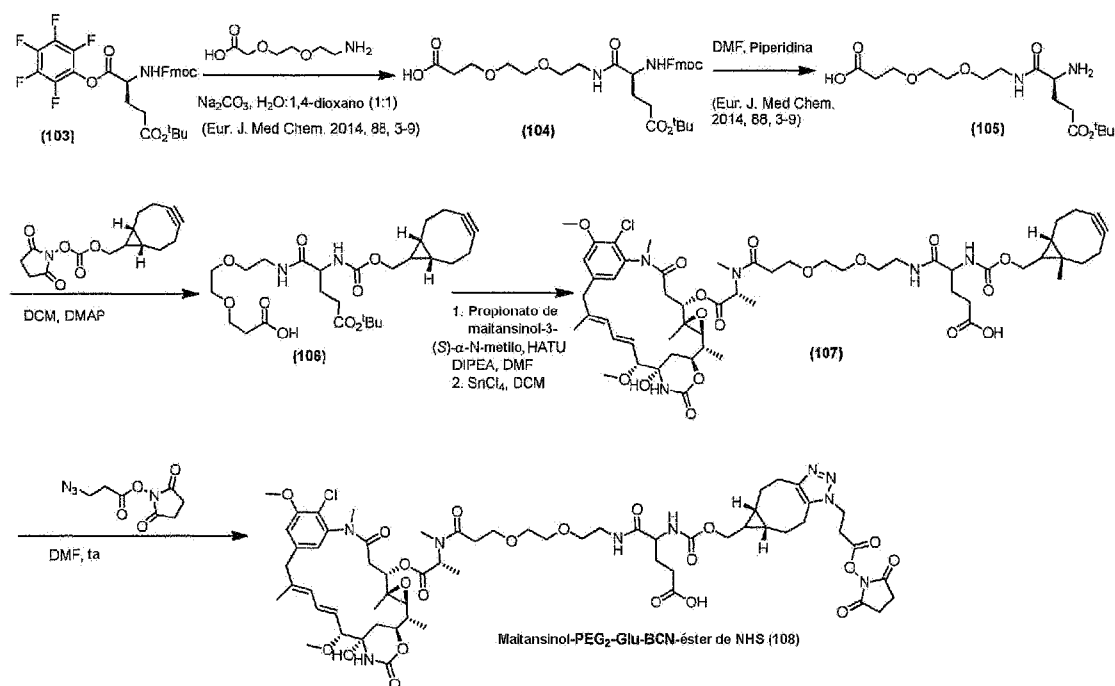
A una solución agitada de fosgeno en tolueno (15 % en peso, 0,36 ml, 0,55 mmol) a 0 °C se le añadió gota a gota una solución de BOC-diamina 91 (94 mg, 0,50 mmol) y Et₃N (77 µl, 0,55 mmol) en tolueno (1,32 ml). Se agitó a 0 °C durante 2 h, se calentó hasta la temperatura ambiente durante la noche, se filtró, se lavó con tolueno (5 ml), se concentró a presión reducida y se disolvió en piridina (2,23 ml, 27,6 mmol), a la que se añadió SN38 (150 mg, 0,39 mmol), se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó con agua (3 × 100 ml), se secó, se concentró a presión reducida y se cromatógrafió (MeOH al 0-10 % en CH₂Cl₂) para obtener el producto del título en forma de un sólido amarillo (72 mg, 31 %). R_f = 0,57 (MeOH al 10 % en CH₂Cl₂); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,15 (dd, J = 9,3, 5,7 Hz, 1H), 7,85-7,73 (m, 1H), 7,64-7,61 (m, 1H), 7,53-7,48 (m, 1H), 5,64

(d, $J = 16,3$ Hz, 1H), 5,22 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H), 5,18 (s, 2H), 3,65-2,85 (m, 6H), 2,82 (s, 6H), 1,85 (p, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,40 (s, 9H), 1,34 (t, $J = 7,8$ Hz, 3H), 0,94 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm; LCMS, $t_R = 2,10$ min, m/z 607,3 $[M + H]^+$.

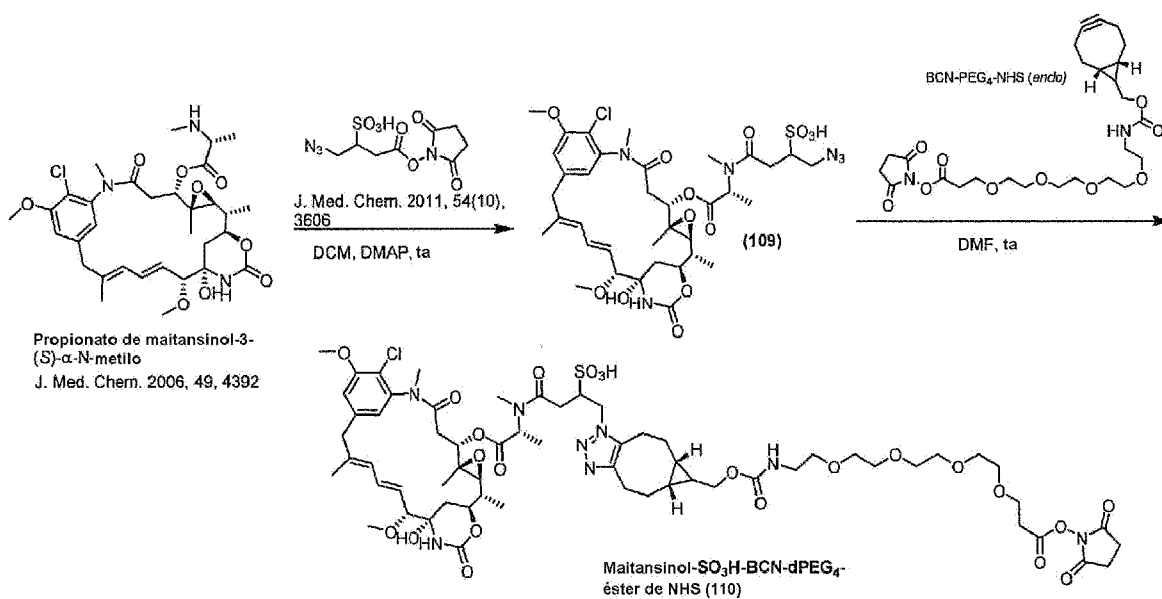
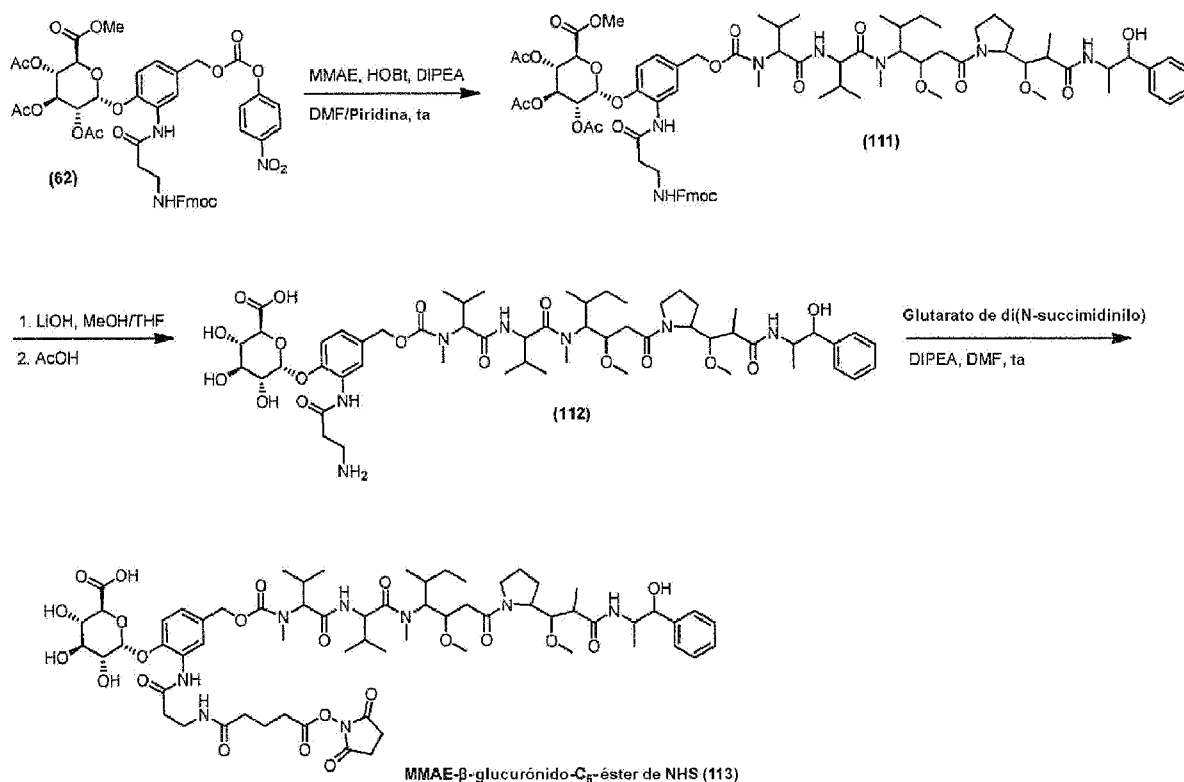
Ejemplo 56: Preparación de DM1-Mal-SO₃H-NHS (102)



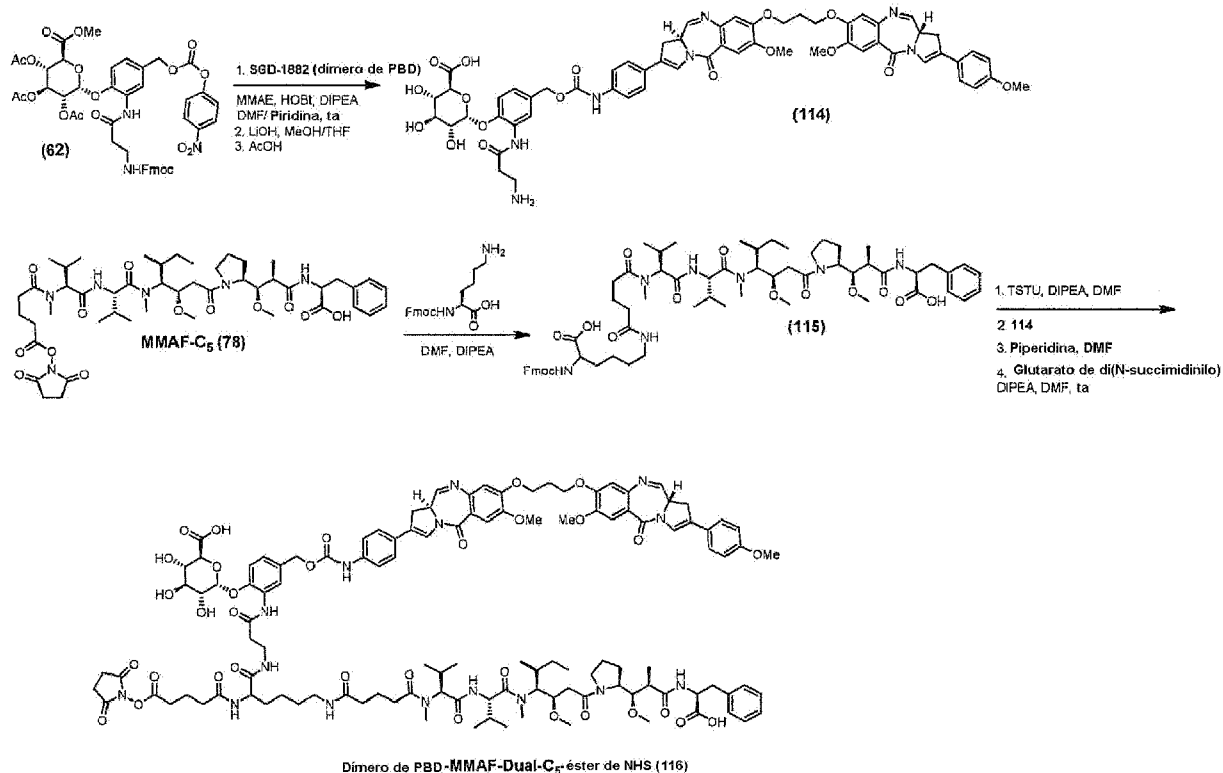
5 Ejemplo 57: Preparación de maitansinol-PEG₂-Glu-BCN-éster de NHS (108)



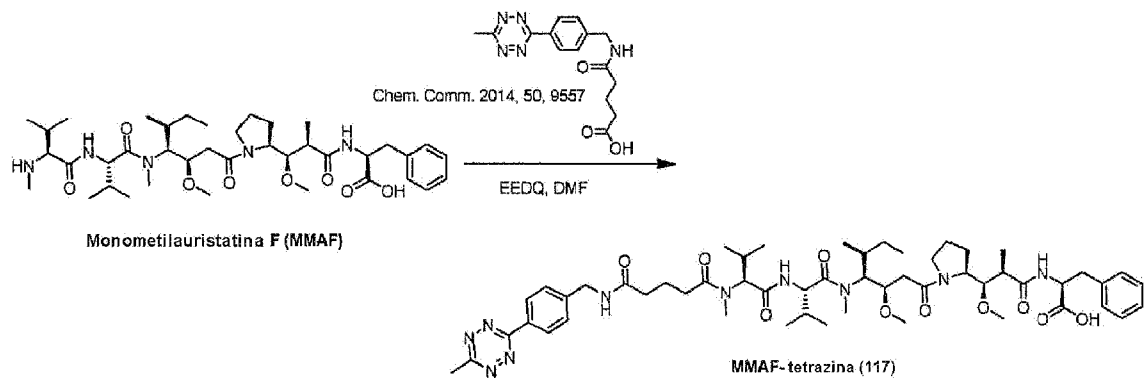
Ejemplo 58: Preparación de maitansinol-SO₃H-BCN-dPEG₄-éster de NHS (110)

Ejemplo 59: Preparación de MMAE-β-glucurónido-C₅-éster de NHS (113)

Ejemplo 60: Preparación de PBD-MMAF-dímero-Cs-éster de NHS (116)

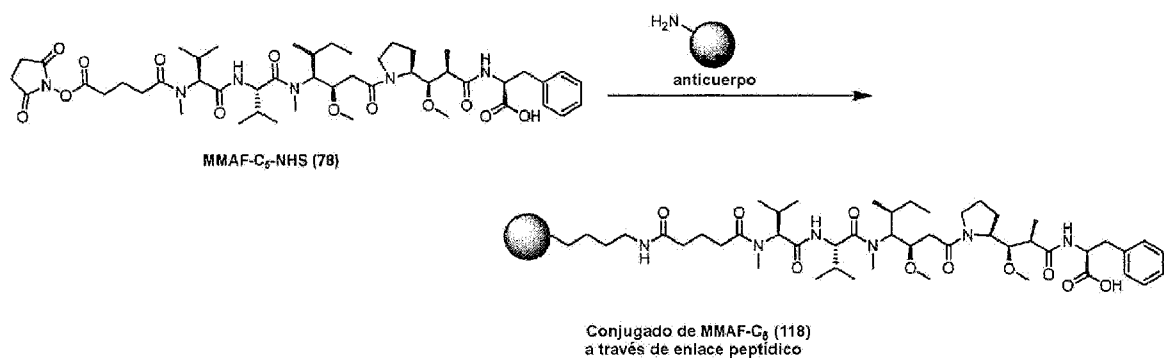


Ejemplo 61: Preparación de MMAF-tetrazina (117)

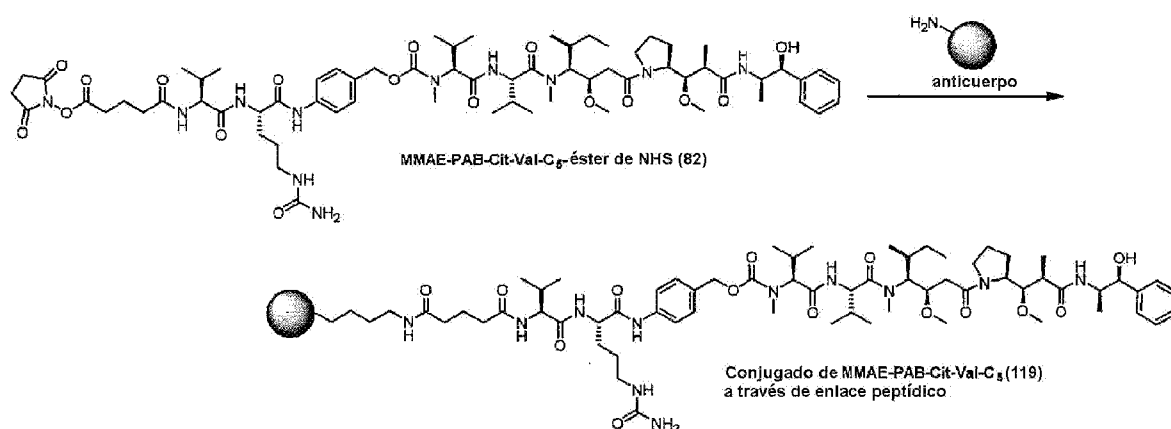


Ejemplo 62: Esquema para conjugados

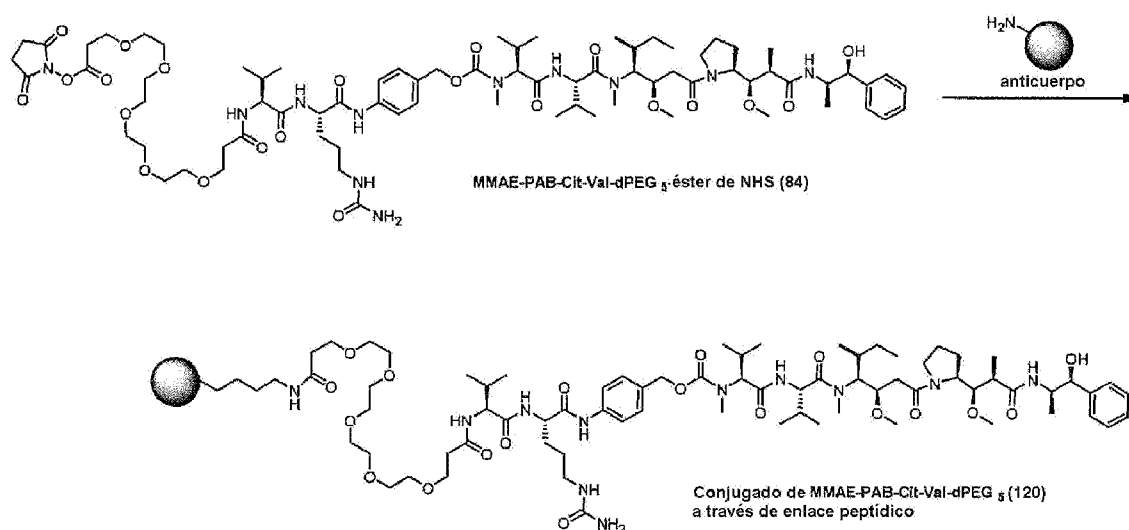
5 Conjugado de MMAF-C₅ (118)



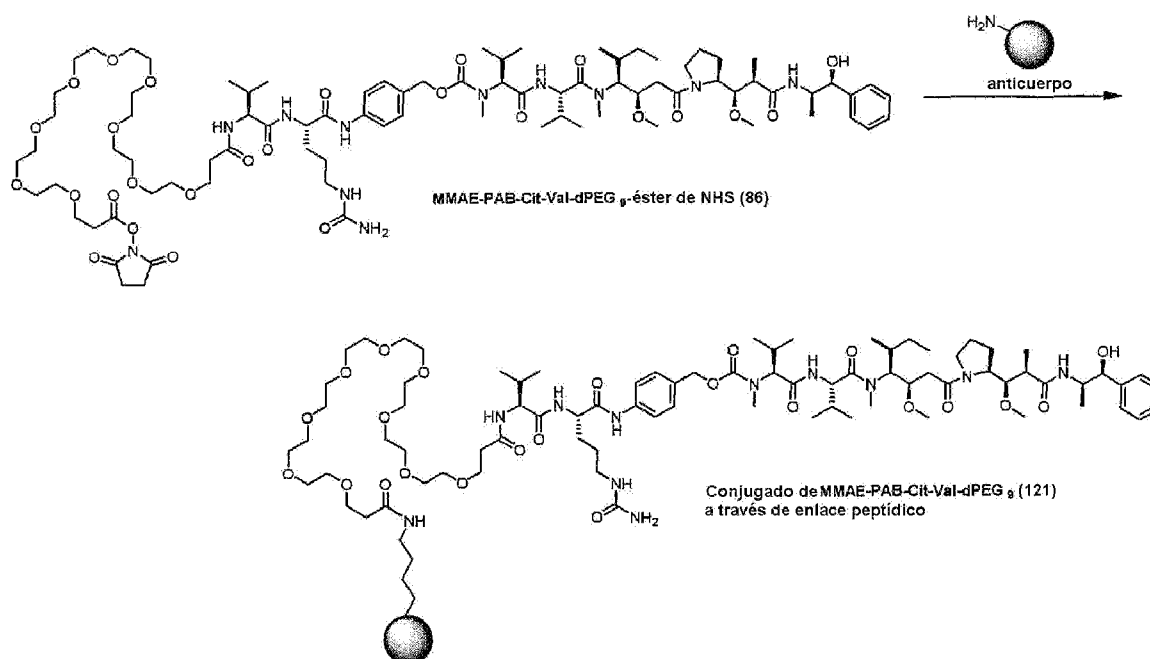
Conjugado de MMAE-PAB-Cit-Val-C₅ (119)



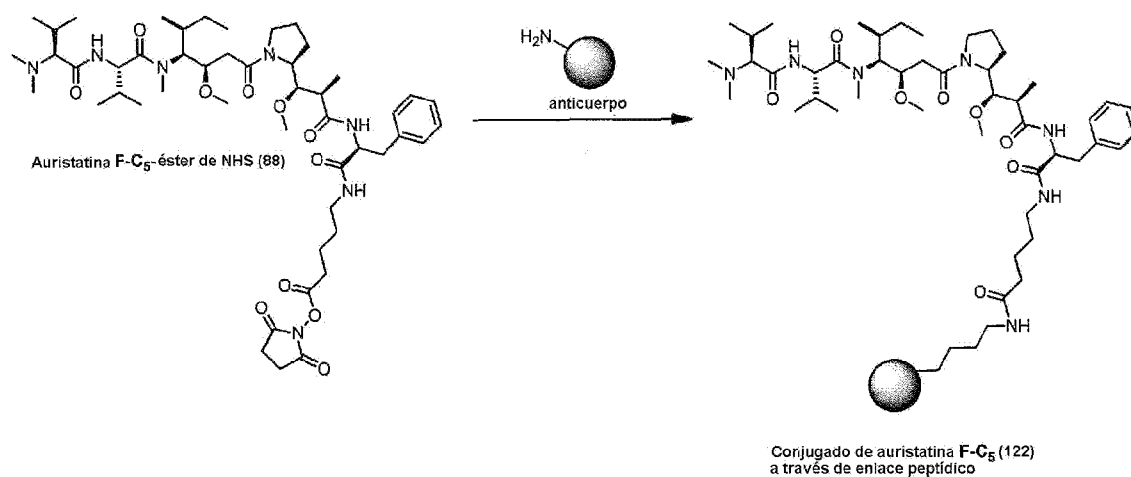
Conjugado de MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₅ (120)



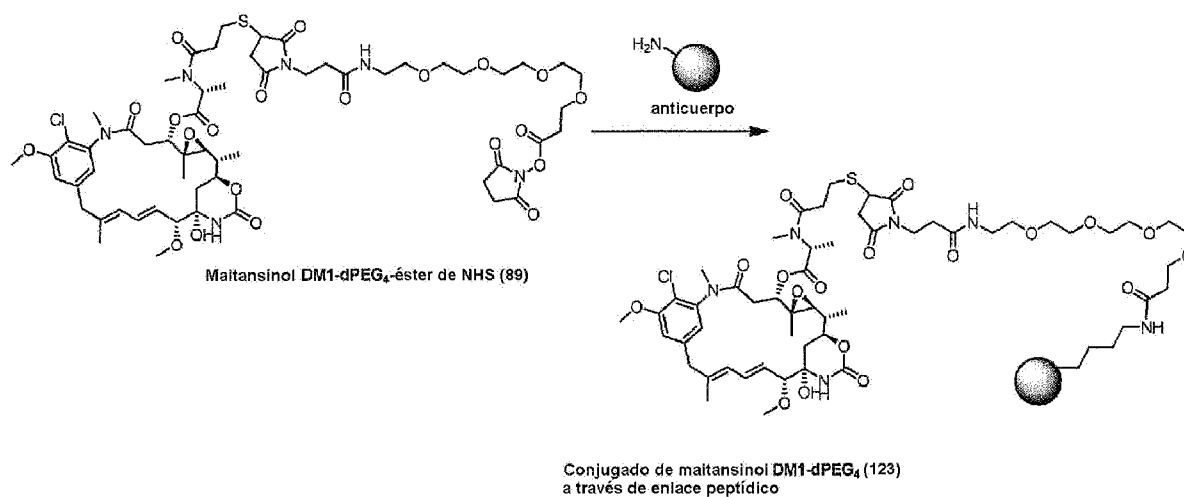
Conjugado de MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ (121)



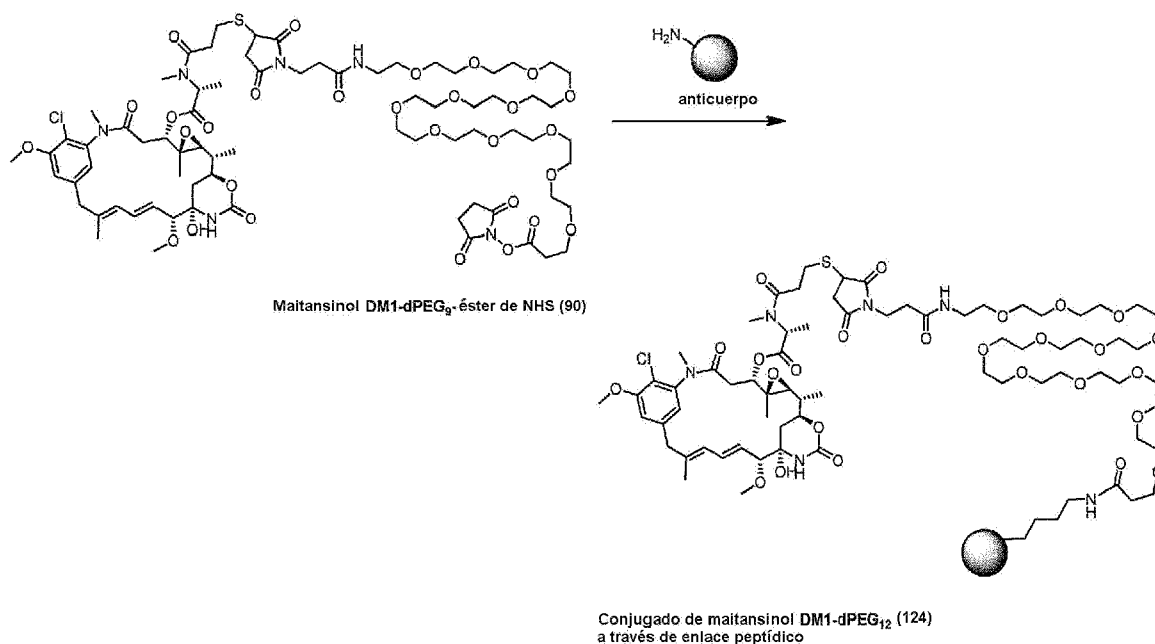
Conjugado de auristatina F-C₅ (122)



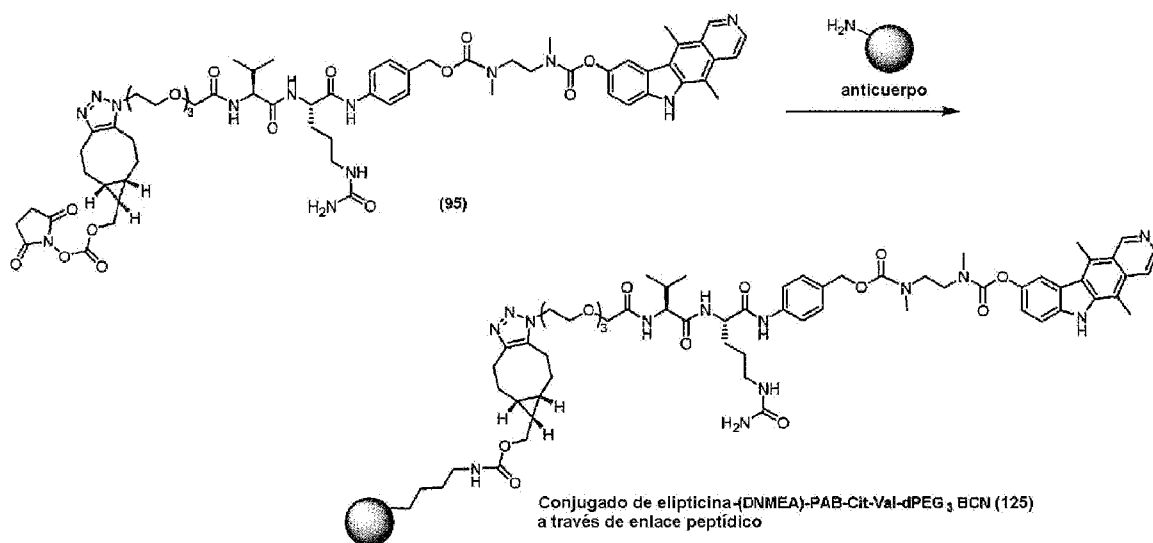
Conjugado de maitansinol DM1-dPEG₄ (123)



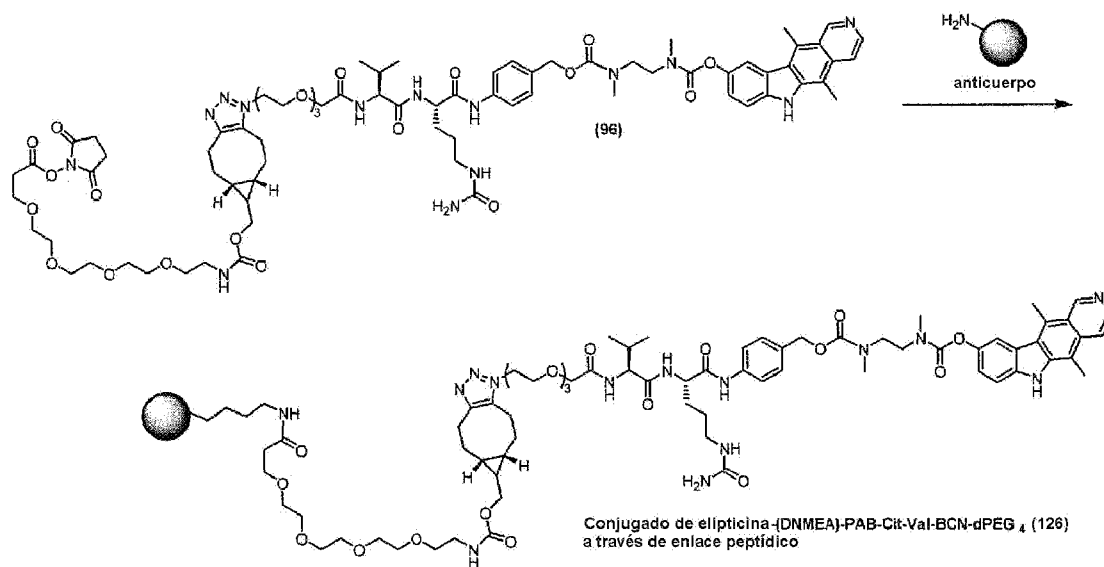
Conjugado de maitansinol DM1-dPEG₁₂ (124)



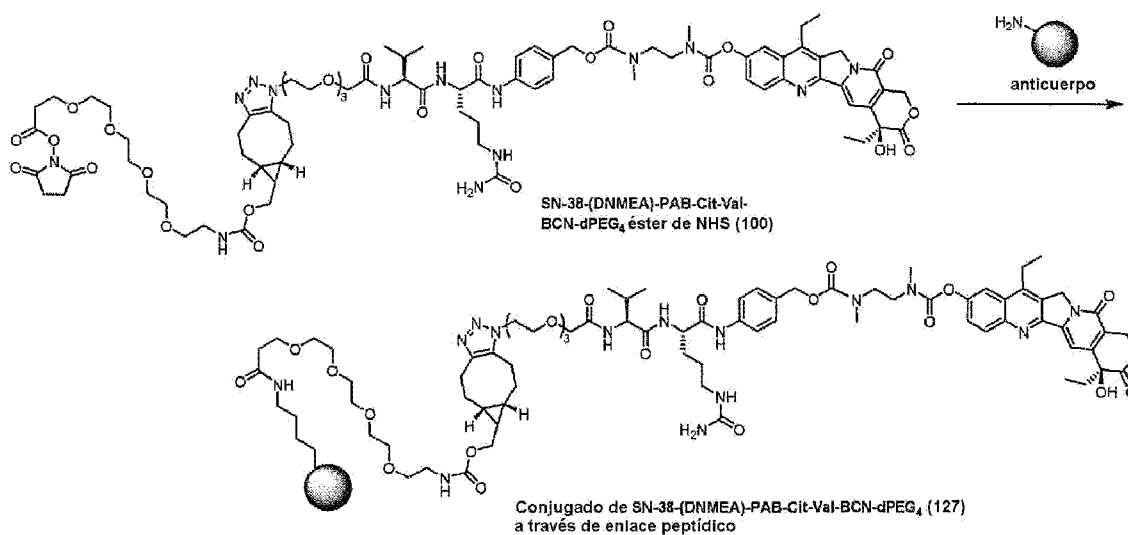
Conjugado de elipticina-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG₃ (125)



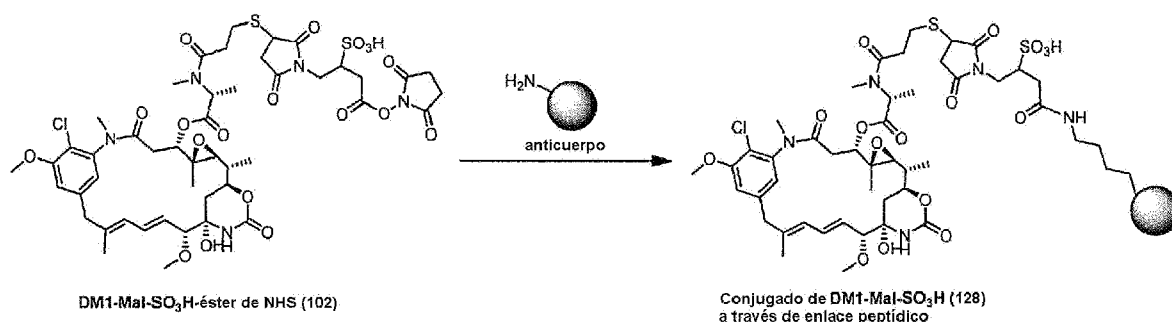
Conjugado de elipticina-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-BCN-dPEG₄ (126)



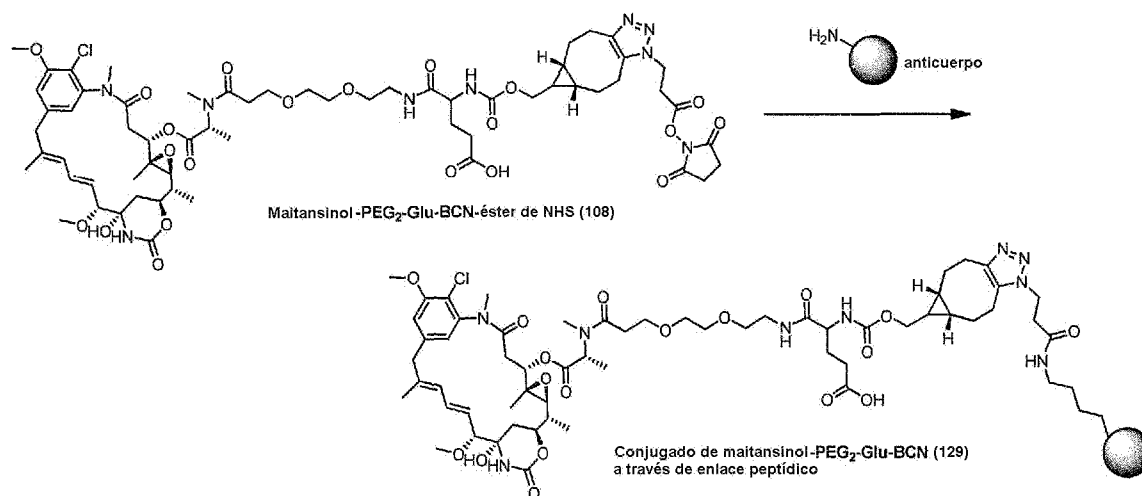
Conjugado de SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-BCN-dPEG₄ (127)



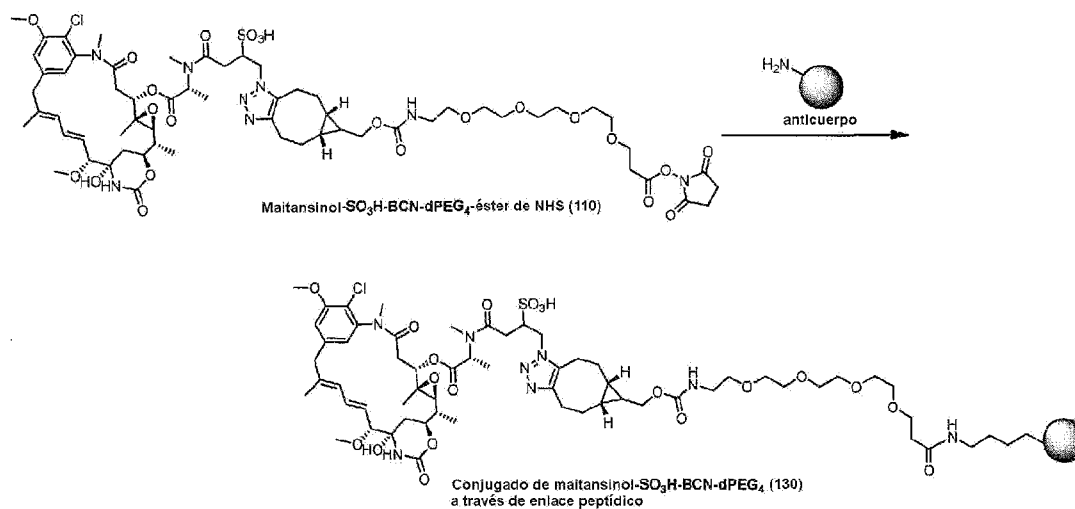
Conjugado de DM1-Mal-SO₃H (128)



Conjugado de maitansinol-PEG₂-Glu-BCN (129)

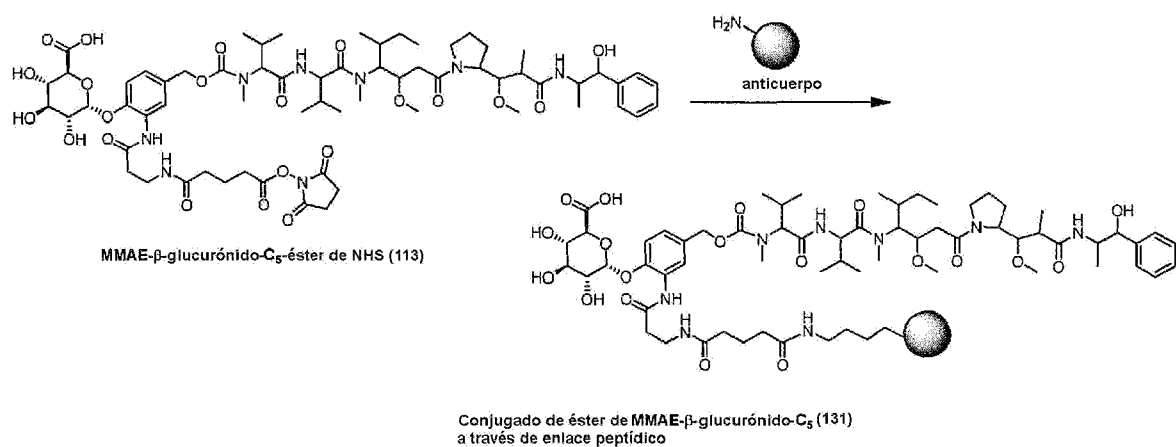


Conjugado de maitansinol-SO₃H-BCN-dPEG₄ (130)

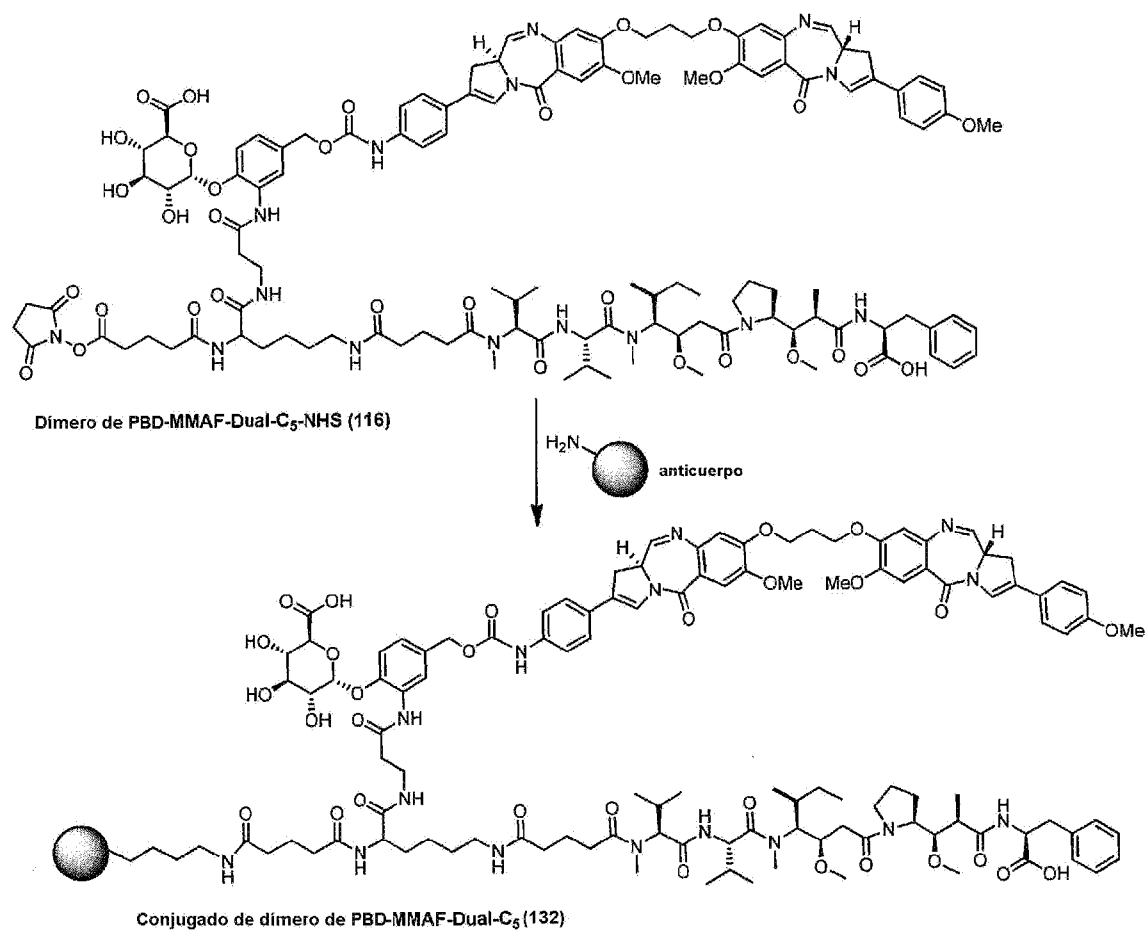


5

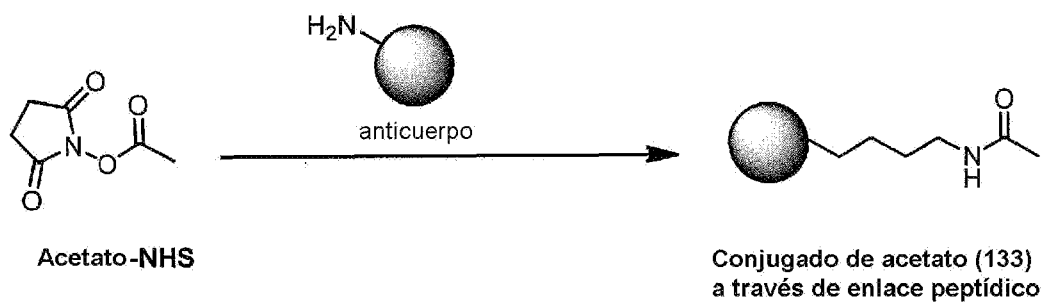
Conjugado de MMAE-β-glucurónido-C₅ (131)

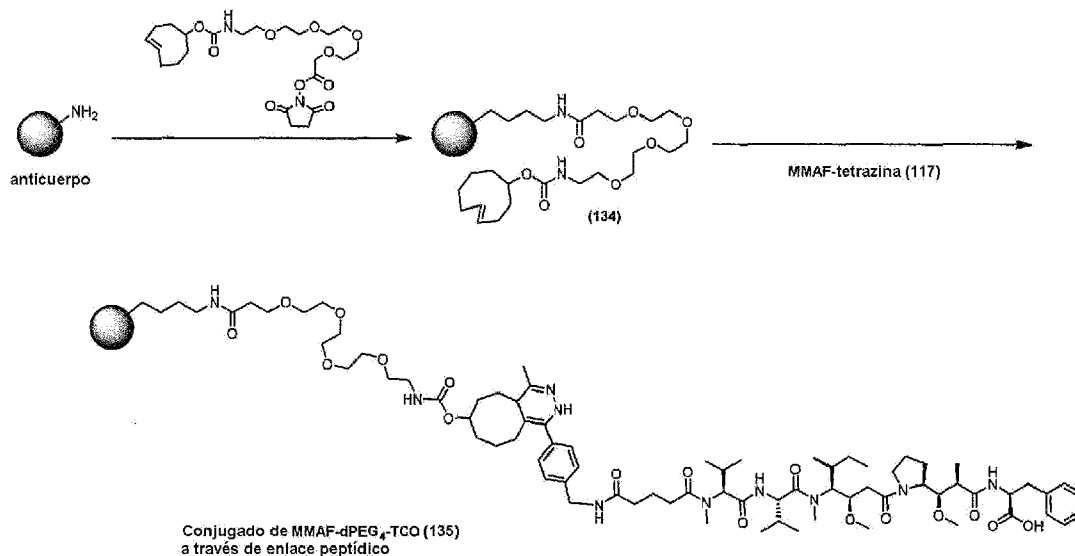
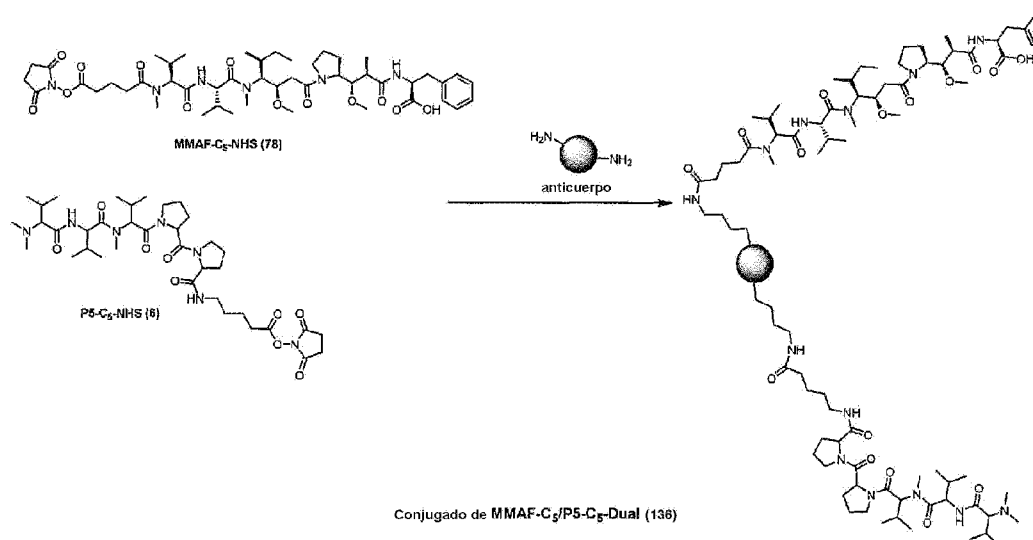


Conjugado de PBD-dímero-MMAF-dual- C_5 (132)



Conjugado de acetato (133)



Conjugado de MMAF-dPEG₄-TCO (135)Conjugado doble de MMAF-C₅/P5-C₅ (136)

- 5 Ejemplo 63: Expresión y purificación de un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario de alta afinidad con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

Construcción del clon de scFv de alta afinidad anti-HER2 de expresión citoplasmática, TCT1067

- 10 El scFv anti-HER2 del ejemplo 27 se modificó por mutagénesis para aumentar su afinidad de unión en más de 1000 veces [Schier R. *et al.* (1996), J. Mol. Biol., 263, 551-567]. Éste conservó la configuración de múltiples residuos de lisina en la superficie, bien espaciados y óptimamente situados, y se expresó y purificó como se describe en el ejemplo 27.

La proteína resultante se denominó scFv (TCT1067). A continuación se muestran las secuencias de ADN y de proteínas:

Secuencia de ADN del TCT1067 escindido

GCGGTAGCGGAGGTAGCGGACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGA
 GGTGAAAAAGCCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATA
 CAGCTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAG
 GCCTGGAGTACATGGGGCTCATCTATCCTGGTGA CTCTGACACCAAATACA
 GCGCGTCCTTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGTCGACAAGTCCGTCAGCA
 CTGCCTACTTGCAATGGAGCAGTCTGAAGCCCTCGGACAGCGCCGTGTATT
 TTTGTGCGAGACATGACGTGGGATATTGCACCGATCGTACCTGCGCAGCGT
 GGCCTGAATGGCTGGGCGTGTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAACCGTCTCC
 TCAGGTGGAGGCGGTTTCAAGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCA
 GTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGG
 TCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATC
 CTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTCA
 CACCAATCGGCCCCGAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG
 CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGTTCGGTCCGAGGATGAGGCTGA
 TTATTACTGTGCAAGCTGGGATTATACCTGAGTGGTTGGGTGTTGCGCGGA
 GGGACCAAGCTGACCGTCCTAATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATG
 GGTGATGAGGCTCTAACTCTCCTCT [SEQ ID NO:3]

CLAVE:

Negrita = Ser residual que queda tras la escisión TEV, Subrayado = Región conectora (GSGGSG)

Sin formato = secuencia de scFv, **Negrita cursiva** = secuencia del marcador T7

5 **Secuencia de aminoácidos del scFv escindido (TCT1067)**

S G S G G S G Q V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S
 Y W I A W V R Q M P G K G L E Y M G L I Y P G D S D T K Y S P S F Q G Q V T
 I S V D K S V S T A Y L Q W S S L K P S D S A V Y F C A R H D V G Y C T D R
 T C A A W P E W L G V W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G G S G G G G
 S Q S V L T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C S G S S S N I G N N Y V S W Y
 Q Q L P G T A P K L L I Y G H T N R P A G V P D R F S G S K S G T S A S L A I
 S G F R S E D E A D Y Y C A S W D Y T L S G W V F G G G T K L T V L **M A S**
M T G G Q Q M G [SEQ ID NO: 4]

Número de aminoácidos: 272, **Peso molecular:** 28,219 Da

PI teórico: 8,14, **Coeficiente de extinción:** 70 735

10 Ejemplo 64A: Bioconjugación de un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos con un resto que porta NHS

Procedimiento genérico para conjugar un scFv con una carga activa-NHS

15 Inicialmente, la velocidad de hidrólisis de la carga activa-NHS pura fue examinada en condiciones de tampón seleccionadas para optimizar su disponibilidad. Otros factores que se tuvieron en cuenta fueron la estabilidad del anticuerpo en el tampón/pH/disolvente orgánico, la estabilidad del fármaco y la cantidad y velocidad de adición del fármaco a la reacción. Las condiciones identificadas y utilizadas en todo el documento, salvo que se especifique lo contrario, son:

Tabla 15:

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO filtrado anhidro en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml
Manipulación de la carga activa de NHS	disuelto en DMSO filtrado anhidro al 100 % en una concentración de 50 mM o 100 mM
Tasa de adición de carga activa	cada 70-120 min
Equivalentes de adición de carga activa	de 10 a 16 equivalentes

El scFv fue descongelado a 4 °C y cualquier precipitado formado fue recogido por centrifugación (10 min, 10 krpm, 4 °C).

- 5 Se preparó la solución madre de la carga activa-NHS en DMSO anhidro filtrado y cualquier precipitado se recogió por centrifugación. Se mezcló tampón bicarbonato, pH 8,8, con DMSO anhidro filtrado en microtubos Eppendorf de unión baja a proteínas y se equilibró la mezcla en un Thermomixer (elevándose la temperatura de 4 °C a 20 °C mientras se mezclaba a 1000 rpm). Se añadió el anticuerpo y se equilibró (20 °C, 1000 rpm) durante 10 min antes de añadir la carga activa-NHS. Esto se llevó a cabo añadiendo el número x de equivalentes (en función de la carga activa) de la disolución madre en DMSO del fármaco-NHS e invirtiendo para mezclar cada 70-120 min, antes de volver a introducir en el Thermomixer y mezclar a 20 °C, 1000 rpm. El número total de equivalentes utilizados dependía de la DAR requerida. Las muestras se dejaron en el Thermomixer durante 2-18 horas más después de la última adición. A continuación, las muestras se recogieron por centrifugación (2,5 min, 11 krpm, 4 °C).

- 15 Se neutralizó el pH de todas las muestras (añadiendo NaH_2PO_4 0,1 M) y se purificaron por HPLC-SEC en una columna Tosoh TSKGel G2000 SW_{XL} eluyendo con IPA al 10 %/PBS a pH 7, 20 °C. La muestra y las fracciones se mantuvieron frías (4 °C), se reunieron las fracciones pertinentes y se concentraron en columnas Vivaspin (membrana HY o PES) (10 000 MWCO). El IPA se eliminó concentrándolo con centrifugación varias veces (al menos en 500 veces) con PBS, se filtró a través de una membrana Supor de 0,2 µm y se cuantificó mediante espectroscopia UV/vis y análisis de aminoácidos.

El producto final se analizó mediante:

- 20 1. SDS-PAGE reductor

Para el análisis de las muestras se utilizaron rutinariamente geles SDS-PAGE reductores prefabricados (al 12 %) que se tiñeron con azul de Coomassie.

2. Análisis de aminoácidos

- 25 La DAR y la concentración de la muestra se determinaron con precisión mediante análisis de aminoácidos (AAA) en la Instalación de Química de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Cambridge. A partir del AAA, se puede obtener la cantidad en moles tanto de la proteína como del fármaco (debido a la liberación de una huella del fármaco, véase la tabla 16A para cada fármaco) y calcular el DAR (n.º de moles de fármaco/n.º de moles de proteína). La concentración de la proteína en la solución puede calcularse calculando en primer lugar el peso molecular del conjugado basándose en la DAR, y convirtiendo posteriormente la concentración obtenida de AAA en mg/ml de proteína. Por ejemplo: scFv (TCT) es 28162 (MS), DAR es 'X', y cada molécula de fármaco añade 'XX' al anticuerpo. Por lo tanto, el Pm del conjugado = 28162 + (X × X) = X. La concentración es X nmol/ml, que equivale a X µg/ml de proteína.

Tabla 16A: Cuantificación mediante análisis de aminoácidos

Carga activa	Aminoácido liberado y utilizado para la cuantificación
P5C5	ácido 5-aminovalérico
Cemadotina	ácido 4-aminometilbenzoico
MMAF	no atípicos, utilizado calc. de exceso de fenilalanina
AF	ácido 5-aminovalérico
MMAE	ornitina (de la citrulina)
DM1	no hay fragmentos identificables

3. HPLC-SEC

Las muestras se analizaron y/o purificaron en un Tosoh TSKGel G2000SW_{XL} o en un Sepax Zenix-C SEC-150, 3 µm, 7,8 × 300 mm, seguimiento a 214 y 280nm, caudal de 0,5 ml/min durante 30 min, 20 °C, muestras a 4 °C.

5 Normalmente, se inyectaron 20 µg de proteína para las series analíticas y 300 µg para las series semipreparativas.

4. Espectrometría de masas

Preparación de la muestra: el anticuerpo libre y los conjugados (carga activa MMAF, P5C5, AuF y MMAE) fueron desalados en un COSTAR(R) SPIN-X(R) (Sigma Aldrich) centrifugando durante 2 min a 10,5 g.

10 Normalmente, para el anticuerpo libre y los conjugados de P5, AF y MMAE se usaron 20-30 µg de proteína. Para el MMAF se utilizaron 80 µg de proteína.

Los conjugados de DM1 fueron desalados usando una columna Zeba de 0,5 ml (Thermofisher), inyectando 30 µg de proteína.

15 Los experimentos de cromatografía líquida se realizaron en un sistema Agilent 1100 conectado a un detector de un único cuadrupolo ("Single Quad Detector", SQD) MSQ Plus. Se utilizó una columna XBridge, BEH300 C4 3,5 µm 2,1 × 100 mm a 0,5 ml/min, gradiente de 10 min de A al 95 % hasta B el 50 % y luego se mantuvo durante 5 min a B al 50 %, siendo:

A: H₂O/FA al 0,1 %

B: CH₃CN al 90 %/H₂O (FA al 0,1 %)

Longitud de onda: 254 nm.

20 Los parámetros de los instrumentos fueron optimizados para permitir la estabilización y transmisión de especies de alto peso molecular. Amplitud de barrido: m/z = 500-2000. Tiempo de escaneado: 1,5 s. Los datos se obtuvieron en modo continuo. La fuente de electronebulización de la MS actuó con una tensión capilar de 4,2 kV y una tensión de cono de 50 V. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y de desolvatación a un caudal total de 600 l/h. Las series de iones se generaron mediante la integración del cromatograma de iones totales ("total ion chromatogram", TIC) en el 25 intervalo de 3,5-5,0 min. Los espectros de masas totales de las muestras de proteínas se reconstruyeron a partir de las series de iones utilizando el software preinstalado ProMass.

5. Análisis de unión mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) Biacore

30 La afinidad de unión con el antígeno diana HER2 inmovilizado se determinó mediante Biacore SPR en comparación con el scFv no modificado en un Biacore T200. Para preparar todas las superficies Biacore (CM5 o CM3) se utilizó un procedimiento convencional de acoplamiento de aminas, como se indica a continuación. Las células de flujo se activaron individualmente inyectando una solución recién mezclada de EDC 0,2 M en NHS 0,05 M a 30 µl/min. Se inyectaron 12,5 µg/ml de Her2 hasta alcanzar el nivel de inmovilización deseado (normalmente -1500 RU). El exceso de éster de NHS se desactivó utilizando una solución de etanolamina 1 M. Para medir la cinética del anticuerpo y del 35 conjugado sobre el chip HER2, se inyectó una dilución en serie triple (normalmente a 5, 2,5, 1,25, 0,6 µg/ml o inferior para el anticuerpo libre y 20, 10, 5, 2,5 µg/ml para los conjugados) durante 160 s a 30 µl/min, permitiendo una fase de disociación de 900 s. El tiempo de disociación se amplió a 3600 s para la concentración más alta. Las superficies se regeneraron con una inyección de 45 s de MgCl₂ 8 M.

Para evaluar la capacidad de unión, se realizaron series manuales a 30 µl/min con una inyección de 60 s del compuesto deseado, seguido de 60 s de tiempo de espera y 45 s de regeneración a 10 µl/min usando MgCl₂ 8 M. Todos los datos se analizaron con el programa informático BIAEvaluation.

Procedimiento de ampliación de conjugaciones para la preparación de muestras in vivo

- 5 Se combinó tampón de bioconjugación recién filtrado con DMSO anhidro recién filtrado en un tubo Falcon de 50 ml y se equilibró en un Thermomixer (12 min a 4 °C a 800 rpm, 6 min, 20 °C, 500 rpm). El scFv se descongeló a 4 °C y cualquier precipitado formado se recogió por centrifugación (10 min, 10 krpm, 4 °C). Se disolvió una solución madre de la carga activa-NHS en DMSO anhidro filtrado y se recogió por centrifugación cualquier precipitado formado. El anticuerpo se añadió a la mezcla tampón y se dejó equilibrar en el termomezclador durante 10 min a 20 °C, 350 rpm
- 10 antes de añadir la carga activa-NHS. Para ello, se añadieron los equivalentes necesarios de la solución madre en DMSO de carga activa-NHS antes de volver a introducir en el Thermomixer y mezclar a 20 °C, 350 rpm. Las muestras se dejaron en el Thermomixer durante 2 h/18 h más después de la última adición. A continuación, las muestras se recogieron por centrifugación (20 min, 4 krpm, 4 °C) y se purificaron por SEC en un sistema AKTA Avant utilizando una columna Superdex 75, 26/600 eluyendo con IPA al 10 %/PBS a menos que se indique lo contrario. Se utilizó un caudal máximo para la columna de 2,6 ml/min, con longitudes de onda de detección de 214 y 280 nm. La muestra bruta y las fracciones se mantuvieron en frío durante todo el proceso de purificación. Las fracciones se reunieron y concentraron utilizando Vivacell 100 10 k MWCO (membrana PES) (Sartorius) antes de someter a intercambio tampón en PBS utilizando el mismo proceso. Las muestras concentradas y con intercambio de tampón se cuantificaron mediante espectroscopia UV/vis, se filtraron a través de una membrana Supor estéril de 0,2 µm, se volvieron a cuantificar, se
- 15 diluyeron convenientemente y se analizaron como antes mediante SDS-PAGE, HPLC-SEC, análisis de aminoácidos, espectrometría de masas y análisis de unión mediante Biacore SPR.
- 20

Se sintetizaron conjugados de trastuzumab-carga activa como muestras de control. Estas reacciones se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente para el scFv, observando los cambios en la concentración de proteína y la adición de la carga activa-NHS:

25 Tabla 16B: Condiciones de reacción para bioconjugaciones de trastuzumab

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO filtrado anhidro en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	5 mg/ml
Manipulación de la carga activa-NHS	Solución 100 mM o 50 mM (según el scFv) en DMSO filtrado anhidro al 100 %
Tasa de adición de la carga activa-NHS	N/A
Porciones de adición de carga activa-NHS	todo añadido en una porción

Se prepararon los siguientes conjugados de trastuzumab usando las siguientes condiciones de reacción:

trastuzumab-P5-C5; 6 equivalentes, trastuzumab-MMAF-C5; 7 equivalentes,

trastuzumab-AF-C5; 5,5 equivalentes, trastuzumab-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉; 6 equivalentes.

- 30 Los conjugados fueron procesados según el scFv usando las columnas HPLC-SEC apropiadas, Tosoh TSKGel G3000SW_{XL} y en el AKTA Avant a Superdex 200, 26/600.

Ejemplo 64B: La bioconjugación de fragmentos de anticuerpos Fv monocatenarios con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos con pequeñas moléculas portadoras de NHS demuestra la plena capacidad de conjugación de OptiLinked

Se conjugó una molécula pequeña, acetato-NHS (CH₃-CO-NHS) con scFv (TCT y TCT1067) para obtener conjugados (compuesto 133) con una DAR alta (siendo "fármaco" = carga activa de acetato, molécula pequeña). Las condiciones identificadas y utilizadas para las conjugaciones fueron:

Tabla 17: Condiciones de reacción para bioconjugaciones de acetato-NHS

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO anhidro filtrado en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml
Manipulación del acetato-NHS	Solución 100 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de acetato-NHS	Cada 90 min
Porciones de adición de acetato-NHS	16 equivalentes

5

Las reacciones se llevaron a cabo según el ejemplo 64A.

En este ejemplo, la configuración fue:

Reacción 1. scFv (TCT): Ac-NHS: 110 equivalentes;

Reacción 2: scFv (TCT1067): Ac-NHS, 110 equivalentes

- 10 Los scFv no conjugados y conjugados (TCT y TCT1067) fueron analizados por cromatografía de exclusión por tamaño HPLC. El scFv (TCT1067) tiene un tiempo de retención de 7,53 min que se corresponde a un P_m de aproximadamente 30kDa. Su conjugado eluyó antes, a los 7,23 min, indicando un mayor peso molecular, pero en forma de un pico único, nítido y monomérico, indicando que no había agregación (figura 44). El ScFv (TCT) tuvo un tiempo de retención de 7,36 min que se corresponde con un P_m de aproximadamente 30kDa. Su conjugado eluyó antes, a los 7,15 min, lo
- 15 que indica un peso molecular mayor (debido a la variación de las cargas de moléculas pequeñas), pero en forma de un pico único, nítido y monomérico, lo que indica que no hay agregación (figura 44).

Procedimiento de LC-MS y adquisición de datos (desnaturalización, condiciones no covalentes)

- 20 Los cromatogramas y espectros de LCMS, corriente iónica total ("Total Ion Current", TIC) y los datos desconvolucionados de scFv (TCT y TCT1067)-acetato se muestran en las figuras 45 y 46 y se ofrece un resumen en la tabla 18.

- 25 Se observó un solo pico principal en el TIC de las muestras de scFv (TCT y TCT1067)-acetato. El TCT-acetato eluyó a los 10,1 minutos y el TCT1067-acetato eluyó a los 10,3 minutos. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo unos picos principales a m/z 28792 para el TCT-acetato y 28891 para el TCT1067-acetato, que coincidían con la masa teórica suministrada de la molécula de scFv (TCT y TCT1067), junto con 15 y 16 adiciones de la molécula pequeña, respectivamente.

Tabla 18: Resumen de los análisis de LC-MS de los conjugados de scFv-acetato (133)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa del pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada
scFv(TCT)	8,27	28160	0	0

Tabla 18: Resumen de los análisis de LC-MS de los conjugados de scFv-acetato (133)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa del pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada
Conjugado 1 de TCT-acetato	12,1	28792	632	15
scFv(TCT1067)	8,35	28215	0	0
Conjugado 2 de TCT1067-acetato	10,72	28891	672	16

Actividad de unión de los conjugados de scFv (TCT y TCT1067)-acetato

Se prepararon los conjugados de scFv (TCT y TCT1067)-acetato y se caracterizaron como se describió anteriormente. Su afinidad de unión al antígeno diana HER2 inmovilizado se determinó mediante Biacore SPR en comparación con el scFv no modificado.

El scFv (TCT)-acetato DAR 15 presentó una tasa de asociación de $5,93 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $1,71 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 2,9 nM. Esto era muy similar al scFv no modificado (TCT), que tenía una tasa de asociación de $2,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $4,17 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 1,49 nM, lo que indica que no hay pérdida de función de unión.

El scFv (TCT1067)-acetato DAR 16 presentó una tasa de asociación de $3,63 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $7,64 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 21 pM. Esto fue muy similar a la scFv no modificada (TCT1067), que presentó una tasa de asociación de $3,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $3,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 9,5 pM, lo que indica que no hubo pérdida de unión.

Conclusiones generales sobre moléculas pequeñas (acetato), datos biofísicos

Las condiciones de conjugación se optimizaron como se ha detallado anteriormente. Esta optimización permitió controlar las reacciones de conjugación con un rendimiento muy elevado de conjugados con DAR baja, intermedia y alta. No se observó precipitación del anticuerpo/conjugado en ninguno de los conjugados y la recuperación fue en general muy alta. Tras la purificación por HPLC SEC, los conjugados resultantes se concentraron hasta aproximadamente 1 mg/ml.

Las técnicas ortogonales usadas para el análisis están de acuerdo y respaldan que una estructura scFv optimizada, ilustrada por scFv (TCT o TCT1067), puede ser cargada completamente con múltiples moléculas usando residuos de lisina en el anticuerpo y la conjugación puede ser controlada para obtener conjugados monoméricos (como se muestra por SEC-HPLC) con la DAR deseada, al mismo tiempo que se conserva la función de unión y afinidad. Los datos de LCMS respaldados por los trazados de HPLC SEC indican que ambos anticuerpos pueden conjugarse eficazmente con la ocupación total de la lisina para obtener conjugados monoméricos. Los conjugados mostraron tiempos de retención SEC más cortos que los respectivos controles de anticuerpos en ambos casos. La LCMS indica que los conjugados en ambos casos tienen una DAR superior al número total de lisinas de cada anticuerpo. Cuando se llevan a cabo reacciones a un pH muy alcalino con un gran exceso de una molécula pequeña activada por NHS es posible que los aminoácidos secundarios empiecen a conjugarse. En este caso, los inventores especulan que se modifican predominantemente 12 lisinas y 1 amina terminal.

Ejemplo 65: Bioconjugación de derivados de MMAF con un conector corto sobre dos fragmentos de anticuerpo Fv monocatenarios con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

Ejemplo 65A: ScFv (TCT)-MMAF con un conector C_5

El MMAF- C_5 -NHS (compuesto 78) se conjugó con scFv (TCT) para obtener conjugados (compuesto 118) con diversas DAR. La reacción se controló para obtener productos con DAR intermedias y altas. Las condiciones identificadas y utilizadas para las conjugaciones fueron:

Tabla 19: Condiciones de reacción para bioconjugaciones de MMAFC5-NHS

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO anhidro filtrado en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml
Manipulación de MMAF-C5-NHS	Solución 50 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de MMAF-C5	Cada 90 min
Porciones de adición de MMAF-C5-NHS	10 equivalentes

Las reacciones fueron llevadas a cabo como en el ejemplo 64A, observándose alguna pequeña agregación en la muestra bruta que se resolvió una vez que la muestra fue purificada. La recuperación fue del -50 %. Esta reacción era escalable.

5 En este ejemplo, la configuración fue:

Reacción 1: scFv-TCT: MMAF-C5-NHS, 60 equivalentes y

Reacción 2: scFv-TCT: MMAF-C5-NHS, 100 equivalentes

10 Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados fueron analizados por cromatografía de exclusión por tamaño HPLC. El scFv tiene un tiempo de retención de 17,9 min, lo que corresponde a un Pm de aproximadamente 30 kDa. Los dos conjugados eluyeron progresivamente antes, a los 16,4 min para el ADC 1 y a los 16,1 min para el ADC 2, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de un pico único, nítido y monomérico, lo que indica que no hay agregación (figura 47). La reacción de conjugación 2 mostró cierta agregación al 17 % que pudo eliminarse. Un gel SDS-PAGE de la reacción 2 mostró una conjugación completa y un mayor peso molecular (figura 48).

15 La DAR se determinó mediante análisis de aminoácidos (AAA) en la Instalación de Química de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Cambridge para obtener los resultados mostrados en las tablas 20-21.

Tabla 20. Resumen de los resultados de AAA que muestran las DAR de 6,6 para la reacción 1

Reacción:	1	TCT-MMAF-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Cys	6	no determinado	-
Asp	15	16,20	dentro del 5-10 %
Thr	14	14,12	mejor que el 5 %
Ser	46	43,97	mejor que el 5 %
Glu	22	21,57	mejor que el 5 %

Reacción:	1	TCT-MMAF-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Gly	44	43,19	mejor que el 5 %
Ala	17	16,46	mejor que el 5 %
Val	0	excluido	-
Met	5	5,15	mejor que el 5 %
Ile	8	8,27	mejor que el 5 %
Leu	15	15,75	mejor que el 5 %
Patrón de Norleu			
Tyr	14	14,62	mejor que el 5 %
Phe	0	excluido	-
His	3	3,22	dentro del 5-10 %
Lys	12	12,69	dentro del 5-10 %
Arg	5	4,79	mejor que el 5 %
Pro	0	excluido	-
Trp	8		(no determinado)
Total (utilizado)	220	residuos	
			Promedio
Muestra total	0,169	nmoles	0,166
	4,76	ug	4,68
Concentración	27,28	nmoles/ml	26,80
	768,28	ug/ml	754,91
DAR de MMAF Muestra total	1,13	nmoles	6,64

Tabla 21. Resumen de los resultados de la AAA que muestran las DAR de 8 para la reacción 2

Reacción:	2	TCT-MMAF-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Cys	6	no determinado	-
Asp	15	15,39	mejor que el 5 %
Thr	14	13,53	mejor que el 5 %
Ser	46	42,72	dentro del 5-10 %
Glu	22	22,56	mejor que el 5 %
Gly	44	47,69	dentro del 5-10 %
Ala	17	16,62	mejor que el 5 %
Val	0	excluido	-
Met	5	4,69	dentro del 5-10 %
Ile	8	7,89	mejor que el 5 %
Leu	15	14,96	mejor que el 5 %
Patrón de Norleu			
Tyr	14	13,87	mejor que el 5 %
Phe	0	excluido	-
His	3	3,10	mejor que el 5 %
Lys	12	12,20	mejor que el 5 %
Arg	5	4,78	mejor que el 5 %
Pro	0	excluido	-
Trp	8		(no determinado)
Total (utilizado)	220	residuos	
			Promedio
Muestra total	0,058	nmoles	0,050
	1,64	ug	1,40
Concentración	5,25	nmoles/ml	4,49

Reacción:	2	TCT-MMAF-C5
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados		
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado
	147,91	ug/ml
DAR de MMAF Muestra total	0,476	7,96

El análisis LC-MS se realizó como se describe en el ejemplo 64A.

Los cromatogramas y espectros de LCMS, corriente iónica total (TIC) y los datos desconvolucionados de scFv (TCT)-C5-MMAF 1 y 2 se muestran en las figuras 49 y 50 y se ofrece un resumen en la tabla 22.

- 5 Se observó un pico principal en el TIC de la muestra de scFv (TCT)-C5-MMAF 1 que eluía a 10,2 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo una serie de picos principales a m/z 30645, 31473, 32301 y 33129, lo que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula scFv (TCT), junto con 3-6 adiciones de la molécula MMAF-C5. Para la muestra 2, se observó un pico principal en el TIC a los 9,9-11,4 min correspondiente a la masa desconvolucionada a carga cero a m/z 31474, 32302, 33130 y 33958 que coincidía con la
- 10 masa teórica suministrada del scFv (TCT) junto con 4-7 adiciones de MMAF-C5.

Tabla 22. Resumen de los análisis de LC-MS de los conjugados de scFv (TCT)-MMAF C5 (118)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa del pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada	DAR promedio
scFv(TCT)	8,27	28160	0	0	0
ADC 1 TCT-MMAF-C5	10,2	30645	2485	3	4,5
		31473	3313	4	
		32301	4141	5	
		33129	4969	6	
ADC 2 TCT-MMAF-C5	9,9	31474	3314	4	5,5
	10,4	32302	4142	5	
	10,9	33130	4970	6	
	11,4	33958	5798	7	

Por lo tanto, para:

la reacción 1, la DAR fue de 6,64 por AAA y de 4,5 por MS, con un promedio de 5,6

la reacción 2, la DAR fue de 8,0 por AAA y de 5,5 por MS, con un promedio de 6,8.

15 Actividad de unión de los conjugados de scFv (TCT)-MMAF-C5

Se prepararon ScFv (TCT)-MMAF-C5 (compuesto 118) y se caracterizaron como se describió anteriormente. Sus afinidades de unión al antígeno diana HER2 inmovilizado se determinaron mediante Biacore SPR en comparación con el scFv no modificado como en el ejemplo 64A.

El scFv (TCT)-MMAF-C5 1 DAR 5.6 presentó una tasa de asociación de $7,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $4,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 5,4 nM. El scFv (TCT)-MMAF-C5 DAR 6.8 presentó una tasa de asociación de $1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $4,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 3,6 nM. Esto se mantuvo fundamentalmente sin cambios en comparación con el scFv no modificado (TCT), que presentó una tasa de asociación de $2,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $4,17 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 1,49 nM, lo que indica que no hubo pérdida de la función de unión.

Conclusiones generales sobre TCT-MMAF-C5, datos biofísicos

Las condiciones de conjugación se optimizaron como se ha detallado anteriormente. Esta optimización permitió controlar las reacciones de conjugación para obtener conjugados de DAR intermedia y alta. Se observó una precipitación mínima del anticuerpo/conjugado durante la síntesis. Tras la purificación por HPLC SEC, los conjugados resultantes se concentraron hasta -1,5mg/ml y se mantuvieron estables en el tampón durante varios meses.

Las técnicas ortogonales usadas para el análisis están de acuerdo y respaldan que una estructura scFv optimizada, ilustrada por scFv (TCT), puede ser cargada con múltiples fármacos usando residuos de lisina en el anticuerpo y la conjugación puede ser controlada para obtener conjugados monoméricos (como se muestra por SEC-HPLC) con la DAR deseada, al mismo tiempo que se conserva la función de unión y afinidad. En la HPLC las muestras tenían tiempos de retención progresivamente más cortos que el scFv (TCT), eluyendo más rápidamente de la columna SEC debido a su tamaño creciente. El análisis de aminoácidos fue una herramienta extremadamente útil para el análisis cuantitativo posterior y complementó los datos de MS.

Ejemplo 65B: ScFv (TCT1067)-MMAF con un conector C5

El MMAF-C5-NHS (compuesto 78) se conjugó con scFv (TCT) para obtener conjugados (compuesto 118) con diversas DAR. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

Tabla 23: Condiciones de reacción para bioconjugaciones de MMAF-C5-NHS

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO anhidro filtrado en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml
Manipulación de MMAF-C5-NHS	Solución 50 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de MMAF-C5	Cada 90 min
Porciones de adición de MMAF-C5-NHS	10 equivalentes

Las reacciones fueron llevadas a cabo como en el ejemplo 64A, observándose alguna pequeña agregación en la muestra bruta que se resolvió una vez que la muestra fue purificada. La recuperación total fue del -50-60 %. Estas reacciones eran escalables.

En este ejemplo, la configuración fue:

Reacción 1: scFv-TCT1067: MMAF-C5-NHS, 60 equivalentes y

Reacción 2: scFv- TCT1067: MMAF-C5-NHS, 100 equivalentes.

Los scFv no conjugados y conjugados (TCT1067) fueron analizados por cromatografía de exclusión por tamaño HPLC. El ScFv tiene un tiempo de retención de 18,1 min, que corresponde a un P_m de aproximadamente 30 kDa. Los dos conjugados eluyeron ligera y progresivamente antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de un único pico monomérico nítido, lo que indica que no hay agregación (figura 51).

La DAR se determinó con precisión mediante análisis de aminoácidos (AAA) en la Instalación de Química de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Cambridge como se muestra en la tabla 24 y 25.

Tabla 24. Resumen de los resultados de AAA que muestran las DAR de 6,4 para la reacción 1

Reacción:	1	TCT1067-MMAF-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Cys	6	no determinado	-
Asp	14	15,11	dentro del 5-10 %
Thr	17	16,77	mejor que el 5 %
Ser	44	41,02	dentro del 5-10 %
Glu	21	20,99	mejor que el 5 %
Gly	45	44,44	mejor que el 5 %
Ala	16	15,65	mejor que el 5 %
Val	0	excluido	-
Met	5	4,84	mejor que el 5 %
Ile	8	8,22	mejor que el 5 %
Leu	16	17,15	dentro del 5-10 %
Patrón de Norleu			
Tyr	14	14,49	mejor que el 5 %
Phe	0	excluido	-
His	2	2,11	dentro del 5-10 %
Lys	12	12,93	dentro del 5-10 %
Arg	6	6,30	mejor que el 5 %
Pro	0	excluido	-
Trp	9		(no determinado)
Total (utilizado)	220	residuos	
			Promedio

Reacción:	1	TCT1067-MMAF-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Muestra total	0,17	nmoles	0,16
Concentración	4,83	ug	4,49
	38,80	nmoles/ml	36,01
	1098,2738	ug/ml	1019,373151
DAR de MMAF Muestra total	1,109		6,36

Tabla 25. Resumen de los resultados de AAA que muestran las DAR de 8,6 para la reacción 2

Reacción:	2	TCT1067-MMAF-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Cys	6	no determinado	-
Asp	14	14,83	dentro del 5-10 %
Thr	17	17,62	mejor que el 5 %
Ser	44	41,77	dentro del 5-10 %
Glu	21	20,66	mejor que el 5 %
Gly	45	48,17	dentro del 5-10 %
Ala	16	15,11	dentro del 5-10 %
Val	0	excluido	-
Met	5	4,92	mejor que el 5 %
Ile	8	8,07	mejor que el 5 %
Leu	16	14,99	dentro del 5-10 %
Patrón de Norleu			
Tyr	14	13,72	mejor que el 5 %
Phe	0	excluido	-

Reacción:	2	TCT1067-MMAF-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
His	2	2,04	mejor que el 5 %
Lys	12	12,05	mejor que el 5 %
Arg	6	6,06	mejor que el 5 %
Pro	0	excluido	-
Trp	9		(no determinado)
Total (utilizado)	220	residuos	
			Promedio
Muestra total	0,071	nmoles	0,078
	2,00	ug	2,20
Concentración	6,47	nmoles/ml	7,12
	183,28	ug/ml	201,43
DAR de MMAF Muestra total	0,635		8,61

El análisis LC-MS se realizó como se describe en el ejemplo 64A.

Los cromatogramas y espectros de LCMS, corriente iónica total (TIC) y los datos desconvolucionados de scFv (TCT1067)-C5-MMAF 1 y 2 se muestran en la figura 52 y se ofrece un resumen en la tabla 26.

- 5 Se observó un pico principal en el TIC de la muestra de scFv (TCT1067)-C5-MMAF 1 que eluye a 10,1 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo una serie de picos principales a m/z 29874, 30702, 31530, 32358 y 33186, lo que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula de scFv (TCT1067), junto con 2-6 adiciones de la molécula de MMAF. En el caso de la muestra 2, los picos principales del TIC eluyeron a los 9,3-12 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo una serie de picos principales a m/z 30703, 31531, 32358, 33186, 34015 y 34843 que coincidía con la masa teórica suministrada de la molécula scFv (TCT1067), junto con 3-8 adiciones de la molécula MMAF.

Tabla 26. Resumen de los análisis DE LC-MS de los conjugados de scFv(TCT1067)-MMAF-C5 (118)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa del pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada	DAR promedio
scFv(TCT1067)	8,35	28215	0	0	0
	10,1	29874	1659	2	4,0

Tabla 26. Resumen de los análisis DE LC-MS de los conjugados de scFv(TCT1067)-MMAF-C5 (118)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa del pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada	DAR promedio
ADC 1 TCT1067-MMAF-C5		30702	2487	3	
		31530	3315	4	
		32358	4143	5	
		33186	4971	6	
ADC 2 TCT1067-MMAF-C5	9,9-12,0	30703	2484	3	
		31531	3312	4	
		32358	4139	5	
		33186	4967	6	
		34015	5796	7	
		34843	6624	8	

Por lo tanto:

En la muestra 1, la DAR fue de 6,4 por AAA y de 4,0 por MS, con un promedio de 5,2

En la muestra 2, la DAR fue de 8,6 por AAA y de 5,5 por MS, con un promedio de 7,1.

5 Actividad de unión de los conjugados de scFv (TCT1067)-MMAF-C5

Se prepararon los ScFv (TCT1067)-MMAF-C5 (compuesto 118) y se caracterizaron como se describió anteriormente. Sus afinidades de unión al antígeno diana HER2 inmovilizado se determinaron mediante Biacore SPR en comparación con el scFv no modificado como se describe en el ejemplo 64A.

- 10 El scFv (TCT1067)-MMAF-C5 DAR 5.2 presentó una tasa de asociación de $1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $3,4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 19,6 pM. El scFv (TCT)-MMAF-C5 DAR 7.1 presentó una tasa de asociación de $4,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $1,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 3,8 pM. Esto se mantuvo fundamentalmente sin cambios en comparación con el scFv no modificado (TCT1067), que presentó una tasa de asociación de $3,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $3,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 9,5 pM, lo que indica que no hubo pérdida de la función de unión.

15 Conclusiones generales sobre scFv (TCT1067)-MMAF-C5, datos biofísicos

- 20 Las condiciones de conjugación se optimizaron como se ha detallado anteriormente. Esta optimización permitió controlar las reacciones de conjugación para obtener conjugados de DAR intermedia y alta. Se observó muy poca precipitación del anticuerpo/conjugado en los conjugados de DAR alta (no se observó ninguna para la DAR intermedia), que se resolvió tras la purificación. Tras la purificación por HPLC SEC, los conjugados resultantes se concentraron hasta aproximadamente 1-3 mg/ml y fueron estables en tampón durante varios meses.

- 25 Las técnicas ortogonales usadas para el análisis están de acuerdo y respaldan que una estructura scFv optimizada, ilustrada por scFv (TCT1067), puede ser cargada con múltiples fármacos usando residuos de lisina en el anticuerpo y la conjugación puede ser controlada para obtener conjugados monoméricos (como se muestra por SEC-HPLC) con la DAR deseada, al mismo tiempo que se conserva la función de unión y afinidad. En el gel SDS (figura 53), los conjugados purificados con DAR intermedia (muestra 1) se desplazaron ligeramente más arriba y estaban más polidispersos, mientras que para la DAR alta (muestra 2) hubo un evidente desplazamiento de migración en el gel, en el que la muestra era claramente de mayor tamaño que el control, scFv no modificado (TCT1067). Estas observaciones fueron corroboradas por la HPLC, en la que las muestras presentaban unos tiempos de retención progresivamente más cortos que el TCT1067, eluyendo más rápidamente de la columna SEC debido a su tamaño cada vez mayor. El

análisis de aminoácidos fue una herramienta extremadamente útil para el análisis cuantitativo posterior y complementó los datos de MS. La espectrometría de masas identificó tanto la DAR alta como la baja dentro de la misma muestra, mientras que el AAA ofreció un promedio.

5 Ejemplo 66: Bioconjugación de derivados de P5-C5 sobre un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario de alta afinidad con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

Se conjugó P5-C5-NHS (compuesto 6) con scFv (TCT1067) para obtener conjugados (compuesto 71) con diversas DAR. La reacción se controló para obtener productos con DAR altas. Las condiciones identificadas y utilizadas para las conjugaciones fueron:

Tabla 27: Condiciones de reacción para bioconjugaciones de P5-C5-NHS

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO anhidro filtrado en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml
Manipulación de P5C5-NHS	Solución 100 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de P5C5-NHS	Cada 80 min
Porciones de adición de P5C5-NHS	10 equivalentes

10

La reacción se llevó a cabo como se detalla en el ejemplo 64A.

En este ejemplo, la configuración fue:

Reacción 1: scFv (TCT1067): P5-C5-NHS, 60 equivalentes;

15 Los scFv no conjugados y conjugados (TCT1067) fueron analizados por cromatografía de exclusión por tamaño HPLC. El scFv tiene un tiempo de retención de 18,1 min, lo que corresponde a un Pm de aproximadamente 30 kDa. El conjugado eluyó ligeramente y antes, a los 16,5 minutos, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de un pico único, nítido y monomérico, lo que indica que no hay agregación (figura 54). Un gel SDS-PAGE (figura 55) mostró un conjugado limpio, de bajo índice de dispersión y mayor peso molecular en comparación con el scFv. Esta reacción era escalable.

20 La DAR también se determinó por análisis de aminoácidos (AAA) en la Instalación de Química de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Cambridge y los resultados se muestran en la tabla 28.

Tabla 28. Resumen de los resultados de AAA que muestran una DAR de 10,4

Reacción:	1	scFv (TCT1067)-P5C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Cys	6	no determinado	-
Asp	14	14,62	mejor que el 5 %

Reacción:	1	scFv (TCT1067)-P5C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Thr	17	18,20	dentro del 5-10 %
Ser	44	43,22	mejor que el 5 %
Glu	21	19,72	dentro del 5-10 %
Gly	45	43,95	mejor que el 5 %
Ala	16	15,25	mejor que el 5 %
Val	19	20,20	dentro del 5-10 %
Met	0	excluido	-
Ile	8	8,63	dentro del 5-10 %
Leu	16	16,17	mejor que el 5 %
Patrón de Norleu			
Tyr	0	excluido	-
Phe	0	excluido	-
His	2	1,87	dentro del 5-10 %
Lys	12	12,63	dentro del 5-10 %
Arg	6	5,53	dentro del 5-10 %
Pro	0	excluido	-
Trp	9		(no determinado)
Total (utilizado)	220	residuos	
			Promedio
Muestra total	0,274	nmoles	0,299
Concentración	7,77	ug	8,47
	68,62	nmoles/ml	74,85
	1942,45	ug/ml	2118,70

Reacción:	1	scFv (TCT1067)-P5C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
DAR	10,4		

El análisis por espectrometría de masas se realizó como se describe en el ejemplo 64A.

En la figura 56 se muestran los cromatogramas y espectros de LCMS, corriente iónica total (TIC) y los datos desconvolucionados de scFv (TCT1067)-P5-C5.

- 5 Se observó un pico principal en el TIC de la muestra de scFv (TCT1067)-P5-C5 que eluía a 7,8 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo una serie de picos principales como se muestra en la tabla 29 que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula scFv (TCT1067), junto con 10-14 adiciones de la molécula P5-C5, lo que ofrece un promedio de DAR 11,7. Esto se correlacionó bien con la determinación del AAA de la DAR de 10,4.

Tabla 29: Resumen de la LC-MS de scFv (TCT1067)-P5-C5 (compuestos 71)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa del pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada	DAR promedio ponderada
scFv(TCT1067)	8,35	28215	0	0	0
ADC 1 TCT1067-P5C5	8,2	34553	6334	10	11,7
		35186	6967	11	
		35819	7600	12	
		36452	8233	13	
		37085	8866	14	

10 En general, para el scFv (TCT1067)-P5-C5, la DAR fue de 10,4 por AAA y de 11,7 por MS con un promedio general de 10,9.

Actividad de unión de los conjugados de scFv (TCT1067)-P5-C5

- 15 Se preparó ScFv (TCT1067)-P5-C5 (compuesto 71) y se caracterizó como se ha descrito anteriormente. Su afinidad de unión al antígeno diana HER2 inmovilizado se determinó mediante Biacore SPR en comparación con el scFv no modificado como se describe en el ejemplo 64A.

- 20 El scFv (TCT1067)-P5-C5 DAR 10.9 presentó una tasa de asociación de $2,36 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $7,13 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una Kd de unión global de 302 pM. Se produjo una reducción moderada de la tasa de asociación (debido al impedimento estérico reversible del sitio de unión del anticuerpo por el elevado número de cargas activas unidas), pero una vez unido, no hubo un efecto significativo sobre la tasa de disociación en comparación con el scFv no modificado (TCT1067), que presentó una tasa de asociación de $3,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $3,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una Kd de unión global de 9,5 pM.

Conclusiones generales sobre scFv (TCT1067)-P5-C5, datos biofísicos

- 25 Las condiciones de conjugación se optimizaron como se ha detallado anteriormente. Esta optimización permitió controlar las reacciones de conjugación con un alto rendimiento de conjugados de DAR alta. No se observó precipitación del anticuerpo/conjugado en ninguno de los conjugados y la recuperación global fue muy alta, del -60 %. Tras la purificación por HPLC SEC, los conjugados resultantes se concentraron hasta aproximadamente 3 mg/ml y se mantuvieron estables en el tampón durante varios meses.

5 Las técnicas ortogonales usadas para el análisis están de acuerdo y respaldan que una estructura scFv optimizada, ilustrada por scFv (TCT1067), puede cargarse con múltiples fármacos usando residuos de lisina en el anticuerpo y la conjugación puede controlarse para obtener conjugados monoméricos (como se muestra por SEC-HPLC) con la DAR deseada, al mismo tiempo que se conserva la afinidad de unión. Los datos de LCMS, SEC y AAA respaldan que se había preparado un conjugado monomérico con un DAR alta. Junto con los datos de Biacore, este conjugado mantuvo la unión a HER2. La espectrometría de masas identificó tanto DAR altas como bajas dentro de la misma muestra, mientras que la AAA produjo un promedio.

Ejemplo 67: Bioconjugación de derivados de auristatina F con un conector corto en dos fragmentos de anticuerpo Fv monocatenario con residuos de lisina en la superficie múltiples y bien dispersos

10 Ejemplo 67A: ScFv (TCT)-auristatina F con un conector C₅

Se conjugó auristatina-F-C5-NHS (compuesto 88) con scFv (TCT) para obtener conjugados (compuesto 122) con diversas DAR. La reacción se controló para obtener productos con una DAR alta. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

Tabla 30: Condiciones de reacción para bioconjugaciones de auristatina F-C5-NHS

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO anhidro filtrado en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml
Manipulación de AF-C5-NHS	Solución 50 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de AF-C5-NHS	Cada 120 minutos
Porciones de adición de AF-C5-NHS	10 equivalentes

15

La reacción se llevó a cabo como se detalla en el ejemplo 64A. En este ejemplo, la configuración era:

Reacción 1: scFv-TCT-auristatina-F-C5-NHS, 30 equivalentes;

20

Los scFv (TCT) no conjugados y conjugados fueron analizados por cromatografía de exclusión por tamaño HPLC. El scFv tiene un tiempo de retención de 7,4 min, lo que corresponde a un Pm de aproximadamente 30 kDa. El conjugado eluyó ligeramente antes, a los 7,2 min, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de un pico único, nítido y monomérico, lo que indica que no hay agregación (figura 57). Estas reacciones eran escalables.

El análisis LC-MS se realizó como se describe en el ejemplo 64A.

25

Los cromatogramas y espectros de LCMS, corriente iónica total (TIC) y los datos desconvolucionados de scFv (TCT)-auristatina F-C5 se muestran en la figura 58 y se ofrece un resumen en la tabla 31.

Se observó un pico principal en el TIC de la muestra de scFv (TCT)-auristatina F-C5 que eluía a 9,5 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo una serie de picos principales a m/z 33125, 33953, 34780, 35607, 36435 y 37261 que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula scFv (TCT), junto con 6-11 adiciones de la molécula MMAF.

Tabla 31: Resumen de la LC-MS de los conjugados scFv (TCT)-auristatina-F-C5 (122)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa del observado (m/z)	pico	Masa añadida (m/z)	DAR calculada	DAR promedio
scFv(TCT)		28160		0	0	0
ADC 1 TCT-AF-C5	9,51	33125		4965	6	8,5
		33953		5793	7	
		34780		6620	8	
		35607		7447	9	
		36435		8275	10	
		37261		9101	11	

Actividad de unión de los conjugados de scFv (TCT)-C5-auristatina-F

Se prepararon ScFv (TCT)-auristatina F-C5 (compuesto 122) y se caracterizaron como se ha descrito anteriormente. Su función de unión al antígeno diana HER2 inmovilizado se verificó en comparación con el scFv no modificado como se describe en el ejemplo 64A.

Conclusiones generales de scFv (TCT)-auristatina F-C5, datos biofísicos

Las condiciones de conjugación se optimizaron como se ha detallado anteriormente. Esta optimización permitió controlar las reacciones de conjugación con un alto rendimiento de conjugados de DAR alta. Tras la purificación por HPLC SEC, los conjugados resultantes se concentraron hasta aproximadamente 600 µg/ml y se mantuvieron estables en el tampón durante varias semanas. De nuevo, la recuperación fue alta, del -50 %.

Las técnicas utilizadas para el análisis respaldan que una estructura scFv optimizada, ilustrada por el TCT, puede ser cargada con múltiples fármacos utilizando residuos de lisina en el anticuerpo y la conjugación puede ser controlada para obtener conjugados monoméricos (como se muestra por SEC-HPLC) con la DAR deseada, al mismo tiempo que se conserva la afinidad de unión. Los datos de LCMS fueron corroborados por el HPLC-SEC, en la que la muestra tenía un tiempo de retención más corto que el TCT, eluyendo más rápidamente de la columna SEC debido a su mayor tamaño.

Ejemplo 67B: ScFv (TCT1067)-auristatina con un conector C₅

Se conjugó auristatina F-C5-NHS (compuesto 88) con scFv (TCT1067) para obtener conjugados (compuesto 122) con diversas DAR. La reacción se controló para obtener productos con DAR intermedias y altas. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

Tabla 32: Condiciones de reacción para bioconjugaciones de auristatina F-C5-NHS

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO filtrado anhidro en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml

Tipo	Condición
Manipulación de AF-C5-NHS	Solución 50 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de AF-C5-NHS	cada 120 minutos
Porciones de adición de AF-C5-NHS	1 x 5 equivalentes (reacción 1); 2 x 10 equivalentes (reacción 2); 3 x 8,3 equivalentes (reacción 3)

Las reacciones se llevaron a cabo según el ejemplo 64A, observándose que la única precipitación pequeña visible se produjo en la muestra con el número más alto de equivalentes de fármaco. Esto se resolvió con la centrifugación y posterior purificación.

5 En este ejemplo, la configuración fue:

Reacción 1: scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5-NHS, 5 equivalentes;

Reacción 2: scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5-NHS, 10 equivalentes;

Reacción 3: scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5-NHS, 25 equivalentes

10 La DAR también se determinó mediante análisis de aminoácidos (AAA) en la Instalación de Química de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Cambridge y los resultados se muestran en las tablas 33-35.

Tabla 33. Resumen de los resultados de AAA, que muestran unas DAR de 3,64

Reacción:	1	scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
	Esperado	Aproximación del ajuste	
Aminoácido	valor	Valor observado	al valor esperado
Cys	6	no determinado	-
Asp	14	14,7	mejor que el 5 %
Thr	17	16,64	mejor que el 5 %
Ser	44	40,77	dentro del 5-10 %
Glu	21	20,87	mejor que el 5 %
Gly	45	46,35	mejor que el 5 %
Ala	16	16,19	mejor que el 5 %
Val	0	excluido	-
Met	5	4,79	mejor que el 5 %
Ile	8	8,08	mejor que el 5 %
Leu	16	16,58	mejor que el 5 %

Reacción:	1	scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
	Esperado	Aproximación del ajuste	
Aminoácido	valor	Valor observado	al valor esperado
Patrón de Norleu			
Tyr	14	14,47	mejor que el 5 %
Phe	0	excluido	-
His	2	2,02	mejor que el 5 %
Lys	12	12,49	mejor que el 5 %
Arg	6	6,07	mejor que el 5 %
Pro	0	excluido	-
Trp	9		(no determinado)
Total (utilizado)	220	residuos	
			Promedio
Muestra total	0,159	nmoles	0,16
	4,49	ug	4,54
Concentración	22,66	nmoles/ml	22,92
	641,34	ug/ml	648,88
		ug/ml corregidos	705,16
		DAR AAA	3,64

Tabla 34. Resumen de los resultados de AAA, que muestran unas DAR de 6,31

Reacción:	2	scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Cys	6	no determinado	
Asp	14	14,46	mejor que el 5 %
Thr	17	16,46	mejor que el 5 %

Reacción:	2	scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Ser	44	41,20	dentro del 5-10 %
Glu	21	20,84	mejor que el 5 %
Gly	45	46,24	mejor que el 5 %
Ala	16	15,89	mejor que el 5 %
Val	0	excluido	-
Met	5	4,58	dentro del 5-10 %
Ile	8	7,88	mejor que el 5 %
Leu	16	17,15	dentro del 5-10 %
Patrón de Norleu			
Tyr	14	14,32	mejor que el 5 %
Phe	0	excluido	-
His Lys	2	2,17	dentro del 5-10 %
	12	12,63	dentro del 5-10 %
Arg	6	6,19	mejor que el 5 %
Pro	0	excluido	-
Trp	9		(no determinado)
Total (utilizado)	220	residuos	
			Promedio
Muestra total	0,163	nmoles	0,168
	4,60	ug	4,74
Concentración	20,84	nmoles/ml	21,49
	589,78	ug/ml	608,28
		ug/ml corregidos	661,03

Reacción:	2	scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
		DAR AAA	6,31

Tabla 35. Resumen de los resultados de AAA, que muestran unas DAR de 13,4

Muestra:	3		
		scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Cys	6	no determinado	-
Asp	14	14,60	mejor que el 5 %
Thr	17	16,66	mejor que el 5 %
Ser	44	40,55	dentro del 5-10 %
Glu	21	21,23	mejor que el 5 %
Gly	45	46,74	mejor que el 5 %
Ala	16	16,06	mejor que el 5 %
Val	0	excluido	-
Met	0	excluido	-
Ile	8	7,74	mejor que el 5 %
Leu	16	16,23	mejor que el 5 %
Patrón de Norleu			
Tyr	14	14,31	mejor que el 5 %
Phe	0	excluido	-
His	2	2,17	dentro del 5-10 %
Lys	12	12,68	dentro del 5-10 %
Arg	6	6,04	mejor que el 5 %
Pro	0	excluido	-

Muestra:	3		
			scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Valor esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
Trp	9		(no determinado)
Total (utilizado)	215	residuos	
			Promedio
Muestra total	0,169	nmoles	0,170
	4,80	ug	4,80
Concentración	18,83	nmoles/ml	18,84
	532,94	ug/ml	533,27
		corregido	579,52
		ug/ml	
		DAR AAA	13,40

Los scFv no conjugados y conjugados (TCT1067) fueron analizados por cromatografía de exclusión por tamaño HPLC. El scFv tiene un tiempo de retención de 18,1 min, lo que corresponde a un Pm de aproximadamente 30 kDa. Los tres conjugados eluyeron ligera y progresivamente antes (a los 17,9 min, 17,92 min y 17,87 min), lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de un pico único, nítido y monomérico, lo que indica que no hay agregación (figura 59).

El análisis LC-MS se realizó como se describe en el ejemplo 64A.

Los cromatogramas y espectros de LCMS, corriente iónica total (TIC) y los datos desconvolucionados de scFv (TCT1067)-C5-auristatina-F se muestran en la figura 60 y se resumen en la tabla 36.

5 Se observó un pico principal en el TIC de la reacción 1 de scFv (TCT1067)-C5-auristatina-F que eluía a 8,19 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo una serie de picos principales a m/z 29037, 29865, 30692, 31519 y 32345, lo que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula de scFv (TCT1067), junto con 1-5 adiciones de la molécula de auristatina F con una DAR promedio de 2,9.

15 Se observó un pico principal en el TIC de la reacción 2 de scFv (TCT1067)-C5-auristatina-F que eluía a los 9,47 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo una serie de picos principales a m/z 29866, 30692, 31519, 32347, 33174 y 34001, lo que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula de scFv (TCT1067), junto con 2-7 adiciones de la molécula de auristatina F con una DAR promedio de 4,98.

20 Se observó un pico importante en el TIC de la reacción 3 de scFv (TCT1067)-C5-auristatina-F que eluía a 9,97 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo una serie de picos principales a m/z 34826, 35653, 36480, 37307, 38134 y 38960, lo que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula de scFv (TCT1067), junto con 8-13 adiciones de la molécula de auristatina F con una DAR promedio de 10,3.

Tabla 36: Resumen de la LC-MS de scFv (TCT1067)-auristatina F-C5(**122**)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa del pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada	DAR promedio ponderada
scFv(TCT1067)	8,35	28215	0	0	0,00
ADC 1 TCT1067-AF-C5	8,11	29037	818	1	2,90
		29865	1646	2	
		30692	2473	3	
		31519	3300	4	
		32345	4126	5	
		33174	4955	6	
ADC 2 TCT1067-AF-C5	9,47	29866	1647	2	4,98
		30692	2473	3	
		31519	3300	4	
		32347	4128	5	
		33174	4955	6	
		34001	5782	7	
ADC 3 TCT1067-AF-C5	9,97	34826	6607	8	10,30
		35653	7434	9	
		36480	8261	10	
		37307	9088	11	
		38134	9915	12	
		38960	10741	13	

Por lo tanto, en general:

Para la reacción 1, la DAR fue de 3,64 por AAA y de 2,9 por MS, con una DAR promedio de 3,3.

Para la reacción 2, la DAR fue de 6,31 por AAA y de 4,98 por MS, con una DAR promedio de 5,65.

5 Para la reacción 3, la DAR fue de 13,4 por AAA y de 10,4 por MS, con una DAR promedio de 11,9.

Se llevó a cabo un SDS-PAGE (figura 61) que muestra el aumento de los pesos moleculares de los conjugados, pero notablemente, la alta homogeneidad de las especies de DAR alta procedentes de la muestra de reacción 3.

Actividad de unión de los conjugados de scFv (TCT1067)-AF-C5

10 Se prepararon conjugados de ScFv (TCT1067)-auristatina-F-C5 (compuesto **122**) y se caracterizaron como se describió anteriormente. Sus afinidades de unión al antígeno diana HER2 inmovilizado se determinaron mediante Biacore SPR en comparación con el scFv no modificado como se describe en el ejemplo 64A.

El scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5 DAR 3.3 presentó una tasa de asociación de $5,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $1,82 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 32,8 pM.

El scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5 DAR 5.65 presentó una tasa de asociación de $3,36 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $1,35 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 40,3 pM.

- 5 El scFv (TCT1067)-auristatina-F-C5 DAR 11.9 presentó una tasa de asociación de $2,17 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $1,76 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 810 pM.

- 10 Las muestras de DAR baja e intermedia presentaban afinidades que eran muy similares al scFv no modificado (TCT1067) que presentaba una tasa de asociación de $3,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $3,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 9,5 pM, indicando que no había pérdida de función de unión. La muestra con DAR alta presentó una tasa de asociación moderadamente reducida (debido al impedimento estérico reversible del sitio de unión del anticuerpo por el alto número de cargas activas unidas), pero una vez unida, hubo un efecto insignificante en la tasa de disociación en comparación con el scFv no modificado.

Conclusiones generales de scFv (TCT1067)-auristatina F-C5, datos biofísicos

- 15 Las condiciones de conjugación se optimizaron como se ha detallado anteriormente. Esta optimización permitió controlar las reacciones de conjugación con un alto rendimiento de conjugados de DAR baja, intermedia y alta. Tras la purificación y el procesamiento, los conjugados se concentraron hasta -9 mg/ml y se mantuvieron estables en el tampón durante varios meses.

- 20 Las técnicas ortogonales usadas para el análisis están de acuerdo y respaldan que una estructura scFv optimizada, ilustrada por scFv (TCT1067), puede cargarse con múltiples fármacos usando residuos de lisina en el anticuerpo y la conjugación puede controlarse para obtener conjugados monoméricos (como se muestra por SEC-HPLC) con la DAR deseada conservando la función y la afinidad de unión. Los conjugados purificados con DAR baja (reacción 1) se aproximaron más al scFv de control (TCT) en el gel y estaban menos polidispersos que la DAR intermedia (reacción 2), que se desplazó ligeramente más arriba y estaba más polidispersa, mientras que para la DAR alta (reacción 3) hubo un claro desplazamiento de migración en el gel, en el que la muestra era evidentemente de mayor tamaño que el control, scFv no modificado (TCT1067). Estas observaciones fueron corroboradas por el HPLC SEC, en el que las muestras tenían tiempos de retención progresivamente más cortos que el TCT, eluyendo más rápidamente debido a su tamaño cada vez mayor. El análisis de aminoácidos fue una herramienta extremadamente útil para el análisis cuantitativo posterior y respaldó los datos de LC-MS.

- 30 Ejemplo 68: Bioconjugación de un derivado de MMAE con un conector escindible por proteasas sobre un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario de alta afinidad con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

Se conjugó el fármaco citotóxico MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ NHS (compuesto 86) con scFv (TCT1067) para obtener conjugados (compuesto 121) con una DAR alta. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

Tabla 37: Condiciones de reacción para bioconjugaciones de MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ NHS

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 20 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO anhidro filtrado en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml
Manipulación de MMAE-PABA-vc-PEG9-NHS	Solución 50 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de MMAE-PABA-vc-PEG9-NHS	Cada 120 minutos
Equivalentes de adición de MMAE-PABA-vc-PEG9-NHS	10 equivalentes

La reacción se llevó a cabo como se detalla en el ejemplo 64A, observándose que el MMAE-PABA-vc-PEG9-NHS requería varias agitaciones en vórtice para solubilizarse completamente en DMSO. La reacción se llevó a cabo en un tampón de baja salinidad. El conjugado bruto no presentaba precipitación visible y se purificó por SEC en un sistema AKTA Avant utilizando una columna Superdex 75, 26/600 eluyendo con tampón fosfato IPA al 10 %/NaCl 20 mM, pH7. Las fracciones se reunieron y concentraron utilizando Vivacell 100 10 k MWCO (membrana PES) (Sartorius) antes de someterlas a intercambio de tampón en tampón fosfato NaCl 20 mM, pH 7, utilizando el mismo proceso. Un ensayo de HPLC-SEC (figura 62) mostró un único pico monomérico con muy baja agregación. Esta reacción era escalable.

Reacción 1: scFv-TCT1067: MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ 30 equivalentes;

La DAR también se determinó por análisis de aminoácidos (AAA) en la Instalación de Química de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Cambridge y los resultados se muestran en la tabla 38.

Tabla 38. Resumen de los resultados de AAA que muestran una DAR de 9,6 para la reacción 1

Reacción:	1	scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG ₉	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
	Esperado		Aproximación del ajuste
Aminoácido	valor	Valor observado	al valor esperado
Cys	6	no determinado	
Asp	14	13,96	mejor que el 5 %
Thr	17	17,56	mejor que el 5 %
Ser	44	40,04	dentro del 5-10 %
Glu	0	excluido	-
Gly	45	45,75	mejor que el 5 %
Ala	16	17,43	dentro del 5-10 %
Val	0	excluido	-
Met	0	excluido	-
Ile	8	8,34	mejor que el 5 %
Leu	16	16,28	mejor que el 5 %
Patrón de Norleu			
Tyr	0	excluido	-
Phe	0	excluido	-
His	2	2,05	mejor que el 5 %
Lys	12	12,39	mejor que el 5 %
Arg	6	5,86	mejor que el 5 %

Reacción:	1	scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG ₉	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
	Esperado		Aproximación del ajuste
Aminoácido	valor	Valor observado	al valor esperado
Pro	13	13,35	mejor que el 5 %
Trp	9		(no determinado)
Total (utilizado)	193	residuos	
			Promedio
Muestra total	0,142	nmoles	0,151
	4,01	ug	4,28
Concentración	2,18	nmoles/ml	2,32
	61,69	ug/ml	65,77
	Ornitina		
Muestra total	1,540		
i			
ii	1,370		
promedio	1,46		
DAR	9,6		

El análisis por espectrometría de masas se realizó como se describe en el ejemplo 64A. Los cromatogramas y espectros de LCMS, corriente iónica total (TIC) y los datos desconvolucionados de scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ se muestran en la figura 63 y se ofrece un resumen en la tabla 39.

- 5 Se observaron varios picos correspondientes a las distintas especies de DAR en la UV/TIC de la muestra que eluía entre 10 y 12 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para cada pico correspondía a una serie de picos principales a m/z 37837, 39439, 41042 y 42644, lo que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula scFv (TCT1067) con 6-9 adiciones del resto MMAE.

Tabla 39: Resumen de la LC-MS de scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ (121)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa de observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada	DAR promedio
scFv(TCT1067)	8,35	28215	0	0	0
	10,7	37837	9618	6	7,5

Tabla 39: Resumen de la LC-MS de scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ (121)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa de pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada	DAR promedio
ADC1 MMAE TCT1067-	11,1	39439	11220	7	
	11,4	41042	12823	8	
	11,9	42644	14425	9	

Por lo tanto, en general, para la reacción de scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEGs 1, la DAR fue 9,6 por AAA y 7,5 por LC-MS con una DAR promedio de 8,6.

- 5 Se realizó un SDS-PAGE (figura 64) que muestra el aumento del peso molecular del conjugado, pero, notablemente, la alta homogeneidad de la especie de DAR alta de la muestra de reacción 1.

Actividad de unión de los conjugados de scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉

Se prepararon TCT(1067)-MMAE-PABA-vc-PEG₉ (compuesto 121) y se caracterizaron como se ha descrito anteriormente. Su afinidad de unión al antígeno diana HER2 inmovilizado se determinó mediante Biacore SPR en comparación con el scFv no modificado como se describe en el ejemplo 64A.

- 10 El conjugado de scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉, DAR 8,6, presentó una tasa de asociación de $2,21 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $2,23 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 1 nM. Hubo una reducción en la tasa de asociación (debido al impedimento estérico reversible del sitio de unión del anticuerpo por el alto número de cargas activas unidas), pero, una vez unido, hubo un efecto insignificante en la tasa de disociación en comparación con el scFv no modificado (TCT1067), que presentaba una tasa de asociación de $3,88 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $3,69 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 9,5 pM.

Conclusiones generales de scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉

Las condiciones de conjugación fueron optimizadas como se detalló anteriormente obteniendo un conjugado con una DAR alta. Tras la purificación, la concentración y la filtración, los conjugados resultantes se mostraron estables en el tampón durante varias semanas.

- 20 Las técnicas ortogonales usadas para el análisis están de acuerdo y respaldan que una estructura scFv optimizada, ilustrada por TCT(1067), puede ser cargada con múltiples fármacos usando residuos de lisina en el anticuerpo y la conjugación puede ser controlada para obtener conjugados monoméricos (como se muestra por SEC-HPLC) con la DAR deseada, al mismo tiempo que se conserva la afinidad de unión. El conjugado purificado con DAR alta (reacción 1) mostró un claro desplazamiento de migración en el gel, en el que la muestra era de mayor tamaño que el control, TCT1067 sin modificar. Estas observaciones se vieron corroboradas por el HPLC SEC, en el que la muestra tenía un tiempo de retención significativamente más corto, eluyendo a los 15,1 minutos que el control, que eluía a los 18,1 minutos, eluyendo más rápidamente de la columna SEC debido al aumento de su tamaño. El análisis de aminoácidos fue una herramienta extremadamente útil para el análisis cuantitativo posterior y respaldó los datos de LC-MS.

- 30 Ejemplo 69: Bioconjugación de dos tipos diferentes de carga activa en un fragmento de anticuerpo scFv con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

Los fármacos citotóxicos P5-C5-NHS (compuesto 6) y MMAF-C5-NHS (compuesto 78) se conjugaron con scFv (TCT1067) para obtener conjugados (compuesto 135) con una DAR alta. Las condiciones identificadas y utilizadas para las conjugaciones fueron:

Tabla 40: Condiciones de reacción para bioconjugaciones de doble carga activa de MMAF/P5C5

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO anhidro filtrado en una concentración final del 20 % (v/v)

Tipo	Condición
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml
Manipulación de MMAF-C5-NHS y P5-C5-NHS	Solución 100 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de MMAF-C5-NHS y P5-C5-NHS	Cada 90 min
Porciones de adición de MMAF-C5-NHS y P5-C5-NHS	11 equivalentes

La reacción se llevó a cabo según el ejemplo 64A, pero el MMAF-C5-NHS se añadió durante la primera adición y las dos adiciones posteriores se llevaron a cabo añadiendo P5-C5-NHS. Todos los demás procesos de manipulación y purificación fueron como en el ejemplo 64A.

5 Reacción 1: scFv- TCT1067: MMAF-C5-P5-C5; 11 equivalentes de MMAF-C5 NHS y 21 equivalentes de P5-C5 NHS;

Los scFv no conjugados y conjugados (TCT1067) fueron analizados por cromatografía de exclusión por tamaño HPLC. El scFv tiene un tiempo de retención de 18,1 min, lo que corresponde a un Pm de aproximadamente 30 kDa. El conjugado eluyó ligeramente antes, a los 17,8 min, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), pero en forma de un pico único, nítido y monomérico, lo que indica que no hay agregación (figura 65).

La DAR también se determinó por análisis de aminoácidos (AAA) en la Instalación de Química de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Cambridge y los resultados se muestran en la tabla 41.

Tabla 41. Resumen de los resultados de AAA que muestran una DAR de doble carga activa

Reacción:	1	scFv (TCT1067)-MMAF-C5/P5-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
	valor		
Cys	6	no determinado	-
Asp	14	14,80	dentro del 5-10 %
Thr	17	17,10	mejor que el 5 %
Ser	44	41,29	dentro del 5-10 %
Glu	21	21,54	mejor que el 5 %
Gly	45	47,85	dentro del 5-10 %
Ala	16	16,20	mejor que el 5 %
Val	0	excluido	-

Reacción:	1	scFv (TCT1067)-MMAF-C5/P5-C5	
Ajuste numérico de las proporciones molares medidas a los valores esperados			
Aminoácido	Esperado	Valor observado	Aproximación del ajuste al valor esperado
	valor		
Met	5	4,95	mejor que el 5 %
Ile	8	7,66	mejor que el 5 %
Leu	16	15,79	mejor que el 5 %
Patrón de Norleu			
Tyr	14	13,82	mejor que el 5 %
Phe	0	excluido	-
His	2	1,81	dentro del 5-10 %
Lys	12	11,48	mejor que el 5 %
Arg	6	5,70	dentro del 5-10 %
Pro	0	excluido	-
Trp	9		(no determinado)
Total (utilizado)	220	residuos	
			Promedio
Muestra total	0,223	nmoles	0,217
	6,32	ug	6,15
Concentración	55,85	nmoles/ml	54,33
	1580,85	ug/ml	1537,79
Total		DAR	
MMAF (Phe)	0,137	0,61	0,7
P5C5 (Ava)	1,028	4,60	4,6

El análisis LC-MS se realizó como se describe en el ejemplo 64A.

Los cromatogramas y espectros de LCMS, corriente iónica total (TIC) y los datos desconvolucionados de scFv (TCT1067)-MMAF-C5/P5-C5 se muestran en la figura 66 y se ofrece un resumen en la tabla 42.

Se observó un pico importante en el TIC de la muestra de scFv (TCT1067)-MMAF-C5/P5-C5 que eluyó a 8,7-10,5 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo una serie de picos principales a m/z 31332, 31964, 32597, 33230, 33963, 31135, 31769, 32499, 30307, 30940, 31673, 32306, 30113, 30746, 31478, 32109.

Estos fueron coherentes con la masa teórica suministrada de la molécula scFv (TCT1067), junto con varias combinaciones de MMAF-C5 y P5-C5 como se indica en la tabla 42.

5

Tabla 42: Resumen de la LCMS de scFv (TCT1067)-MMAF-C5/P5-C5 con doble carga activa (135)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa del pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR de MMAF-C5 estimada	DAR de P5-C5 estimada
scFv(TCT1067)	8,35	28215	0	0	0
ADC de TCT1067-MMAF/C5-P5-C5	9,7	31332	3113	3	1
		31964	3745	3	2
		32597	4378	3	3
		33230	5011	3	4
	9,4	31135	2916	2	2
		31769	3550	2	3
		32499	4280	2	4
		33135	4916	2	5
	8,9	30307	2088	1	2
		30940	2721	1	3
		31673	3454	2	3
		32306	4087	1	5
	8,7	30114	1895	0	3
		30747	2528	0	4
		31479	3260	0	5
		32109	3890	0	6

Conclusiones generales sobre scFv (TCT1067)-MMAF-C5/P5-C5, datos biofísicos

Las condiciones de conjugación se optimizaron como se ha detallado anteriormente. Esta optimización permitió conseguir reacciones de conjugación controladas con un alto rendimiento de conjugados con DAR alta. Los conjugados resultantes se concentraron hasta aproximadamente 1,5 g/ml y fueron estables en tampón durante varias semanas.

10

Ejemplo 70: Bioconjugación de un derivado de la maitansina-DM1 con un conector sobre un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario de alta afinidad con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

Se conjugó maitansina DM1-dPEG₁₂-NHS (compuesto 90) con scFv (TCT1067) para obtener conjugados (compuesto 124) con diversas DAR. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

Tabla 43: Condiciones de reacción para bioconjugaciones de DM1-dPEG₁₂-NHS

Tipo	Condición
Tampón	Tampón PBS a pH 8,0 y polisorbato-20 al 0,1 %
Codisolvente	DMSO anhidro filtrado en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml
Manipulación de maitansina DM1-PEG(12)-NHS	Solución 100 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de maitansina DM1-PEG(12)-NHS	Cada 120 min
Porciones de adición de maitansina DM1-PEG(12)-NHS	8 equivalentes

5 Las reacciones se prepararon según la tabla 37 y el ejemplo 64A, teniendo en cuenta que, antes de añadir la solución madre de fármaco a la reacción, la cantidad total necesaria se diluyó en el 25 % del volumen total de DMSO requerido para la reacción. La adición del fármaco se llevó a cabo añadiendo 16 equivalentes del fármaco-NHS en DMSO a partir de esta nueva solución madre. La precipitación era visible al final de las reacciones y aumentaba con el incremento del número de equivalentes.

10 En este ejemplo, la configuración fue:

Reacción 1: scFv- TCT1067: DM1-dPEG₁₂ NHS, 16 equivalentes;

Reacción 2: scFv- TCT1067: OM1-dPEG₁₂ NHS, 32 equivalentes

15 Los scFv no conjugados y conjugados (TCT1067) se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño HPLC (figura 67). El scFv tiene un tiempo de retención de 19 min, lo que corresponde a un P_m de aproximadamente 30 kDa. Los dos conjugados eluyeron todos ligeros y progresivamente antes, lo que indica un mayor peso molecular (debido a las diferentes cargas de fármaco), observándose cierta agregación, como se indica a continuación:

Reacción 1	1 % de agregados
Reacción 2	4 % de agregados

El análisis LC-MS se realizó como se describe en el ejemplo 64A.

20 Los cromatogramas y espectros de LCMS, corriente iónica total (TIC) y los datos desconvolucionados de scFv (TCT1067)-DM1-dPEG₁₂ se muestran en la figura 68 y se ofrece un resumen en la tabla 44.

25 En la muestra 1, se observó un pico principal en el TIC de la muestra de scFv (TCT1067)-DM1-dPEG₁₂ que eluía a 11 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo una serie de picos principales a m/z 37144, 38631 y 40079, lo que era coherente con la masa teórica suministrada de la molécula scFv (TCT1067), junto con 6, 7 y 8 adiciones de la molécula de maitansina DM1. En la muestra 2, el conjugado eluyó a los 11,5 minutos y la masa desconvolucionada produjo un pico a m/z 40123 que corresponde al scFv (TCT1067) junto con 8 adiciones de maitansina DM1.

Tabla 44. Resumen de la LC-MS de scFv (TCT1067)-DM1-dPEG₁₂ (124)

Muestra	Tiempo de retención (min)	Masa del pico observado (m/z)	Masa añadida (m/z)	DAR calculada	DAR promedio
scFv(TCT1067)	8,35	28215	0	0	
ADC 1 TCT1067-maitansina-PEG(12) DM1	10,6	37144	9024	6	
	10,9	38631	10528	7	
	11-11,5	40079	12032	8	7
ADC 2 TCT1067-maitansina-PEG(12) DM1	11,5-12,0	40123	12032	8	8

Se realizó un SDS-PAGE (figura 69) que muestra el aumento del peso molecular de las muestras de reacción de los conjugados 1 y 2.

Actividad de unión de scFv (TCT1067)-DM1-dPEG₁₂

- 5 Se preparó ScFv (TCT1067)-DM1-dPEG₁₂ (compuesto 124) y se caracterizó como se ha descrito anteriormente. Sus afinidades de unión al antígeno diana HER2 inmovilizado se determinaron mediante Biacore SPR en comparación con el scFv no modificado como se describe en el ejemplo 64A.

- 10 El scFv (TCT1067)-DM1-dPEG₁₂ DAR 8 presentó una tasa de asociación de $1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $3,28 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 2,48 nM. El scFv (TCT1067)-DM1-dPEG₁₂ DAR 7 presentó una tasa de asociación de $1,95 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $2,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 1,39 nM. Ambos conjugados presentaban una tasa de asociación moderadamente reducida (debido al impedimento estérico reversible del sitio de unión del anticuerpo por el elevado número de cargas activas unidas), pero una vez unidos, el efecto sobre la tasa de disociación era insignificante en comparación con el scFv no modificado (TCT1067), que presentaba una tasa de asociación de $3,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una tasa de disociación de $3,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con una K_d de unión global de 9,5 pM.

Conclusiones generales de scFv (TCT1067)-DM1-dPEG₁₂, datos biofísicos

Las condiciones de conjugación se optimizaron como se ha detallado anteriormente. Esta optimización permitió controlar las reacciones de conjugación para obtener conjugados con DAR intermedias y altas. Los conjugados purificados se concentraron hasta aproximadamente 500 µg/ml en tampón.

- 20 Las técnicas ortogonales usadas para el análisis están de acuerdo y respaldan que una estructura scFv optimizada, ilustrada por scFv (TCT1067), puede cargarse con múltiples fármacos usando residuos de lisina en el anticuerpo y la conjugación puede controlarse para obtener conjugados monoméricos (como se muestra por SEC-HPLC) con la DAR deseada, al mismo tiempo que se conserva la afinidad de unión. En un gel SDS, los conjugados purificados con una DAR intermedia (muestra 1) se desplazaron ligeramente más arriba y estaban más polidispersos, mientras que para la DAR alta (muestra 2) había un claro desplazamiento de migración en el gel, en el que la muestra era claramente de mayor tamaño que el control, scFv no modificado (TCT1067). Estas observaciones fueron corroboradas por la HPLC, en la que las muestras tenían tiempos de retención progresivamente más cortos que el TCT, eluyendo más rápidamente de la columna SEC debido a su tamaño cada vez mayor.

- 30 Ejemplo 71: La bioconjugación de auristatina F con un scFv que tiene un alto contenido de lisina que no está óptimamente dispersado ("no OptiLinked") conduce a la agregación y a proporciones de fármaco:anticuerpo inferiores a las deseadas

- 35 Un scFv basado en el anticuerpo monoclonal panitumumab [SEQ ID NO:5] tiene una alta afinidad [documento US 8227580B2] y posee 8 residuos de lisina que se predice que están expuestos en la superficie, pero no están en una configuración espacial óptima y no están en ubicaciones preferidas en comparación con el ejemplo de scFv (TCT1067), con sólo 4 posiciones similares (véase a continuación). Este scFv de panitumumab (scFv (Pan)) se construyó, expresó y purificó siguiendo la metodología establecida [Bhatti M. *et al.* (2008), 122: 1155] y se utilizó en reacciones de bioconjugación en condiciones idénticas al scFv (TCT1067) utilizando la carga activa de auristatina F. Las condiciones utilizadas fueron:

Tabla 44A. Condiciones de reacción para bioconjugaciones DE AF-C5-NHS

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO filtrado anhidro en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	0,83 mg/ml
Manipulación de AF-C5-NHS	Solución 50 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de AF-C5-NHS	cada 120 min
Porciones de adición de AF-C5-NHS	5 equivalentes

Secuencia de aminoácidos del Fv monocatenario del panitumumab

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHI
 YYSNTNYPNPSLKSRLLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIW
 GQGTMVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQAS
 QDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSRFGSGSGTDFTFTISLQF
 EDIATYFCQHFHDLPLAFGGGKVEIQNGSEQKLISEEDLAAA [SEQ ID NO. 5]

- 5 **Alineación de la secuencia de aminoácidos de scFv (TCT1067), T contra scFv (panitumumab), P.** Los residuos de lisina están en **negrita** y los residuos de lisina en posiciones comunes están subrayados. El panitumumab tiene 8 lisinas que se encuentran en una configuración significativamente diferente a las 12 que están presentes en el scFv (TCT1067).

```

T   QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS--FTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGDSDT
P   QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYS-GNT

T   KYSFSPGQGVTVISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHVDVGYCTDRTCAAWPEWLGV
P   NYNPSLKSRLLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVT-----GAFDI

T   WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPP-SVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY
P   WGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQ--DISNY

T   VSWYQQLPGTAPKLLIYGHNTNRFAGVDFRFGSGSKSCTSASLAISGFRSEDEADYYCASWD
P   LNWYQQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSRFGSGSGTDFTFTISLQFPEDIATYFCQHFH

T   YTLSCGWVFGGGTKLTVL
P   HLP--LAFGGGTVKVEIQ

```

[T = SEQ ID NO. 6; P = SEQ ID NO. 7]

- 10 Las condiciones de reacción de conjugación de DAR baja, intermedia y alta se establecieron como se describe en el ejemplo 67B y los conjugados se analizaron por SDS-PAGE (figura 70), HPLC-SEC (figura 71), análisis de unión Biacore SPR y LC-MS (figura 72). Los resultados se resumen en la tabla 45. En cada caso, se encontró una fracción significativamente mayor de scFv (Pan) agregada y se observó que precipitaba. En condiciones de reacción similares a las utilizadas para el scFv (TCT1067), sólo se observaron DAR bajas con el scFv panitumumab y los intentos de obtener una DAR máxima de 9 dieron lugar a precipitados insolubles. Los conjugados solubles conservaron su función de unión.
- 15 El scFv (TCT1067) conservó su función de unión como también se demostró con la auristatina F (ejemplo 67). La tabla 45 demuestra que se puede obtener una DAR promedio superior con un scFv OptiLinked en condiciones

de conjugación similares (DAR 3,5 frente a DAR 5 y sin conjugado frente a DAR 9) con rendimientos superiores. No hay agregados observables en los conjugados de scFv OptiLinked, a diferencia de los scFv no OptiLinked (figura 71, tabla 45). Esto demuestra que la estructura, el espaciado óptimo y las ubicaciones preferentes son factores clave para una bioconjugación eficaz y que no basta con un alto contenido en lisina.

Tabla 45: Comparación de un scFv "no OptiLinked" (panitumumab) frente a un scFv "OptiLinked" (TCT1067)

Reacción	scFv	Equivalentes molares de auristatina F-C5 NHS utilizados	Distribución de DAR por LC-MS y (DAR media)	Rendimiento	% agregado por HPLC-SEC (figura 71)
1	Panitumumab	5	0,1,2,3,4 (3)	44 %	37 %
2	Panitumumab	10	0,1,2,3,4 ,5 (3.4)	26 %	42 %
3	Panitumumab	25	Ninguno	0 %*	95 %
4	TCT1067	5	0,1,2,3 (2)	65 %	0 %
5	TCT1067	10	2,3,4,5,6,7 (5)	70 %	0 %
6	TCT1067	25	7,8,9,10,11(9)	46 %	0 %
* precipitación observada					

5

Ejemplo 72: Potencia de destrucción celular y especificidad de un scFv de afinidad media y alta conjugado con cargas activas de DAR intermedia y alta

Ejemplo 72A: Conjugados de scFv (TCT)-MMAF-C5, scFv (TCT1067)-MMAF-C5 y trastuzumab-MMAF-C5 (117), DAR 6,5

10 Se prepararon y caracterizaron conjugados de ScFv (TCT)-MMAF-C5, ScFv (TCT1067)-MMAF-C5 y trastuzumab-MMAF-C5 (118) como se describió anteriormente (ejemplo 65) que tuvieron DAR similares a los anteriores. Se cultivó SKBr3, una línea celular de cáncer de mama humana, con altos niveles de expresión de HER2, hasta 1 000 000 de receptores por célula [Lazar G.A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103:4005-4010] en McCoy's 5A/FCS al 10 % (medio completo) a 37 °C, 5 % de CO₂ en atmósfera humidificada. Cuando la confluencia fue del 70-80 %, las células se lavaron con PBS (2 × 10 ml) y se incubaron con tripsina durante 5-7 min. Se añadió McCoy's 5A completo y se resuspendieron las células mediante pipeteo. Las células se recuperaron por centrifugación (2 min, 2000 rpm), el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en McCoy's 5A completo (5 ml). A continuación, se contaron las células con un hemocitómetro y se diluyeron en consecuencia. Se sembraron a 5000 células/pocillo (200 µl) utilizando factor de fijación y se incubaron durante la noche a 37 °C, 5 % de CO₂ en atmósfera humidificada. U87 es una línea celular de glioblastoma que no expresa HER2 [Zitron I.M. *et al.* (2013), BMC Cancer, 13:83] y se cultivó de forma similar, sembrándose a 1000 células/pocillo (utilizando medio DMEM). BT474 es una línea celular de cáncer de mama que expresa HER2 [Brockhoff G. *et al.* (2007), Cell Prolif., 40:488-507] y se cultivó de forma similar, sembrándose a 7500 células/pocillo (utilizando medio RPMI). NCI-N87 es una línea celular de cáncer gástrico que expresa HER2 [Yamashita-Kashima Y. *et al.* (2013), Oncol. Rep., 30:1087-1093] y se cultivó de forma similar, sembrándose a 7500 células/pocillo (utilizando medio RPMI).

Las células fueron expuestas a los diversos ADC diluidos en medios completos por 96 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. La viabilidad celular se midió con el kit de proliferación celular de una solución acuosa Promega Aqueous Cell-titre-96™ (reactivo MTS) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se retiró el medio y se añadieron a las células 100 µl de medio completo sin rojo de fenol, previamente combinado con reactivo MTS (20 µl de reactivo por 100 µl de medio). Las placas se leyeron en un lector de placas ELISA a 490 nm tras una incubación de 2 horas en la oscuridad (5 % de CO₂, 37 °C).

Los datos (unidades de absorción) fueron convertidos a porcentaje de supervivencia celular utilizando los controles no tratados como el 100 % de supervivencia celular y los controles con Triton X-100 como el 100 % de muerte celular. El valor medio de absorción de este último se restó del resto de los datos para obtener una línea de base adecuada. Los promedios se convirtieron en supervivencia y se obtuvieron valores de error estándar para cada valor n (en forma de porcentaje de supervivencia celular). Los datos se representaron gráficamente y ajustaron a una curva sigmoideal logística de 3 parámetros de dosis-respuesta utilizando la ecuación $y = y_0 + \frac{a}{1 + (x/x_0)^b}$, en la que $x_0 = \text{CI50}$ y $x_0 > 0$

y a = 100 utilizando GraphPad Prism. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces para cada compuesto ensayado y se representó gráficamente y ajustó un conjunto o un promedio de los datos para obtener una curva de dosis-respuesta.

- 5 Los datos (figuras 73-76, tabla 46) demuestran que los ADC de scFv (TCT o TCT1067) son específicamente citotóxicos para las células que expresan HER2 con potencias de nM a pM. La DAR alta se traduce en una gran potencia de destrucción celular. El fármaco libre tiene baja potencia y poca especificidad por sí solo (figura 73, tabla 46) debido a la escasa captación celular, y los anticuerpos no conjugados tienen una potencia nula o baja por sí solos (figura 74-75, tabla 46)

Tabla 46: Resumen de la potencia de destrucción celular de los conjugados de scFv (TCT y TCT1067) y trastuzumab MMAF-C5 (compuestos **118**)

SC = Sin citotoxicidad

Muestra	Células SKBr3 (HER2+++)		Células BT474 (HER2++)		Células U87 (HER2 -)	
	CI50 µg/ml	CI50 pM	CI50 µg/ml	CI50 pM	CI50 µg/ml	CI50 pM
scFv (TCT)-MMAF-C5, DAR 6,6	0,087	3,1	0,2	7,14	>5	SC
scFv (TCT1067)-MMAF-C5, DAR 6,4	0,007	250	0,008	286	>5	SC
Trastuzumab-MMAF-C5, DAR 4	0,004	26	0,01	67	>5	SC
Fármaco MMAF libre	SC	SC	-	>10,000	SC	SC
ScFv no conjugado	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Trastuzumab no conjugado	0,6	4000	SC	SC	SC	SC

- 10 Ejemplo 72B: Conjugados de scFv (TCT)-MMAF-C5, scFv (TCT1067)-MMAF-C5 y trastuzumab-MMAF-C5 (118), DAR 8

Los ensayos de destrucción celular se prepararon como se describe en el ejemplo 72A

- 15 Los datos (figuras 73-75 y 77, tabla 47) demuestran que los conjugados de scFv (TCT o TCT1067) son específicamente citotóxicos para las células que expresan HER2 con potencias de nM a pM. La DAR alta se traduce en una gran potencia de destrucción celular. El fármaco libre tiene baja potencia y poca especificidad por sí solo (figura 73, tabla 47) debido a la escasa captación celular, y los anticuerpos no conjugados tienen una potencia de nula a baja por sí solos (figura 74-75, tabla 47).

Tabla 47: Resumen de la potencia de destrucción celular de los conjugados de scFv (TCT y TCT1067) y trastuzumab MMAF-C5 (compuestos **118**)

SC = Sin citotoxicidad

Muestra	Células SKBr3 (HER2+++)		Células BT474 (HER2++)		Células U87 (HER2-)	
	CI50 µg/ml	CI50 pM	CI50 µg/ml	CI50 pM	CI50 µg/ml	CI50 pM
scFv (TCT)-MMAF DAR 8	0,0053	189	0,02	714	SC	SC
scFv (TCT1067)-MMAF DAR 8,7	0,00091	32,5	0,001	35,7	SC	SC

Tabla 47: Resumen de la potencia de destrucción celular de los conjugados de scFv (TCT y TCT1067) y trastuzumab MMAF-C5 (compuestos **118**)

SC = Sin citotoxicidad

Muestra	Células SKBr3 (HER2+++)		Células BT474 (HER2++)		Células U87 (HER2-)	
	CI50 µg/ml	CI50 pM	CI50 µg/ml	CI50 pM	CI50 µg/ml	CI50 pM
Trastuzumab-MMAF, DAR 6	0,0051	34	0,05	336	SC	SC
Fármaco MMAF libre	SC	SC	SC	SC	SC	SC
ScFv no conjugado	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Trastuzumab no conjugado	0,6	4000	SC	SC	SC	SC

Ejemplo 72C: Conjugados de scFv (TCT1067)-P5C5 y trastuzumab-P5C5 (71), DAR 10,6 y 12,5

Los ensayos de destrucción celular se prepararon como se describe en el ejemplo 72A.

5 Los datos (figura 78-80, tabla 48) demuestran que los conjugados de scFv (TCT o TCT1067) son específicamente citotóxicos para las células que expresan HER2 con potencias de nM a pM. La DAR alta se traduce en una gran potencia de destrucción celular. El fármaco libre tiene baja potencia y poca especificidad por sí solo (figura 78-80, tabla 48) debido a la escasa captación celular, y los anticuerpos no conjugados tienen una potencia de nula a baja por sí solos (figura 74-75, tabla 48).

Tabla 48: Resumen de la potencia de destrucción celular de los ADC de scFv (TCT1067) y trastuzumab P5C5 (compuestos **71**)

SC = Sin citotoxicidad, ND = No determinado

Muestra	Células SKBr3 (HER2+++)		Células BT474 (HER2++)		Células U87 (HER2-)	
	CI50 µg/ml	CI50 nM	CI50 µg/ml	CI50 nM	CI50 µg/ml	CI50 nM
scFv (TCT1067)-P5C5 DAR 12,5	0,04	1,42	0,3	10,7	SC	SC
scFv (TCT1067)-P5C5 DAR 10,6	ND	ND	0,5	17,85	SC	SC
Trastuzumab-P5C5, DAR 6	ND	ND	0,2	1,33	SC	SC
Fármaco P5C5 libre	-	>33.000	-	>3300	-	100,00 0
ScFv no conjugado	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Trastuzumab no conjugado	0,6	4	SC	SC	SC	SC

10 Ejemplo 72D: Conjugados de scFv (TCT1067)-auristatina F-C5 a DAR baja, intermedia y alta y conjugados de trastuzumab-auristatina F-C5 (122)

Los ensayos de destrucción celular se prepararon como se describe en el ejemplo 72A. Los datos (figuras 74-75, 81-82, tabla 49) demuestran que los ADC de scFv (TCT1067) fueron específicamente citotóxicos para las células que expresan HER2 con potencias de nM a pM. La DAR alta se traduce en una gran potencia de destrucción celular. El

fármaco libre tiene cierta potencia, pero poca especificidad por sí solo (figura 81, tabla 49) debido a la captación celular inespecífica, y los anticuerpos no conjugados tienen una potencia nula o baja por sí solos (figura 74-75, tabla 49).

Tabla 49: Resumen de la potencia de destrucción celular de los ADC de scFv (TCT1067)-auristatina F-C5 y trastuzumab auristatina F-C5 (compuestos **122**)

SC = Sin citotoxicidad, ND = No determinado

Muestra	Células SKBr3 (HER2+++)		Células BT474 (HER2++)		Células NCI-N874 (HER2++)		Células U87 (HER2 -)	
	CI50 µg/ml	CI50 pM	CI50 µg/ml	CI50 pM	CI50 µg/ml	CI50 pM	CI50 µg/ml	CI50 pM
scFv (TCT1067)-auristatina F-C5, DAR 2,7	0,000 89	31,7	0,001 15	39,2	0,000 87	31,05	SC	SC
scFv (TCT1067)-auristatina F-C5, DAR 6,2	0,001 01	36,1	0,001 12	39,9	0,000 36	12,85	SC	SC
scFv (TCT1067)-auristatina F-C5, DAR 11,8	0,008 44	299	0,010 82	386	0,008 7	310	SC	SC
Trastuzumab-auristatina F-C5, DAR 4,8	0,003 171	21	0,008 193	54,6	0,001 8	6,7	SC	SC
Fármaco auristatina F libre		>5500		>2500		ND		>12,500
ScFv no conjugado	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Trastuzumab no conjugado	0,6	4000	SC	SC	SC	SC	SC	SC

5 Ejemplo 72E: Conjugados de ScFv (TCT1067)-DM1-(dPEG₁₂) y de trastuzumab-DM1-(dPEG₁₂) (124) DAR baja, intermedia y alta

Los ensayos de destrucción celular se prepararon como se describe en el ejemplo 72A

10 Los datos (figuras 74-75, 83-84, tabla 50) demuestran que los conjugados de scFv (TCT o TCT1067) son específicamente citotóxicos para las células que expresan HER2 con potencias de nM a pM. La DAR alta se traduce en una gran potencia de destrucción celular. El fármaco libre tiene cierta potencia, pero poca especificidad por sí solo (figura 83, tabla 50) debido a la captación celular inespecífica, y los anticuerpos no conjugados tienen una potencia nula o baja por sí solos (figura 74-75, tabla 50).

Tabla 50: Resumen de la potencia de destrucción celular de los ADC de scFv (TCT1067)-DM1-(dPEG₁₂) y trastuzumab-DM19(dPEG₁₂) (compuestos **124**) SC = Sin citotoxicidad

Muestra	Células SKBr3 (HER2+++)		Células U87 (HER2-)	
	CI50 µg/ml	CI50 nM	CI50 µg/ml	CI50 nM
scFv (TCT1067)-DM1 DAR 3,5	0,0417	1,49	0,641	22,9
scFv (TCT1067)-DM1 DAR 5,5	0,0078	0,0278	0,419	14,94
scFv (TCT1067)-DM1 DAR 8	0,07606	2,7	0,355	12,66

Tabla 50: Resumen de la potencia de destrucción celular de los ADC de scFv (TCT1067)-DM1-(dPEG₁₂) y trastuzumab-DM19(dPEG₁₂) (compuestos **124**) SC = Sin citotoxicidad

Muestra	Células SKBr3 (HER2+++)		Células U87 (HER2-)	
	CI50 µg/ml	CI50 nM	CI50 µg/ml	CI50 nM
Fármaco DM1 libre	-	47,63	-	50,7
ScFv no conjugado	SC	SC	SC	SC

Ejemplo 72F: Conjugados de ScFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ y de trastuzumab-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉, DAR 9 (121)

Los ensayos de destrucción celular se prepararon como se describe en el ejemplo 72A.

- 5 Los datos (figuras 74-75, 85-86, tabla 51) demuestran que los ADC de scFv (TCT o TCT1067) son específicamente citotóxicos para las células que expresan HER2 con potencias de nM a pM. La DAR alta se traduce en una gran potencia de destrucción celular. La DAR alta se traduce en una gran potencia de destrucción celular. El fármaco libre tiene una potencia baja, pero una especificidad deficiente por sí solo (figura 85, tabla 50) debido a la captación celular inespecífica, y los anticuerpos no conjugados tienen una potencia de nula a baja por sí solos (figura 74-75, tabla 51).

Tabla 51. Resumen de la potencia de destrucción celular de los ADC de scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ y trastuzumab-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ (compuestos **120**) SC = Sin citotoxicidad

Muestra	Células SKBr3 (HER2+++)		Células U87 (HER2-)		Células NCI-N87 (HER2++)	
	CI50 µg/ml	CI50 nM	CI50 µg/ml	CI50 nM	CI50 µg/ml	CI50 nM
scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG ₉ , DAR 9	0,0447 6	1,59	0,1	3,57	0,195	6,947
Trastuzumab-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG ₉ , DAR 4	0,0052	0,035	SC	SC	0,067	0,45
Fármaco MMAE libre	SC	SC	SC	SC	ND	ND
ScFv no conjugado	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Trastuzumab no conjugado	0,6	4	SC	SC	SC	SC

10 Ejemplo 73: Demostración de que las ADC de fragmentos de anticuerpos son altamente potentes a tiempos de incubación más bajos

15 Los ensayos de destrucción celular se configuraron como se describe en el ejemplo 72A, pero el tiempo de incubación se acortó a 4 horas para imitar el tiempo de exposición reducido esperado *in vivo* de los ADC basados en fragmentos de anticuerpos. Se compararon dos conjugados con DAR similares (aproximadamente 5): (1) conjugado de scFv de alta afinidad (TCT1067)-AF-C5, DAR 5,3, (2) conjugado de trastuzumab-AF-C5, DAR 4,8. Los resultados se muestran en la figura 87-88 y en la tabla 52. Una reducción de 24 veces en el tiempo de exposición para el conjugado de scFv (TCT1067)-AF-C5 condujo a una reducción de 2,2 veces en la potencia, mientras que una reducción de 24 veces en el tiempo de exposición para el conjugado de trastuzumab-AF-C5 condujo a una reducción más intensa en la potencia de 4,8 veces. Esto sugiere que la DAR alta en una proteína de menor tamaño conduce a un ADC que mantiene su potencia en condiciones de contacto más cortas con células tumorales.

Tabla 52: Potencia de destrucción celular de los conjugados de scFv (TCT1067)-AF-C5, DAR 5,3 (compuestos **122**) para incubaciones cortas y largas

SC = Sin citotoxicidad

Muestra	Células SKBr3 (HER2+++)	
	CI50 µg/ml	CI50 pM
<i>Auristatina libre, 4 horas</i>	0,00181	>100.000
<i>Auristatina libre, 96 horas</i>	0,00081	>10.000
<i>ScFv (TCT1067)-AF-C5 DAR 5,3, 4 horas</i>	0,00181	64,4
<i>ScFv (TCT1067)-AF-C5 DAR 5,3, 96 horas</i>	0,00081	28,8
<i>Trastuzumab-AF-C5 DAR 4,8, 4 horas</i>	0,0144	93,4
<i>Trastuzumab-AF-C5 DAR 4,8, 96 horas</i>	0,0029	19,3

Ejemplo 74: Demostración de que los conjugados de scFv OptiLinked-fármaco penetran en xenoinjertos tumorales humanos más rápidamente que el conjugado de inmunoglobulina completa-fármaco con cargas equivalentes

- 5 *Ratones.* Las hembras de ratón con inmunodeficiencia combinada grave (Fox Chase SCID®, CB-17/lcr-Prkdcscid/lcrIcoCrl, Charles River Laboratories) tenían doce semanas de edad y un peso corporal (PC) comprendido entre 15,3 y 18,4 gramos el día 1 del estudio. A los animales se les suministró a demanda agua (ósmosis inversa, CI 1 ppm) y pienso Lab Diet® modificado con NIH 31 e irradiado consistente en proteína bruta al 18,0 %, grasa bruta al 5,0 % y fibra bruta al 5,0 %. Los ratones se alojaron en lechos para animales de laboratorio Enrich-o-cobs™ irradiados en microaisladores estáticos con un ciclo de luz de 12 horas a 20-22 °C (68-72 °F) y un 40-60 % de humedad. Charles River Discovery Services North Carolina (CR Discovery Services, que llevó a cabo esta I+D contratada) cumple específicamente con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en lo que respecta a las restricciones, cría, procedimientos quirúrgicos, regulación de alimentos y líquidos y cuidados veterinarios. El programa de cuidado y uso de animales de CR Discovery Services está acreditado por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC), que garantiza el cumplimiento de las normas aceptadas para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

- 20 *Implantación in vivo y crecimiento tumoral.* Los xenoinjertos se iniciaron con carcinomas de mama humanos BT474 mantenidos en CR Discovery Services mediante trasplante subcutáneo en serie en ratones SCID. El día del implante tumoral, cada ratón de prueba recibió un fragmento de BT474 de 1 mm³ implantado subcutáneamente en el flanco derecho, y se controló el crecimiento tumoral a medida que el tamaño medio se aproximaba al intervalo objetivo de 400 a 600 mm³. Cincuenta días después de la implantación del tumor, designado como día 1 del estudio, los animales se volvieron a clasificar en grupos de dos ratones cada uno, con volúmenes tumorales individuales de 405 a 600 mm³ y volúmenes tumorales medios de grupo de 466 a 503 mm³. Los tumores se midieron en dos dimensiones con calibradores y el volumen se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = a^2 \times l/2$$

- 25 en la que a = anchura e l = longitud, en mm, del tumor. El peso del tumor puede calcularse suponiendo que 1 mg equivale a 1 mm³ de volumen tumoral.

- 30 *Agentes terapéuticos (de ensayo).* Todos los agentes de ensayo se prepararon en forma de soluciones de dosificación listas para la administración en concentraciones de 0,625 mg/ml. Todas las soluciones de dosificación almacenaron a 4 °C hasta su administración. Todos los tratamientos se administraron en un volumen de dosificación de 8 ml/kg escalado a los pesos corporales de los animales individuales, dando como resulta una dosis de 5 mg/kg. *Tratamiento.* El día 1 del estudio, ratones SCID hembra portadores de xenoinjertos BT474 establecidos fueron administrados según el plan de tratamiento resumido en la tabla 53. Todos los agentes se administraron por vía intravenosa (i.v.) a través de una inyección en la vena de la cola en una dosis única el día 1.

Tabla 53: Plan de tratamiento para el estudio de captación tumoral mediante conjugados de scFv-P5C5 (71)

Grupo	Agente	Dosis (mg/kg)	Número de dosis	Tumores extirpados después de (horas)
1	Trastuzumab-P5C5	5	1	2
2	scFv (TCT)-P5C5	5	1	2
3	scFv (TCT1067)-P5C5	5	1	2

Finalización. El final del estudio se produjo el día 1, dos horas después de la dosis.

Efectos secundarios relacionados con el tratamiento. Los animales de ensayo se pesaron el día 1. Se observó con frecuencia a los animales para detectar signos evidentes de efectos secundarios adversos relacionados con el tratamiento. La pérdida de peso corporal individual se controló cada dos días y cualquier animal cuyo peso superase los límites de pérdida de peso corporal aceptable recibió eutanasia. La pérdida media de peso corporal del grupo también se controló según el protocolo. La toxicidad aceptable para la dosis máxima tolerada (DMT) se definió como una pérdida de peso corporal media del grupo inferior al 20 % durante el ensayo.

Muestreo. Se recogieron muestras dos horas después de la dosis en el estudio para su posterior análisis. Se extrajo sangre (volumen sanguíneo completo) de todos los animales mediante punción cardíaca terminal con anestesia de isoflurano. Una vez recogidas, las muestras de sangre se procesaron para obtener plasma utilizando heparina de litio como anticoagulante. A continuación, cada muestra de plasma se congeló y almacenó a -80 °C para su análisis. Inmediatamente después de la extracción de sangre, se recogieron los tumores. Los tumores se introdujeron en formol durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente y luego se transfirieron a etanol al 70 %.

A continuación, los tumores se incrustaron en bloques de cera de parafina y se prepararon múltiples portaobjetos con secciones en serie de cada tumor.

Análisis inmunohistoquímicos. Los portaobjetos que contenían secciones tumorales se desparafinizaron incubándolos en xileno durante 2 × 5 minutos, se rehidrataron incubándolos en etanol al 100 % durante 4 × 2 minutos y en agua destilada durante 2 × 5 minutos. Los portaobjetos se escurrieron brevemente colocándolos sobre tejido absorbente y se utilizó un rotulador hidrófobo (un rotulador "PAP") para dibujar un círculo alrededor de cada sección, teniendo cuidado de no tocarla. Cada sección se cubrió con 100-400 µl de solución de bloqueo (BSA al 1 % en TBS) y se incubó durante 1 h en una cámara humidificada. Se retiró la solución de bloqueo y se aplicaron 100-400 µl de anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal anticemadotina de ratón, ejemplo 33, 5 µg/ml) en el tampón de bloqueo y se incubaron durante la noche a 4 °C en una cámara humidificada. A continuación, se retiró la solución de anticuerpos y se lavaron las secciones tres veces en tampón TBS durante 5 minutos cada una, después se añadió la solución de anticuerpos secundarios (conjugado de FITC antirratón de cabra, Thermo-Fisher 62-6511, 1:50 o conjugado de FITC antihumano Thermo-Fisher 054211, 1:20) (en el tampón de bloqueo) y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se retiró la solución de anticuerpos y las secciones se lavaron tres veces en tampón TBS durante 5 minutos cada una. Las secciones se montaron con cubreobjetos utilizando un medio de montaje. Se dejó fraguar el medio de montaje y se observaron los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia, capturándose imágenes digitales.

La figura 89 muestra imágenes representativas de secciones tumorales a las 2 horas posteriores a la administración. Los conjugados de scFv (TCT)-P5C5 de afinidad intermedia y de scFv (TCT1067)-P5C5 de afinidad alta se pueden ver claramente localizados en todo el tumor con alguna tinción perivascular evidente en la muestra de afinidad alta. Se observan muy pocos ADC de trastuzumab en el tumor a las 2 h, como se aprecia por la baja fluorescencia. Esto demuestra una captación tumoral más rápida de un ADC basado en fragmentos, cuando se detecta el componente de carga activa (ADC total).

Ejemplo 75A: Demostración de que los conjugados de scFv OptiLinked-fármaco tienen un perfil farmacocinético plasmático más lento que el de los scFv no modificados en modelos animales de roedores

Ratones. Las hembras de ratón BALB/c (BALB/cAnNCrI, Charles River) tenían ocho semanas de edad y pesaban entre 15,9 y 21,9 gramos al inicio del estudio. A los animales se les suministró a demanda agua (ósmosis inversa, 1 ppm Cl) y pienso Lab Diet® modificado con NIH 31 e irradiado consistente en proteína bruta al 18,0 %, grasa bruta al 5,0 % y fibra bruta al 5,0 %. Los ratones se alojaron en lechos para animales de laboratorio Enrich-o-cobs™ irradiados en microaisladores estáticos con un ciclo de luz de 12 horas a 20-22 °C (68-72 °F) y un 40-60 % de humedad. Charles River Discovery Services North Carolina (CR Discovery Services, que llevó a cabo esta I+D contratada) cumple específicamente con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en lo que respecta a las restricciones, cría, procedimientos quirúrgicos, regulación de alimentos y líquidos y cuidados

veterinarios. El programa de Cuidado y Uso de Animales de CR Discovery Services está acreditado por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, que garantiza el cumplimiento de las normas aceptadas para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

5 *Ratas.* Las ratas macho Sprague-Dawley (procedentes de Charles River, Reino Unido) se alojaron en grupo en una instalación con temperatura y luz controladas en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con comida y agua sin restricciones. Las ratas seleccionadas para su inclusión en el estudio fueron alojadas individualmente hasta la finalización del estudio. Todos los animales fueron sometidos a un control sanitario de acuerdo con las directrices del veterinario registrado en la sede de la empresa *in situ*. Toda la experimentación con animales estaba amparada por la Ley de Animales (Procedimientos Científicos) del Reino Unido (1986) y la Directiva 86/609/CEE de la UE. Todo este trabajo fue supervisado mediante inspecciones periódicas de los procedimientos y las instalaciones por parte del veterinario *in situ* y los inspectores del Ministerio del Interior del Reino Unido. El diseño del estudio requería la implantación quirúrgica de catéteres en la yugular de ratas macho Sprague-Dawley. Se anestesió a las ratas con el anestésico inhalatorio isoflurano y se las colocó en decúbito dorsal. Se expuso la vena yugular derecha y se colocó una ligadura suelta caudalmente y se ligó el extremo craneal de la vena. Se practicó una pequeña incisión entre las ligaduras en la que se introdujo el catéter (tubo de polietileno 50). El catéter se fijó en su sitio atando la ligadura suelta alrededor del vaso cateterizado. Se practicó una pequeña incisión en la región escapular para que sirviera de lugar de salida del catéter. El catéter se tunelizó subcutáneamente y se exteriorizó a través de la incisión escapular. Se comprobó la permeabilidad del catéter, que se llenó con una solución de bloqueo (solución salina heparinizada) y se cerró con un pasador de acero inoxidable. El seguimiento postoperatorio de los animales se realizó de acuerdo con las directrices de buenas prácticas del Ministerio del Interior. La administración intravenosa se realizó a través de la vena caudal.

25 *Agentes terapéuticos (de ensayo).* Todos los agentes de ensayo se suministraron como soluciones de dosificación listas para la administración. Todas las soluciones de dosificación almacenaron a 4 °C hasta su administración. Todos los tratamientos se administraron en un volumen de dosificación escalado a los pesos corporales de los animales individuales para obtener la concentración de dosificación descrita en las tablas de tratamiento.

Tratamiento (ratones). El día 1 del estudio, los ratones se dividieron en grupos de dieciocho ratones cada uno (por agente de ensayo evaluado), y se inició la administración según el plan de tratamiento resumido en las tablas de tratamiento. Todas las dosis se administraron por vía intravenosa (i.v.) mediante inyección en la vena de la cola, tal como se describe en las tablas siguientes.

30 *Tratamiento (ratas).* El día 1 del estudio, las ratas se dividieron en grupos de tres animales (por agente de ensayo evaluado), y se inició la administración según el plan de tratamiento resumido en las tablas siguientes.

Finalización. El final del estudio se produjo después del último punto de muestreo, normalmente el día 2 o 4, veinticuatro o setenta y dos horas después de la dosis.

35 *Efectos secundarios relacionados con el tratamiento.* Los animales de experimentación se pesaron dos veces el día 1. Se observó con frecuencia a los animales para detectar signos evidentes de efectos secundarios adversos relacionados con el tratamiento. La pérdida de peso corporal individual se controló cada dos días y cualquier animal cuyo peso superase los límites de pérdida de peso corporal aceptable recibió eutanasia. También se controló la pérdida media de peso corporal del grupo. La toxicidad aceptable para la dosis máxima tolerada (DMT) se definió como una pérdida de peso corporal media del grupo inferior al 20 % durante el ensayo.

40 *Muestreo (ratones).* Se recogió sangre (volumen sanguíneo completo) de tres animales por grupo de tratamiento y por punto temporal. Se recogieron muestras de todos los animales mediante punción cardíaca terminal con anestesia de isoflurano. Una vez recogidas, las muestras de sangre se introdujeron en tubos de recogida que contenían heparina de litio o K2EDTA como anticoagulantes y se procesaron para obtener plasma en cada punto temporal. Cada muestra de plasma se almacenó a -80 °C hasta su utilización para el análisis.

45 *Muestreo (ratas).* Se recogieron muestras seriadas de sangre venosa (aprox. 0,1-0,2 ml) a través del catéter exteriorizado de la vena yugular en los puntos temporales (de 0,5 a 72 h después de la dosis) y se introdujeron en recipientes heparinizados. Antes de tomar las muestras de sangre, se vació el catéter de solución salina heparinizada para evitar la dilución de la muestra de sangre. Después de cada muestra de sangre, el volumen de sangre extraído se sustituye por un volumen igual de solución salina heparinizada a través del catéter y se cierra herméticamente. Las muestras de sangre se centrifugaron (5 minutos, 16 100 g, 4 °C) para separar el plasma. Las muestras de plasma se transfirieron a recipientes frescos y se congelaron y almacenaron rápidamente a -20 °C hasta su utilización para el análisis.

55 *Cuantificación de los agentes de ensayo en plasma.* Se realizó un ELISA como se describe en el ejemplo 31. Los anticuerpos detectores fueron (a) marcador anti-T7 para detectar el scFv (anticuerpo total), (b) anti-Fab humano específico para detectar trastuzumab (anticuerpo total), (c) anti-MMAF (Concortis), anti-MMAE (Concortis), anti-DM1 (Concortis) y anticemadotina (anticuerpo monoclonal de ratón propio, ejemplo 33 que también reconocía P5C5 y auristatinaF), ADC total. Los agentes de ensayo de referencia se utilizaron para construir una curva de calibración con la que se compararon las muestras de plasma, con el fin de cuantificar la cantidad presente. La concentración se

representó gráficamente frente al tiempo (promedio de tres animales con error estándar) y se ajustó a una curva de decaimiento de 2 fases utilizando GraphPad Prism para obtener los parámetros cinéticos.

Ejemplo 75B: Análisis farmacocinéticos de conjugados de ScFv (TCT)-MMAF-C5, de trastuzumab-MMAF-C5 (118) y anticuerpos no conjugados en ratones

- 5 Se prepararon ratones, se trataron y se analizó el plasma como se describe en el ejemplo 75A. La pauta posológica y el de muestreo figura en la tabla 54.

Tabla 54: Dosis y análisis farmacocinéticos de compuestos de scFv (TCT)-MMAF-C5, trastuzumab-MMAF-C5 (compuestos 118) y anticuerpos no conjugados en ratones

Agente de ensayo	Dosis administrada	Tiempos de muestreo (horas)	Análisis
scFv (TCT)-MMAF-C5	1 x 5 mg/kg	0,5, 1, 2, 4, 8, 24	ELISA anticarga activa
			Marcador de ELISA anti-T7
Trastuzumab-MMAF-C5	1 x 5 mg/kg	1, 2, 6, 24, 48, 72	ELISA anti-IgG humana
			ELISA anticarga activa
scFv (TCT)	1 x 5 mg/kg	2, 4, 6, 24	Marcador de ELISA anti-T7

- 10 El gráfico farmacocinético se muestra en la figura 90 y los parámetros farmacocinéticos derivados se muestran en la tabla 55. El scFv (TCT) se depura rápidamente de la circulación, mientras que el ADC de trastuzumab IgG se depura mucho más lentamente, como era de esperar. Inesperadamente, el conjugado de scFv (TCT)-MMAF-C5 se depura más lentamente que el fragmento no modificado a pesar de la elevada carga activa, lo que indica que la elevada DAR que permite la conjugación de OptiLink no conduce a la agregación *in vivo* ni a una rápida depuración a través del sistema retículoendotelial. La depuración más lenta del conjugado de scFv (TCT)-MMAF-C5 conduce a una exposición sanguínea significativa (como ilustra el área bajo la curva ("area under the curve", AUC) de depuración) que, a su vez, conduce a una exposición tumoral significativa y eficaz. Los conjugados de MMAF también presentaron un menor volumen de distribución en comparación con el scFv no modificado, lo que condujo a una biodisponibilidad 14 veces mayor. Los conjugados de scFv (TCT)-MMAF-C5 se detectaron en el plasma a través de su marcador T7 (que detecta el anticuerpo total) y a través de la carga activa (que detecta el ADC total). Los conjugados de trastuzumab-MMAF-C5 se detectaron en el plasma utilizando Fab antihumano (que detecta el anticuerpo total) y a través de la carga activa (que detecta el ADC total). Las líneas de depuración de los conjugados de scFv (TCT)-MMAF fueron muy similares, lo que sugiere que los conjugados de scFv (TCT)-MMAF-C5 eran estables en plasma y que se estaba produciendo una desconjugación insignificante.

Tabla 55: Parámetros farmacocinéticos de conjugados de scFv (TCT)-MMAF-C5, trastuzumab-MMAF-C5 (compuestos 117) y anticuerpos no conjugados en ratones *Calculado a partir del AUC media en la detección de anticuerpos anticarga activa y antiproteína (µg/ml)

Agente de ensayo	Semivida de eliminación (horas)	Biodisponibilidad (exposición en sangre, AUC, 24 h)*
	Anticuerpo total	ADC totales
scFv (TCT)-MMAF-C5	2,84	2,78
Trastuzumab-MMAF-C5	20,11	24,93
scFv (TCT)	2,78	-

- 25 Ejemplo 75C: Análisis farmacocinéticos de conjugados de scFv (TCT1067)-MMAF-C5, de trastuzumab-MMAF-C5 (118) y anticuerpos no conjugados en ratones

Se prepararon ratones, se trataron y se analizó el plasma como se describe en el ejemplo 75A. La pauta posológica y el de muestreo figura en la tabla 56.

Tabla 56: Dosis y análisis farmacocinéticos de compuestos de scFv (TCT)-MMAF-C5, trastuzumab-MMAF-C5 (compuestos 118) y anticuerpos no conjugados en ratones

Agente de ensayo	Dosis administrada	Tiempos de muestreo (horas)	Análisis
scFv (TCT1067)-MMAF-C5	1 x 5 mg/kg	0,5, 1, 2, 4, 8, 24	ELISA anticarga activa
			Marcador de ELISA anti-T7
Trastuzumab-MMAF-C5	1 x 5 mg/kg	1, 2, 6, 24, 48, 72	ELISA anti-IgG humana
			ELISA anticarga activa
scFv (TCT1067)	1 x 5 mg/kg	0,5, 1, 2, 4, 8, 24	Marcador de ELISA anti-T7

- 5 El gráfico farmacocinético se muestra en la figura 91 y los parámetros farmacocinéticos derivados se muestran en la tabla 57. El scFv (TCT1067) se depura rápidamente de la circulación, mientras que el ADC de trastuzumab IgG se depura mucho más lentamente, como era de esperar. Inesperadamente, el conjugado de scFv (TCT1067)-MMAF-C5 se depura más lentamente que el fragmento no modificado a pesar de la elevada carga activa, lo que indica que la elevada DAR que permite la conjugación de OptiLink no conduce a la agregación *in vivo* ni a una rápida depuración a través del sistema retículoendotelial. La depuración más lenta del conjugado de scFv (TCT1067)-MMAF-C5 conduce a una exposición sanguínea significativa (como ilustra el área bajo la curva (AUC) de depuración), mostrando un aumento de 15,5 veces en la biodisponibilidad, lo que a su vez conduce a una exposición tumoral significativa y eficaz.
- 10 Los conjugados de MMAF-C5 también presentaron un menor volumen de distribución en comparación con el scFv no modificado, lo que condujo a una mayor biodisponibilidad. Los conjugados de scFv (TCT1067)-MMAF-C5 se detectaron en el plasma a través de su marcador T7 (que detecta el anticuerpo total) y a través de la carga activa (que detecta el ADC total). Los conjugados de trastuzumab-MMAF-C5 se detectaron en el plasma utilizando Fab antihumano (que detecta el anticuerpo total) y a través de la carga activa (que detecta el ADC total). Las líneas de depuración de los conjugados de scFv (TCT1067)-MMAF-C5 fueron muy similares, lo que sugiere que los conjugados de scFv (TCT1067)-MMAF-C5 eran estables en plasma y se producía una desconjugación insignificante.
- 15

Tabla 57: Parámetros farmacocinéticos de conjugados de scFv (TCT)-MMAF-C5, trastuzumab-MMAF-C5 (compuestos 118) y anticuerpos no conjugados en ratones *Calculado a partir del AUC media en la detección de anticuerpos anticarga activa y antiproteína (µg/ml)

Agente de ensayo	Semivida de eliminación (horas)	Biodisponibilidad (exposición en sangre, AUC, 24 h)*	
	Anticuerpo total	ADC totales	
scFv (TCT1067)-MMAF-C5	3,34	2,62	126
Trastuzumab-MMAF-C5	20,11	24,93	1890
scFv (TCT1067)	1,05	-	8,12

- 20 Ejemplo 75D: Análisis farmacocinéticos de conjugados de scFv (TCT)-P5C5, de trastuzumab-P5C5 (71) y anticuerpos no conjugados en ratones

Se prepararon ratones, se trataron y se analizó el plasma como se describe en el ejemplo 75A. La pauta posológica y el programa de muestreo se muestra en la tabla 58.

Tabla 58: Dosis y análisis farmacocinéticos de compuestos de scFv (TCT)-P5C5, trastuzumab-P5C5 (compuestos 71) y anticuerpos no conjugados en ratones

Agente de ensayo	Dosis administrada	Tiempos de muestreo (horas)	Análisis
scFv (TCT)-P5C5	1 x 5 mg/kg	0,5, 1, 2, 4, 8, 24	ELISA anticarga activa y marcador de ELISA anti-T7
Trastuzumab-P5C5	1 x 5 mg/kg	1, 2, 6, 24, 48, 72	ELISA anti-IgG humana y ELISA anticarga activa
scFv (TCT)	1 x 5 mg/kg	2, 4, 6, 24	Marcador de ELISA anti-T7

El gráfico farmacocinético se muestra en la figura 92 y los parámetros farmacocinéticos derivados se muestran en la tabla 59. El scFv (TCT) se depura rápidamente de la circulación, mientras que el ADC de trastuzumab IgG se depura mucho más lentamente, como era de esperar. Inesperadamente, el conjugado de scFv (TCT)-P5C5 se depura más lentamente que el fragmento no modificado a pesar de la elevada carga activa, lo que indica que la elevada DAR que permite la conjugación de OptiLink no conduce a la agregación *in vivo* ni a una rápida depuración a través del sistema reticuloendotelial. La depuración más lenta del conjugado de scFv (TCT)-P5C5 conduce a una exposición sanguínea significativa (como ilustra el aumento de 74 veces en el área bajo la curva (AUC) de depuración), que a su vez conduce a una exposición tumoral significativa y efectiva. Los conjugados de P5C5 también presentaron un menor volumen de distribución en comparación con el scFv no modificado, lo que condujo a una mayor biodisponibilidad. Los conjugados de scFv (TCT)-P5C5 se detectaron en el plasma a través de su marcador T7 (que detecta el anticuerpo total) y a través de la carga activa (que detecta el ADC total). Los conjugados de trastuzumab-P5C5 se detectaron en el plasma utilizando Fab antihumano (que detecta el anticuerpo total) y a través de la carga activa (que detecta el ADC total). Las líneas de depuración de los conjugados de scFv (TCT)-P5C5 fueron muy similares, lo que sugiere que los conjugados de scFv (TCT)-P5C5 eran estables en plasma y que se estaba produciendo una desconjugación insignificante.

Tabla 59: Parámetros farmacocinéticos de conjugados de scFv (TCT1067)-P5C5, trastuzumab-P5C5 (compuestos 71) y anticuerpos no conjugados en ratones *Calculado a partir del AUC media en la detección de anticuerpos anticarga activa y antiproteína ($\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$)

Agente de ensayo	Semivida de eliminación (horas)		Biodisponibilidad (exposición en sangre, AUC, 24 h)*
	Anticuerpo total	ADC totales	
scFv (TCT)-P5C5	4,69	4,99	215,35
Trastuzumab-P5C5	17,3	ND	>150
scFv (TCT)	2,78		2,91

Ejemplo 75E: Conjugados de scFv (TCT1067)-auristatina F-C5, de trastuzumab-auristatina F-C5 (122) y anticuerpos no conjugados en ratones

Se prepararon ratones, se trataron y se analizó el plasma como se describe en el ejemplo 75A. La pauta posológica y el programa de muestreo se muestra en la tabla 60.

Tabla 60: Dosis y análisis farmacocinéticos de conjugados de scFv (TCT1067)-AF-C5, trastuzumab-AF-C5 (compuestos **122**) y anticuerpos no conjugados en ratones

Agente de ensayo	Dosis administrada	Tiempos de muestreo (horas)	Análisis
scFv (TCT1067)-AF-C5	1 x 2 mg/kg	0,5, 1, 2, 4, 8, 24	ELISA anticarga activa
			Marcador de ELISA anti-T7
scFv (TCT1067)	1 x 2 mg/kg	0,5, 1, 2, 4, 8, 24	Marcador de ELISA anti-T7

El gráfico farmacocinético se muestra en la figura 93 y los parámetros farmacocinéticos derivados se muestran en la tabla 61. El scFv (TCT1067) se depura rápidamente de la circulación. Inesperadamente, el conjugado de scFv (TCT1067)-AF-C5 se depura más lentamente que el fragmento no modificado a pesar de la elevada carga activa, lo que indica que la elevada DAR que permite la conjugación de OptiLink no conduce a la agregación *in vivo* ni a una rápida depuración a través del sistema retículoendotelial. La depuración más lenta del conjugado de scFv (TCT1067)-AF-C5 conduce a una exposición sanguínea significativa (como ilustra el área bajo la curva (AUC) de depuración), mostrando una biodisponibilidad 3,5 veces mayor, lo que a su vez conduce a una exposición tumoral significativa y eficaz. Los conjugados de auristatinaF también tuvieron un menor volumen de distribución en comparación con el scFv no modificado, lo que condujo a una mayor biodisponibilidad. Los conjugados de scFv (TCT1067)-AF-C5 se detectaron en el plasma a través de su marcador T7 (que detecta el anticuerpo total) y a través de la carga activa (que detecta el ADC total). Las líneas de depuración de los conjugados de scFv (TCT1067)-AF-C5 fueron muy similares, lo que sugiere que los conjugados de scFv (TCT1067)-AF-C5 eran estables en plasma y se producía una desconjugación insignificante.

ND = no determinado

Tabla 61: Parámetros farmacocinéticos de conjugados de scFv (TCT1067)-AF-C5, trastuzumab-AF-C5 (compuestos **122**) y anticuerpos no conjugados en ratones

*Calculado a partir del AUC media en la detección de anticarga y antiproteína (µgh/ml)			
Agente de ensayo	Semivida de eliminación (horas)	Biodisponibilidad (exposición en sangre, AUC, 24 h)*	
	Anticuerpo total	ADC totales	
scFv (TCT1067)-AF-C5	0,92	0,85	27,6
scFv (TCT1067)	1,05		8,13

Ejemplo 75F: Conjugados de scFv (TCT1067)-DM1(PEG12), de trastuzumab-DM1(PEG12) (124) y anticuerpos no conjugados en ratones

Se prepararon ratones, se trataron y se analizó el plasma como se describe en el ejemplo 75A. La pauta posológica y el programa de muestreo se muestra en la tabla 61.

Tabla 61: Análisis farmacocinéticos y de dosis de scFv (TCT1067)-DM1(dPEG₁₂) (compuesto **124**) y scFv no conjugado en ratones

Agente de ensayo	Dosis administrada	Tiempos de muestreo (horas)	Análisis
scFv (TCT1067)-DM1(dPEG ₁₂)	1 x 2 mg/kg	0,5, 1, 2, 4, 8, 24	ELISA anticarga activa y marcador de ELISA anti-T7

Tabla 61: Análisis farmacocinéticos y de dosis de scFv (TCT1067)-DM1(dPEG₁₂) (compuesto **124**) y scFv no conjugado en ratones

Agente de ensayo	Dosis administrada	Tiempos de muestreo (horas)	Análisis
scFv (TCT1067)	1 x 2 mg/kg	0,5, 1, 2, 4, 8, 24	Marcador de ELISA anti-T7

El gráfico farmacocinético se muestra en la figura 94 y los parámetros farmacocinéticos derivados se muestran en la tabla 62. El scFv (TCT1067) se depura rápidamente de la circulación. Inesperadamente, el conjugado de scFv (TCT1067)-DM1(dPEG₁₂) se depura más lentamente que el fragmento no modificado a pesar de la elevada carga activa, lo que indica que la elevada DAR que permite la conjugación de OptiLink no conduce a la agregación *in vivo* ni a una rápida depuración a través del sistema reticuloendotelial. La depuración más lenta del conjugado de scFv (TCT1067)-DM1(dPEG₁₂) conduce a una exposición sanguínea significativa (como ilustra el área bajo la curva (AUC) de depuración), mostrando una biodisponibilidad 3 veces mayor, lo que a su vez conduce a una exposición tumoral significativa y eficaz. El conjugado de DM1(dPEG₁₂) también tuvo un menor volumen de distribución en comparación con el scFv no modificado, lo que condujo a una mayor biodisponibilidad. Los conjugados de scFv (TCT1067)-DM1 (dPEG₁₂) se detectaron en el plasma a través de su marcador T7 (que detecta el anticuerpo total) y a través de la carga activa (que detecta el ADC total). Las líneas de depuración de los conjugados de scFv (TCT1067)-DM1(dPEG₁₂) fueron muy similares, lo que sugiere que los conjugados de scFv (TCT1067)-DM1(dPEG₁₂) eran estables en plasma y que se producía una desconjugación insignificante.

Tabla 62: Parámetros farmacocinéticos de los conjugados de scFv (TCT1067)-DM1(dPEG₁₂), trastuzumab-DM1(dPEG₁₂) (compuestos **124**) y anticuerpos no conjugados en ratones

*Calculado a partir del AUC media en la detección de anticarga y antiproteína (µg/ml)

Agente de ensayo	Eliminación (horas)	semivida	Biodisponibilidad (exposición en sangre, AUC 24 h)*
	Anticuerpo total	ADC totales	
scFv (TCT1067)-DM1(dPEG ₁₂)	0,92	1,53	22,15
scFv (TCT1067)	1,05	-	8,13

Ejemplo 75G: Conjugado de scFv (TCT1067)-P5C5 (71) y anticuerpo no conjugado en ratas

Las ratas fueron preparadas, tratadas y el plasma analizado como se describe en el ejemplo 75A. La pauta posológica y el programa de muestreo se muestra en la tabla 63.

Tabla 63: Análisis farmacocinético y de dosis del scFv (TCT1067)-P5C5 (compuesto **71**) y del anticuerpo no conjugado en ratas

Agente de ensayo	Dosis administrada	Tiempos de muestreo (horas)	Análisis
scFv (TCT1067)-P5C5	1 x 4 mg/kg	0,5, 1, 2, 4, 8, 24	ELISA anticarga activa
			Marcador de ELISA anti-T7
scFv (TCT1067)	1 x 4 mg/kg	0,5, 1, 2, 4, 8, 24	Marcador de ELISA anti-T7

El gráfico farmacocinético se muestra en la figura 95 y los parámetros farmacocinéticos derivados se muestran en la tabla 64. El scFv (TCT1067) se depura rápidamente de la circulación, mientras que el ADC de trastuzumab IgG se

depura mucho más lentamente, como era de esperar. Inesperadamente, el conjugado de scFv (TCT1067)-P5C5 se depura más lentamente que el fragmento no modificado a pesar de la elevada carga activa, lo que indica que la elevada DAR que permite la conjugación de OptiLink no conduce a la agregación *in vivo* ni a una rápida depuración a través del sistema retículoendotelial. La depuración más lenta del conjugado de scFv (TCT1067)-P5C5 conduce a una exposición sanguínea significativa (como ilustra el área bajo la curva (AUC) de depuración), mostrando una biodisponibilidad 4,5 veces mayor, lo que a su vez conduce a una exposición tumoral significativa y eficaz. El conjugado de P5C5 también tuvo un menor volumen de distribución en comparación con el scFv no modificado, lo que condujo a una mayor biodisponibilidad. El conjugado de scFv (TCT1067)-P5C5 se detectó en el plasma a través de su marcador T7 (que detecta el anticuerpo total) y a través de la carga activa (que detecta el ADC total). Las líneas de depuración de los conjugados de scFv (TCT1067)-P5C5 fueron muy similares, lo que sugiere que los conjugados de scFv (TCT1067)-P5C5 eran estables en plasma y se producía una desconjugación insignificante. La orina de los animales tratados se recogió durante 24 horas, se concentró en 10 veces en un centrifugador (MWCO: 10 kDa) y se dializó frente a PBS. Estas muestras, procedentes de tres ratas por grupo, se analizaron en un chip SPR Biacore. Los datos demostraron (figuras 95B y C) que había una actividad de unión comparable en las muestras de scFv libre en comparación con las muestras de conjugado de scFv-P5C5, lo que sugiere que el scFv y los conjugados se depuran en cierta medida a través de los riñones, lo que deja intactas las proteínas y sus conjugados.

Tabla 64: Parámetros farmacocinéticos del conjugado de scFv (TCT1067)-P5C5 (compuesto 71) y del anticuerpo no conjugado en ratas

*Calculado a partir del AUC media en la detección de anticarga y antiproteína (µgh/ml)

Agente de ensayo	Semivida de eliminación (horas)		Biodisponibilidad (exposición en sangre, AUC 24 h)*
	Anticuerpo total	ADC totales	
scFv (TCT1067)-P5C5	0,512	2,2085	90,1
scFv (TCT1067)	0,8		20,46

Ejemplo 76: Estudios de regresión o erradicación tumoral en modelos de xenoinjertos tumorales humanos con conjugados de scFv OptiLink-fármaco en comparación con conjugados de inmunoglobulina completa-fármaco con carga activa equivalente y con controles.

Ratones. Los ratones hembra con inmunodeficiencia combinada grave (Fox Chase SCID®, CB-17/lcr-Prkdcscid/lcrcoCrl Charles River Laboratories) tenían doce semanas de edad y un peso corporal (PC) de 15,3 a 18,4 gramos el día 1 del estudio. A los animales se les suministró a demanda agua (ósmosis inversa, Cl 1 ppm) y pienso Lab Diet® modificado con NIH 31 e irradiado consistente en proteína bruta al 18,0 %, grasa bruta al 5,0 % y fibra bruta al 5,0 %. Los ratones se alojaron en lechos para animales de laboratorio Enrich-o'cobs™ irradiados en microaisladores estáticos con un ciclo de luz de 12 horas a 20-22 °C (68-72 °F) y un 40-60 % de humedad. Charles River Discovery Services North Carolina (CR Discovery Services, que llevó a cabo esta I+D contratada) cumple específicamente con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en lo que respecta a las restricciones, cría, procedimientos quirúrgicos, regulación de alimentos y líquidos y cuidados veterinarios. El programa de Cuidado y Uso de Animales de CR Discovery Services está acreditado por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC), que garantiza el cumplimiento de las normas aceptadas para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Implantación *in vivo* y crecimiento tumoral. Los xenoinjertos se iniciaron con (a) carcinomas de mama humanos BT474 mantenidos en CR Discovery Services mediante trasplante subcutáneo en serie en ratones SCID. El día del implante tumoral, cada ratón de ensayo recibió un fragmento de BT474 de 1 mm³ implantado subcutáneamente en el flanco derecho, y se controló el crecimiento tumoral a medida que el tamaño promedio se aproximaba al intervalo diana de 110 a 144 mm³. Cincuenta días después de la implantación del tumor, designado como día 1 del estudio, los animales se volvieron a clasificar en seis grupos formados cada uno por dos ratones con volúmenes tumorales individuales de 110 a 144 mm³ y volúmenes tumorales medios de grupo de 115 a 118 mm³. (b) Los xenoinjertos se iniciaron con una suspensión celular de células tumorales NCI-N87 implantadas por vía subcutánea en el flanco derecho, y se controló el crecimiento tumoral a medida que el tamaño promedio se aproximaba al intervalo diana de 110 a 144 mm³. Los tumores se midieron en dos dimensiones con calibradores y el volumen se calculó mediante la fórmula:

Volumen tumoral (mm³) = anchura² × longitud/2

en la que la anchura y la longitud del tumor están en mm. El peso del tumor puede estimarse suponiendo que 1 mg equivale a 1 mm³ de volumen tumoral.

Agentes terapéuticos y tratamiento. Todos los agentes de ensayo se suministraron como soluciones de dosificación listas para la administración y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización. Todos los tratamientos se administraron en un volumen de dosificación ajustado al peso corporal de cada animal para alcanzar la concentración de dosificación descrita en las respectivas tablas de tratamiento. Todos los agentes se administraron por vía intravenosa (i.v.) mediante inyección en la vena caudal.

Finalización. El estudio continuó durante 90 días o hasta que los tumores alcanzaron un tamaño máximo de 1.000 mm³.

Efectos secundarios relacionados con el tratamiento. Los animales de ensayo se pesaron el día 1. Se observó con frecuencia a los animales para detectar signos evidentes de efectos secundarios adversos relacionados con el tratamiento. La pérdida de peso corporal individual se controló cada dos días y cualquier animal cuyo peso superase los límites de pérdida de peso corporal aceptable recibió eutanasia. La pérdida media de peso corporal del grupo también se controló según el protocolo. La toxicidad aceptable para la dosis máxima tolerada (DMT) se definió como una pérdida de peso corporal media del grupo inferior al 20 % durante el ensayo.

Ejemplo 76A: Inhibición o erradicación del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto BT474 con conjugados de scFv (TCT1067)-MMAF-C5, de trastuzumab-MMAF-C5 (117) y agentes terapéuticos de MMAF libre

Los tumores BT474 se prepararon como se describe en el ejemplo 76. El plan de tratamiento para este experimento se describe en la tabla 65

Tabla 65: Plan de tratamiento para scFv (TCT1067)-MMAF-C5 (compuesto 118) comparado con trastuzumab-MMAF-C5 de referencia

n.º	Agente terapéutico o control	Dosis administrada (mg/kg)	Pauta	Número de dosis
1	Vehículo (solución salina)	8 ml vol	Cada dos días	12
2	MMAF libre	1	Cada dos días	12
3	scFv (TCT1067)-MMAF-C5	0,05	Cada dos días	12
4	scFv (TCT1067)-MMAF-C5	0,5	Cada dos días	12
5	scFv (TCT1067)-MMAF-C5	2	Cada dos días	12
6	Trastuzumab-MMAF-C5	5	Una vez por semana	4
7	Trastuzumab-MMAF-C5	1	Una vez por semana	4

El volumen tumoral (mm³) se representó gráficamente en función del tiempo (figura 96) y el cambio de peso corporal de los animales (%) se representó gráficamente en función del tiempo (figura 96). El control de referencia (trastuzumab-MMAF-C5) se administró a 5 mg/kg, así como la dosis más baja de 1 mg/kg, a intervalos semanales. Anteriormente se había demostrado que un ADC muy similar era muy eficaz [Zimmerman E.S. *et al.* (2014), Bioconj. Chem., 25:351-361]. Los conjugados de scFv (1067)-MMAF-C5 de alta afinidad se administraron con mayor frecuencia para tener en cuenta la depuración farmacocinética más rápida con tres dosis.

Los resultados demuestran que existe una evidente relación de dosis-respuesta con todos los ADC con la pauta posológica de scFv (TCT1067)-MMAF-C5 2 mg/kg que conduce a curas completas (100 %) (duraderas hasta casi 90 días) al día 30. La pauta posológica de scFv (TCT1067)-MMAF-C5 0,5 mg/kg también condujo a curaciones completas (100 %) (alcanzadas a los 90 días). Se observó una respuesta similar, como era de esperar, con la pauta posológica de trastuzumab-MMAF-C5 5 mg/kg. Sin embargo, la capacidad de proporcionar más carga activa con el ADC de scFv (TCT1067)-MMAF-C5, hizo que los tumores se redujeran más rápidamente, aproximadamente el doble que con el ADC de trastuzumab-MMAF-C5. Los tumores de los grupos de animales tratados con solución salina (vehículo) y carga activa libre crecieron rápidamente. El tratamiento con scFv (TCT1067)-MMAF-C5 pareció ser mejor tolerado, como se desprende del aumento del peso corporal, siendo el grupo de ratones con ADC de fragmentos de anticuerpo hasta un 15 % más pesado que el grupo de ratones con ADC de IgG-MMAF-C5. Una estimación del índice terapéutico

para el scFv (TCT1067)-MMAF-C5 es de al menos 40 (al menos 2 mg/kg, dosis máxima tolerada/0,05 mg/kg dosis mínima eficaz), en comparación con un valor aproximado de aproximadamente 5 para el ADC de trastuzumab.

Ejemplo 76B: Inhibición o erradicación del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto BT474 con conjugados de scFv (TCT)-MMAF-C5, de trastuzumab-MMAF-C5 (compuesto 118) y agentes terapéuticos de MMAF libre

- 5 Los tumores BT474 se prepararon como se describe en el ejemplo 76. El plan de tratamiento para este experimento se describe en la tabla 66.

Tabla 66: Plan de tratamiento para scFv (TCT)-MMAF-C5(118) comparado con trastuzumab-MMAF-C5 de referencia

n.º	Agente terapéutico o control	Dosis administrada (mg/kg)	Pauta	Número de dosis
1	Vehículo (solución salina)	8 ml vol	Cada dos días	12
2	MMAF libre	1	Cada dos días	12
3	scFv (TCT)-MMAF-C5	0,5	Cada dos días	12
4	scFv (TCT)-MMAF-C5	2	Cada dos días	12
5	Trastuzumab-MMAF-C5	1	Una vez por semana	4
6	Trastuzumab-MMAF-C5	5	Una vez por semana	4

- 10 El volumen tumoral (mm³) se representó gráficamente en función del tiempo (figura 97) y el cambio de peso corporal de los animales (%) se representó gráficamente en función del tiempo (figura 97). El control de referencia (trastuzumab-MMAF-C5) se administró a 5 mg/kg, dosis que previamente ha demostrado ser muy eficaz, así como la dosis más baja de 1 mg/kg, a intervalos semanales. Los conjugados de scFv (TCT)-MMAF-C5 de afinidad intermedia se administraron con mayor frecuencia para tener en cuenta la depuración farmacocinética más rápida con tres dosis más bajas. Los datos del ejemplo 74A se incluyen como comparación.

- 15 Los resultados demuestran que existe una evidente relación de dosis-respuesta con todos los ADC con la pauta posológica de scFv (TCT)-MMAF-C5 2 mg/kg que conduce a curas completas (100 %) (duraderas hasta casi 90 días) al día 30. Se observó una respuesta similar a la esperada con la pauta posológica de trastuzumab-MMAF-C5 5 mg/kg. Sin embargo, la capacidad de proporcionar más carga activa con el ADC de scFv (TCT)-MMAF-C5 hizo que los tumores se redujeran más rápidamente. Los tumores de los grupos de animales tratados con solución salina (vehículo) y carga activa libre crecieron rápidamente. El tratamiento con scFv (TCT)-MMAF-C5 pareció ser mejor tolerado, como se desprende del aumento del peso corporal, siendo el grupo de ratones con ADC de fragmentos de anticuerpo hasta un 20 % más pesado que el grupo de ratones con ADC de trastuzumab-MMAF-C5. A pesar de la diferencia de 1000 veces en la afinidad de unión (ejemplo 63) entre los dos ADC de fragmentos de anticuerpos, las pautas posológicas de 2 mg/kg condujeron a respuestas similares y rápidas, lo que sugiere que la afinidad de unión no es un factor crítico (aunque debe haber una afinidad mínima), pero la alta carga activa y la rápida penetración conducen a una alta eficacia.
- 20 Con la dosis más baja de 0,5 mg/kg de scFv (TCT)-MMAF-C5, las respuestas son inferiores a las del scFv de mayor afinidad, en el que los tumores comienzan a rebrotar en el día 40, con una tasa de curación del 50 %
- 25

Ejemplo 76C: Inhibición o erradicación del crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto BT474 con conjugados de scFv (TCT1067)-P5C5 y de trastuzumab-P5C5 (compuestos 71)

- 30 Los tumores BT474 se prepararon como se describe en el ejemplo 76. El plan de tratamiento para este experimento se describe en la tabla 67.

Tabla 67: Plan de tratamiento para scFv (TCT1067)-P5C5 comparado con trastuzumab-P5C5 de referencia (compuestos 71)

n.º	Agente terapéutico o control	Dosis administrada (mg/kg)	Pauta	Número de dosis
1	Vehículo (solución salina)	8 ml vol	Cada dos días	12

Tabla 67: Plan de tratamiento para scFv (TCT1067)-P5C5 comparado con trastuzumab-P5C5 de referencia (compuestos 71)

n.º	Agente terapéutico o control	Dosis administrada (mg/kg)	Pauta	Número de dosis
2	scFv (TCT1067)-P5C5	5	Cada dos días	12
3	Trastuzumab-P5C5	5	Una vez por semana	4

El volumen tumoral (mm³) se representó gráficamente en función del tiempo (figura 98) y el cambio de peso corporal de los animales (%) se representó gráficamente en función del tiempo (figura 98). El control de referencia (trastuzumab-P5C5) se administró a 5 mg/kg, dosis que previamente ha demostrado ser muy eficaz, así como la dosis más baja de 1 mg/kg, a intervalos semanales. Los conjugados de scFv (TCT1067)-P5-C5 de alta afinidad se administraron con mayor frecuencia para tener en cuenta la depuración farmacocinética más rápida con tres dosis más bajas.

La pauta posológica de scFv (TCT1067)-MMAF 2 mg/kg que condujo a curas completas (100 %) también se muestra para comparación. La pauta posológica de scFv (TCT1067)-P5C5 5 mg/kg produjo un retraso del crecimiento tumoral de aproximadamente 20 días, mientras que la pauta posológica de trastuzumab-P5C5 5 mg/kg produjo un retraso del crecimiento marginal e insignificante. Por lo tanto, la capacidad de proporcionar más carga activa con el ADC de scFv (TCT1067)-P5C5, dio lugar, con mayor frecuencia, a que los tumores se redujeran más eficazmente que el ADC de trastuzumab-P5C5. Los tumores de los grupos de animales tratados con solución salina (vehículo) y carga activa libre crecieron rápidamente. El tratamiento con scFv (TCT1067)-P5C5 pareció ser mejor tolerado, como se desprende del aumento del peso corporal, siendo el grupo de ratones con ADC de fragmentos de anticuerpo hasta un 20 % más pesado que el grupo de ratones con ADC de trastuzumab-P5-C5.

Ejemplo 76D: Inhibición o erradicación del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano BT474 con conjugados de scFv (TCT1067) con dos DAR diferentes

Los tumores BT474 se prepararon como se describe en el ejemplo 76. El plan de tratamiento para este experimento se describe en la tabla 68.

Tabla 68: Plan de tratamiento para los conjugados de scFv (TCT1067)-auristatina F-C5 (compuestos 122) en dos DAR

n.º	Agente terapéutico o control	Dosis administrada (mg/kg)	Pauta	Número de dosis
1	Vehículo (solución salina)	8 ml	Cada 4 días	4
2	scFv (TCT1067)-AF-C5 (L)	5	Cada 4 días	4
3	scFv (TCT1067)-AF-C5 (M)	5	Cada 4 días	4

El volumen tumoral (mm³) se representó gráficamente en función del tiempo (figura 99) y el cambio de peso corporal de los animales (%) se representó gráficamente en función del tiempo (figura 99). Se administraron 4 dosis de los conjugados de scFv (1067)-AF-C5 de alta afinidad con una DAR baja (L) (2,7) e intermedio (M) (5,7). La pauta posológica de scFv (TCT1067)-AF 5 mg/kg condujo a curaciones completas (100 %) al día 45, con una pauta posológica menos frecuente y menos dosis en comparación con los ejemplos 76A y 76B. El conjugado con DAR más alta fue más eficaz. Los tumores del grupo de animales tratados con solución salina (vehículo) crecieron rápidamente. Ambos conjugados parecieron ser bien tolerados, como se observa por el aumento del peso corporal.

Ejemplo 76E: Inhibición o erradicación del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano BT474 con conjugados de scFv (TCT1067)-AF-C5 con tres DAR diferentes

Los tumores BT474 se prepararon como se describe en el ejemplo 76. El plan de tratamiento para este experimento se describe en la tabla 69.

Tabla 69: Plan de tratamiento para los conjugados scFv (TCT1067)-auristatina F-C5 (compuestos **122**) en tres DAR

n.º	Agente terapéutico o control	Dosis administrada (mg/kg)	Pauta	Número de dosis
1	Vehículo (solución salina)	8 ml	Cada 4 días	2
2	scFv (TCT1067)-AF-C5 (L)	5	Cada 4 días	2
3	scFv (TCT1067)-AF-C5 (M)	5	Cada 4 días	2
3	scFv (TCT1067)-AF-C5 (H)	5	Cada 4 días	2

El volumen tumoral (mm³) se representó gráficamente frente al tiempo (figura 100). Los conjugados de scFv (1067)-AF de alta afinidad con una DAR baja (L) (2,7), intermedia (M) (5,7) y alta (H) (11) recibieron 2 dosis. En el momento de esta solicitud, el conjugado con mayor DAR era más eficaz para provocar la regresión tumoral.

- 5 Ejemplo 76F: Conjugados de scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉, de trastuzumab-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ (121) y MMAE libre en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano NCI-N87

Los tumores NCI-N87 se preparan como se describe en el ejemplo 76. El plan de tratamiento para este experimento se describe en la tabla 64.

Tabla 70: Plan de tratamiento para scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ comparado con trastuzumab-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG₉ de referencia (compuestos **121**)

n.º	Agente terapéutico o control	Dosis administrada (mg/kg)	Pauta	Número de dosis
1	Vehículo (solución salina)	8 ml	Cada 4 días	8
2	scFv (TCT1067)-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG ₉	5	Cada 4 días	8
3	Trastuzumab-MMAE-PAB-Cit-Val-dPEG ₉	5	Una vez por semana	4

- 10 Ejemplo 77: Bioconjugación de un derivado de TCO con un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario de alta afinidad con múltiples residuos de lisina en la superficie y bien dispersos para una reacción de "click" de tetrazina de 2 etapas

Se conjugó TCO-PEG4-NHS (adquirido en Jena Biosciences) con scFv (TCT) para obtener 1 conjugado (compuesto 134) con DAR intermedias. Las condiciones identificadas y utilizadas fueron:

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO filtrado anhidro en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml
Manipulación de TCO-PEG4-NHS	Solución 100 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %

Tipo	Condición
Tasa de adición de TCO-PEG4-NHS	cada 120 min
Porciones de adición de TCO-PEG4-NHS	8 equivalentes

Las reacciones se llevaron a cabo según el ejemplo 64A.

En este ejemplo, la configuración fue:

Reacción 1: scFv (TCT): TCO-PEG4-NHS, 16 equivalentes.

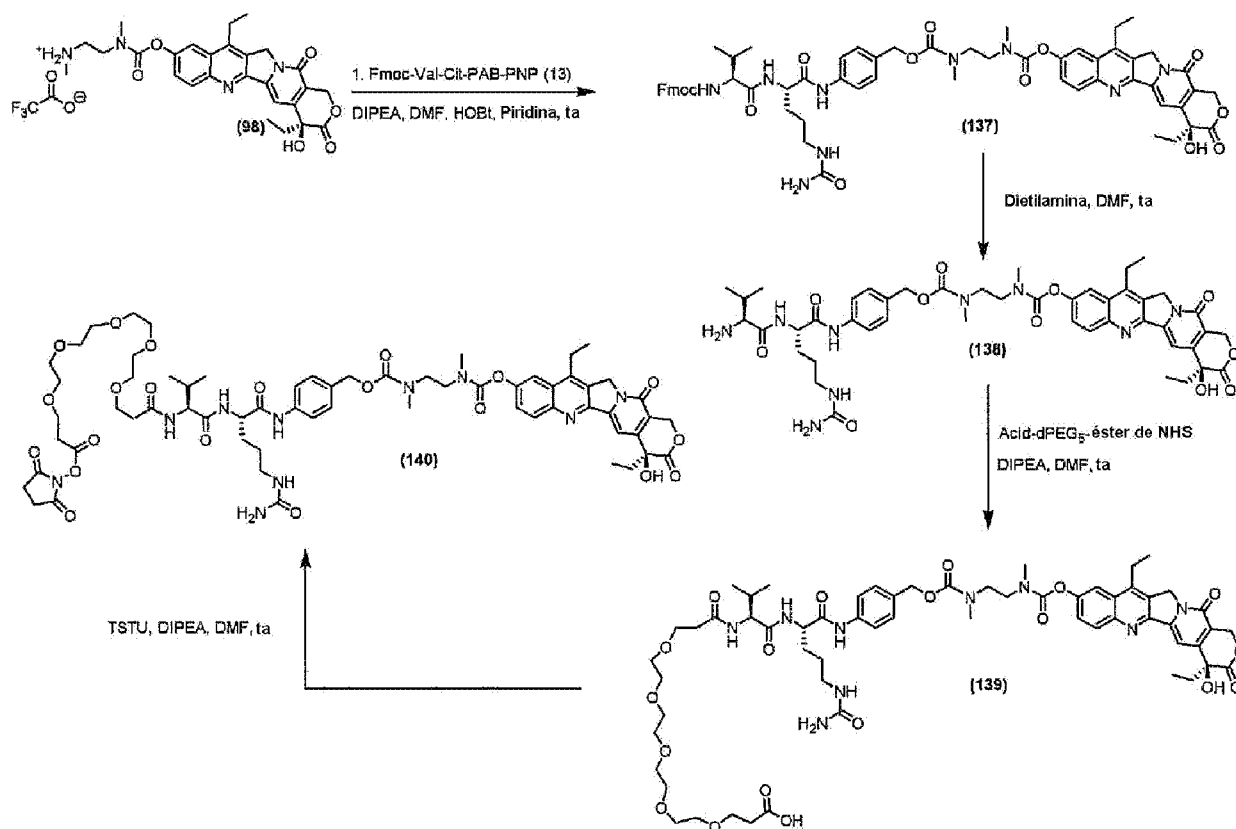
- 5 No se apreciaron precipitados visibles y la recuperación de la muestra fue alta. La muestra se analizó mediante SDS-PAGE (figura 101) y LCMS (figura 102).

En la figura 102 se muestran los cromatogramas y espectros de LCMS, corriente iónica total (TIC) y los datos desconvolucionados.

- 10 Se observó un pico principal en el TIC de la muestra de scFv (TCT)-TCO-PEG4 que eluía a 12,3 min. El espectro de masas desconvolucionado a carga cero para este pico produjo picos a m/z 30956 y 31372 correspondientes a la masa teórica del scFv junto con 7 y 8 adiciones de la molécula de TCO-PEG4. Por lo tanto, el conjugado (compuesto 134) tenía una DAR promedio de 7,5.

Una carga de conector terminado en tetrazina, tal como el MMAF (117), puede conjugarse posteriormente en una segunda etapa para formar un conjugado de anticuerpo-fármaco (135).

- 15 Ejemplo 78: Preparación de SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG₅-éster de NHS (140)



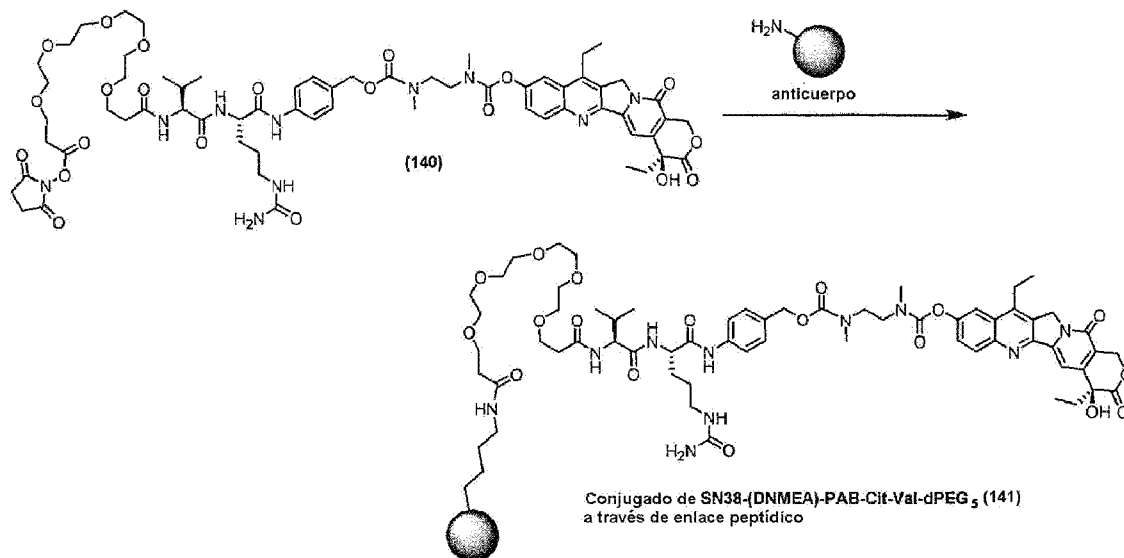
20 A una solución agitada de DNMEA-SN38 98 (80 mg, 0,13 mmol) y Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP 13 (0,14 g, 0,19 mmol) en DMF (2 ml) se le añadió HOBT (34 mg, 0,25 mmol), piridina (52 µl) y DIPEA (22 µl). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N₂ a temperatura ambiente durante 24 h. Los disolventes se evaporaron al vacío y el residuo resultante se utilizó directamente para la siguiente etapa. HRMS: ESI m/z Encontrado 1135,0803 [$M+H$]⁺ calculado 1135,2650 para C₆₁H₆₈N₉O₁₃.

Una solución de Fmoc-Val-Cit-PAB-DNMEA-SN38 137 (90 mg, 0,08 mmol) en DMF (1,5 ml) y dietilamina (0,4 ml) se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se concentró al vacío y se utilizó directamente sin más purificación. HRMS: ESI m/z Encontrado 913,0200 $[M+H]^+$ calculado 913,0220 para $C_{46}H_{58}N_9O_{11}$.

- 5 A una solución de H-Val-Cit-PAB-DNMEA-SN38 138 (70 mg, 0,08 mmol) en DMF (3 ml) se le añadió DIPEA (40 μ l) y ácido-dPEG₅-NHS (40 mg, 0,09 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N₂ durante 16 h. Los disolventes se evaporaron al vacío y el compuesto bruto obtenido se utilizó directamente para la siguiente etapa. HRMS: ESI m/z Encontrado 1233,2537 $[M+H]^+$ calculado 1233,3600 para $C_{60}H_{82}N_9O_{19}$.

- 10 A una solución de ácido-dPEG₅-Val-Cit-PAB-DNMEA-SN38 (90 mg, 0,07 mmol) en DMF (3 ml) se le añadió DIPEA (63 μ l) y TSTU (44 mg, 0,14 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de N₂ durante 3 h. Los disolventes se evaporaron al vacío y el producto bruto se purificó en el sistema de purificación rápido Biotage utilizando una columna C18 para obtener el compuesto deseado NHS-dPEG₅-Val-Cit-PAB-DNMEA-SN38 140. HRMS: ESI m/z Encontrado 1330,3479 $[M+H]^+$ calculado 1330,4300 para $C_{64}H_{85}N_{10}O_{21}$

- 15 Ejemplo 79: Bioconjugación de un derivado de SN-38 con un conector escindible por proteasas sobre un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario de alta afinidad con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos



Se conjugó SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG₅-éster de NHS (140) con scFv (TCT1067) para obtener conjugados (141) con diversas DAR.

Las condiciones utilizadas para las conjugaciones fueron:

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO filtrado anhidro en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	1 mg/ml
Manipulación de SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG ₅ -NHS	Solución 50 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG ₅ -NHS	cada 90 min

Tipo	Condición
Porciones de adición de SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG ₅ -NHS	5 equivalentes para la reacción 1; 10 equivalentes para la reacción 2; 12,5 equivalentes para las reacciones 3 y 4.

Las reacciones se llevaron a cabo como se detalla en el ejemplo 64A.

En este ejemplo, la configuración fue:

Reacción 1: scFv (TCT1067): SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG₅-NHS, 5 equivalentes

Reacción 2: scFv (TCT1067): SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG₅-NHS, 10 equivalentes

Reacción 3: scFv (TCT1067): SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG₅-NHS, 25 equivalentes

Reacción 4: scFv (TCT1067): SN38-(DNMEA)-PAB-Cit-Val-dPEG₅-NHS, 35 equivalentes

Los scFv no conjugados y conjugados (TCT1067) se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño HPLC (figura 103) y SDS PAGE (figura 104). El scFv tiene un tiempo de retención de 18,4 minutos, lo que corresponde a un Pm de aproximadamente 30 kDa. Los conjugados eluyeron ligeramente antes, a los 18,1 min para la reacción 1, 17,8 min para la reacción 2, 16,9 min para la reacción 3 y 16,8 min para la reacción 4, lo que indica un peso molecular más elevado (debido a las diferentes cargas de fármaco). Los conjugados también mostraron (en el mismo tiempo de retención) una absorción significativa a 360 nm, un pico de absorción característico del fármaco que está ausente en el control de scFv no conjugado. Los agregados que se forman pueden retirarse. Las DAR de las muestras purificadas se calcularon mediante espectroscopia de absorción UV/vis, utilizando el coeficiente de extinción para el fármaco a 370 nm ($17\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y 280 nm ($4700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y para el anticuerpo a 280 nm ($70\,735\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las DAR calculadas fueron de 2,9, 4,6 y 6,4 para las muestras 1, 2 y 3, respectivamente. Para las muestras 1 y 2, el gel SDS PAGE mostró una banda polidispersa con un peso molecular superior al scFv.

Ejemplo 80: Bioconjugación de auristatina-C5-NHS con un fragmento de diacuerpo de alta afinidad con múltiples residuos de lisina en la superficie bien dispersos

Se conjugó AF-C5-éster de NHS (88) con un diacuerpo (TCT) y como control con scFv (TCT) para obtener conjugados (compuesto 122) con diversas DAR.

Las condiciones de reacción utilizadas fueron las siguientes:

Tipo	Condición
Tampón	Tampón bicarbonato con NaCl 150 mM a pH 8,8
Codisolvente	DMSO filtrado anhidro en una concentración final del 20 % (v/v)
Temperatura	20 °C
Agitación	Thermomixer 1000 rpm
Concentración de anticuerpo	0,71 mg/ml
Manipulación de AF-C5-NHS	Solución 50 mM en DMSO anhidro filtrado al 100 %
Tasa de adición de AF-C5-NHS	cada 90 min
Porciones de adición de AF-C5-NHS	7,5 equivalentes

Las reacciones se llevaron a cabo como se detalla en el ejemplo 64A.

En este ejemplo, la configuración fue:

Reacción 1: diacuerpo (TCT): AF-C5-NHS, 30 equivalentes;

Reacción 2: scFv (TCT): AF-C5-NHS, 15 equivalentes;

El gel SDS PAGE de la figura 105 que se desarrolla bajo condiciones reductoras muestra el díacuerpo no conjugado y el scFv no conjugado desplazándose con al mismo peso molecular como se esperaba. Los conjugados, 1 y 2 se desplazan ligeramente más arriba que los anticuerpos no conjugados. Los dos conjugados tienen el mismo peso molecular, lo que indica que los dos anticuerpos se han conjugado igual de bien.

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende un agente terapéutico acoplado a una molécula portadora, con una proporción de acoplamiento mínima de 5:1; en el que la molécula portadora es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre scFv, Fv, Fab, Fab-SH, dsFv, bs-scFv, di-scFv (también conocidos como bi-scFv), diacuerpos y TandAbs, en el que el fragmento de anticuerpo no incluye todos los dominios de un anticuerpo completo; y en el que los agentes terapéuticos están acoplados a un residuo de aminoácido lisina; y en el que el agente terapéutico no es un agente fotosensibilizante; y además en el que el agente terapéutico se selecciona entre cernadotina, P5-C5, doxorubicina, elipticina, MMAE, maitansinas, MMAF, auristatinas, dolastatinas y un inhibidor de topoisomerasas.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene una CI50 de 100 nM o inferior; y/o
 - en el que el compuesto tiene una CI50 al menos 10 veces inferior a la del agente terapéutico cuando no está conjugado; y/o
 - en el que el compuesto tiene una semivida en suero de al menos 2 horas; opcionalmente, la semivida en suero de al menos 2 horas se mide en ratones o en seres humanos; y/o
 - en el que el compuesto tiene una semivida en suero de al menos el 50 % de la del anticuerpo libre cuando no está conjugado; y/o
 - en el que el compuesto tiene una solubilidad de al menos 1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato a temperatura ambiente; y/o
 - en el que el compuesto tiene una solubilidad de al menos 1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato a temperatura ambiente en presencia de un excipiente en una concentración y de un tipo aprobados por la FDA, opcionalmente en el que el excipiente es hasta un 0,5 % de polisorbato, un 1 % de glicerol, un 0,5 % de glicina, un 0,1 % de histidina, un 0,5 % de clorobutanol, un 5 % de propilenglicol, un 2 % de alcohol bencílico, un 0,05 % de ácido octanoico y/o un 0,1 % de N-acetilriptófano; y/o
 - en el que el compuesto tiene un nivel de agregación de hasta el 5 % en solución salina tamponada con fosfato a temperatura ambiente.
3. Un compuesto según cualquier reivindicación anterior, en el que los agentes terapéuticos, cuando se acoplan a la molécula portadora, están separados por una distancia de al menos dos aminoácidos (de 3,5 a 7,5 angstroms); opcionalmente, en el que los agentes terapéuticos, cuando están acoplados a la molécula portadora, están separados por una distancia de dos aminoácidos (de 3,5 a 7,5 angstroms), tres aminoácidos de 9 a 12 angstroms), cuatro aminoácidos (de 10 a 15 angstroms), cinco aminoácidos (de 15 a 20 angstroms) o seis aminoácidos (de 20 a 25 angstroms).
4. Un compuesto según cualquier reivindicación anterior, en el que los agentes terapéuticos están directamente acoplados a la molécula portadora en el aminoácido, opcionalmente en el que el acoplamiento directo al aminoácido es a través de un éster de N-hidroxisuccinimida.
5. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los agentes terapéuticos están acoplados a la molécula portadora en el aminoácido a través de una maleimida.
6. El compuesto de cualquier reivindicación anterior, en el que la molécula portadora se une selectivamente a una diana, opcionalmente en el que la diana es una célula diana o una molécula diana extracelular, opcionalmente en el que la molécula portadora, al unirse a una célula diana, se internaliza en la célula; opcionalmente en el que la molécula portadora, tras unirse a la diana, se desacopla del agente terapéutico.
7. El compuesto de cualquier reivindicación anterior, en el que la molécula portadora está humanizada o es humana; y/o en el que la molécula portadora se une específicamente a HER2, EGFR, HER3, MUC1, EpCAM, CEA, fibronectina-EDB, CD19, CD20, CD22, LeY, CD30, CD33, CD79b, GPNMB, PSMA, CD56, CD37, receptor de folato, CA6, CD27L, MUC16, CD66e, CD74, Trop-2 o guanilato ciclasa.
8. El compuesto de cualquier reivindicación anterior, en el que el inhibidor de topoisomerasas se selecciona entre SN-38 y camptotecinas.
9. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la molécula portadora es un scFv y el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en cernadotina, doxorubicina, elipticina, MMAE, P5-C5, una maitansina y MMAF.
10. El compuesto de la reivindicación 9, en el que el scFv se une específicamente a HER2, opcionalmente en el que el scFv tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.
11. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 5 12. Un compuesto o una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el diagnóstico, el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, opcionalmente en la que la enfermedad se selecciona entre cáncer, tumores benignos, enfermedades infecciosas, incluidas infecciones bacterianas, víricas, fúngicas, por tripanosomas, nematodos y priones, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunitarias, opcionalmente en el que el cáncer se selecciona entre cáncer de colon, pulmón, mama, cabeza/cuello, próstata, piel, estómago/gastrointestinal, glioma de vejiga, renal, de ovario, tiroides y hueso.
- 10 13. Un proceso de fabricación de un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las etapas de:
- (i) proporcionar un agente terapéutico;
- (ii) proporcionar una molécula portadora;
- (iii) conjugar el agente terapéutico y la molécula portadora en presencia de al menos un disolvente aprótico polar y un tampón acuoso; opcionalmente
- 15 en el que dicho al menos un disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO); acetonitrilo; N,N-dimetilformamida (DMF); HMPA; dioxano; tetrahydrofurano (THF); glima y diglima; 2-butanona (MEK); sulfolano; nitrometano; N-metilpirrolidona; piridina; y acetona; y/o
- en el que la etapa de conjugación del agente terapéutico y la molécula portadora se realiza a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 37 °C; y/o
- en el que la etapa de conjugación del agente terapéutico y la molécula portadora se realiza a un pH comprendido entre 6,0 y 10,0; y/o
- 20 en el que la etapa de conjugación del agente terapéutico y la molécula portadora se lleva a cabo durante un tiempo comprendido entre 0,1 horas y 48 horas; y/o
- comprendiendo además la etapa de:
- (v) combinar el compuesto con un portador farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica.
- 25

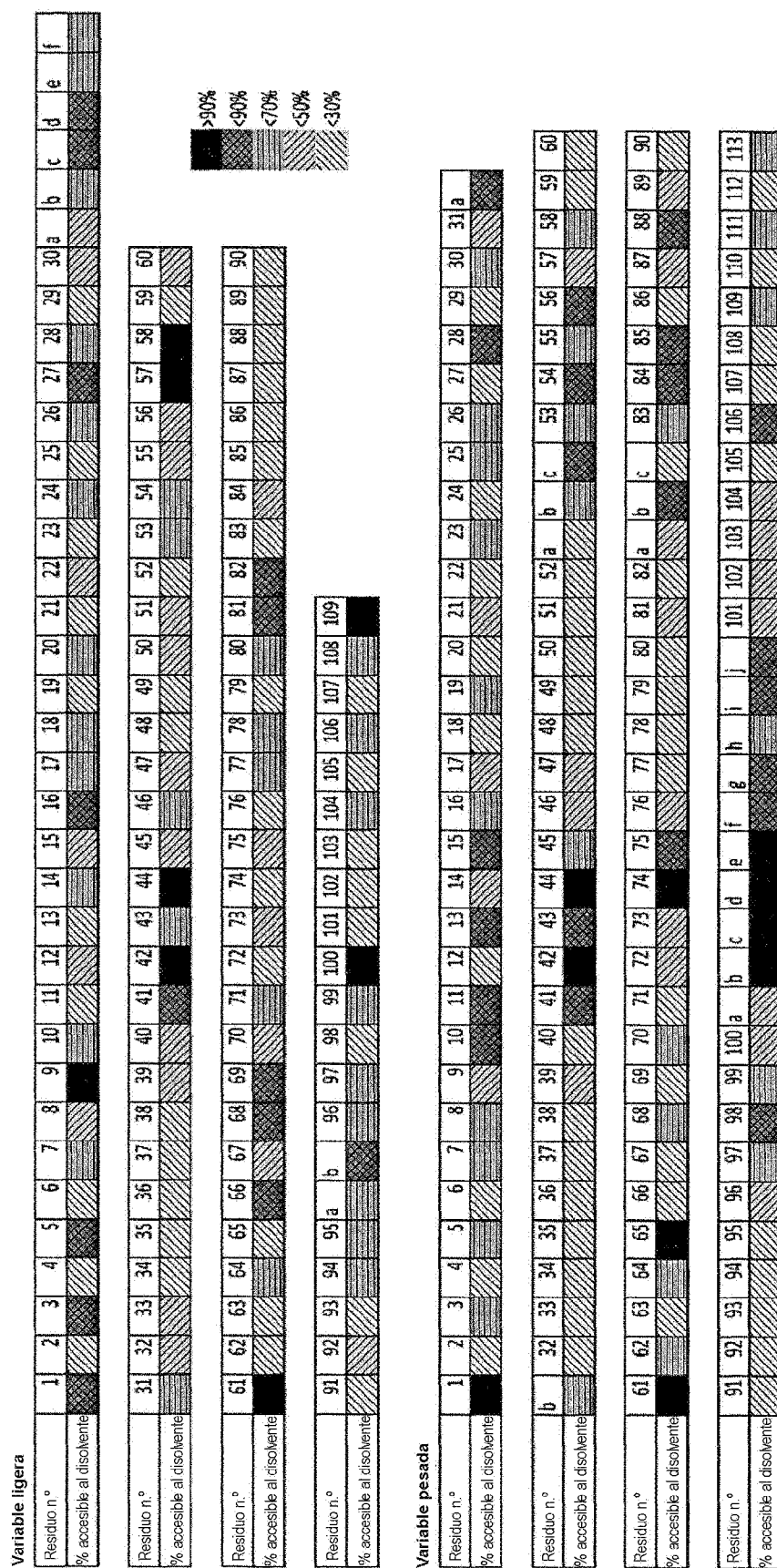


Figura 1

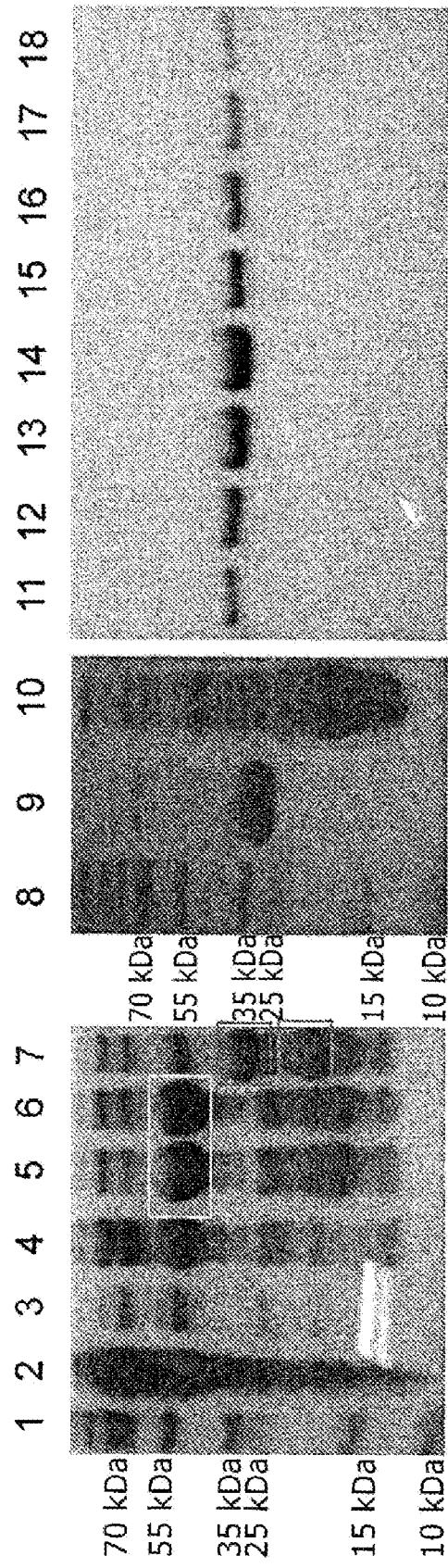


Figura 2

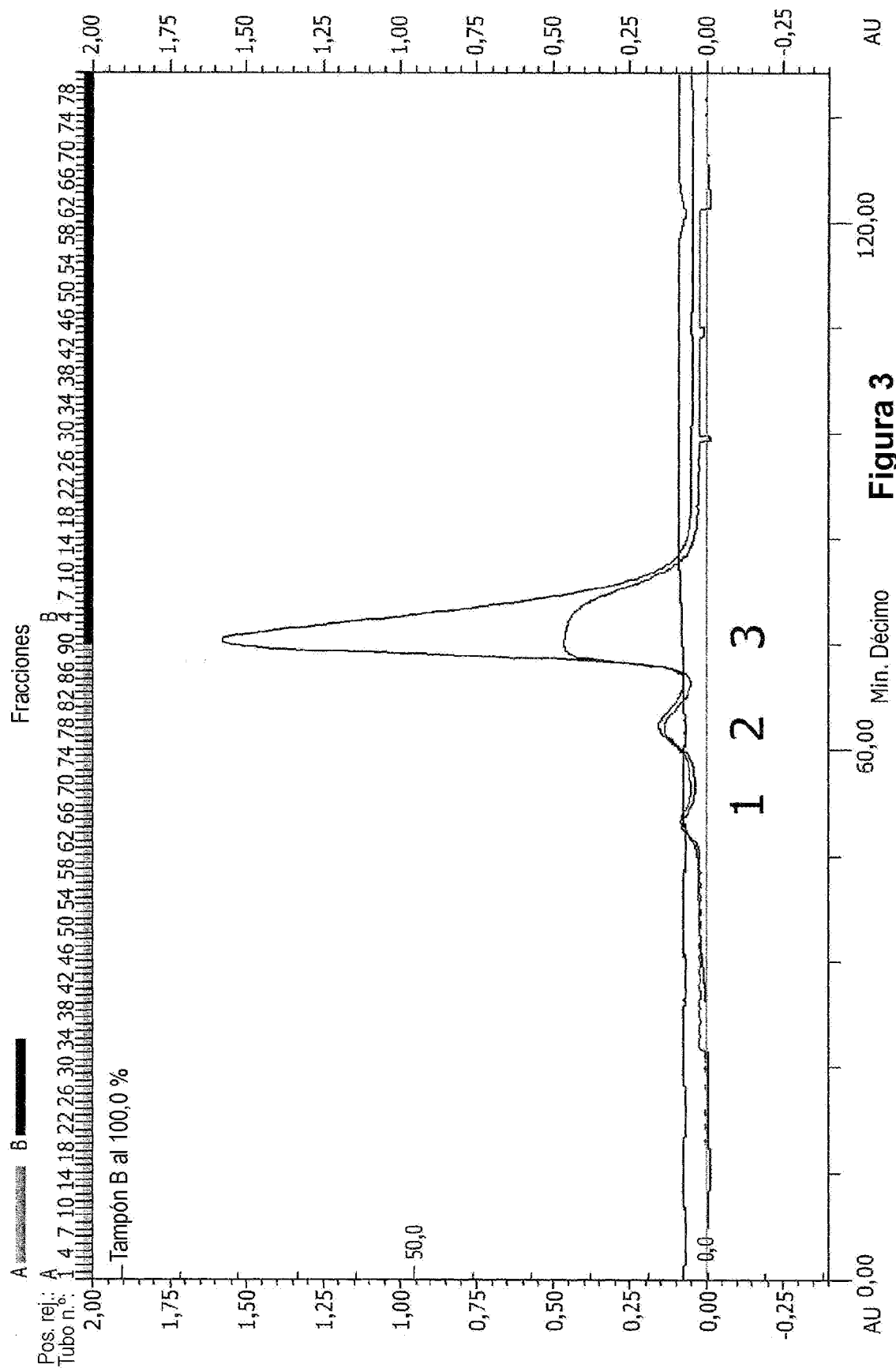


Figura 3

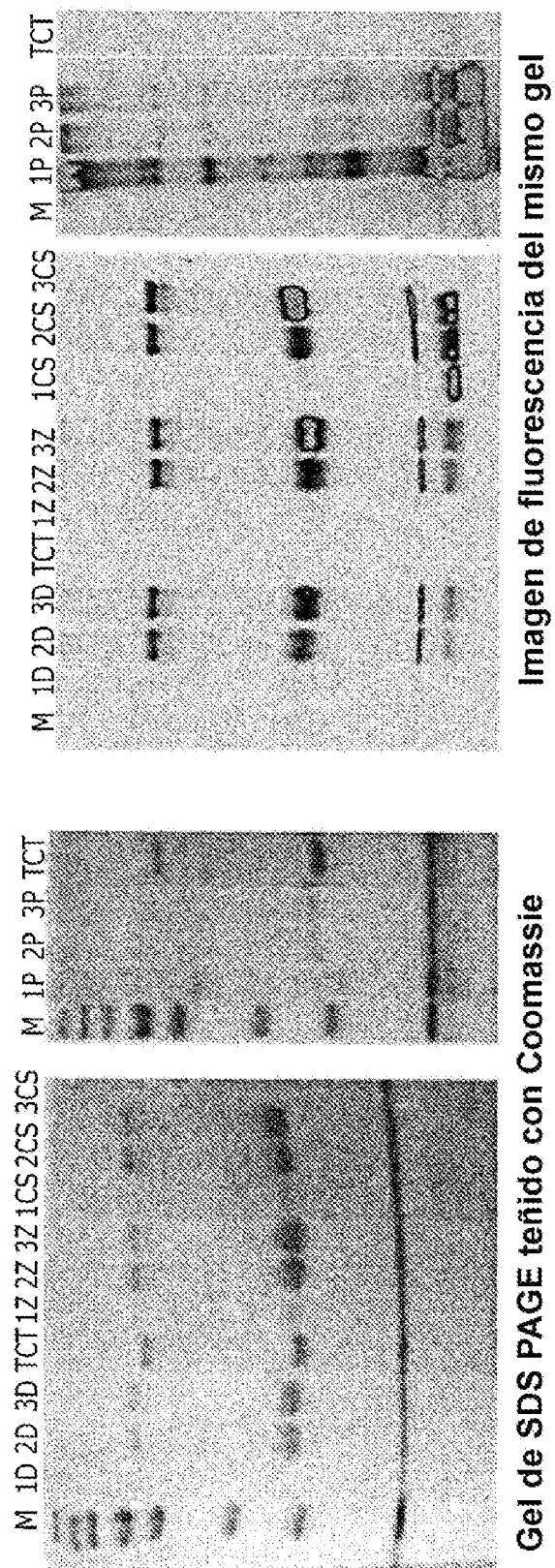
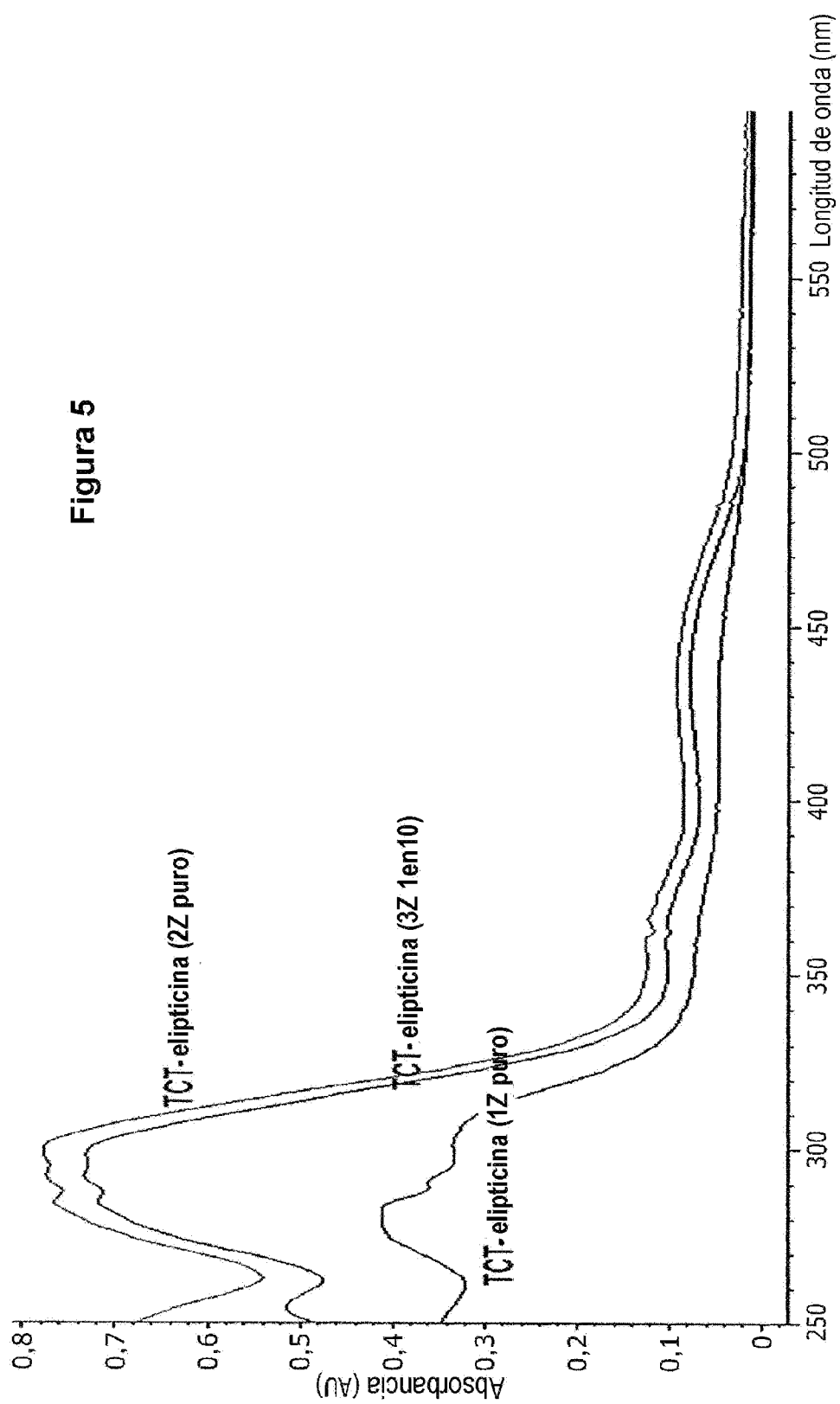
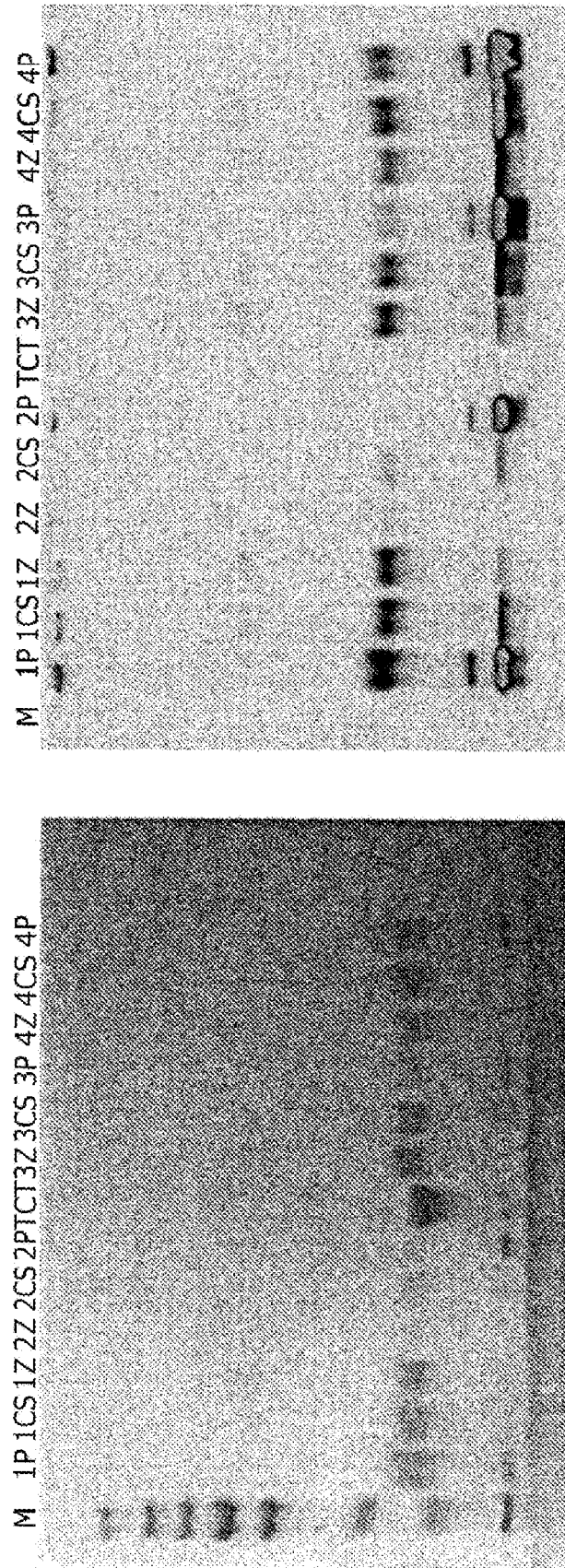


Figura 4





Gel de SDS PAGE teñido con Coomassie

Imagen de fluorescencia del mismo gel de SDS PAGE

Figura 6

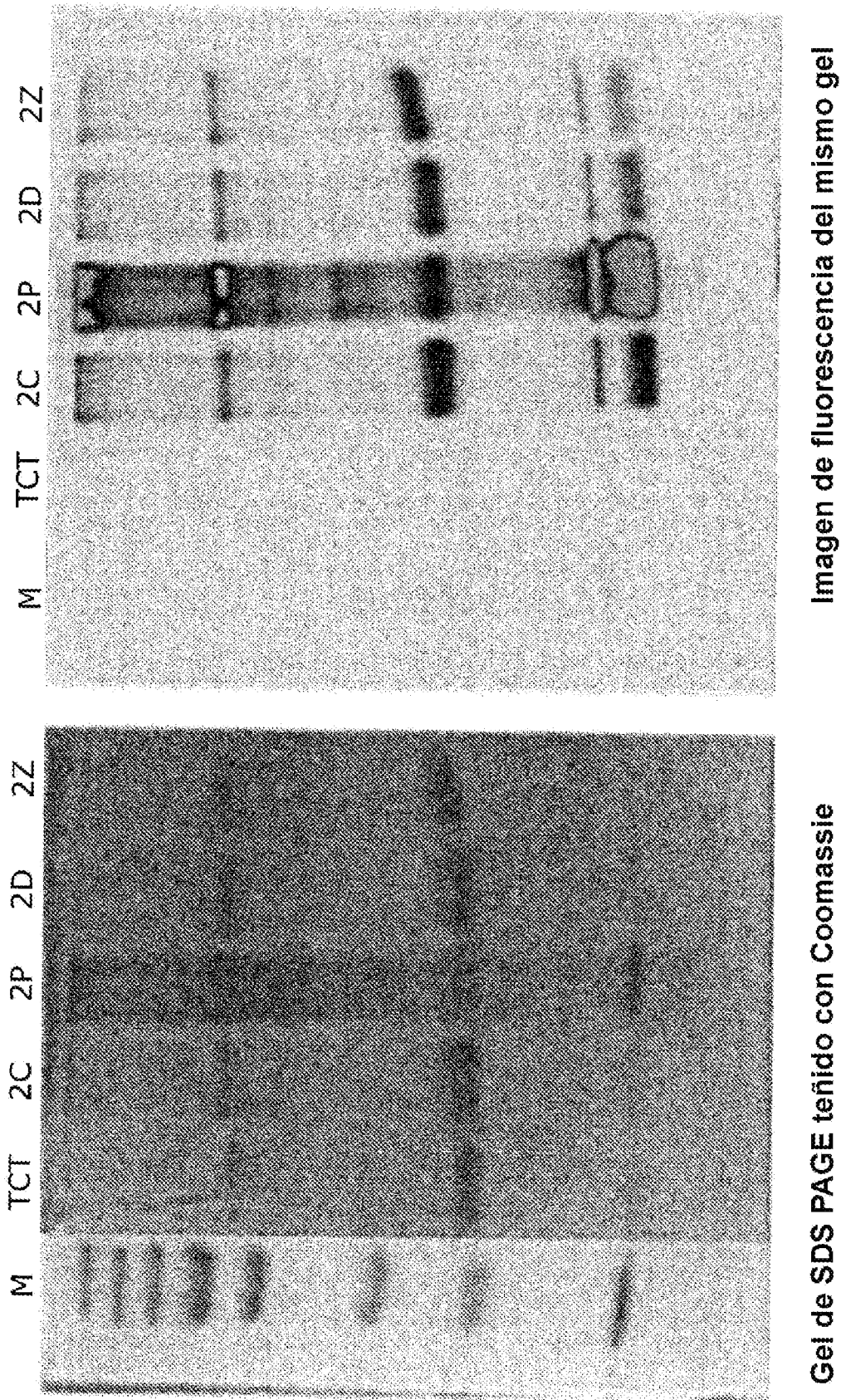
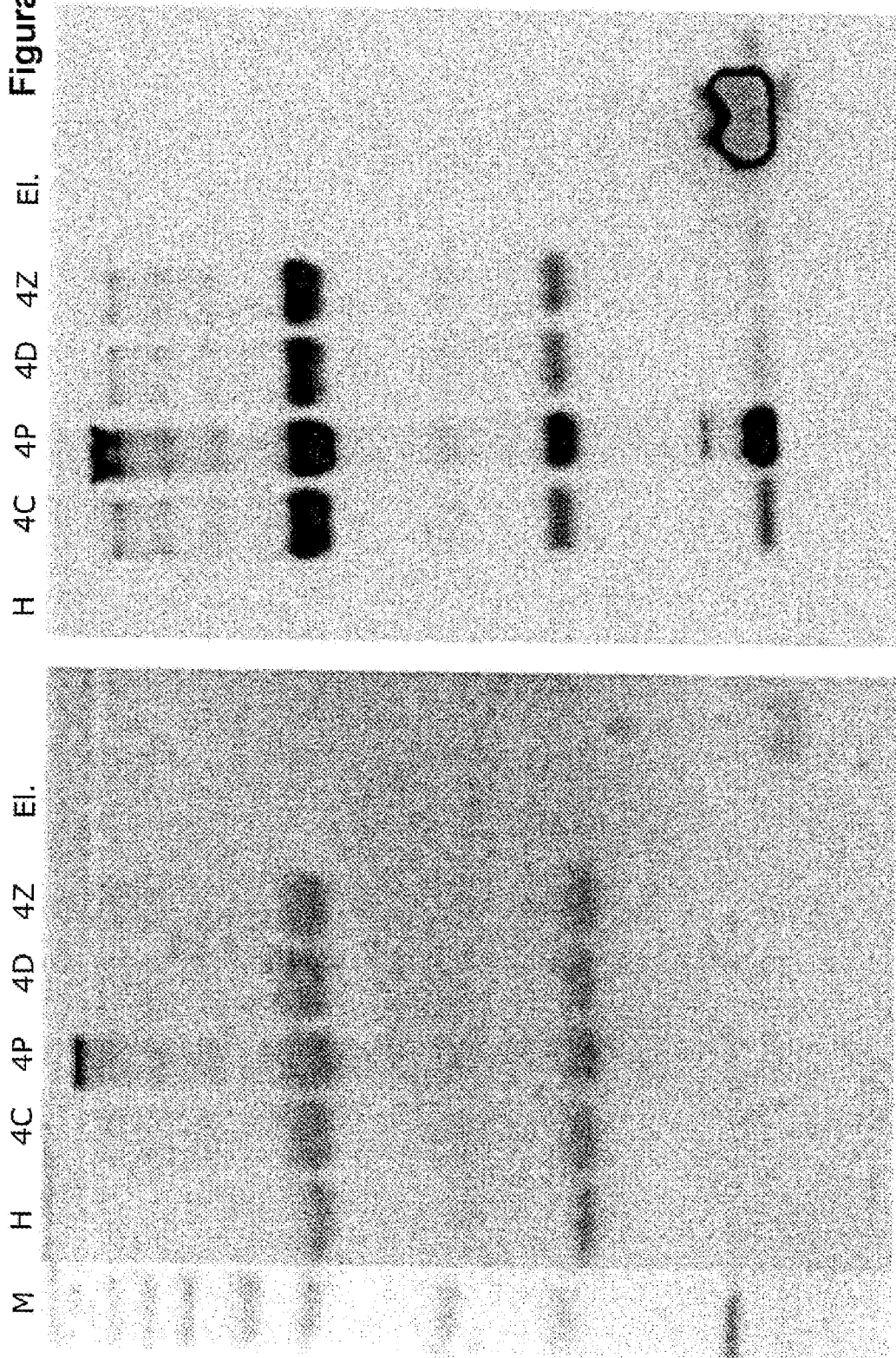


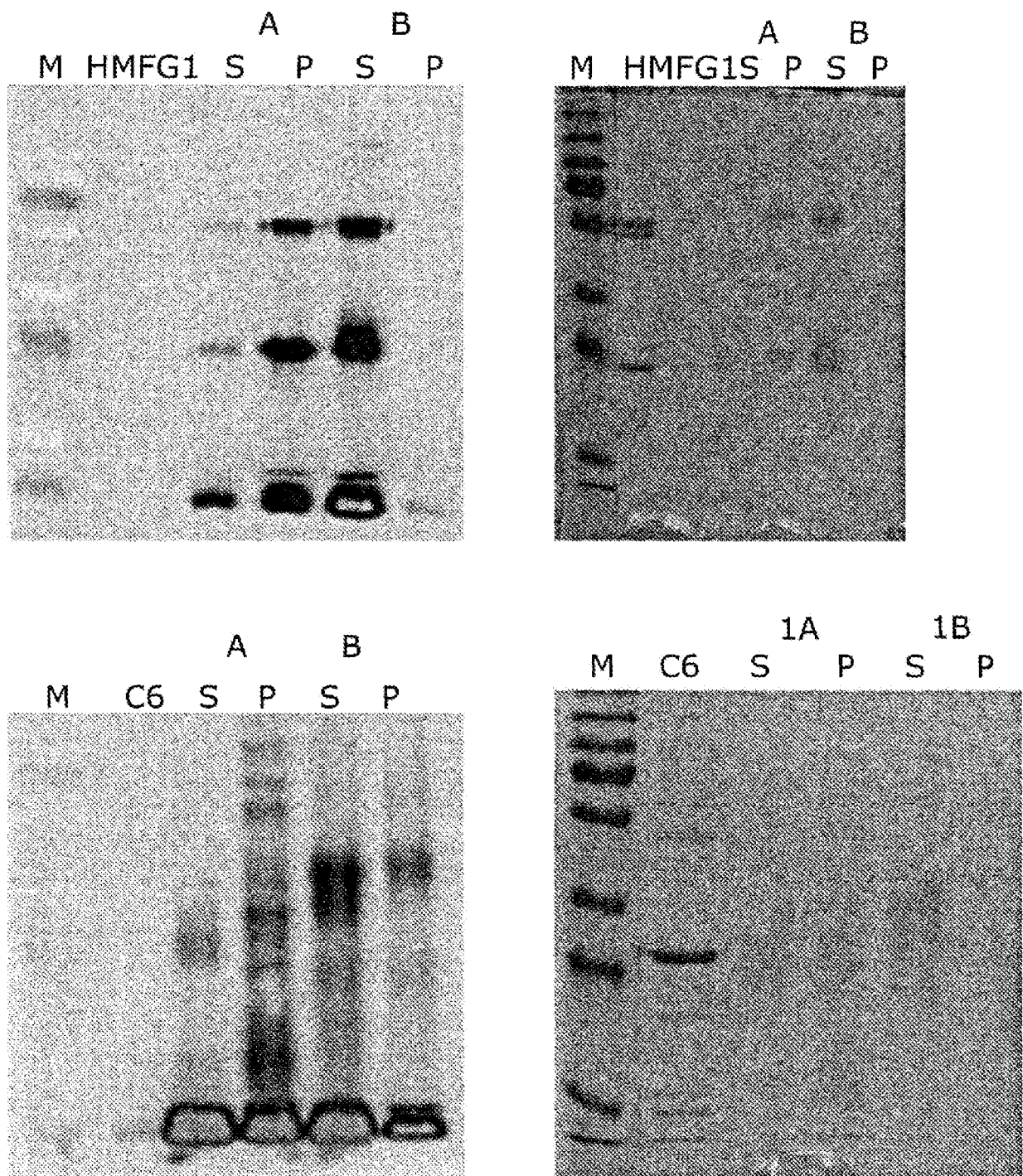
Figura 7

Figura 8



Gel de SDS PAGE teñido con Coomassie

Imagen de fluorescencia del mismo gel



Izquierda: imagen fluorescente del gel; y derecha: geles teñidos con Coomassie

Figura 9

**ELISA anti-HER2 que detecta el marcador anti-myc
conjugados de scFv C6.5(-k)-SPDP**

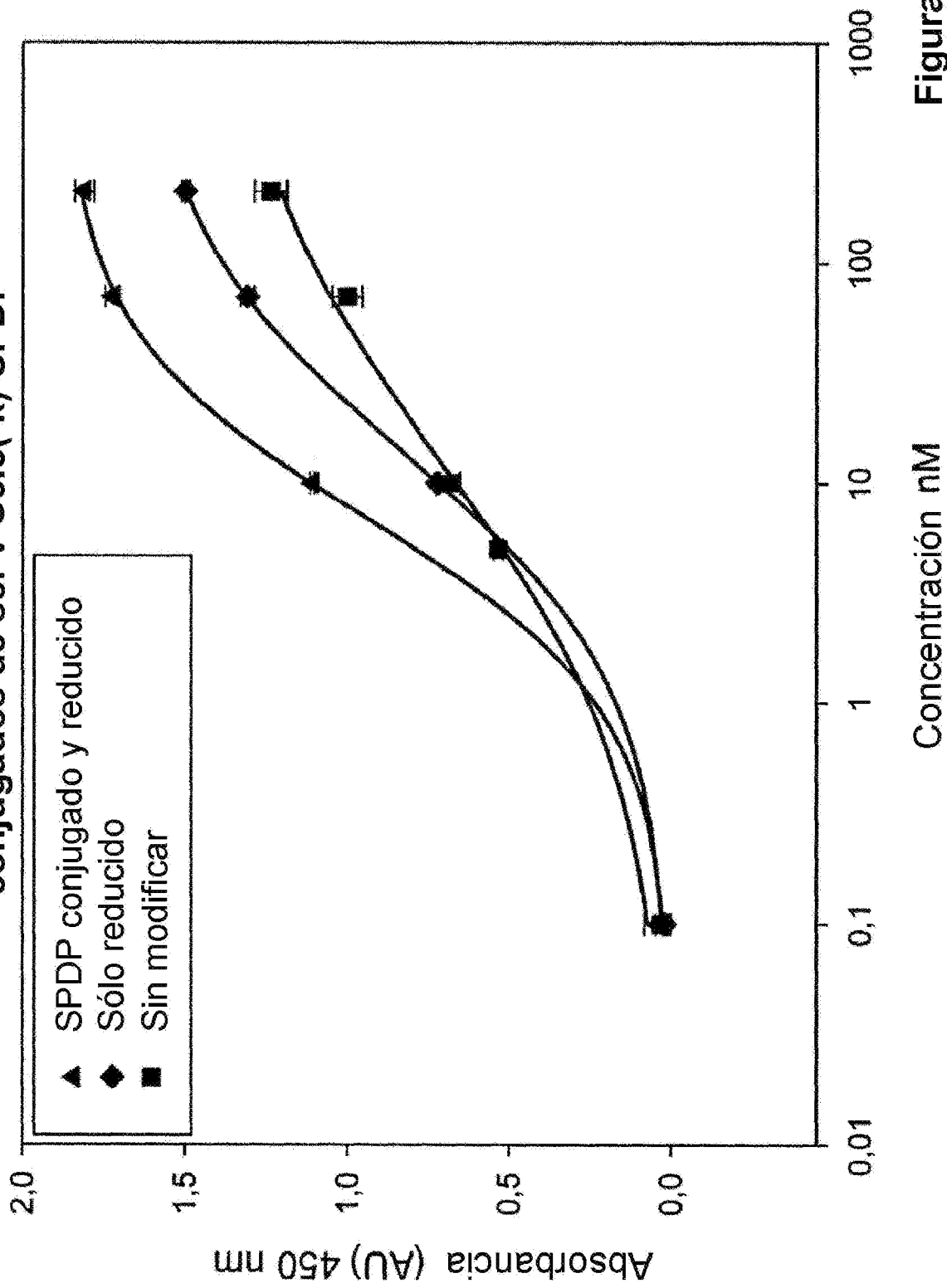


Figura 10

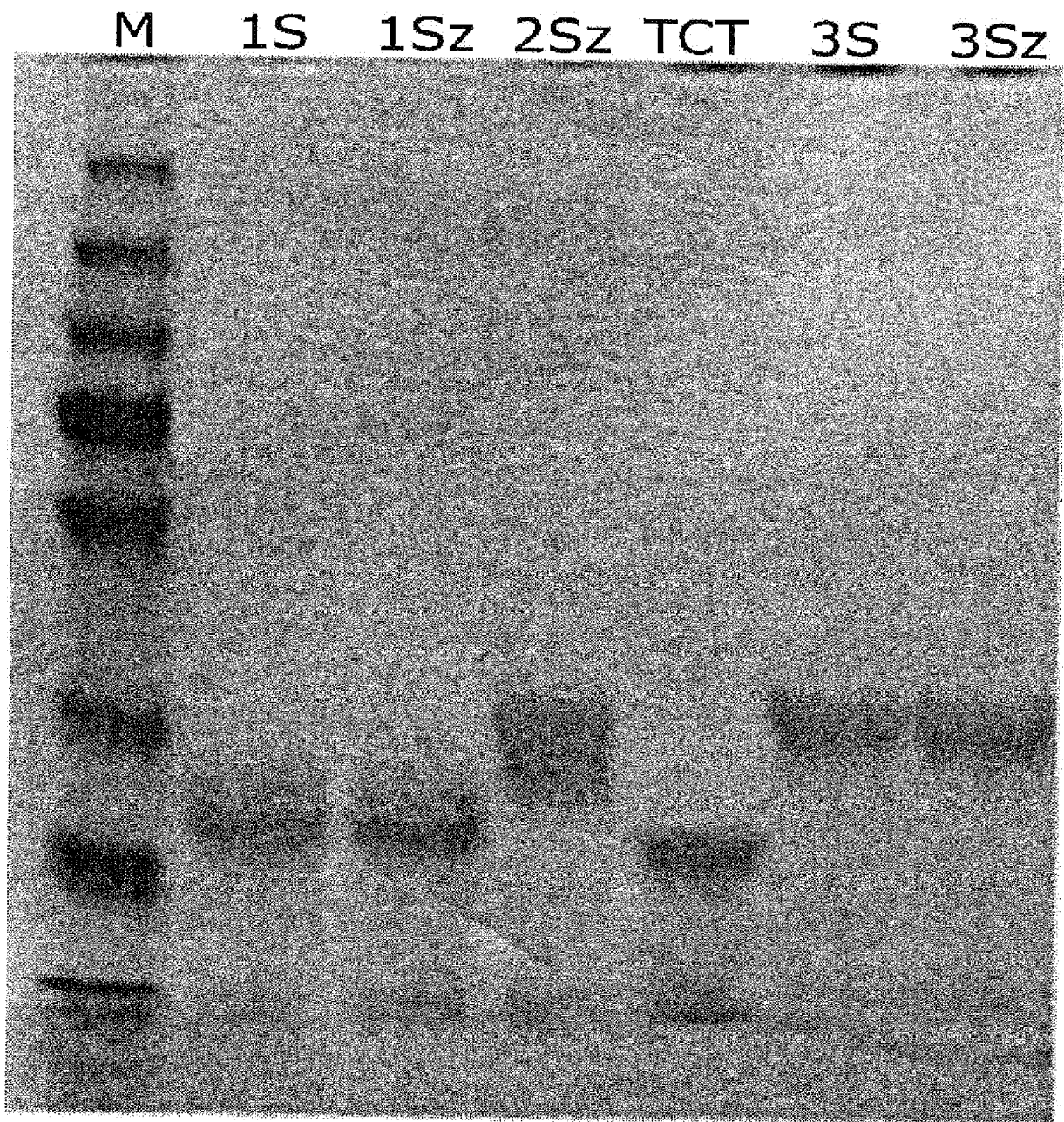


Figura 11

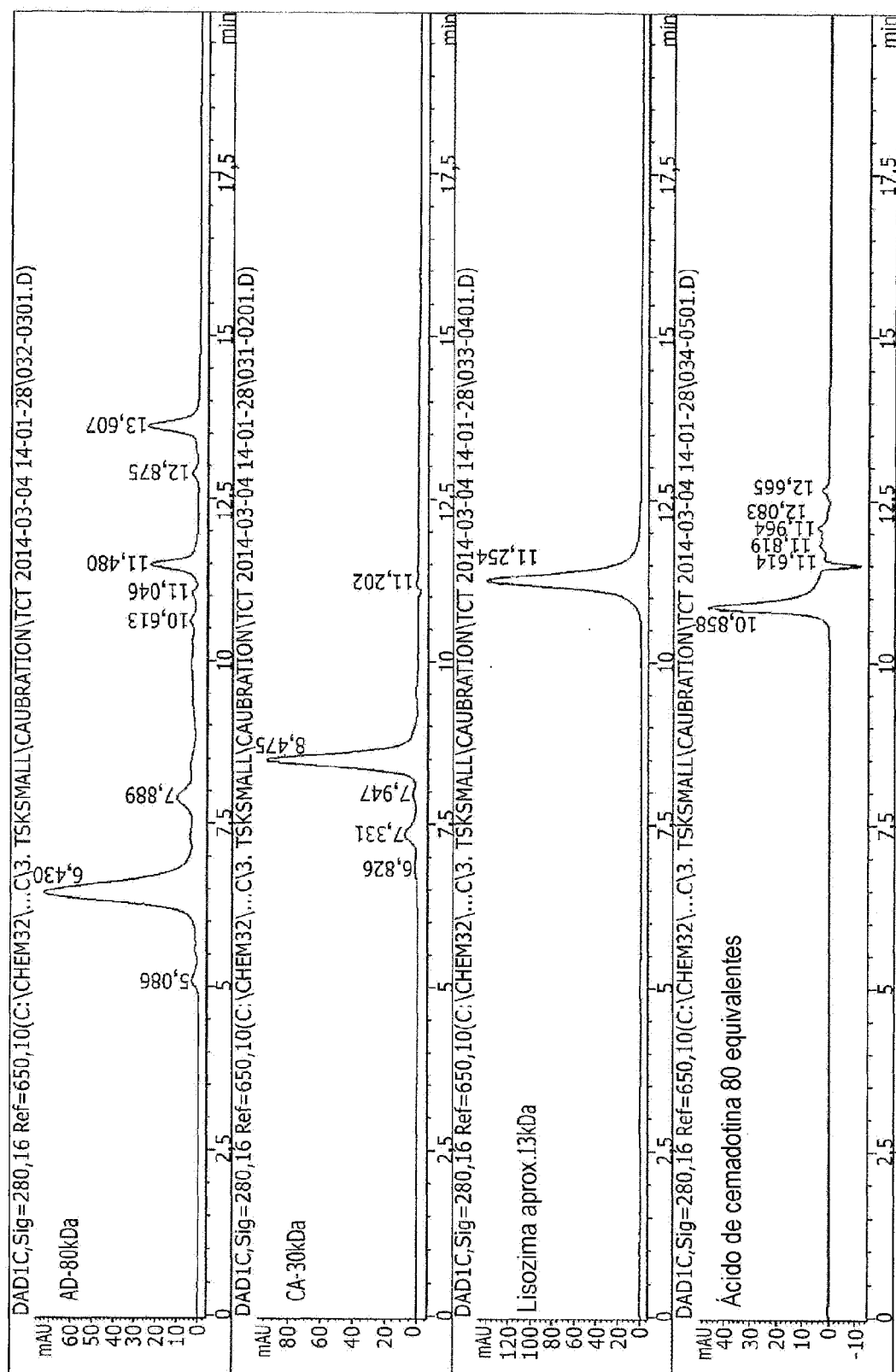


Figura 12A

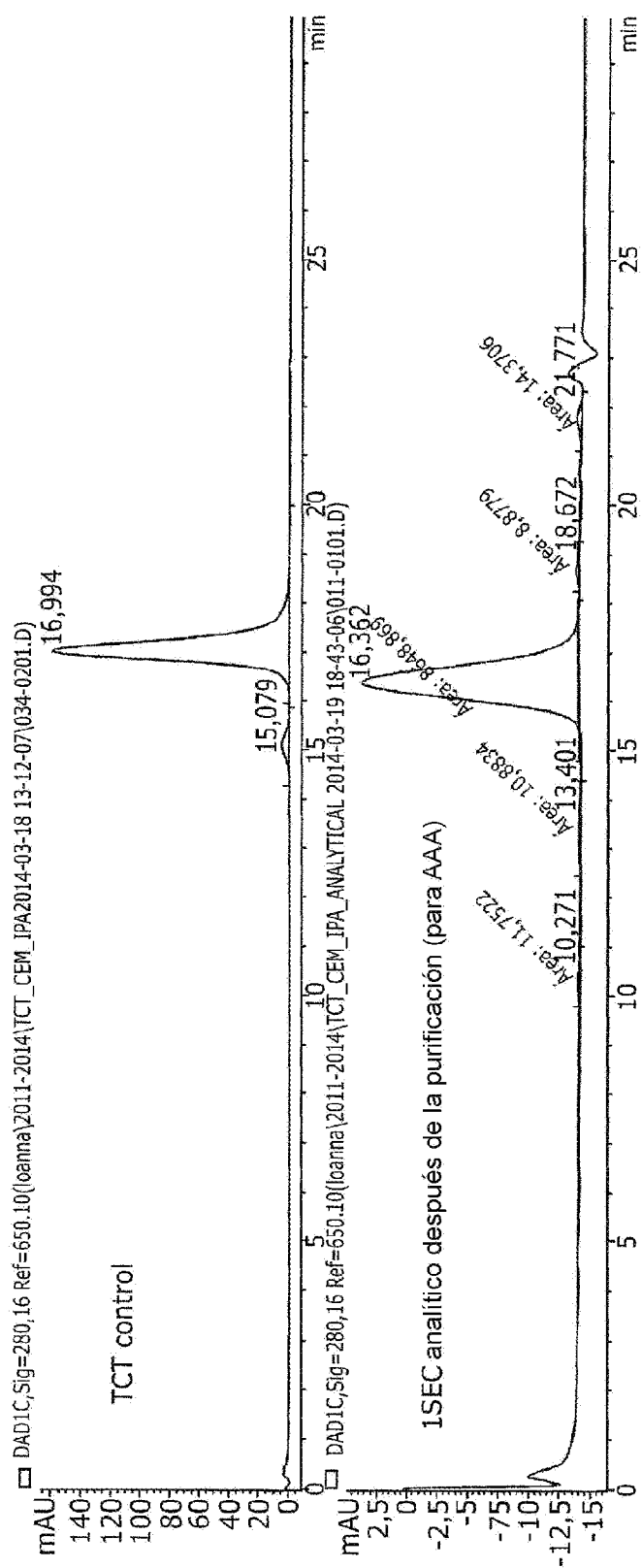


Figura 12B

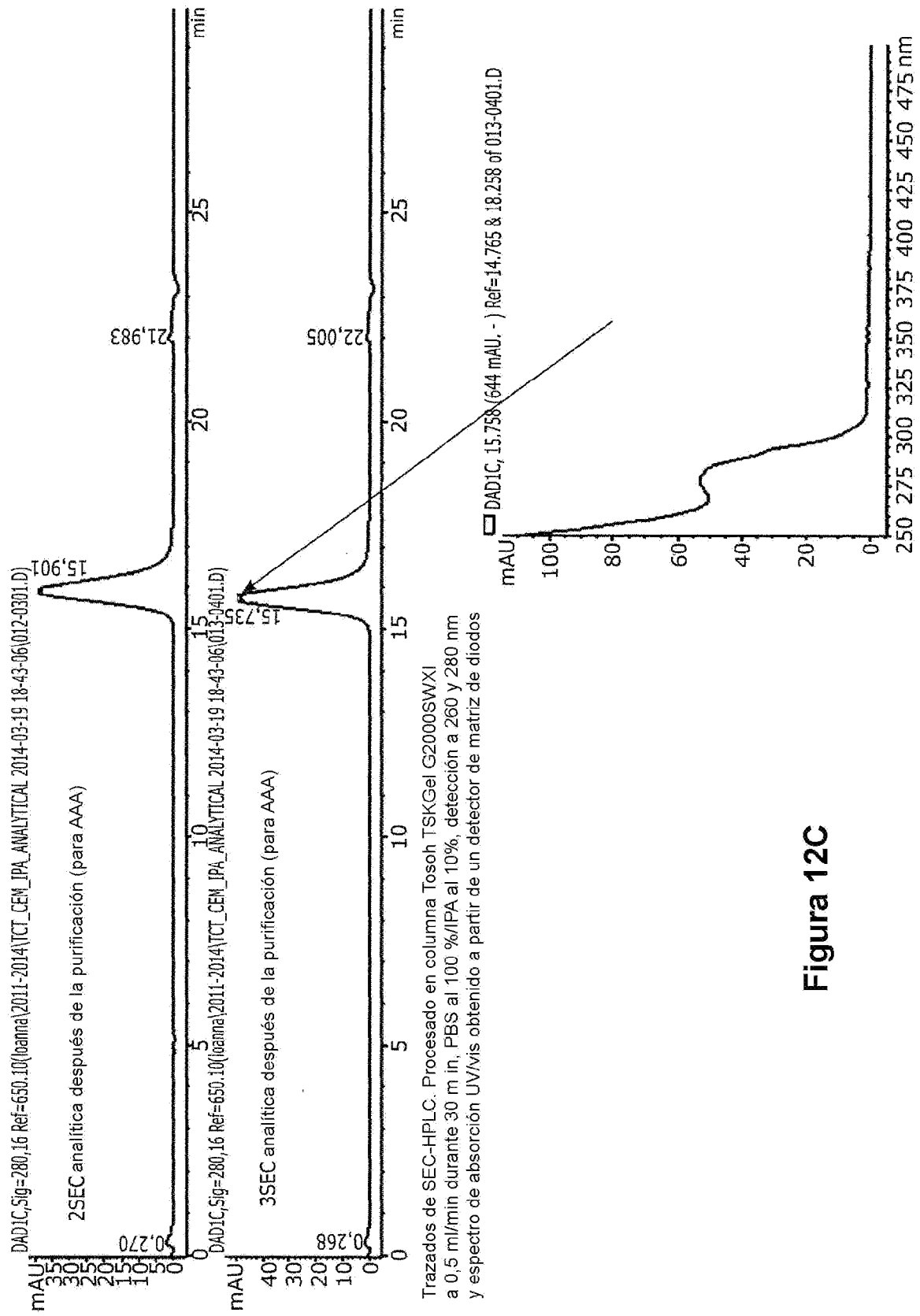


Figura 12C

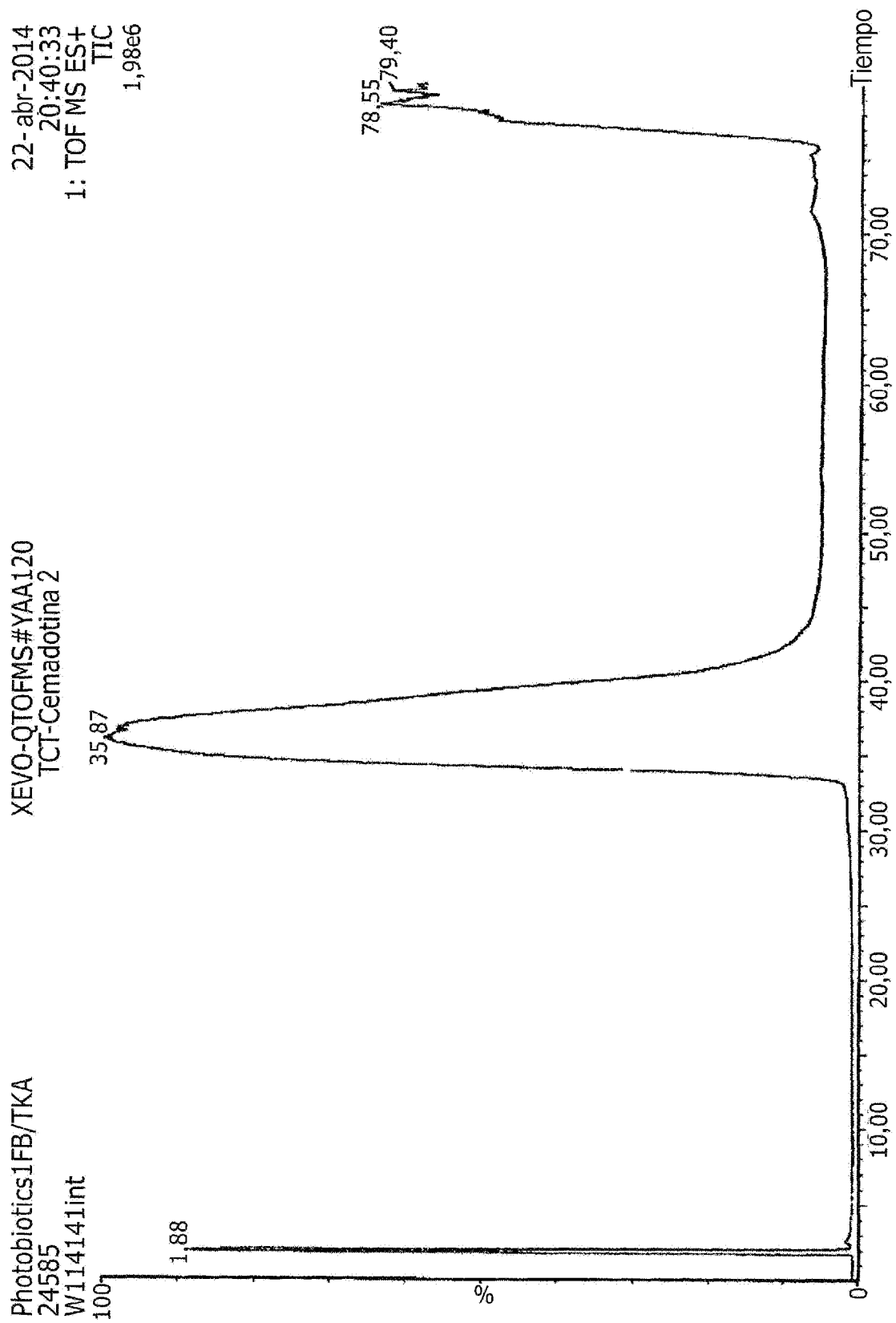


Figura 13a

22-abr-2014
20:40:33
1: TOF MS ES+
1,67e4

XEVO-QTOFMS#YAA120
TCT-Cemadotina 2

24585
FB/TKA
W114141int 1050 (35.875) Cm (1036:1083)

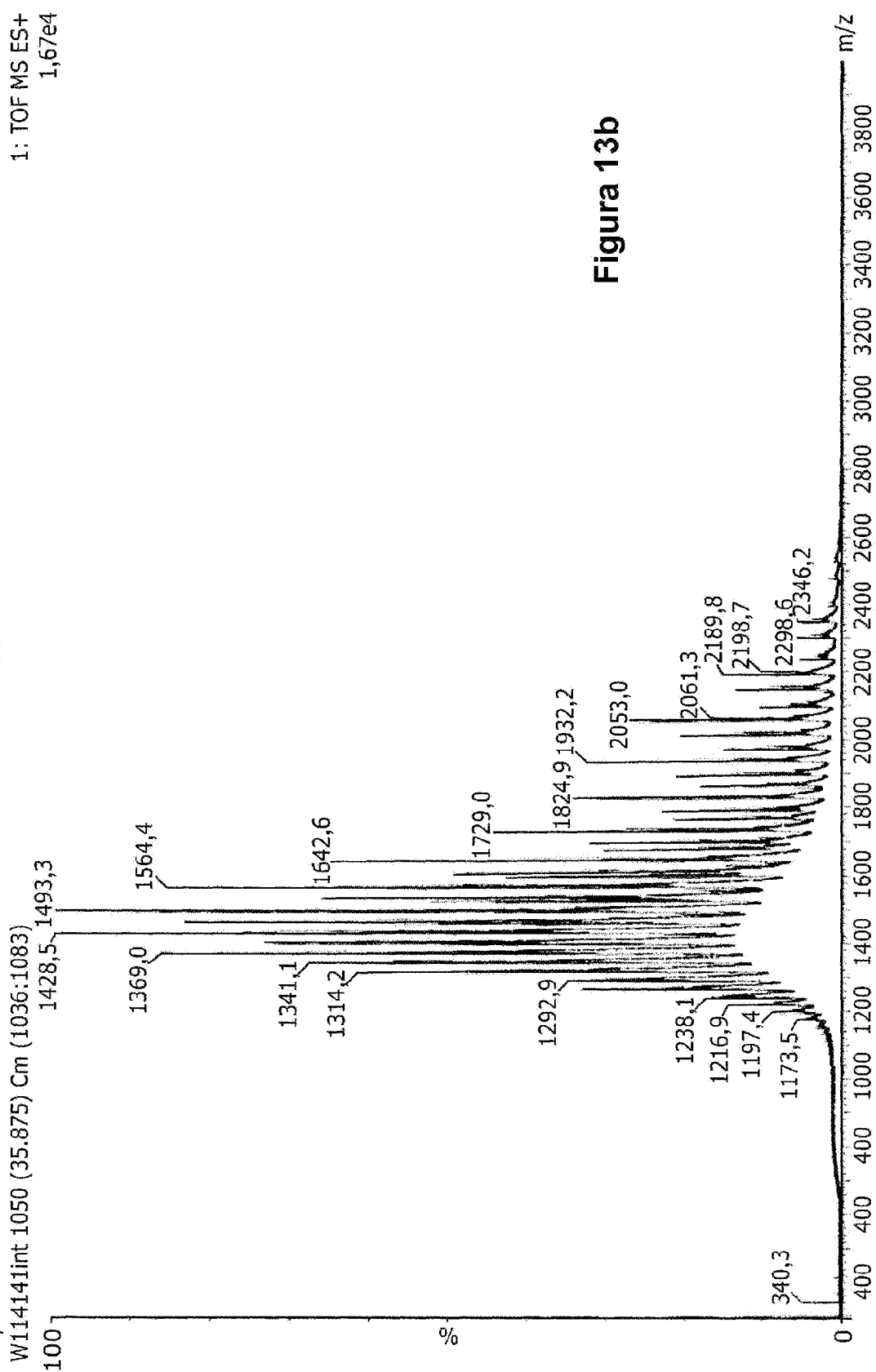


Figura 13b

22-abr-2014
20:40:33
1: TOF MS ES+
4,68e4

24585 XEVO-QTOFMS#YAA120
FB/TKA TCT-Cemadotina 2
W114141int 1050 (35.875) M1 [Ev-37756,t21] (Gs,0.500,1305:1594,0.50,L20,R20); Cm (1036:1083)

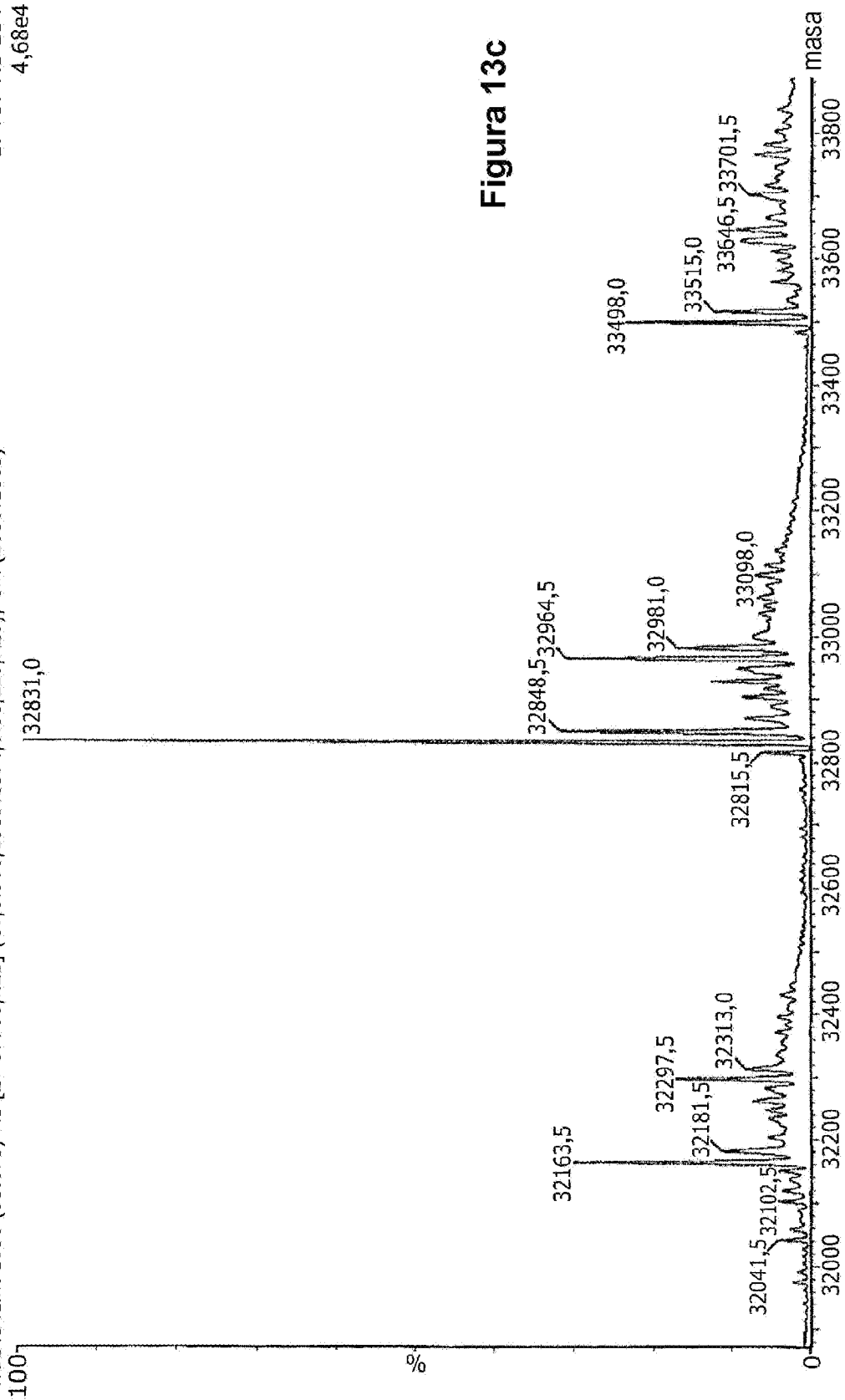
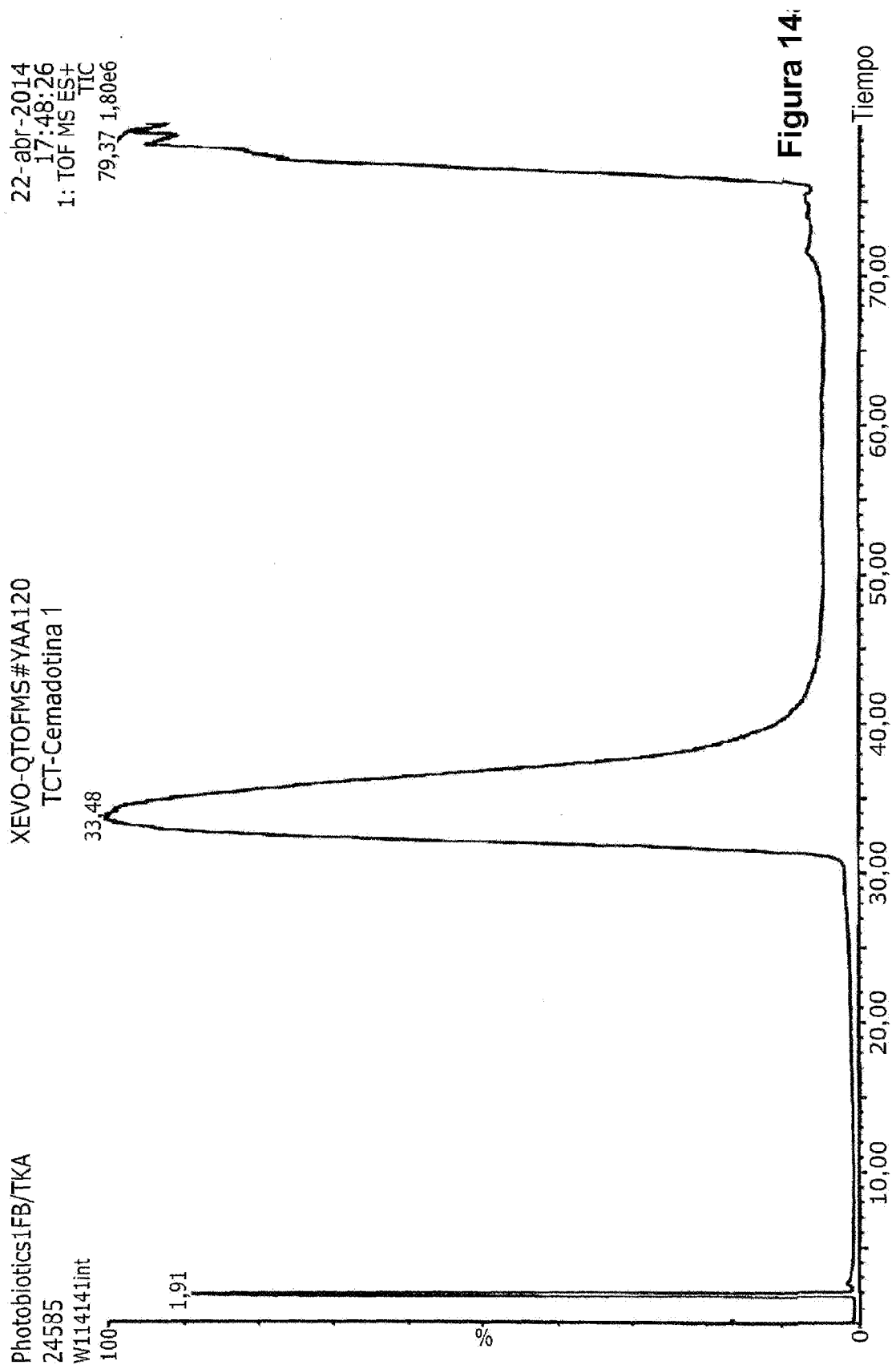
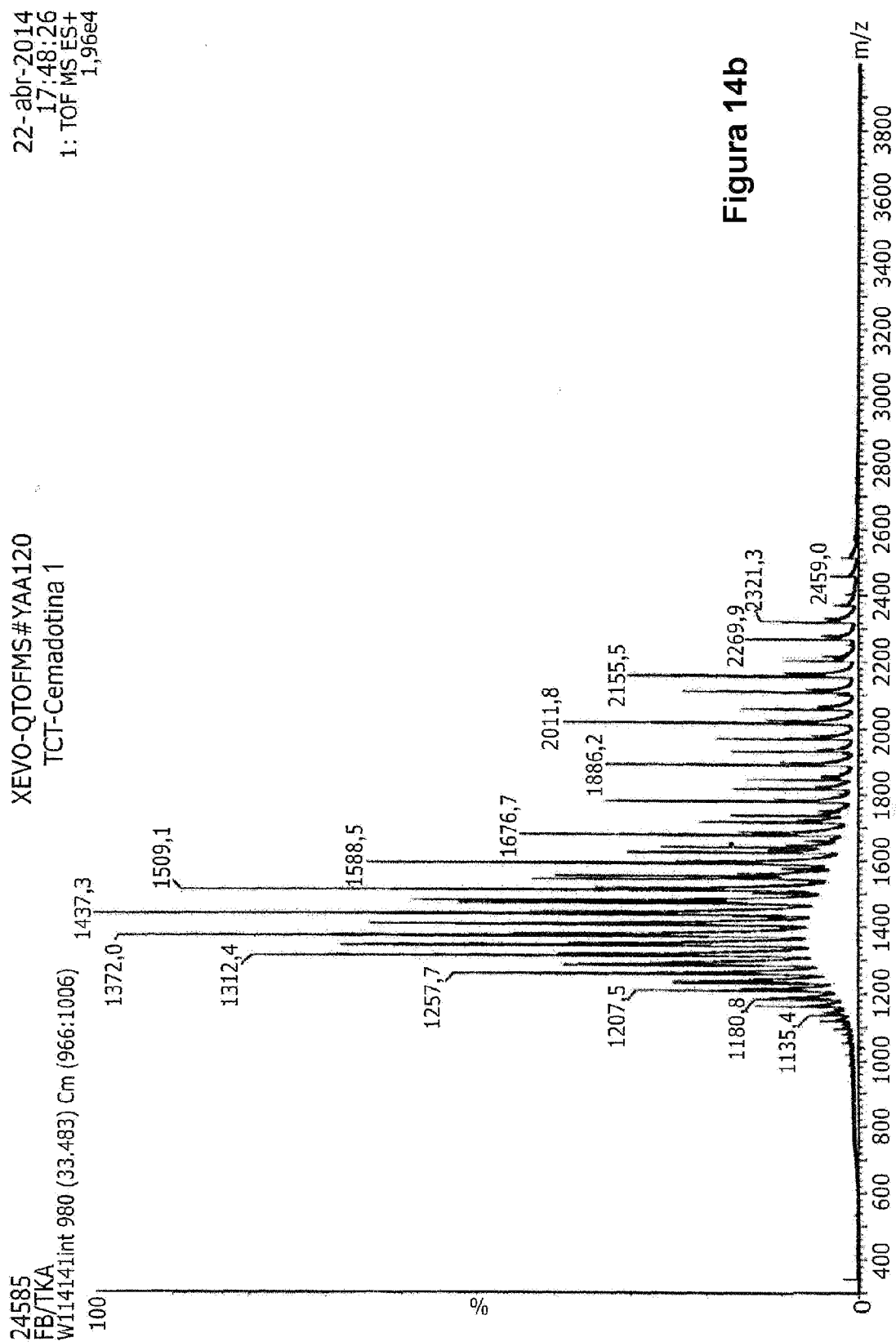


Figura 13c





22-abr-2014
17:48:26
1: TOF MS ES+
1,02e5

24585
FB/TKA
W114141int 980 (33.483) M1 [Ev-49926,lt21] (Gs,0.500,1247:1643,0.50,L20,R20); Cm (966:1006)
XEVO-QTOFMS#YAA120
TCT-Cemadotina 1
30161,5

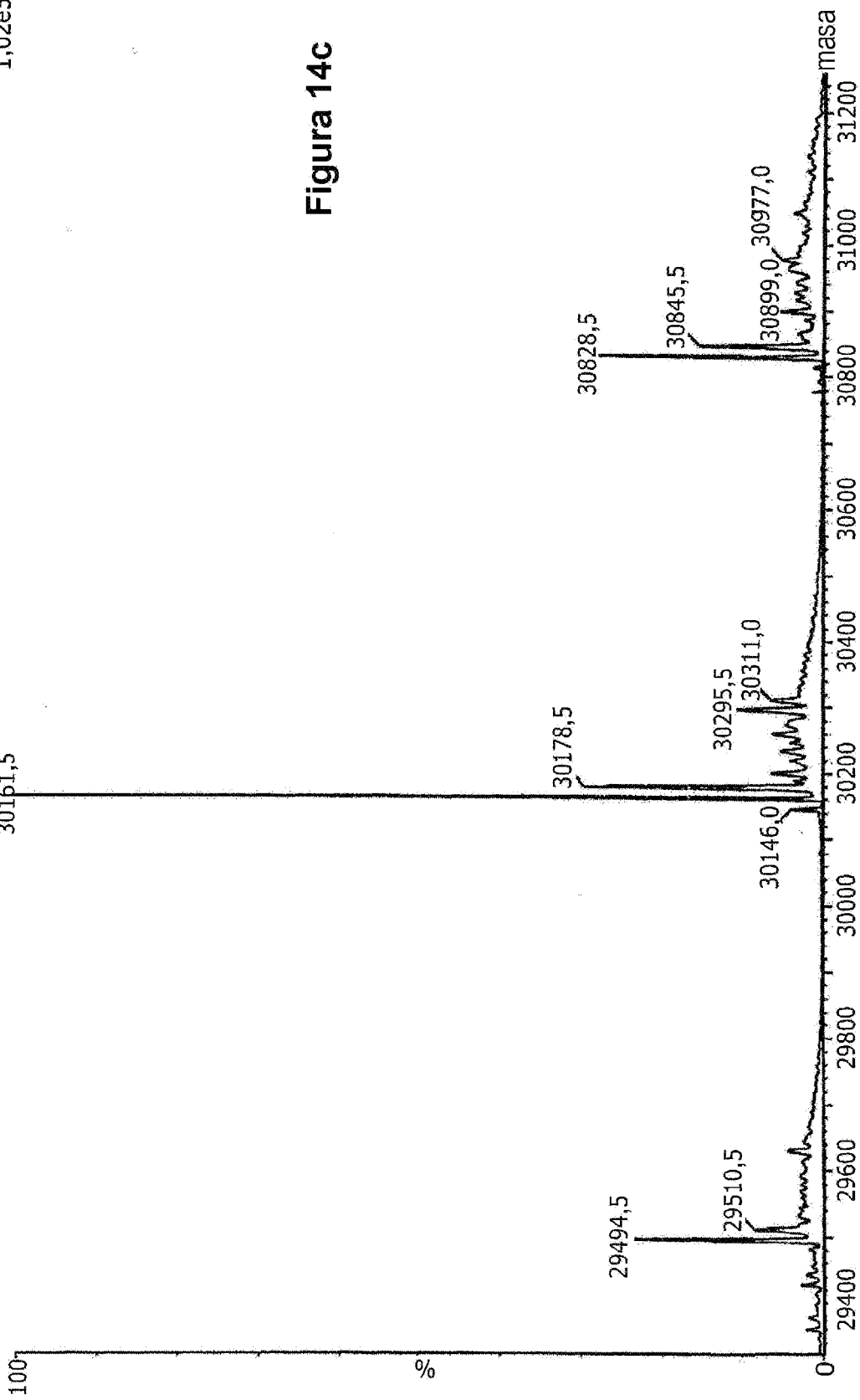
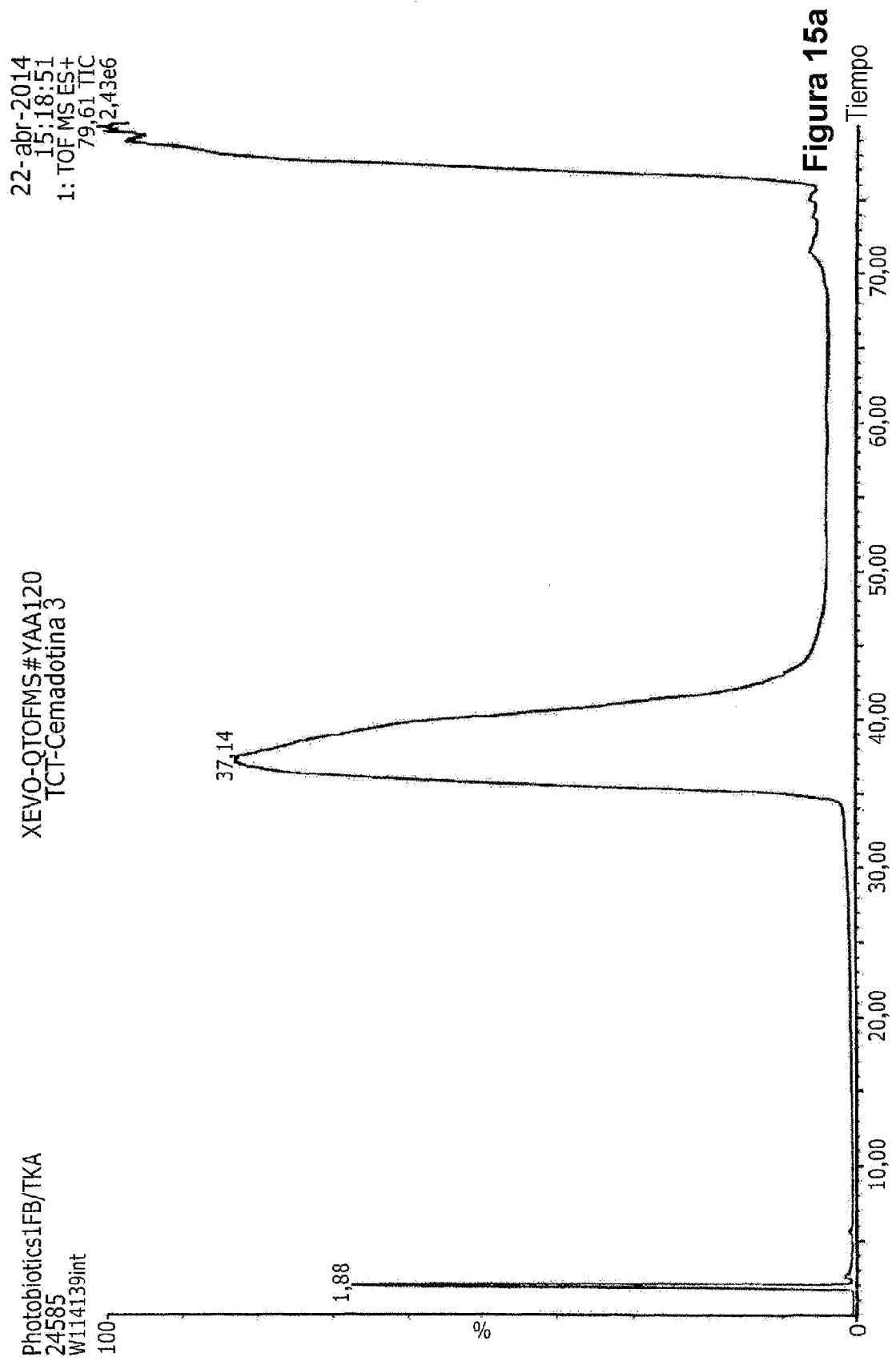
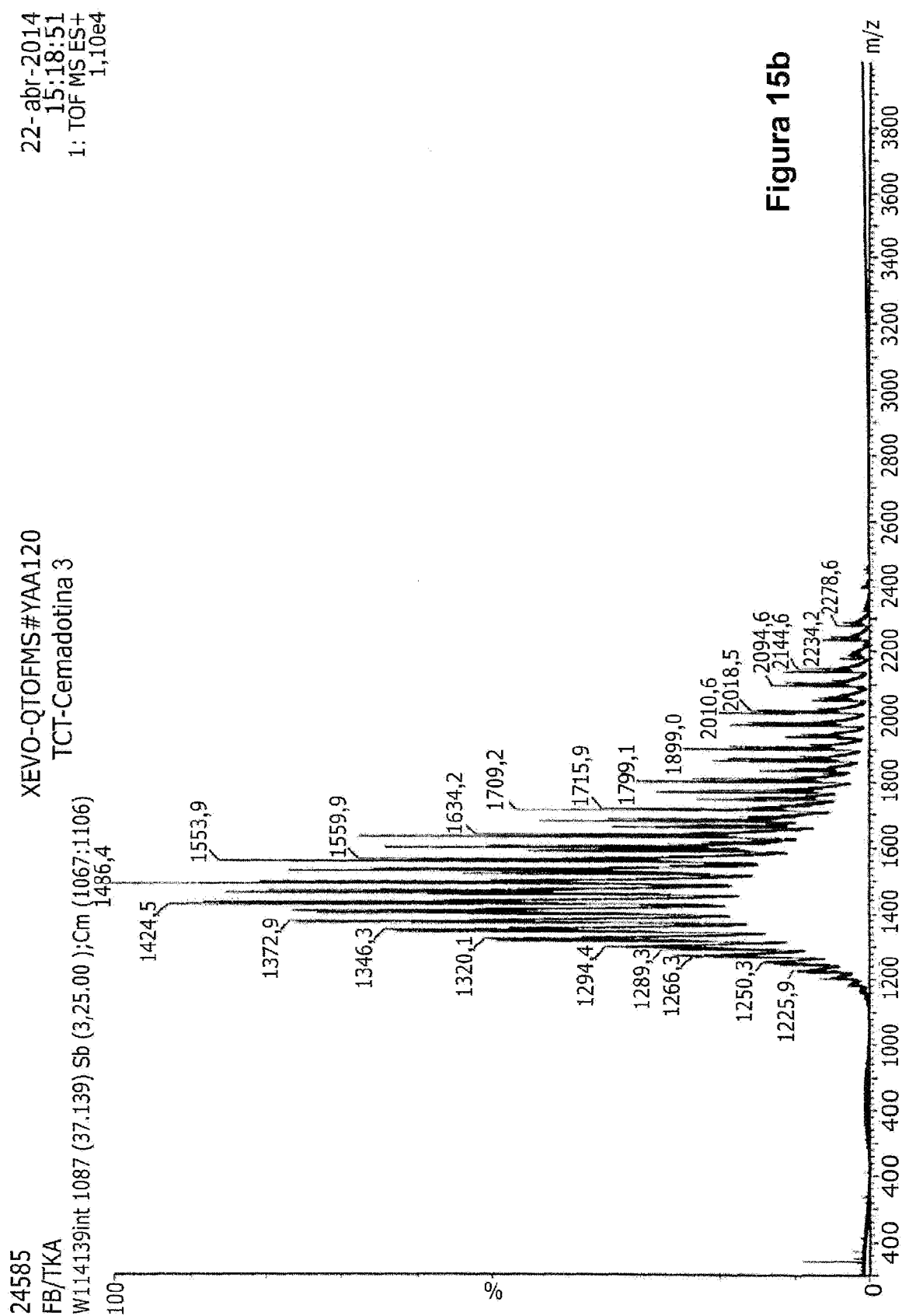


Figura 14c





22-abr-2014
15:18:51
1: TOF MS ES+
1,10e4

24585 XEVO-QTOFMS#YAA120
FB/TKA TCT-Cemadotina 3
W114139int 1087 (37.139) M1 [Ev-20859.lt20] (Gs,0.500, 1367:1527,0.50,L20,R20); Sb (3,25.00); Cm (1067:1106)

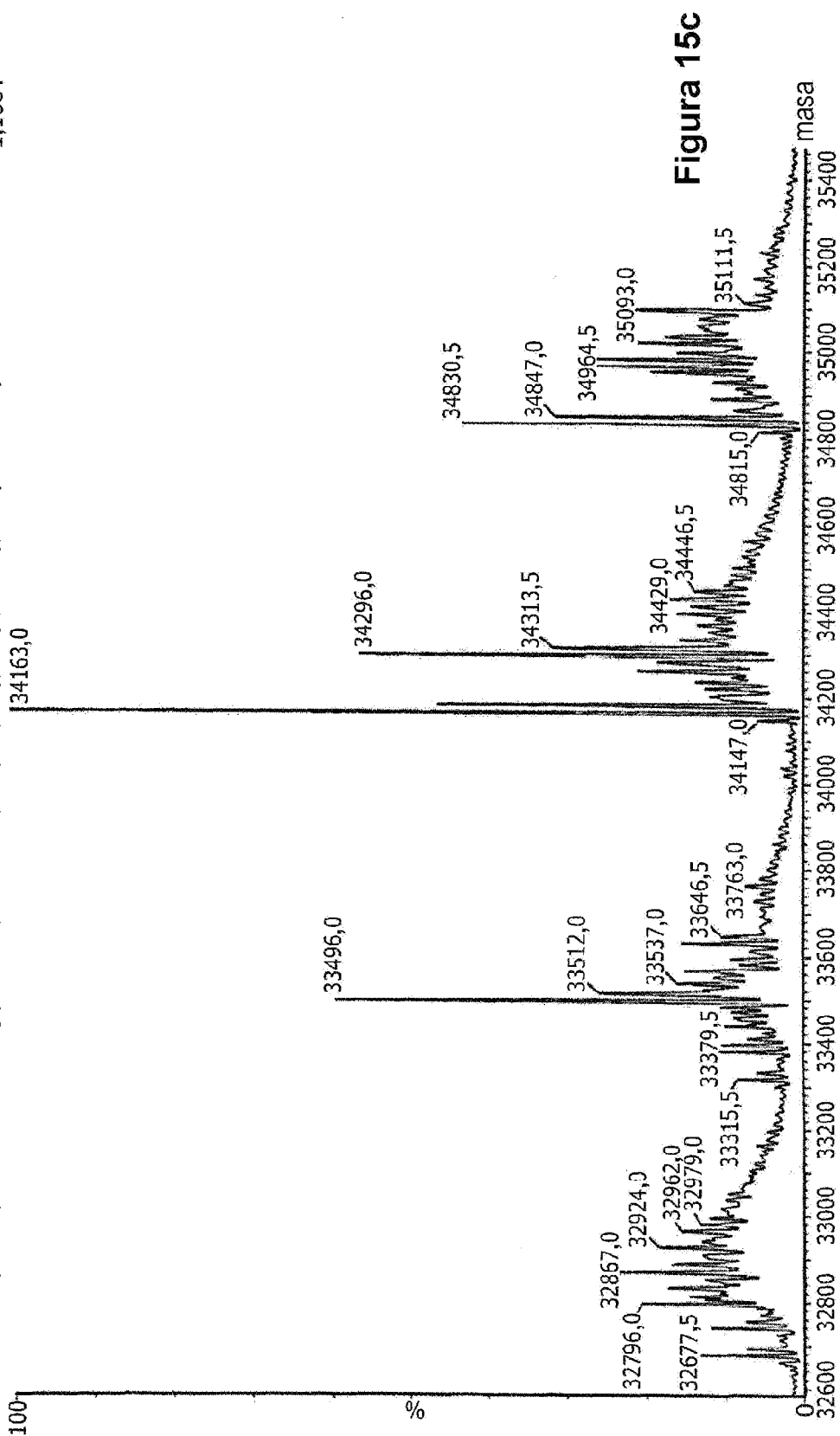


Figura 15c

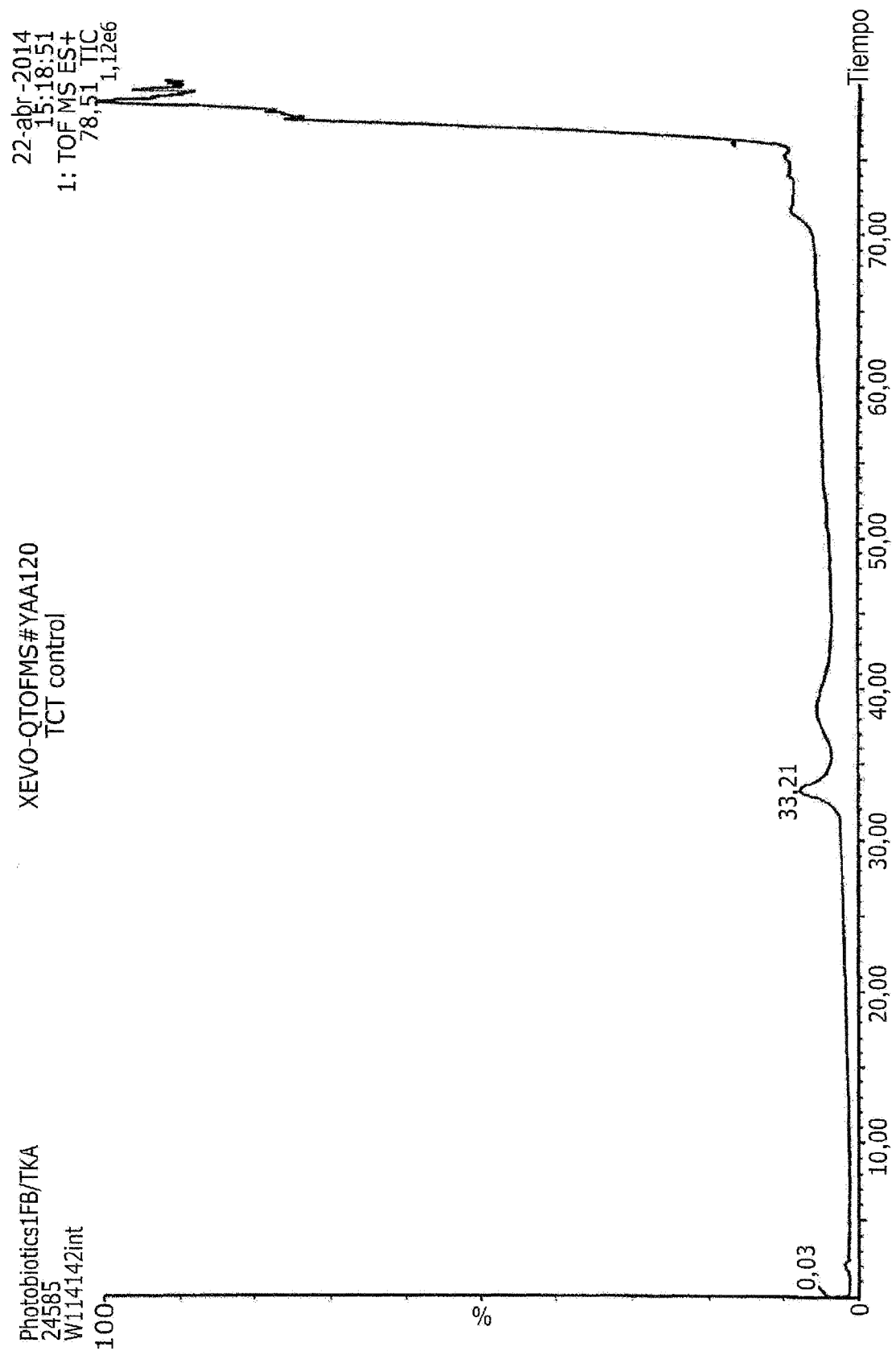


Figura 16a

22-abr-2014
23:32:42
1: TOF MS ES+
772

XEVO-QTOFMS#YAA120
TCT control

24585
FB/TKA

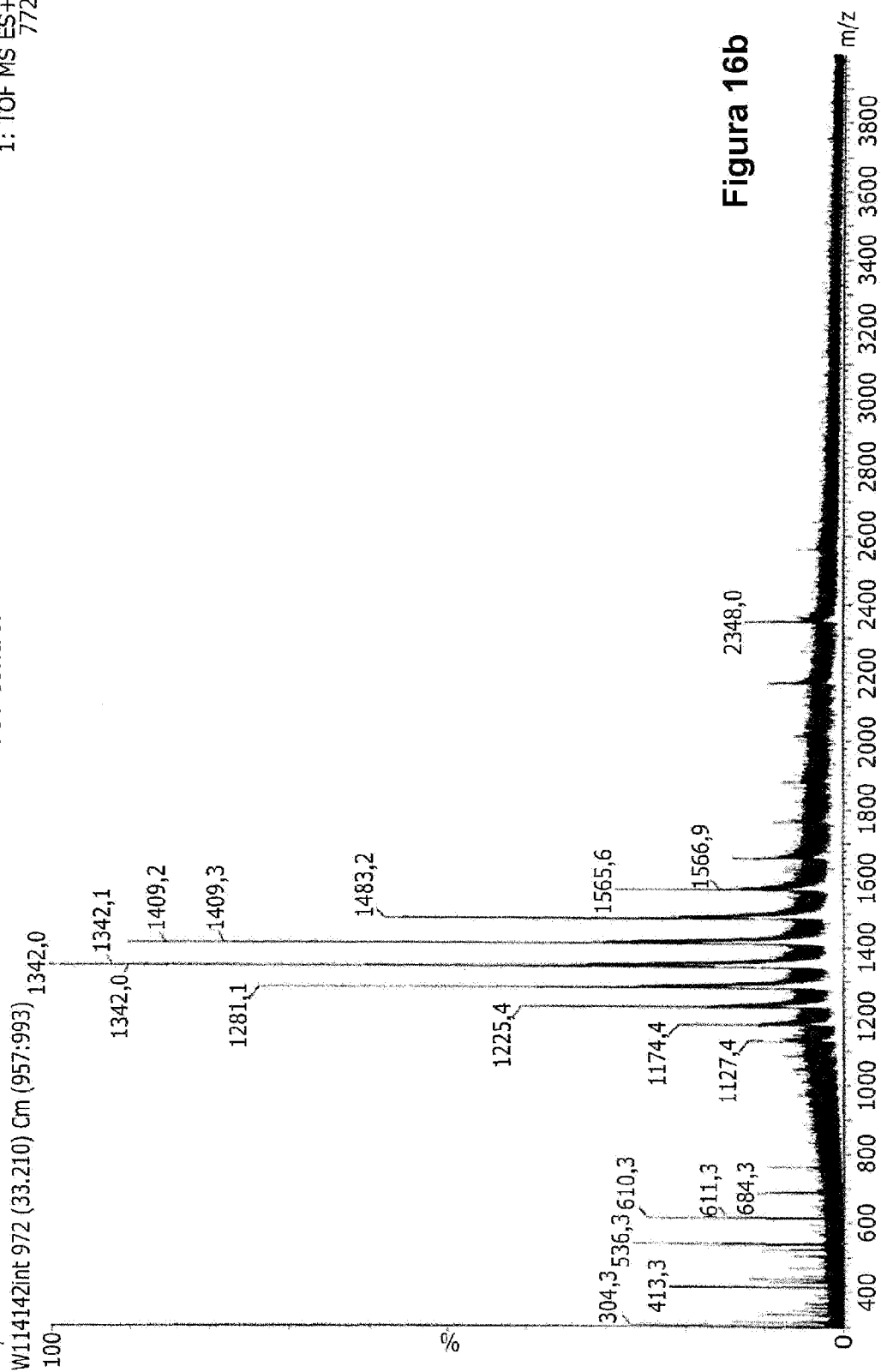


Figura 16b

22-abr-2014
23:32:42
1: TOF MS ES+
3,06e3

24585
FB/TKA
W114142int 972 (33.210) M1 [Ev-28674,li15] (Gs,0.500,1217:1603,0.50,L20,R20); Cm (957.993)
XEVO-QTOFMS#YAA120
TCT control
28162,0

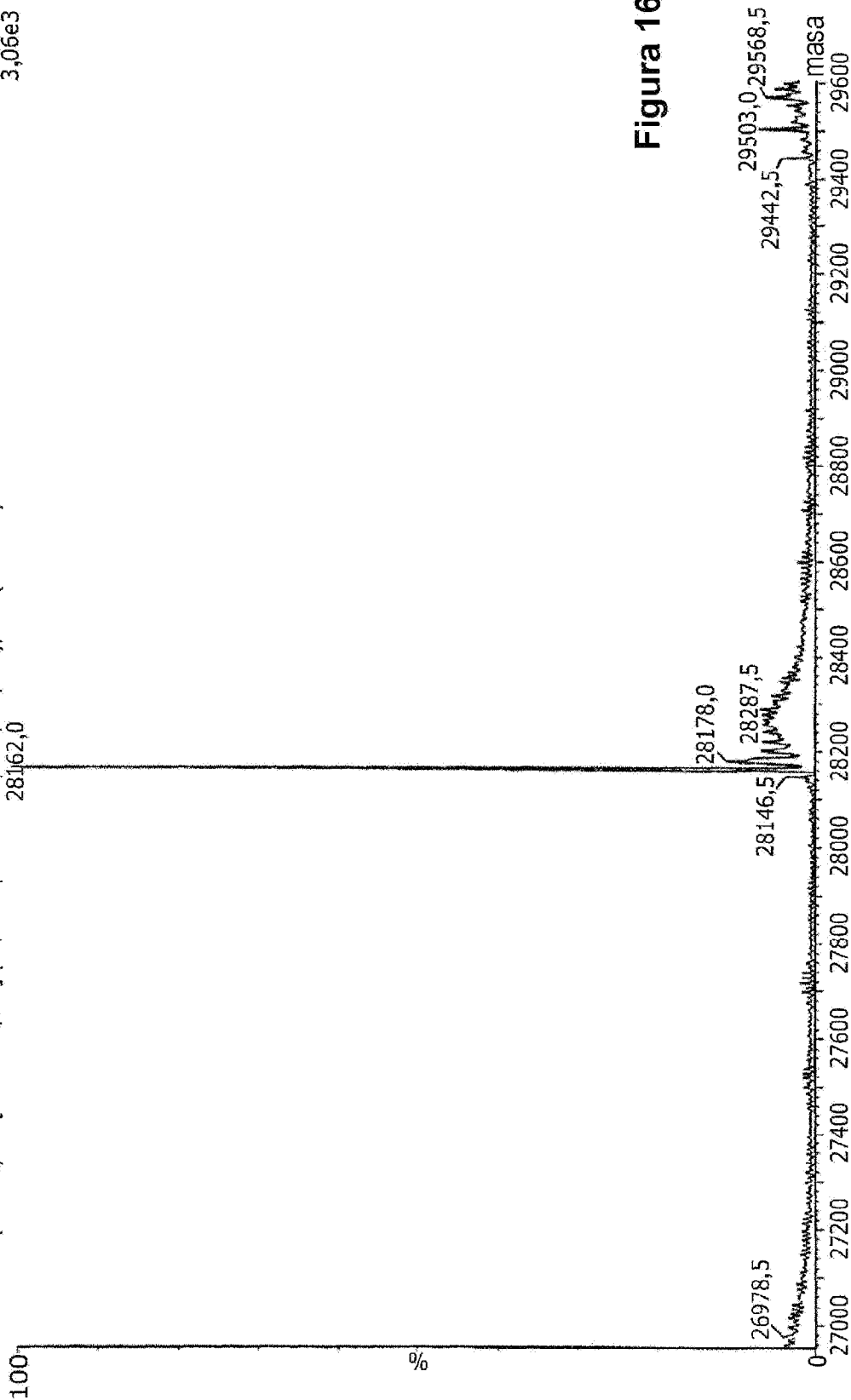


Figura 16c

Datos: w114142_sa_0001.H12[c] 4 abr 2014 17:44 Cal: TKA myo 4 abr 2014 14:52
 Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624: Modo lineal, Potencia: 119, P.Ext. @ 30000 (bin 234)
 %Int. 6.3 mV[suma=1319 mV] Perfiles 1-210 Gauss suaviza. 500

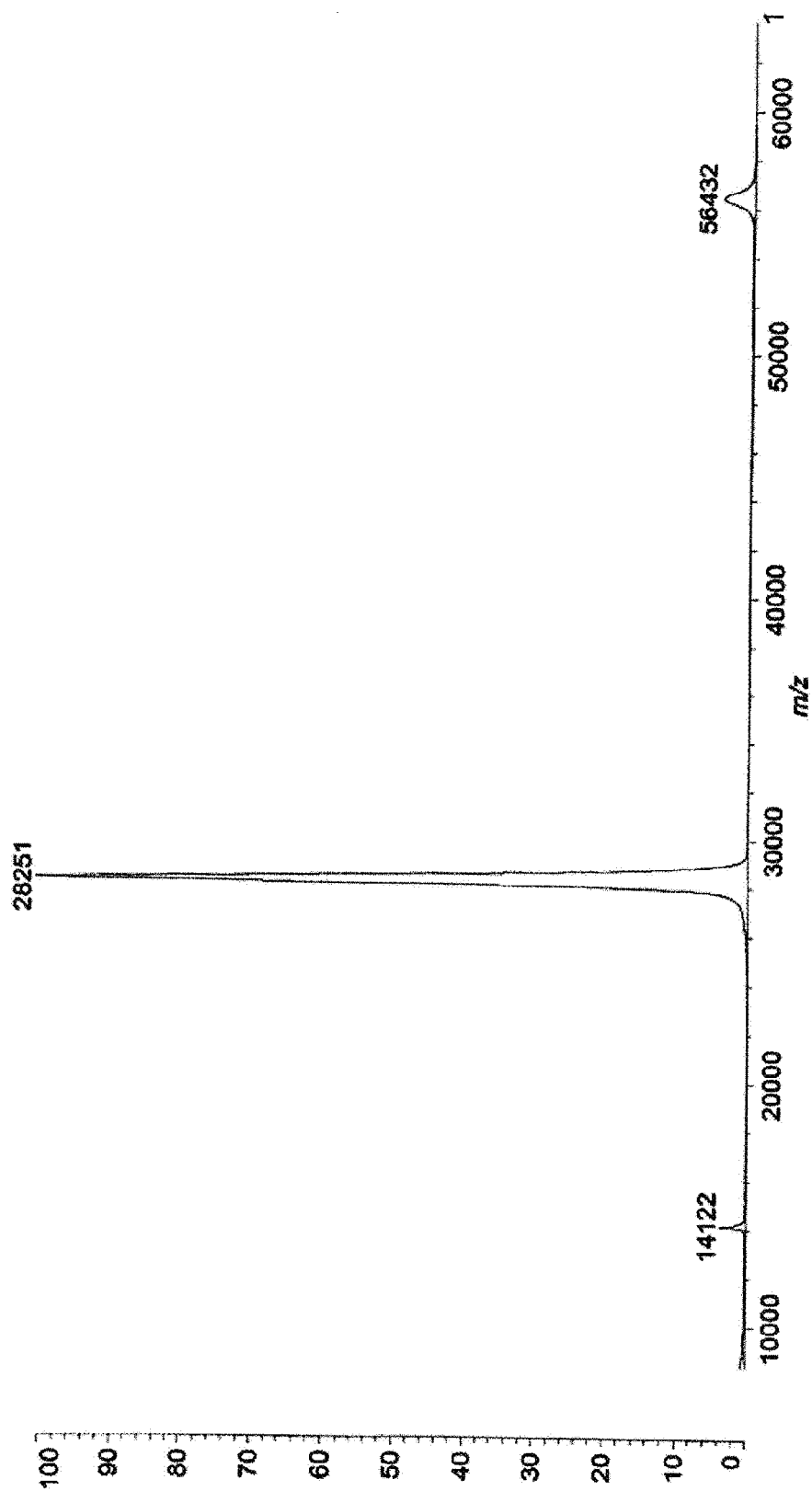


Figura 17

Datos: w114140_sa_0001.F12[c] 4 abr 2014 17:41 Cal: TKA myo 4 abr 2014 14:52
Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624: Modo lineal, Potencia:119, P.Ext. @ 30000 (bin 234)
%Int. 0,9 mV[suma=185 mV] Perfiles 1-204 Gauss suaviza. 500

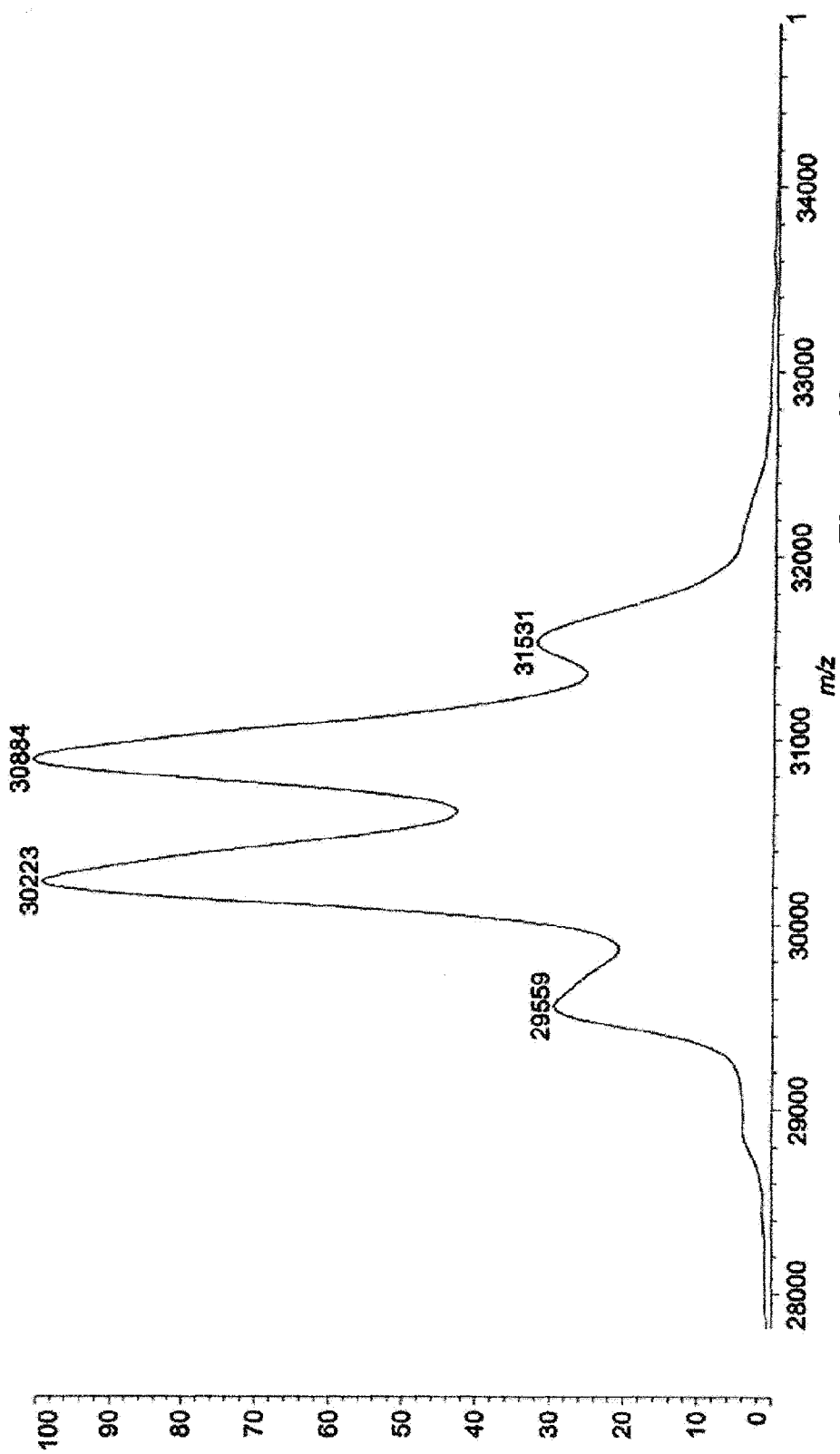


Figura 18

Datos: w114141_sa_0001.G12[c] 4 abr 2014 17:43 Cal: TKA myo 4 abr 2014 14:52
Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624: Modo lineal, Potencia:119, P.Ext. @ 30000 (bin 234)
%Int. 0,5 mV[suma=113 mV] Perfiles 1-207 Gauss suaviza. 500

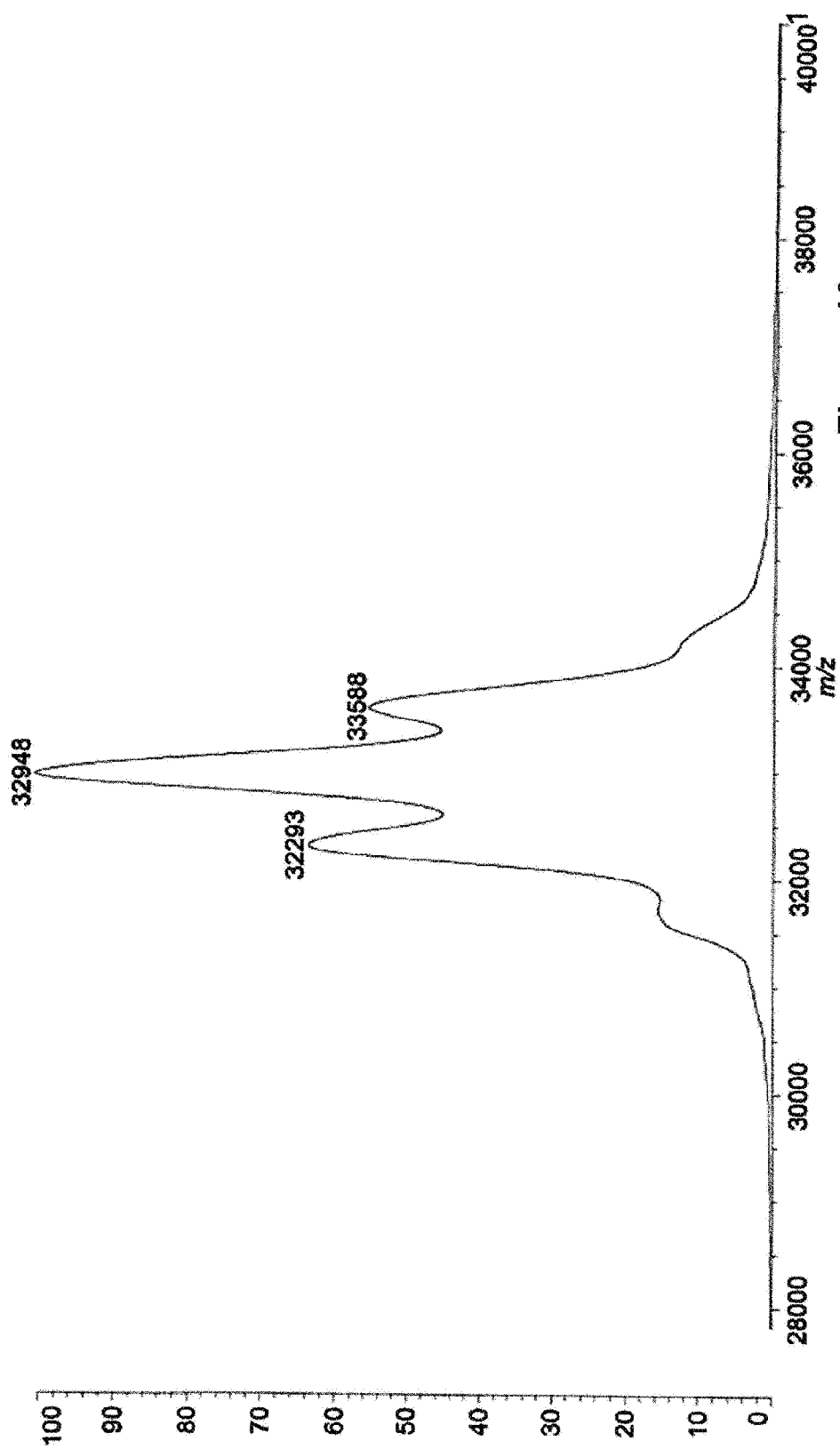


Figura 19

Datos: w114139_sa_0001.E11[c] 4 abr 2014 17:23 Cal: TKA myo 4 abr 2014 14:52
Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624: Modo lineal, Potencia: 119, P.Ext. @ 30000 (bin 234)
%Int. 0,1 mV[suma=26 mV] Perfiles 1-320 Gauss suaviza. 500

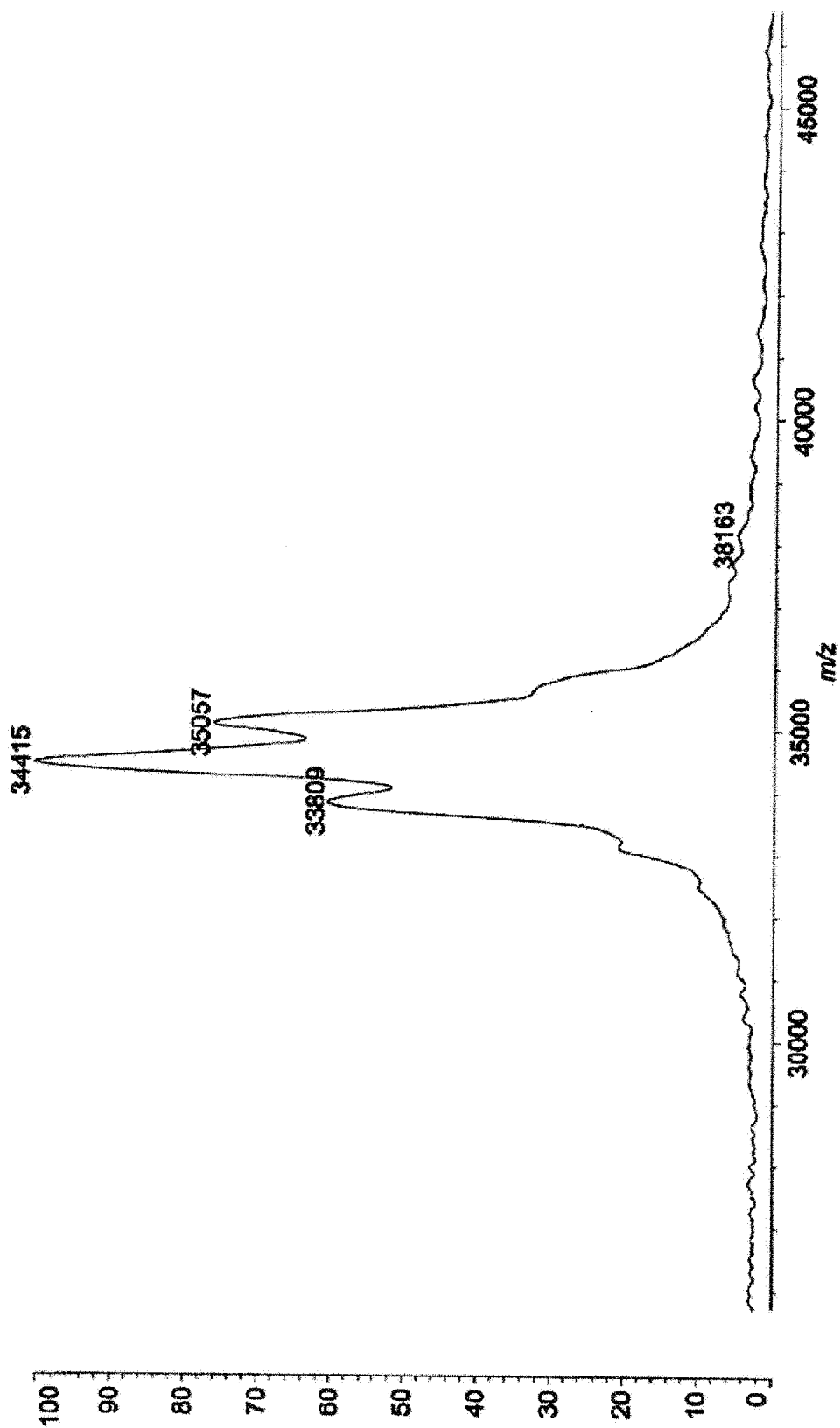
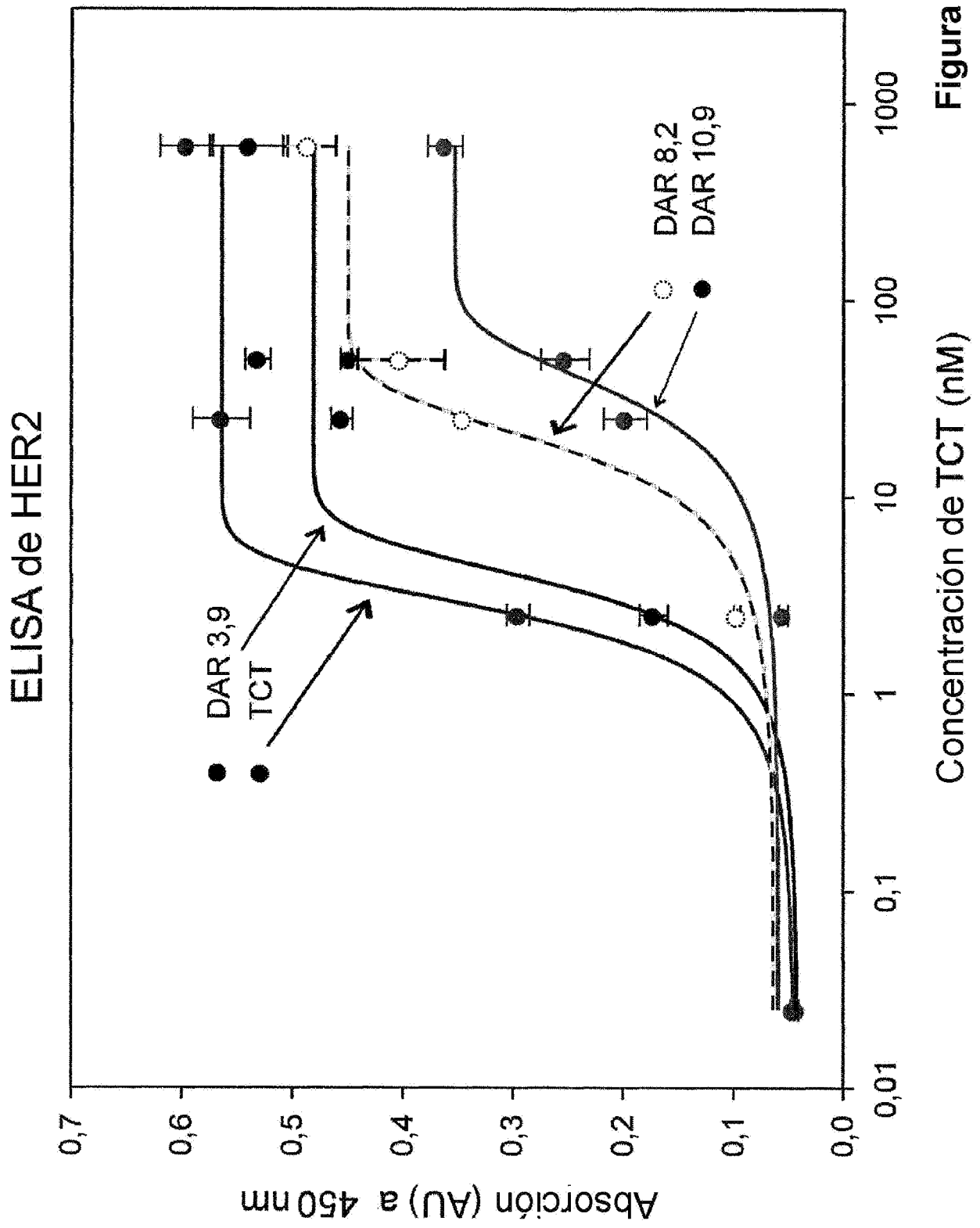


Figura 20



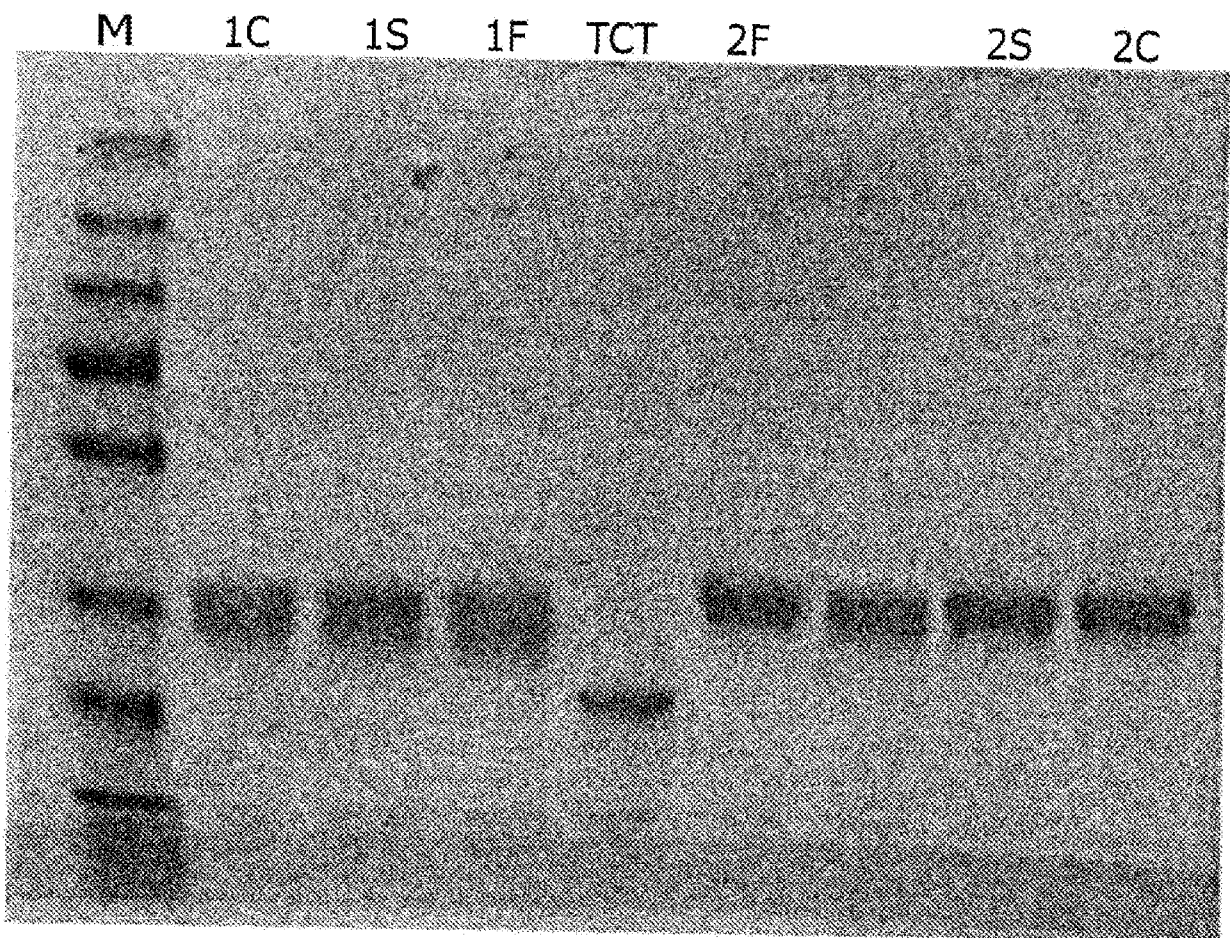


Figura 22

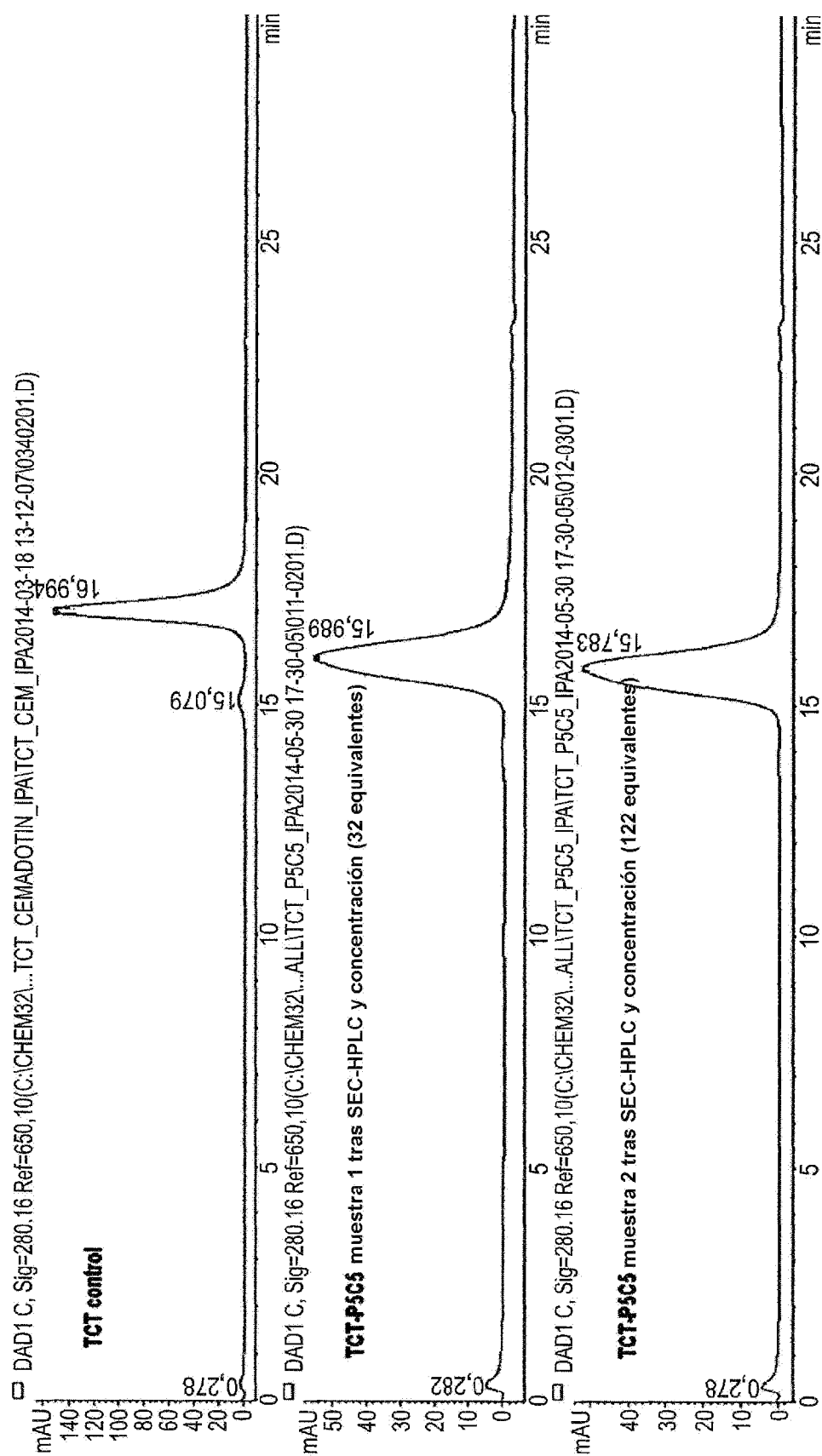


Figura 23a

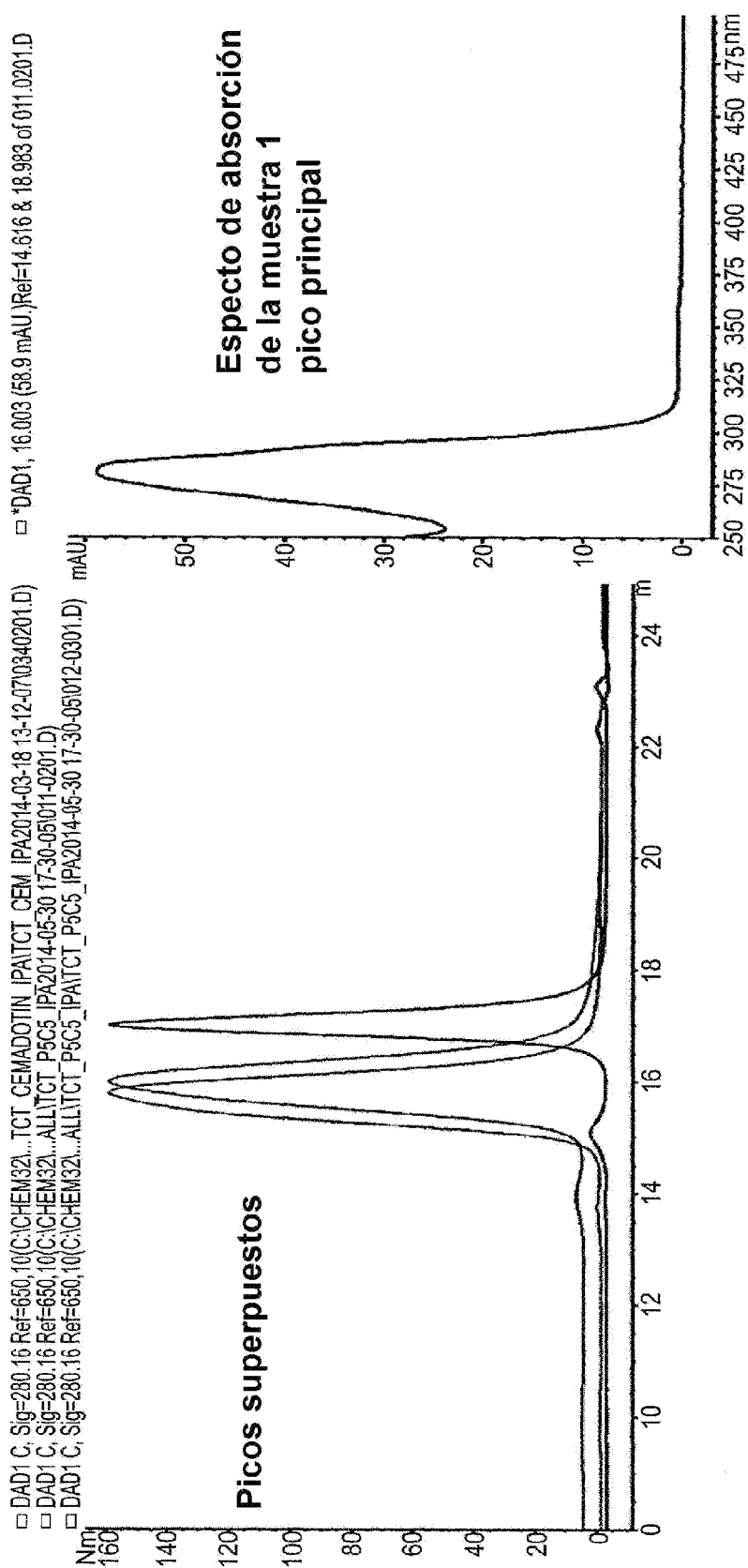


Figura t23b

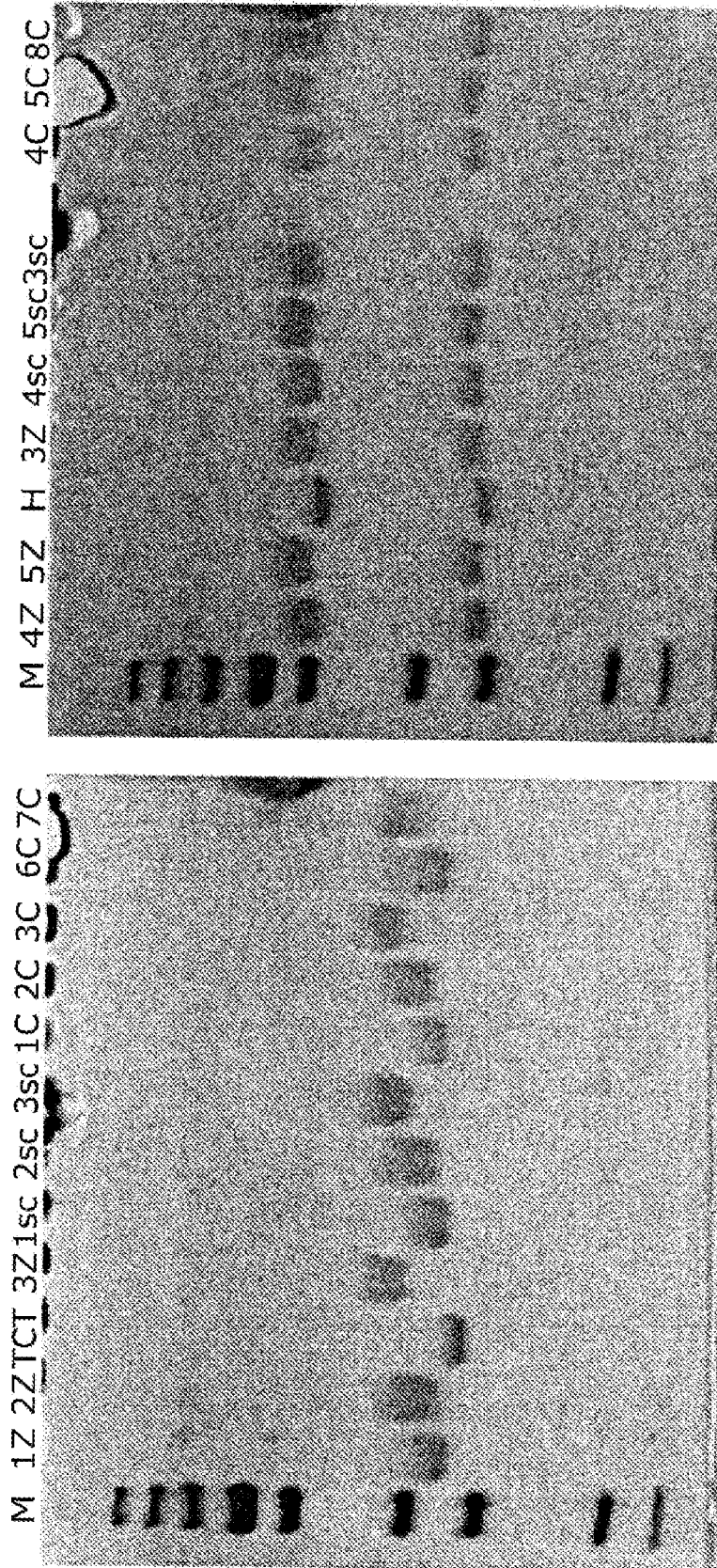


Figura 24

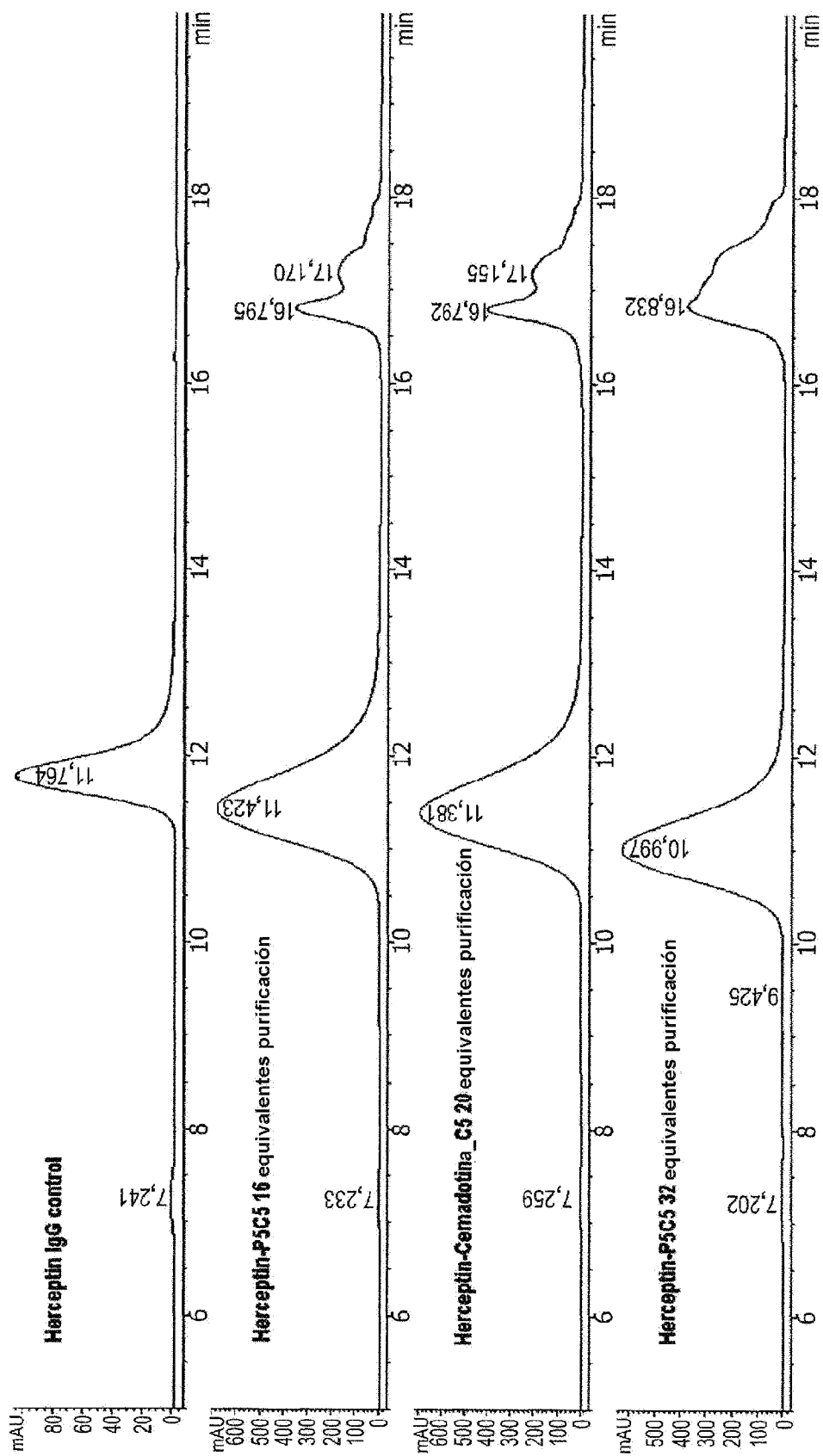


Figura 25

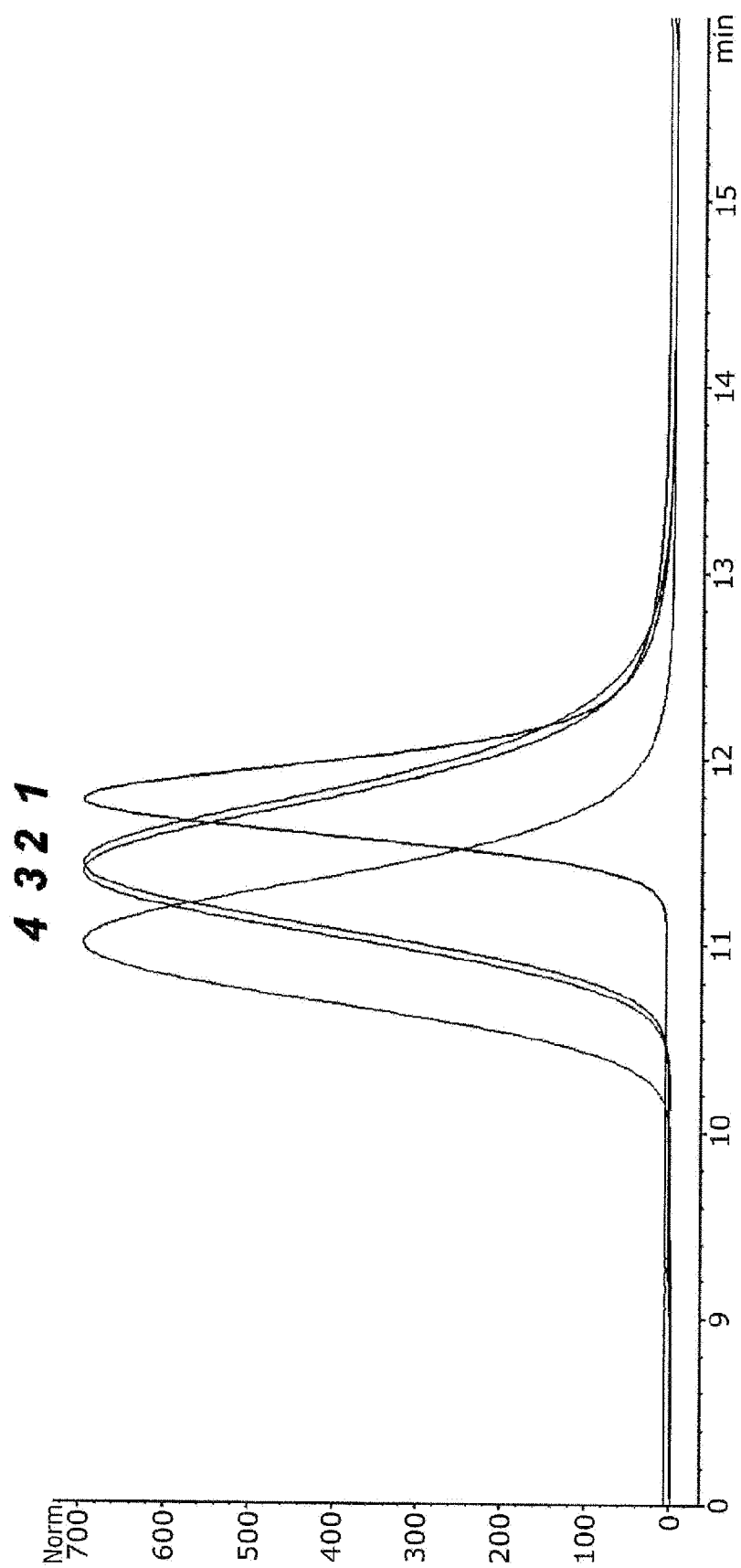


Figura 26

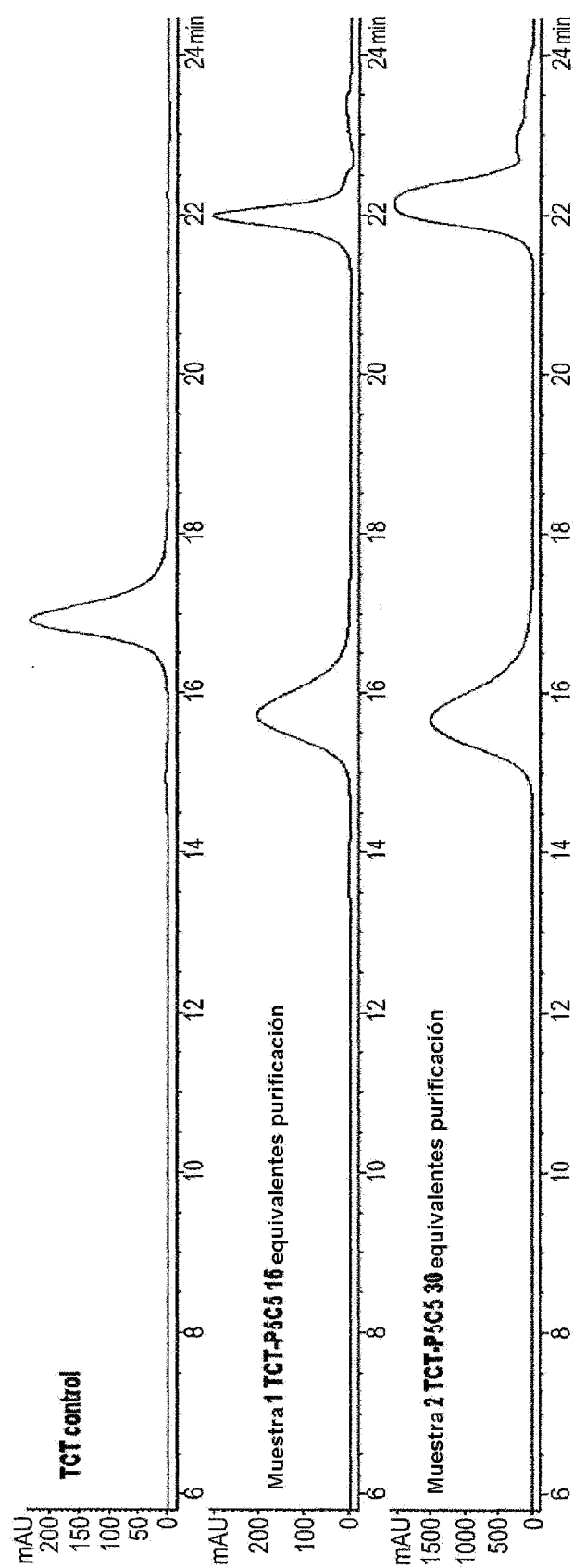


Figura 27

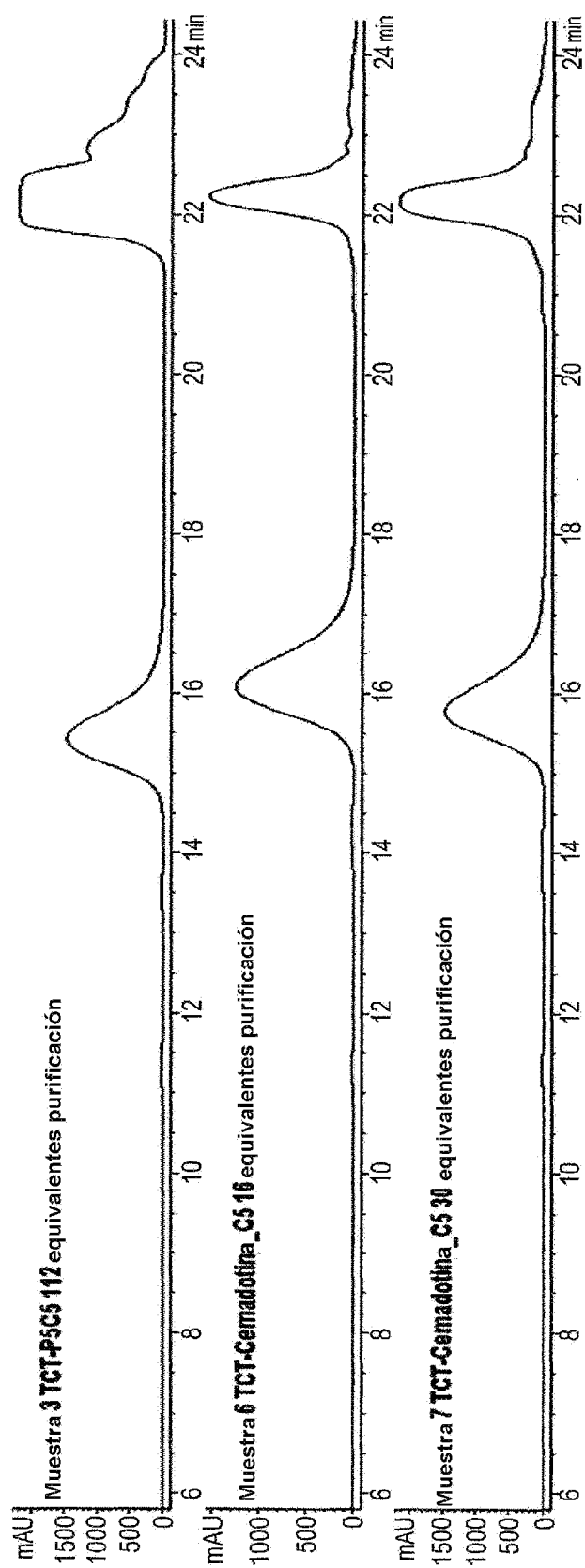
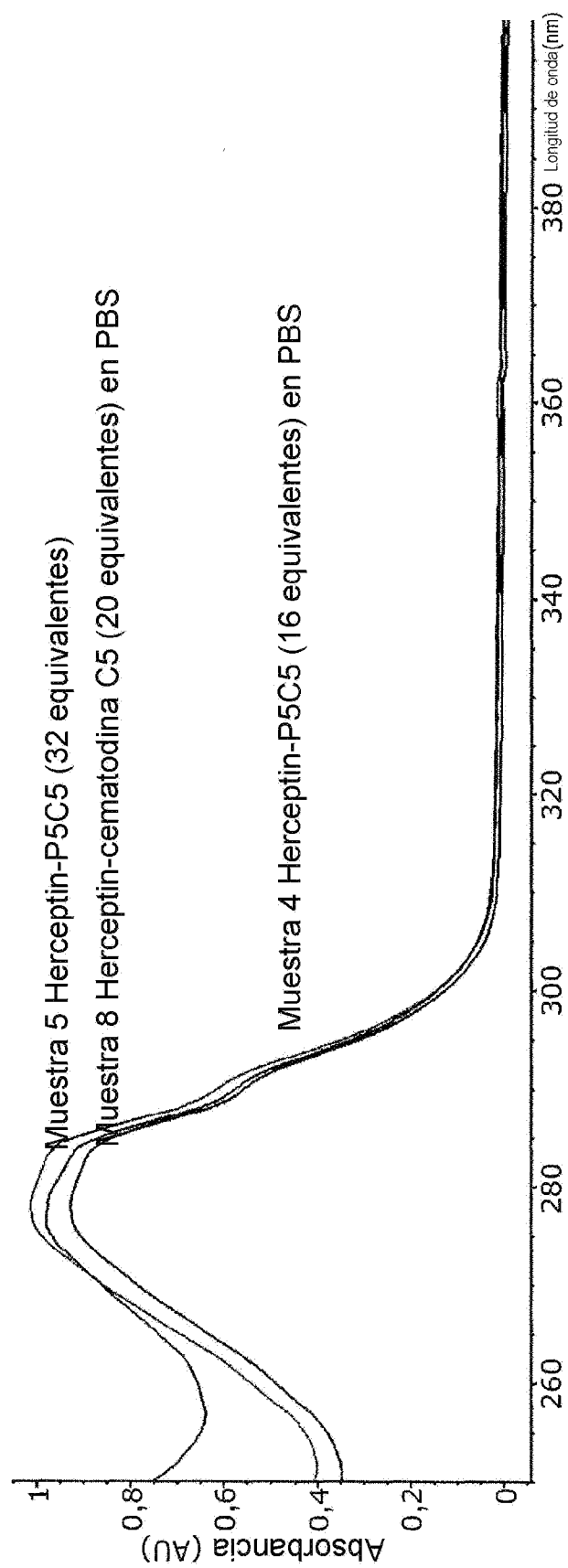
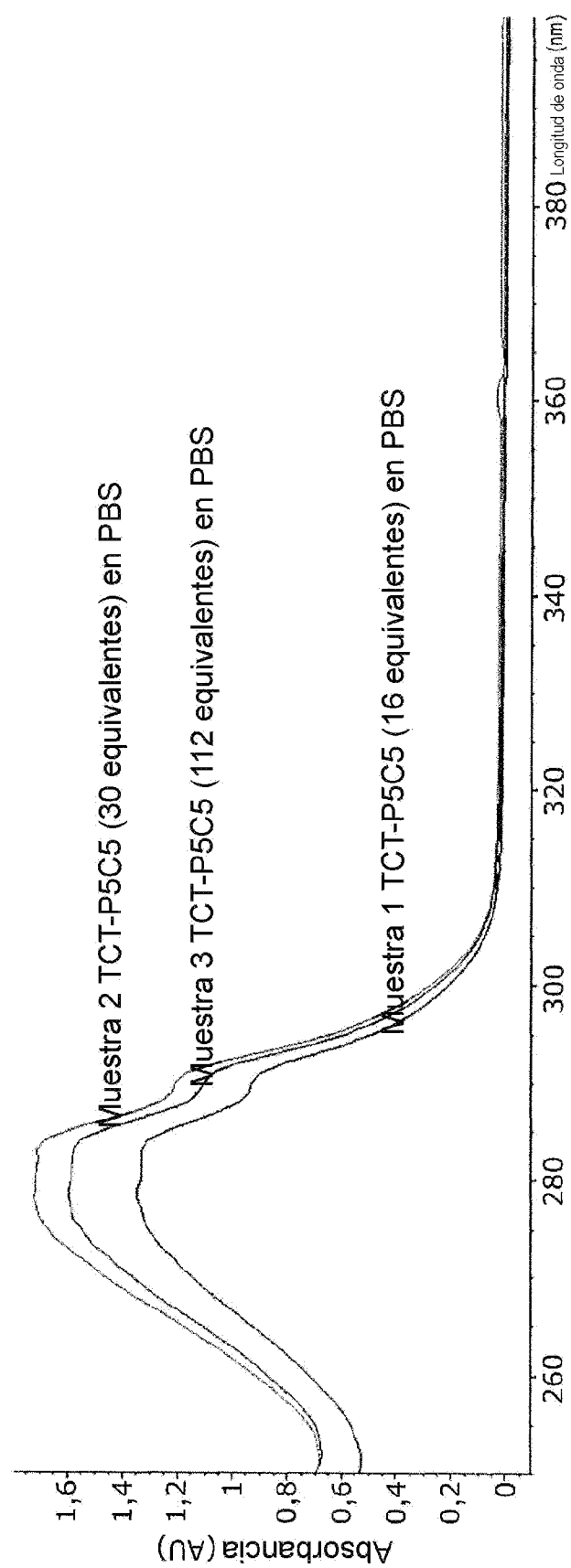


Figura 27 (continuación)

**Figura 28**

**Figura 29**

ELISA anti-HER2 que detecta el marcador anti-T7 ADC ScFv (TCT)-P5C5

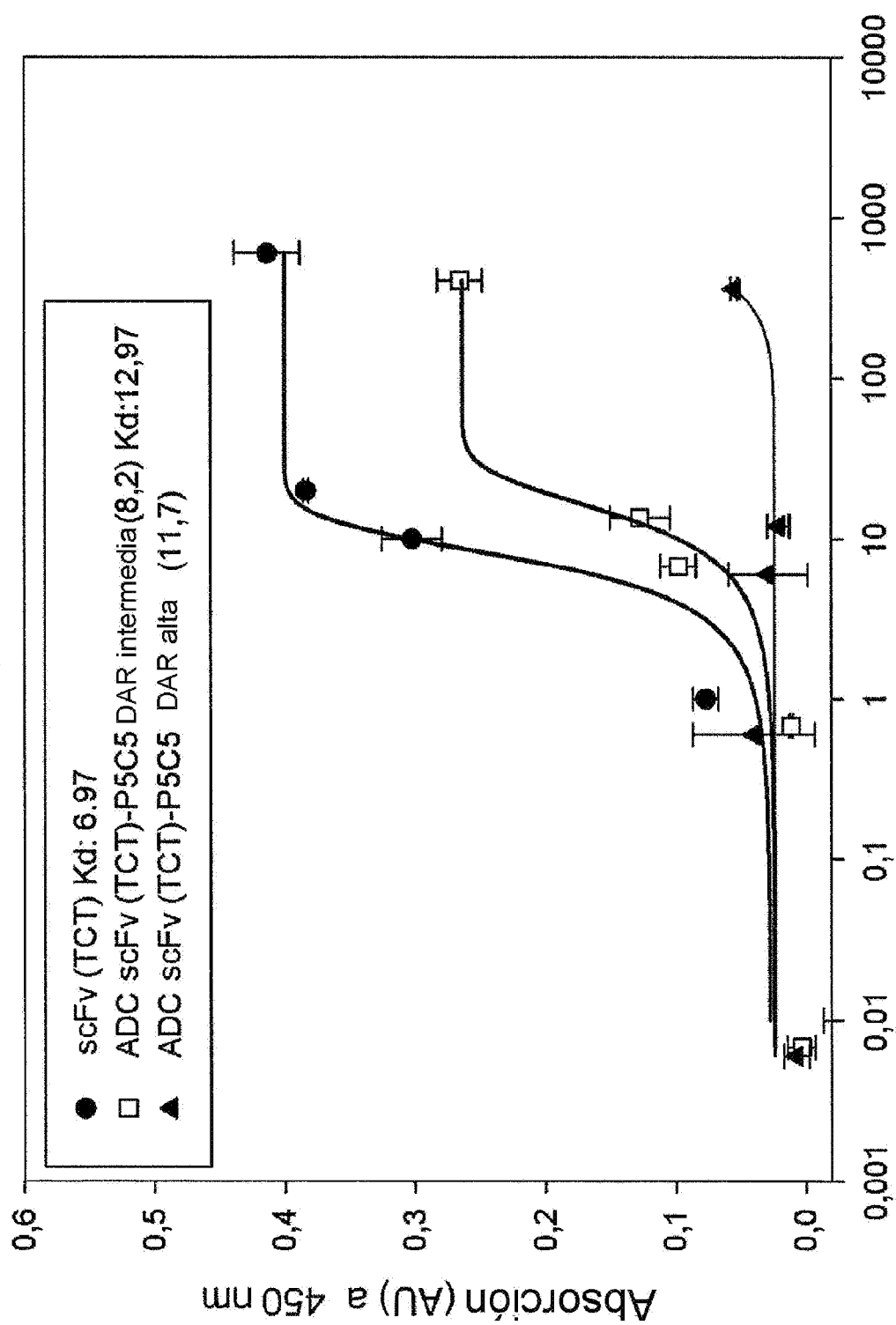


Figura 30

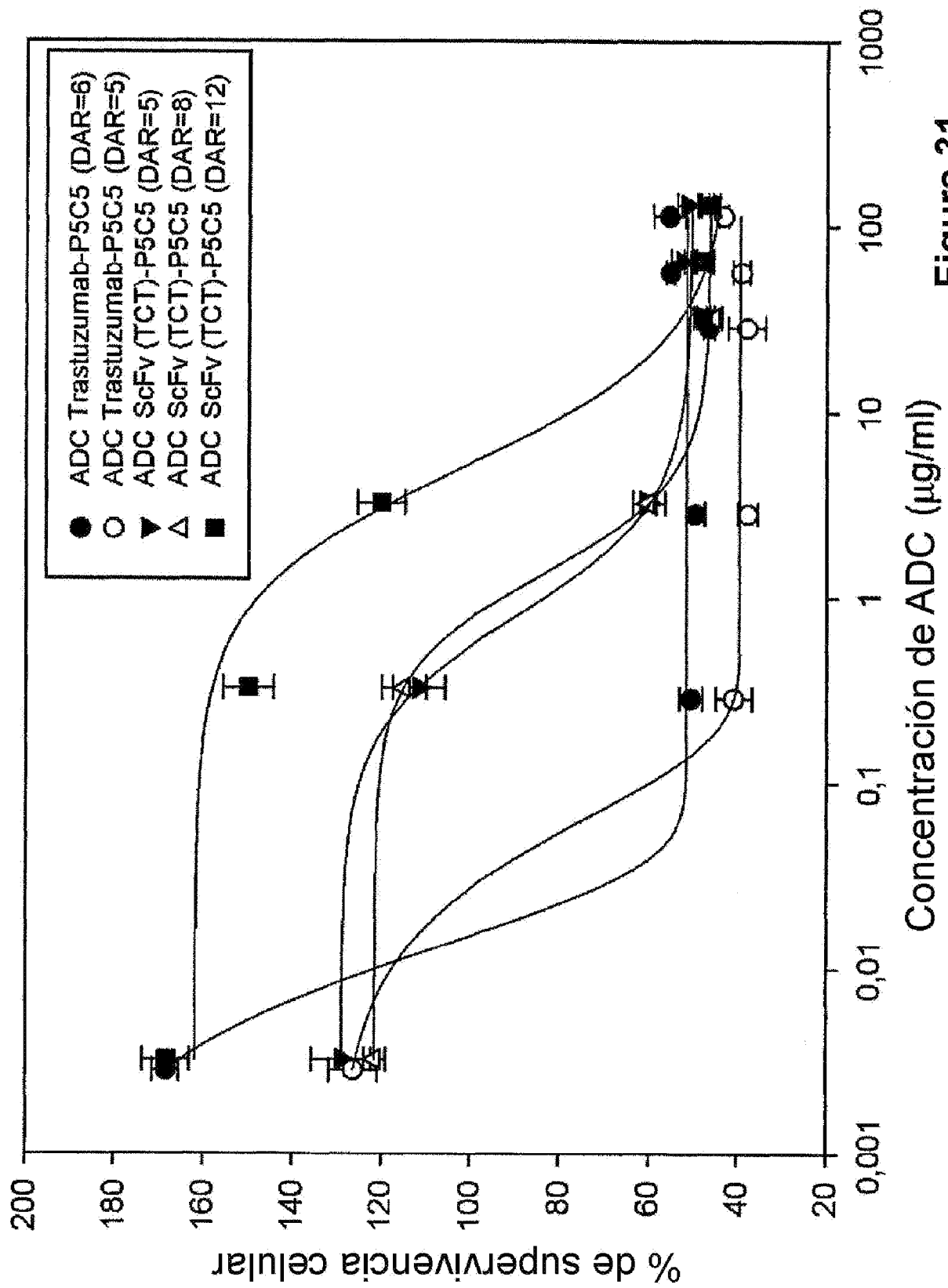


Figura 31

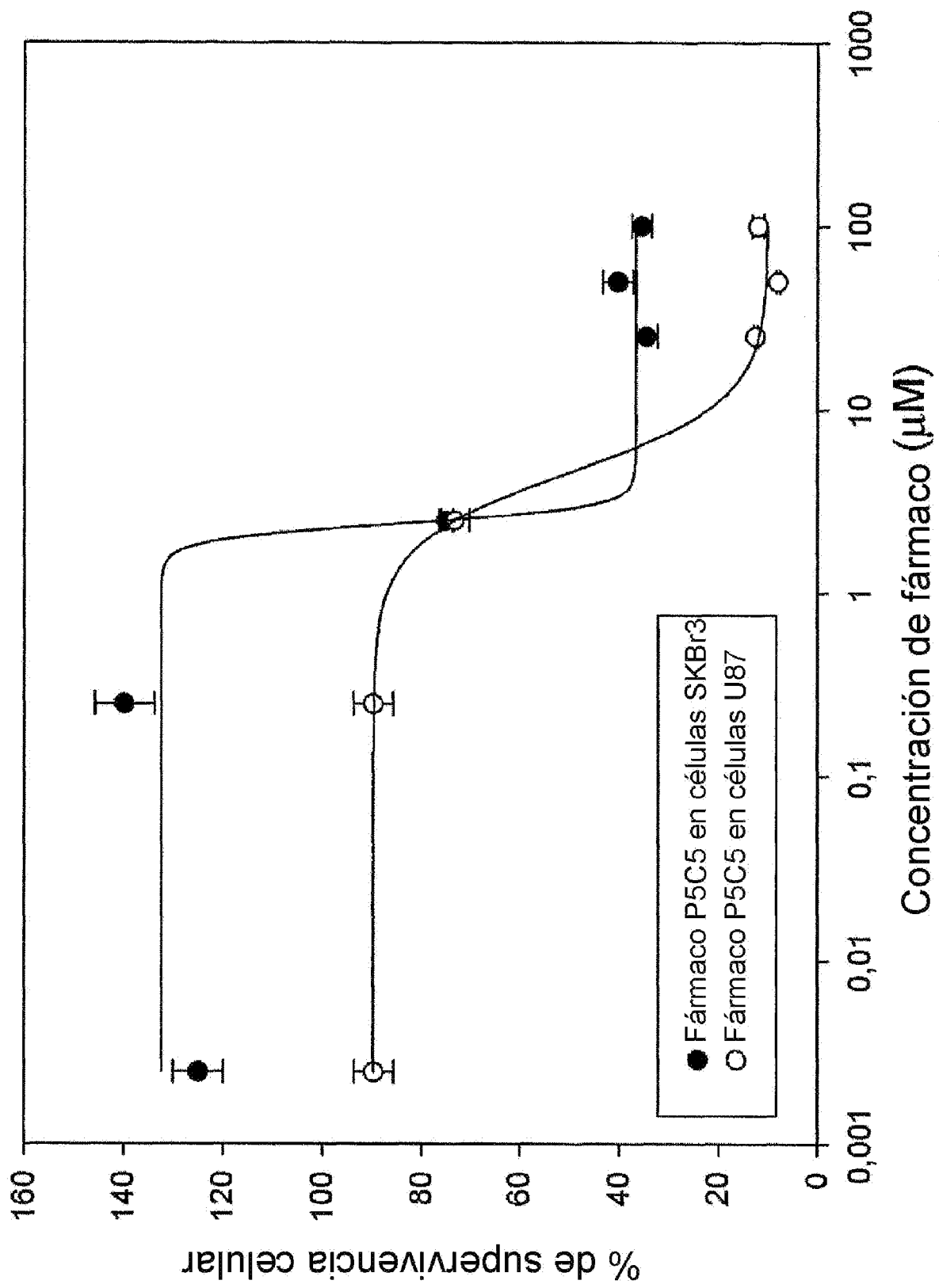


Figura 32

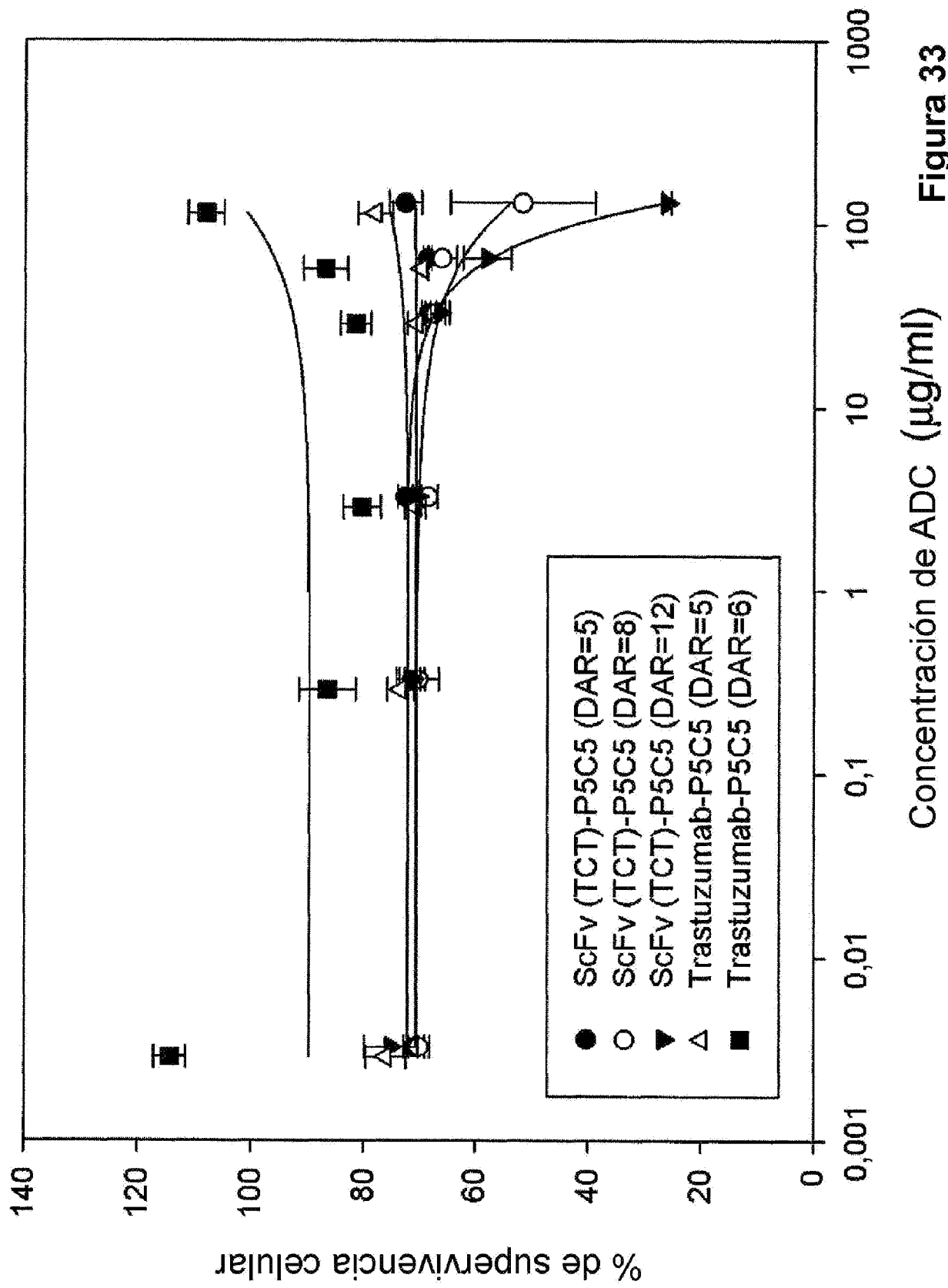


Figura 33

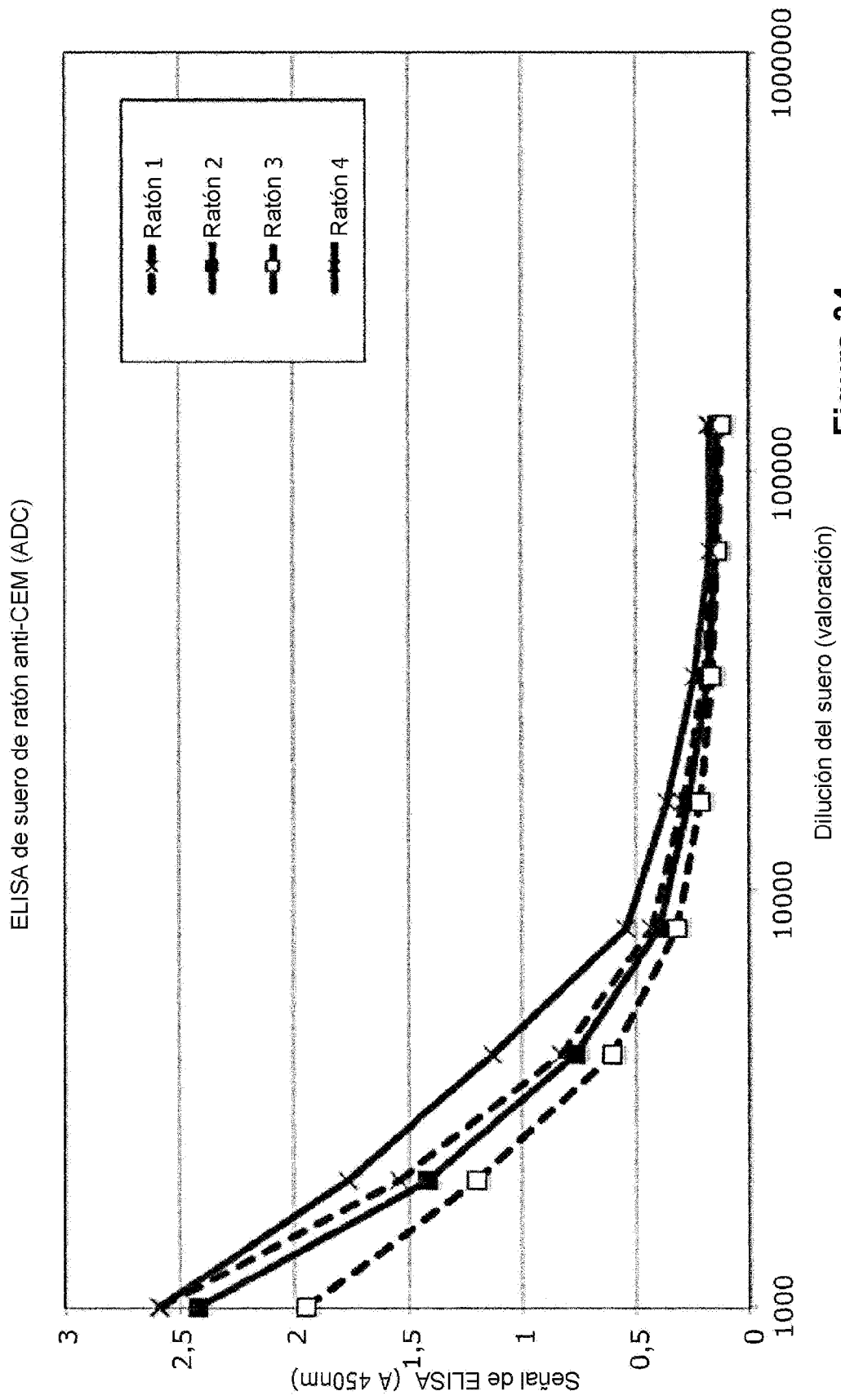


Figura 34

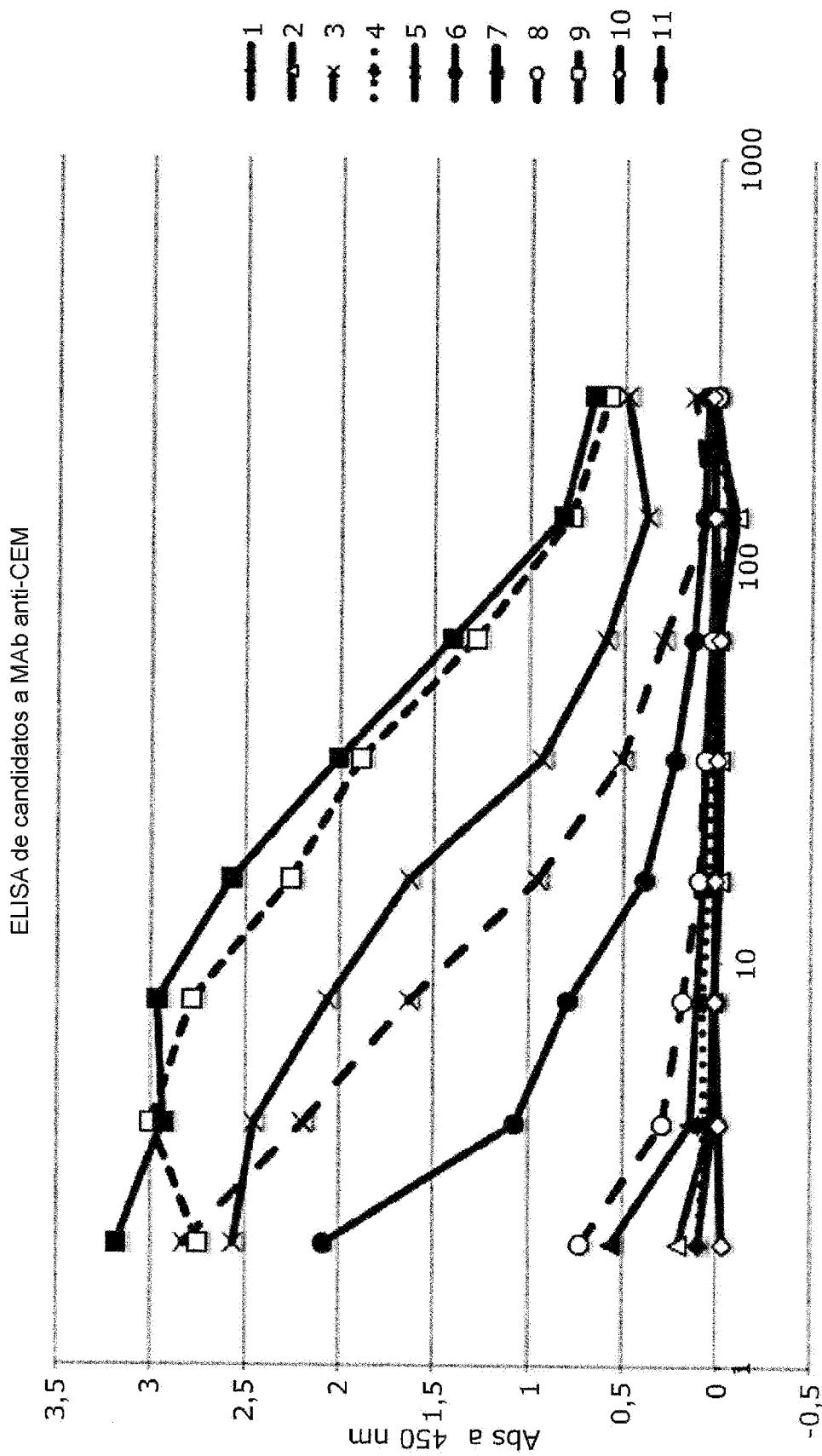
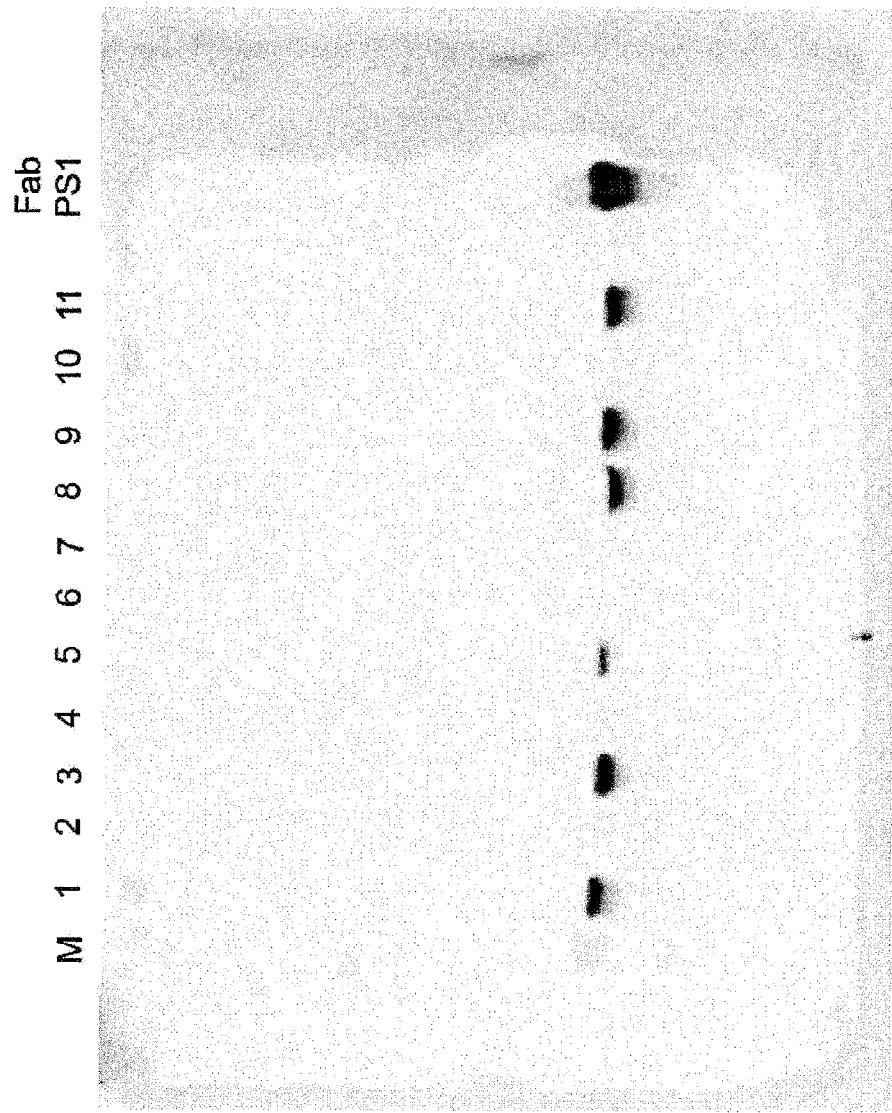


Figura 35



Clon n.º	Ref. de la placa
1	GC7
2	EB3
3	BH8
4	BF1
5	BD7
6	FH5
7	GD5
8	GE11
9	IE11
10	CG5
11	GA6

Figura 36

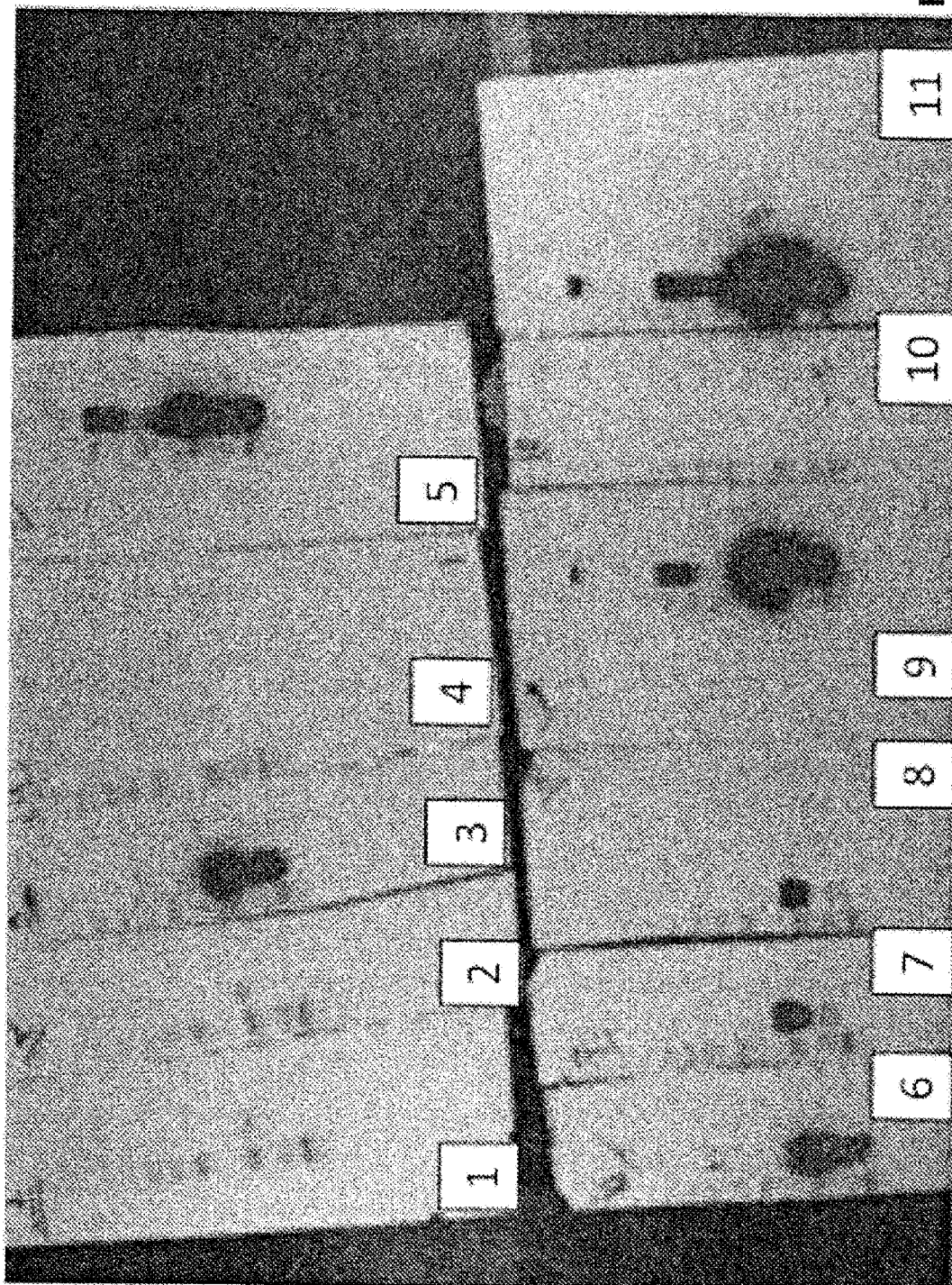


Figura 37

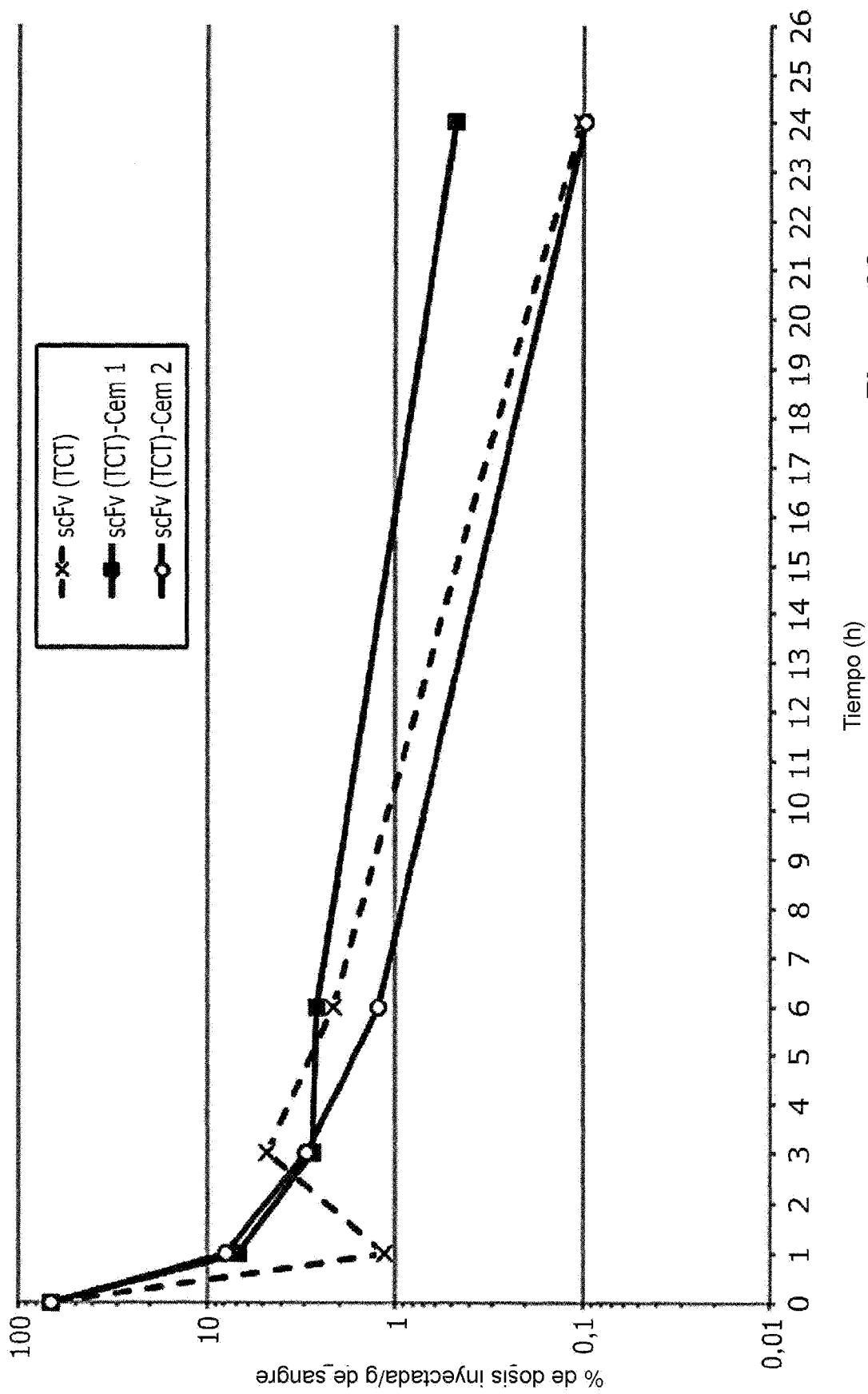


Figura 38

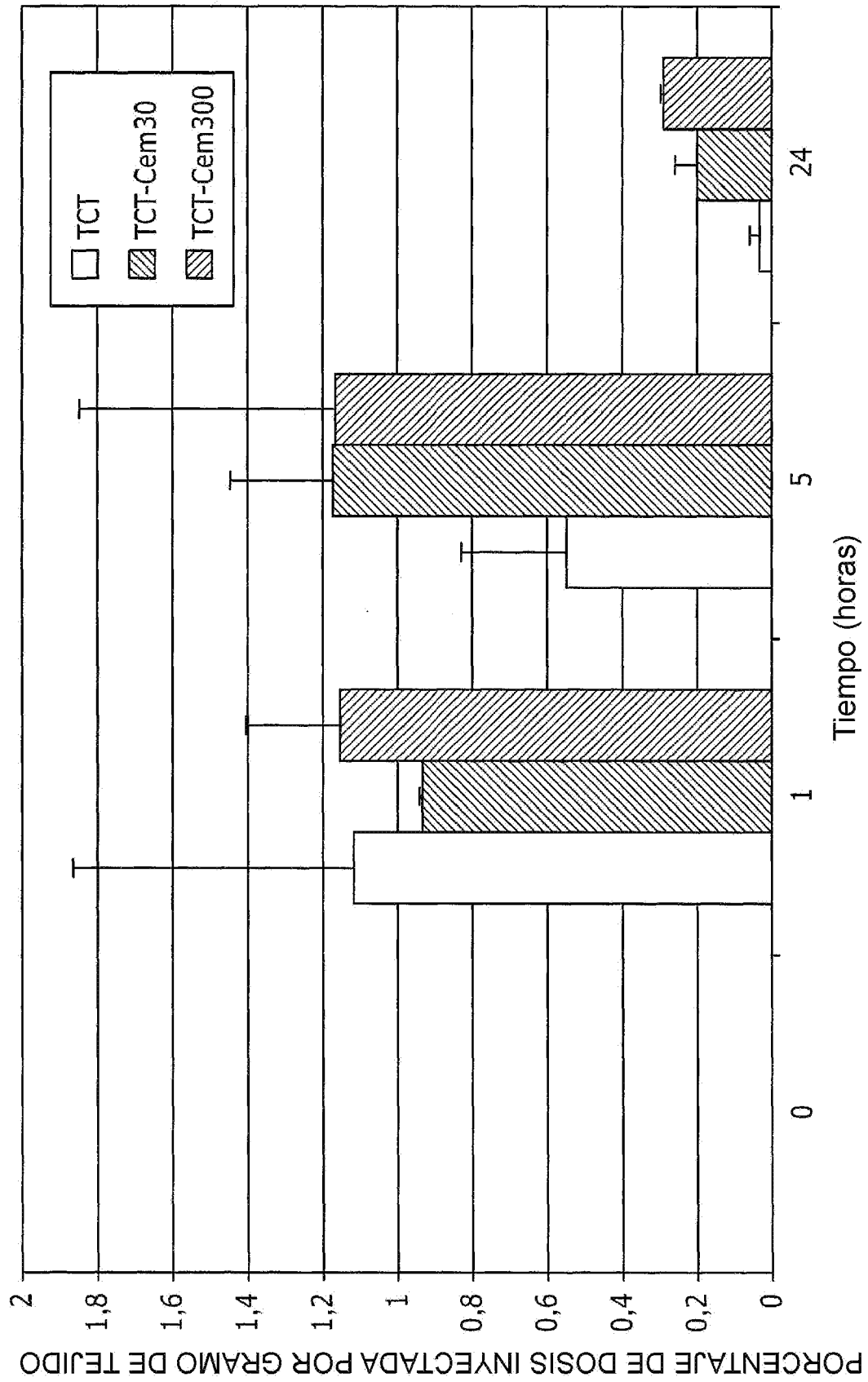


Figura 39

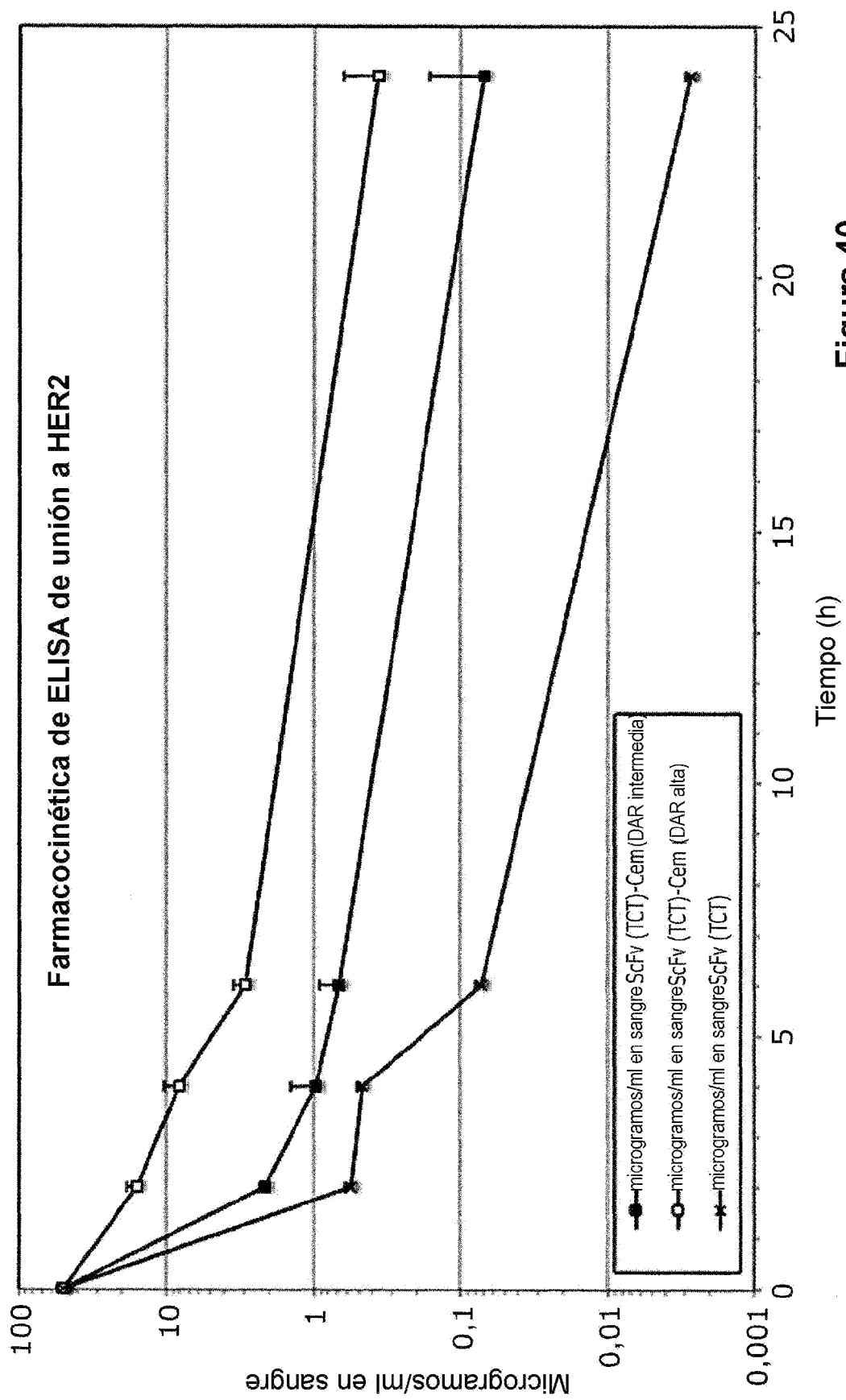


Figura 40

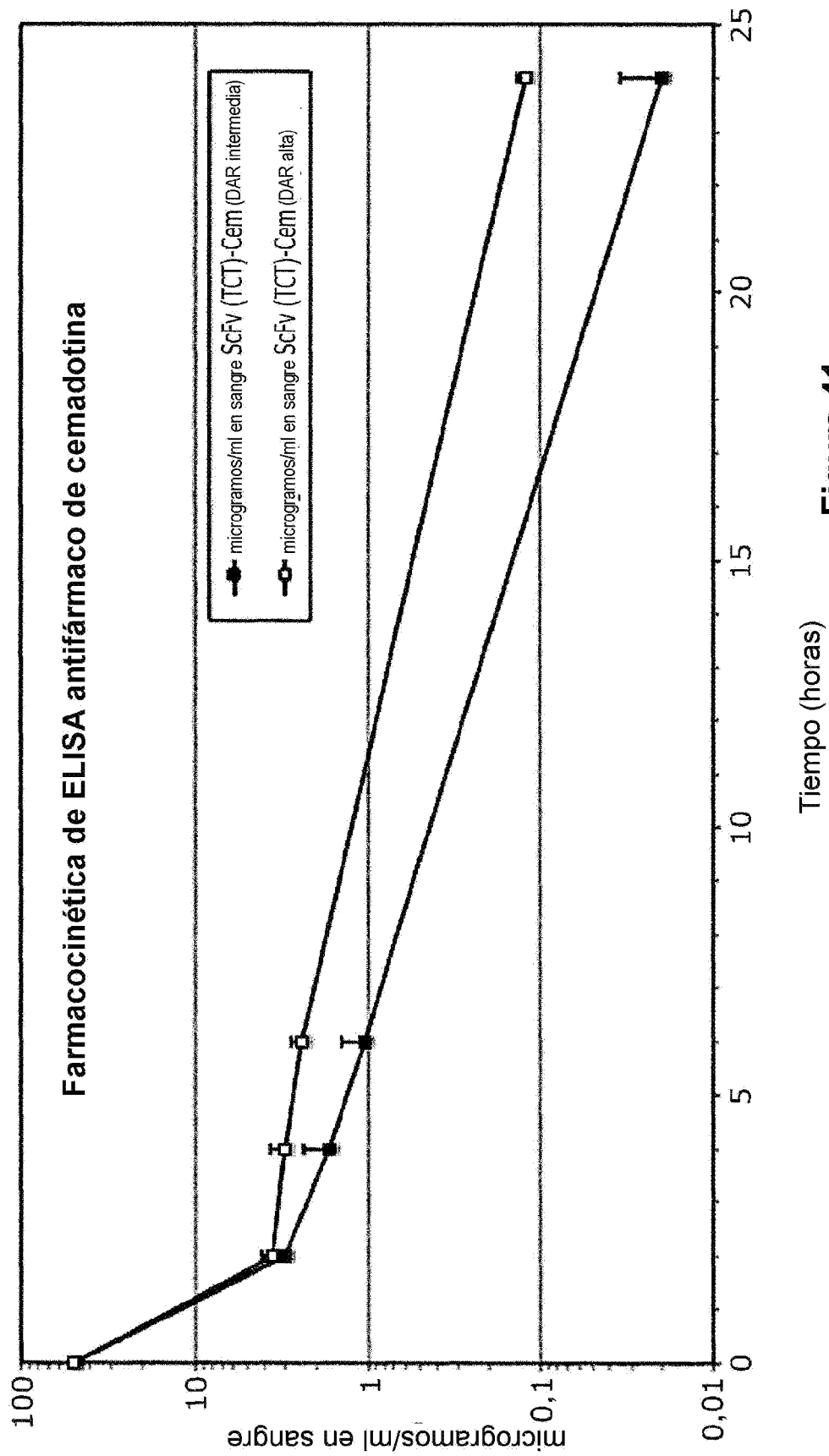
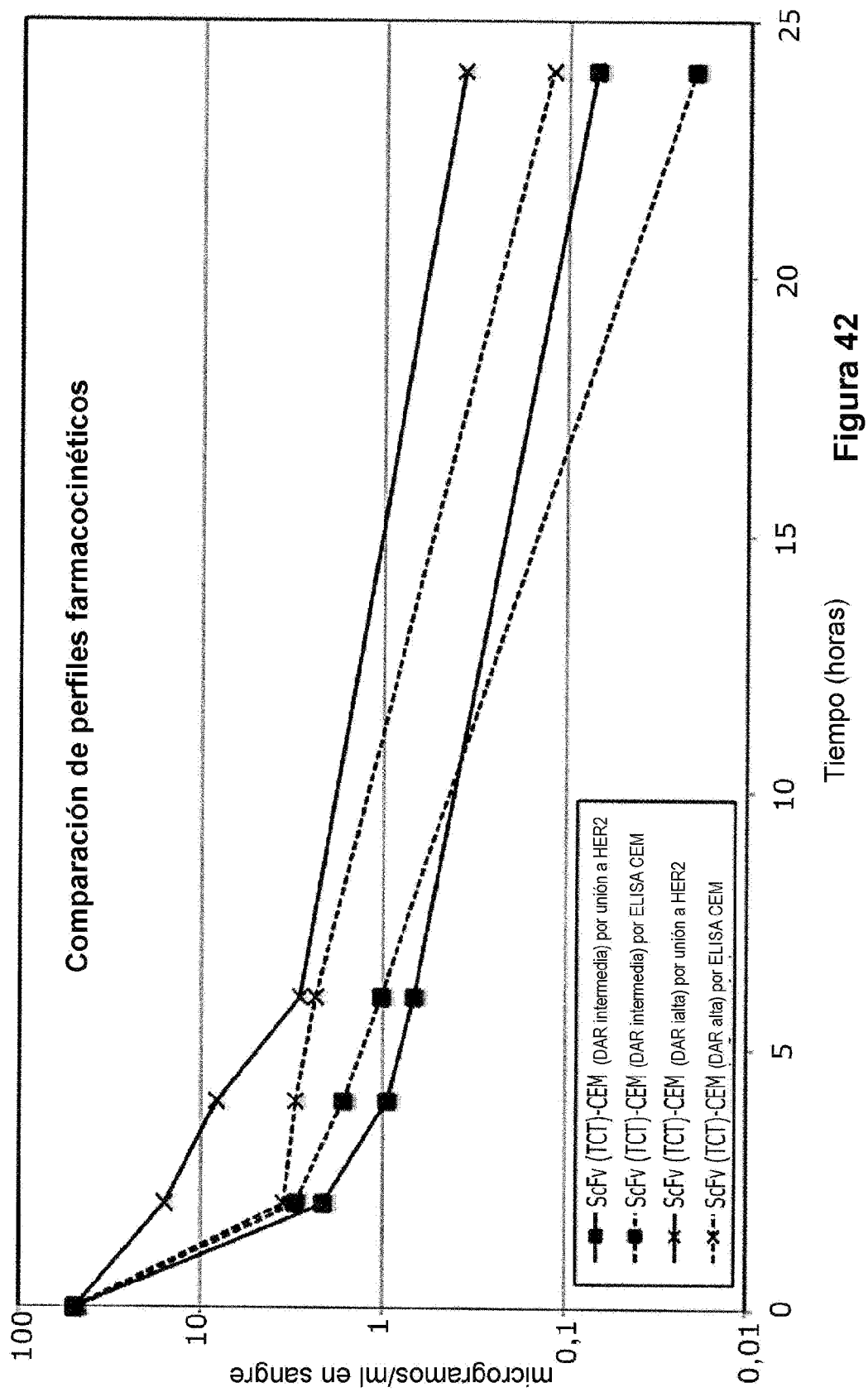
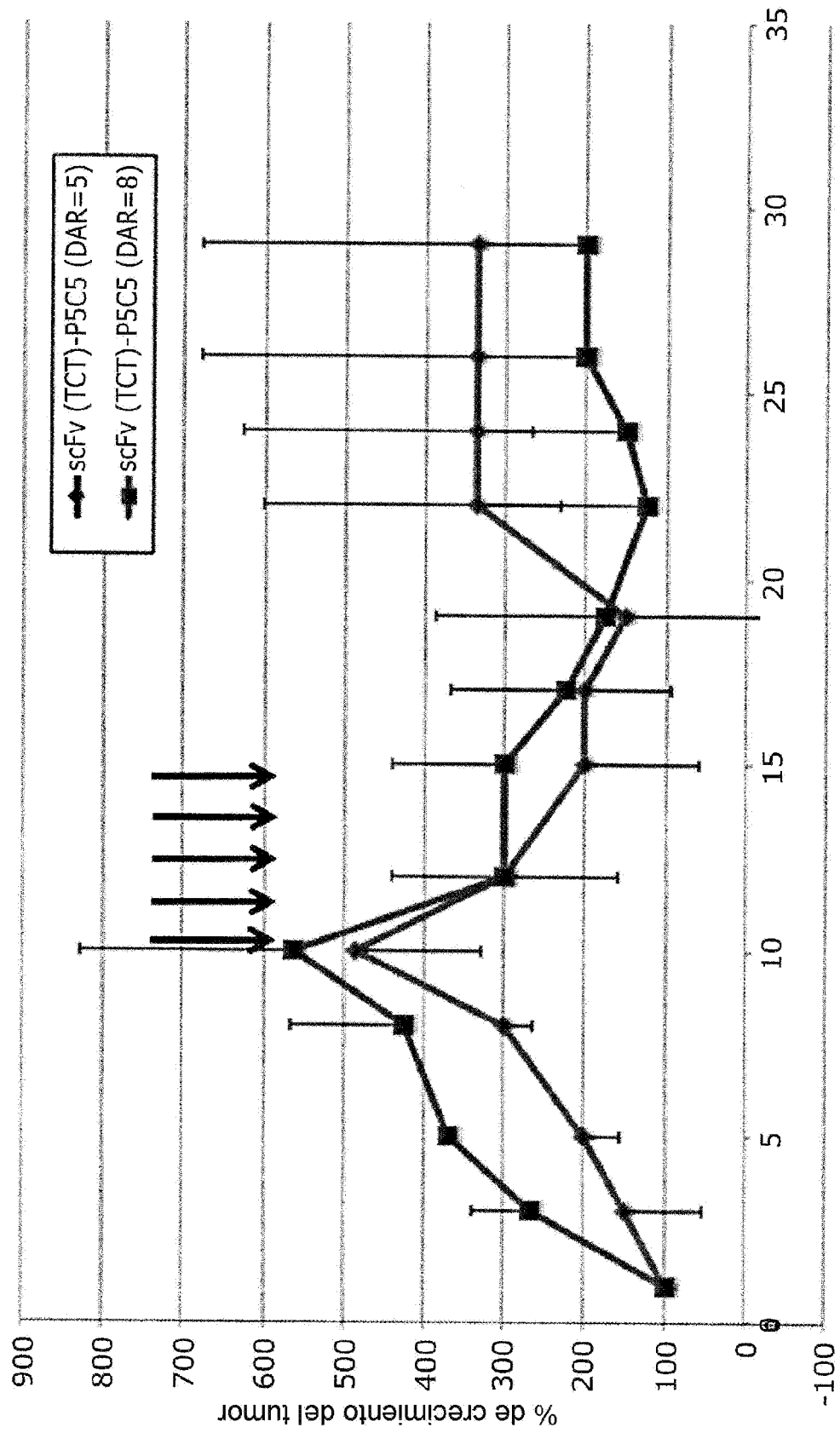


Figura 41





Días tras el implante del tumor

Figura 43

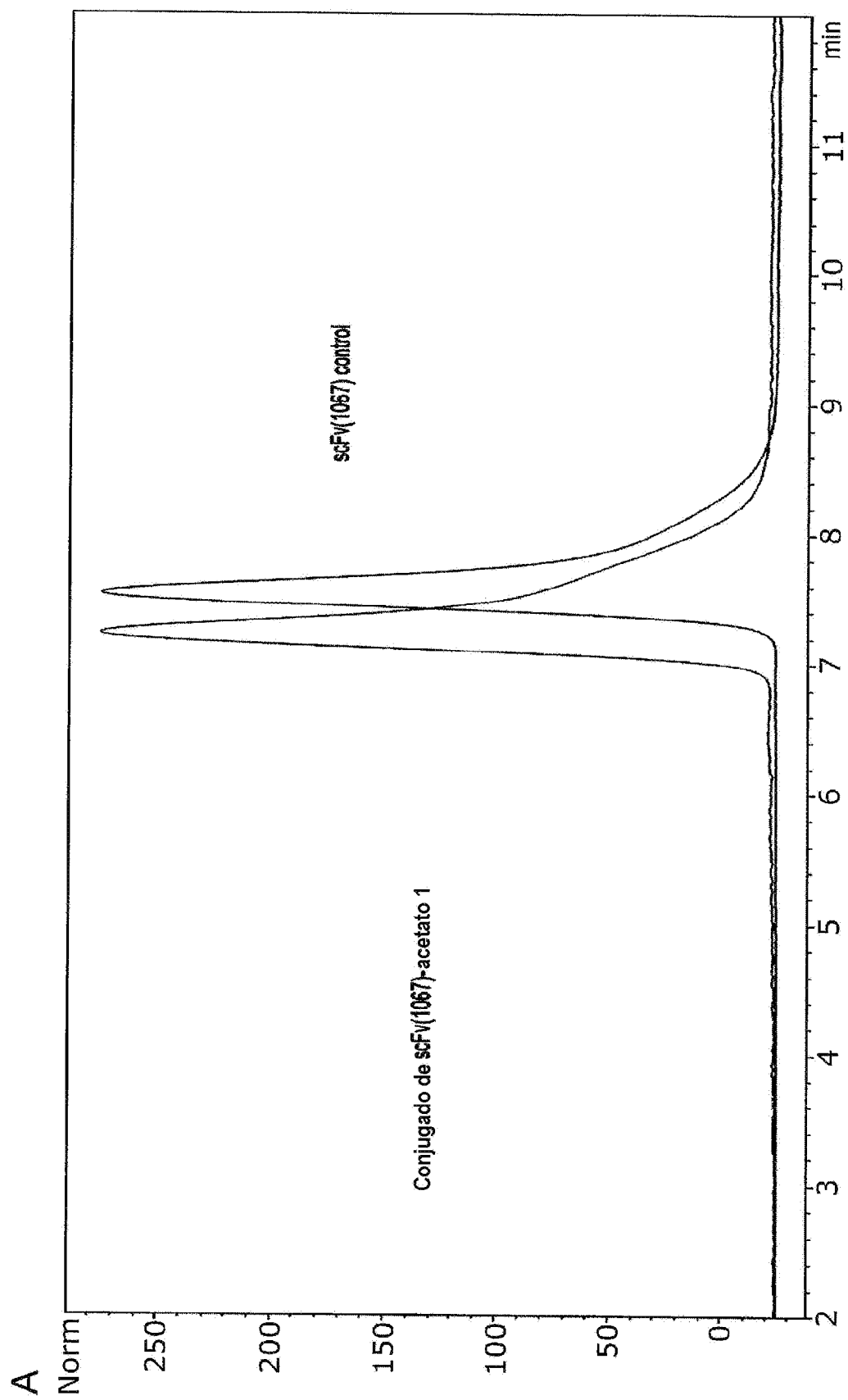


Figura 44

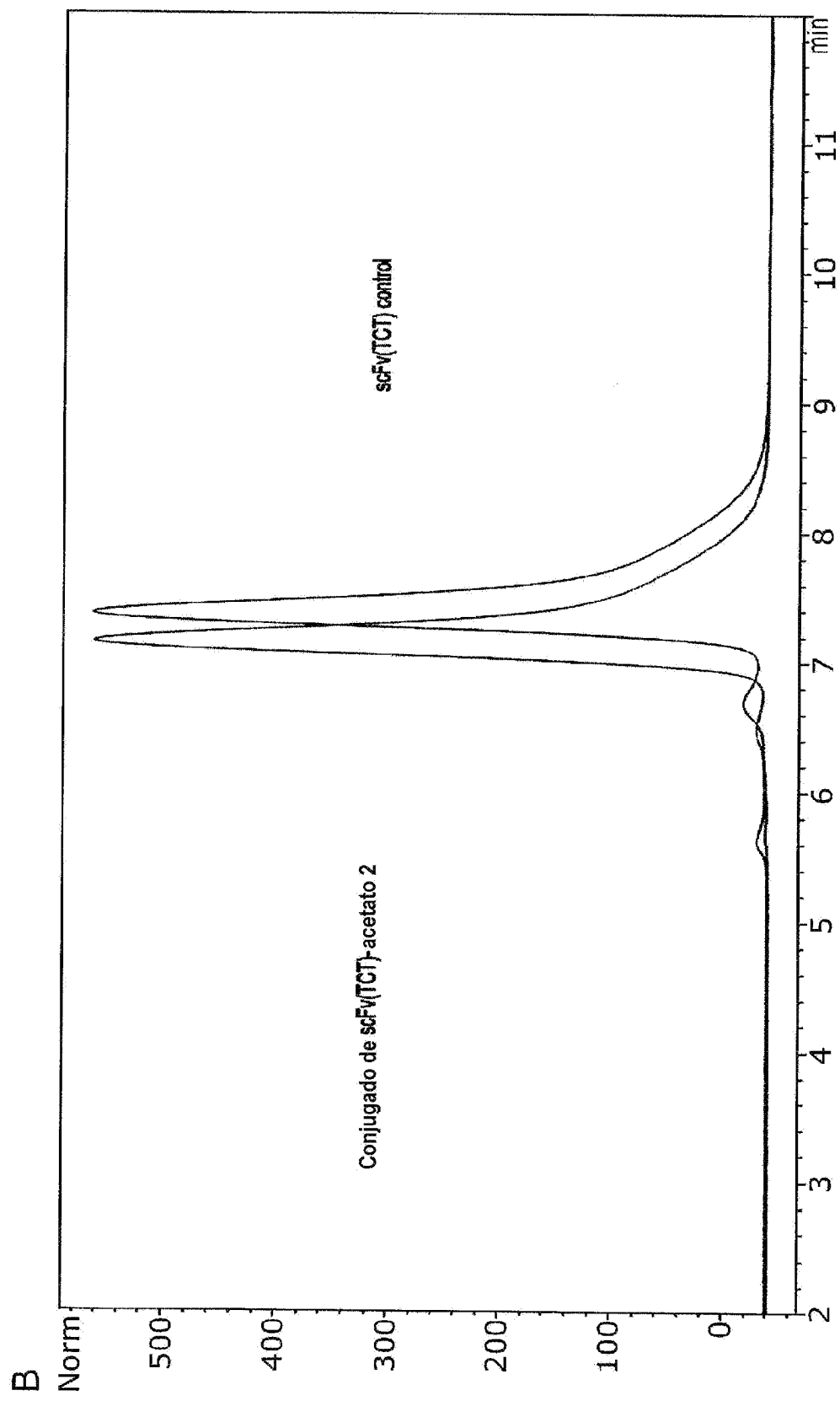


Figura 44 (continuación)

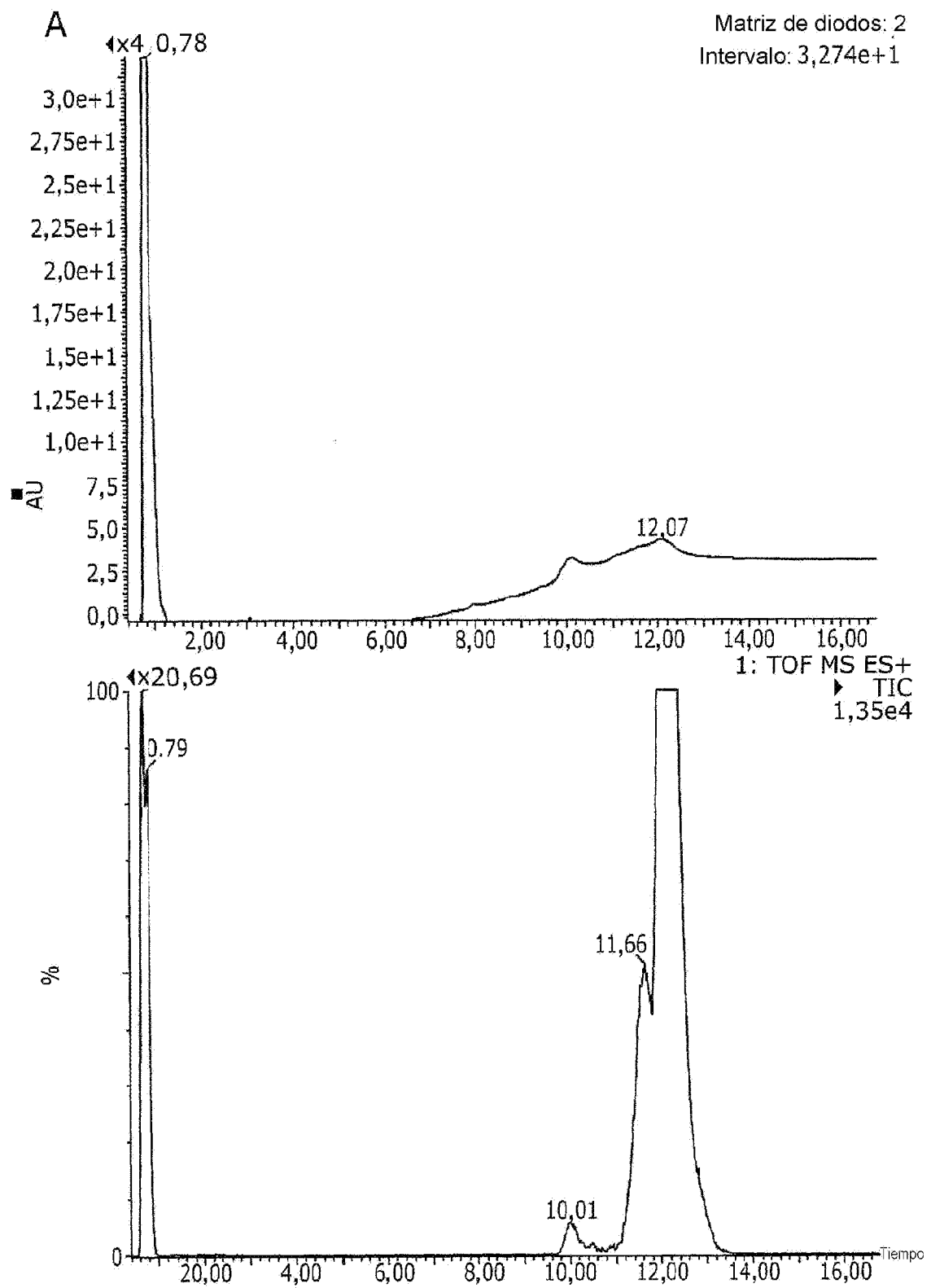


Figura 45

B

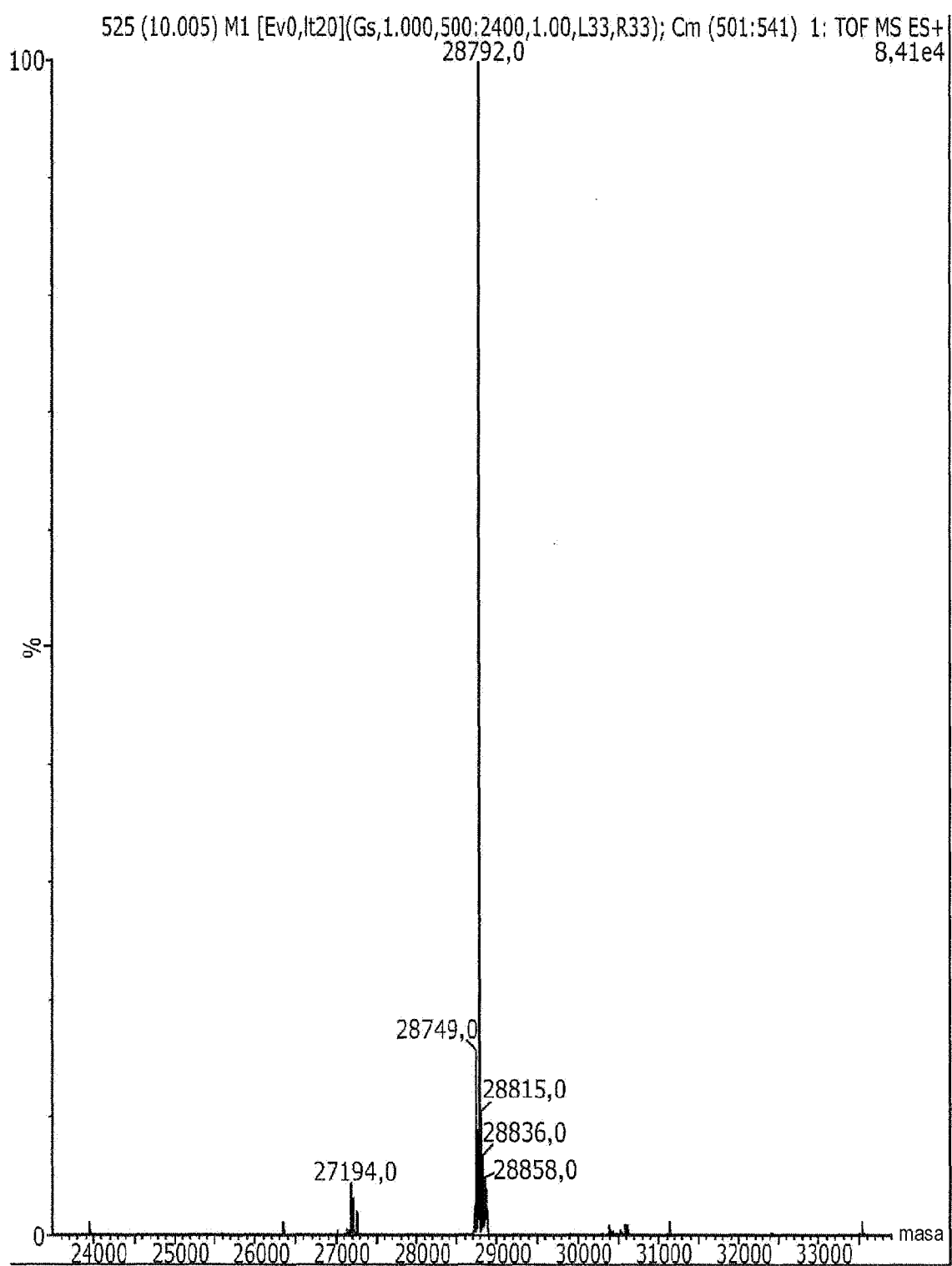


Figura 45 (continuación)

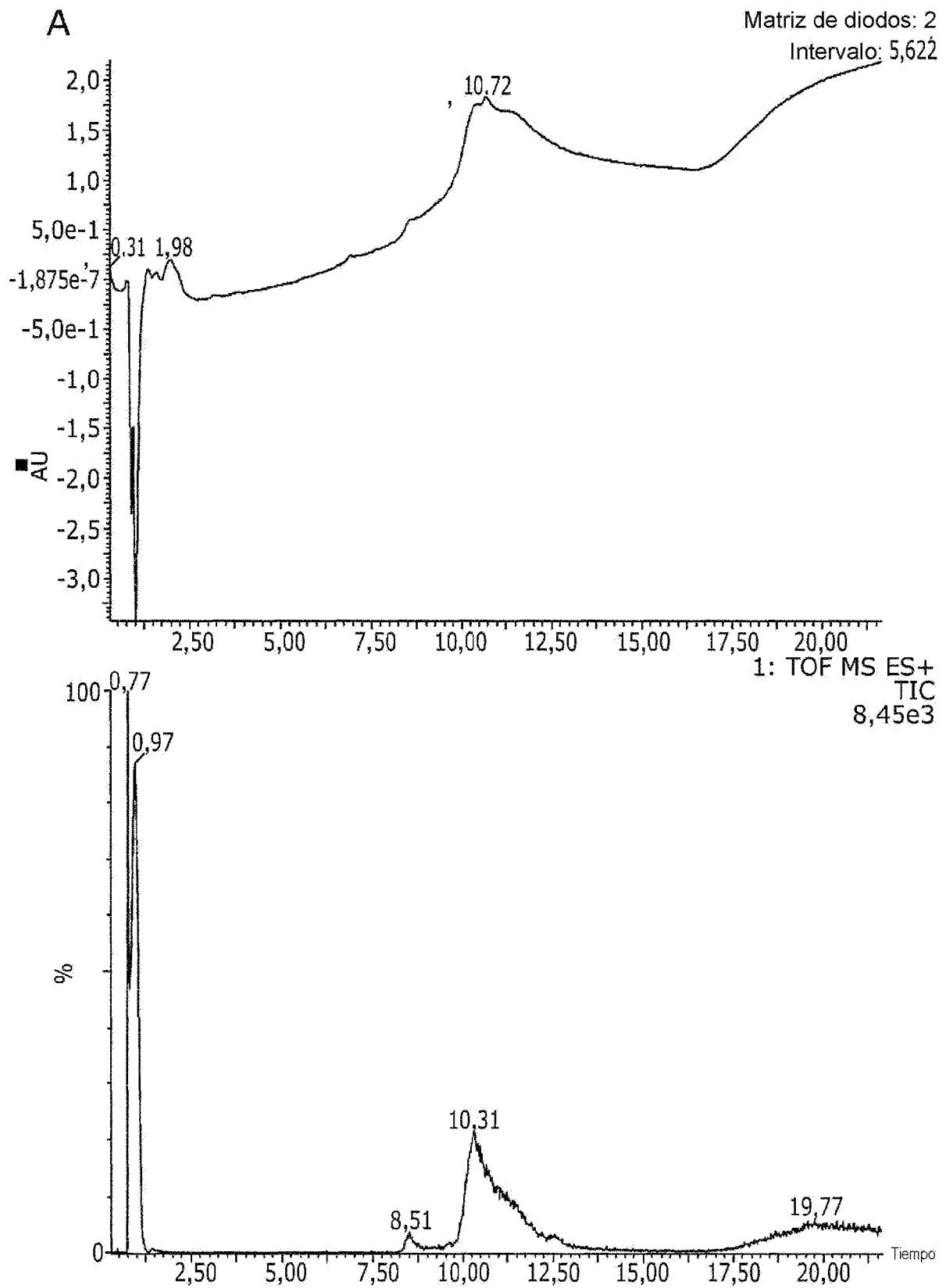


Figura 46

B

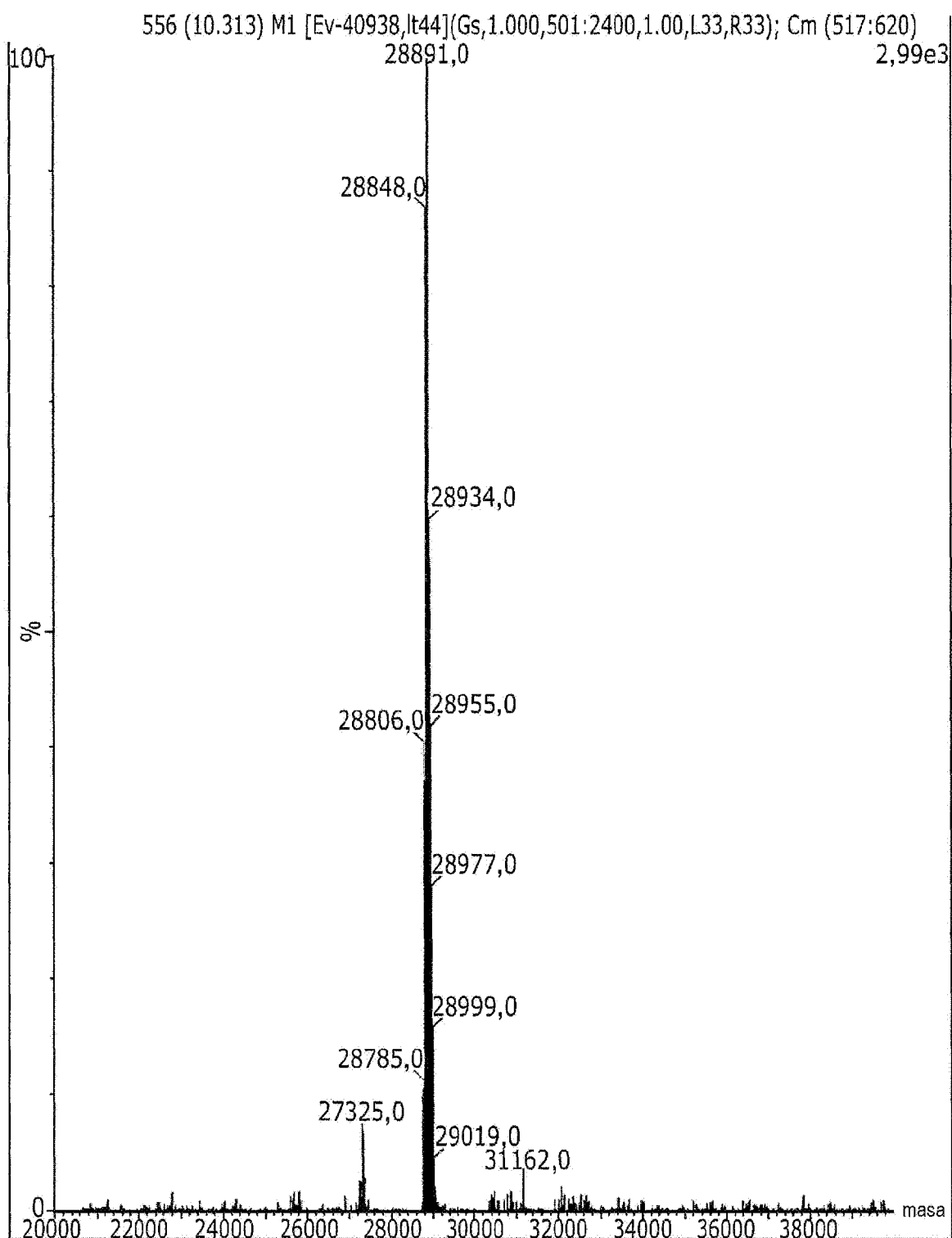


Figura 46 (continuación)

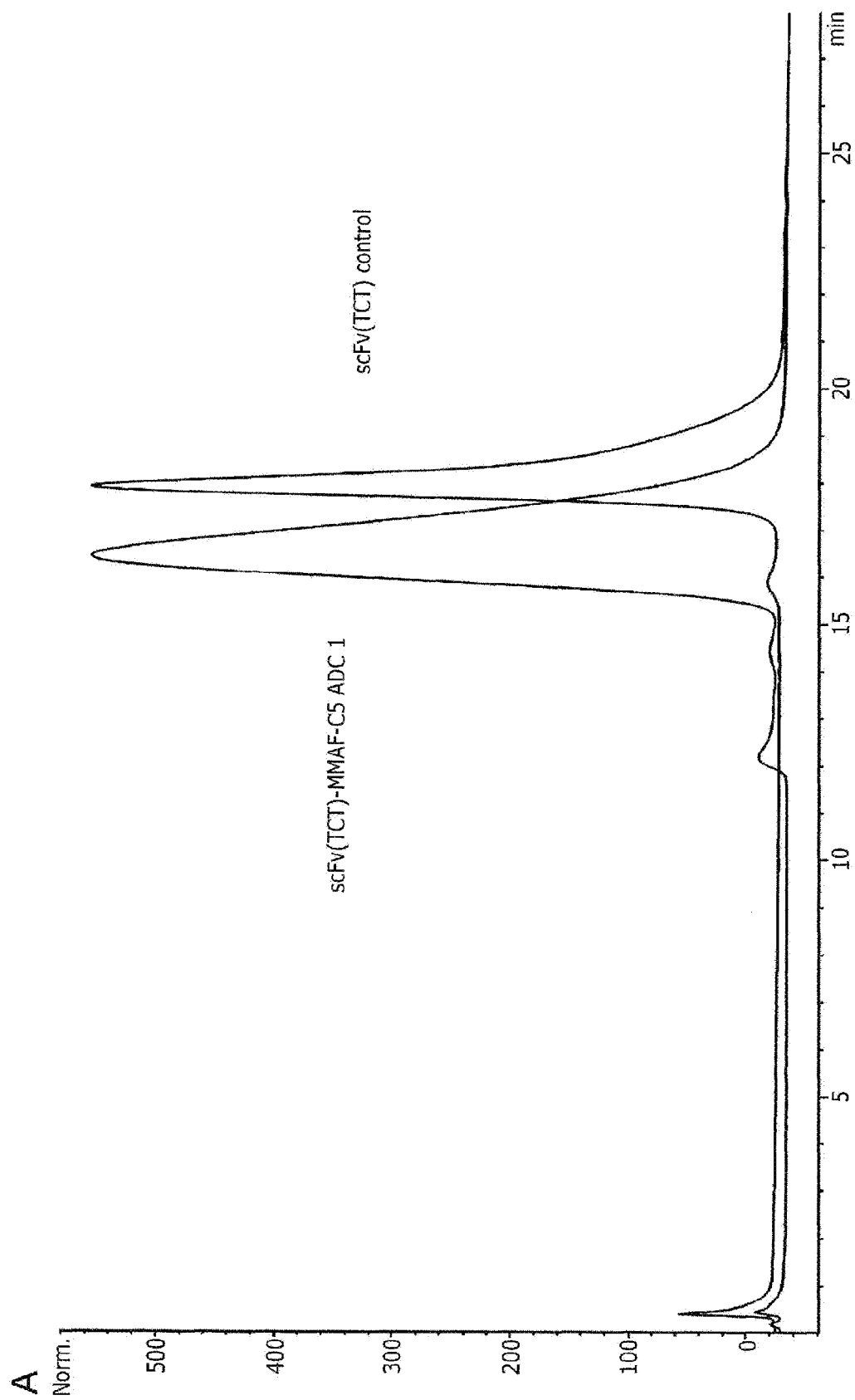


Figure 47

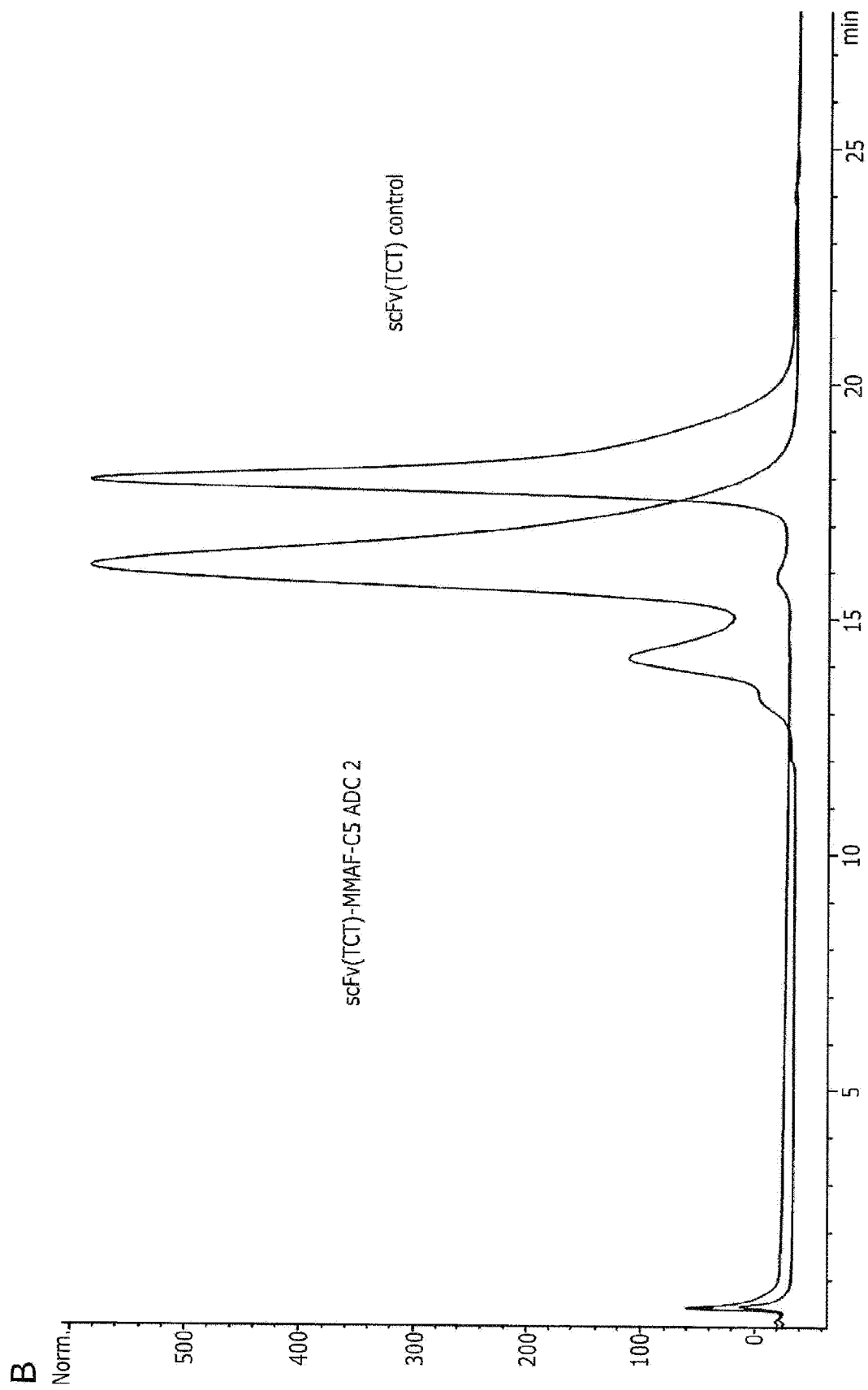


Figura 47 (continuación)

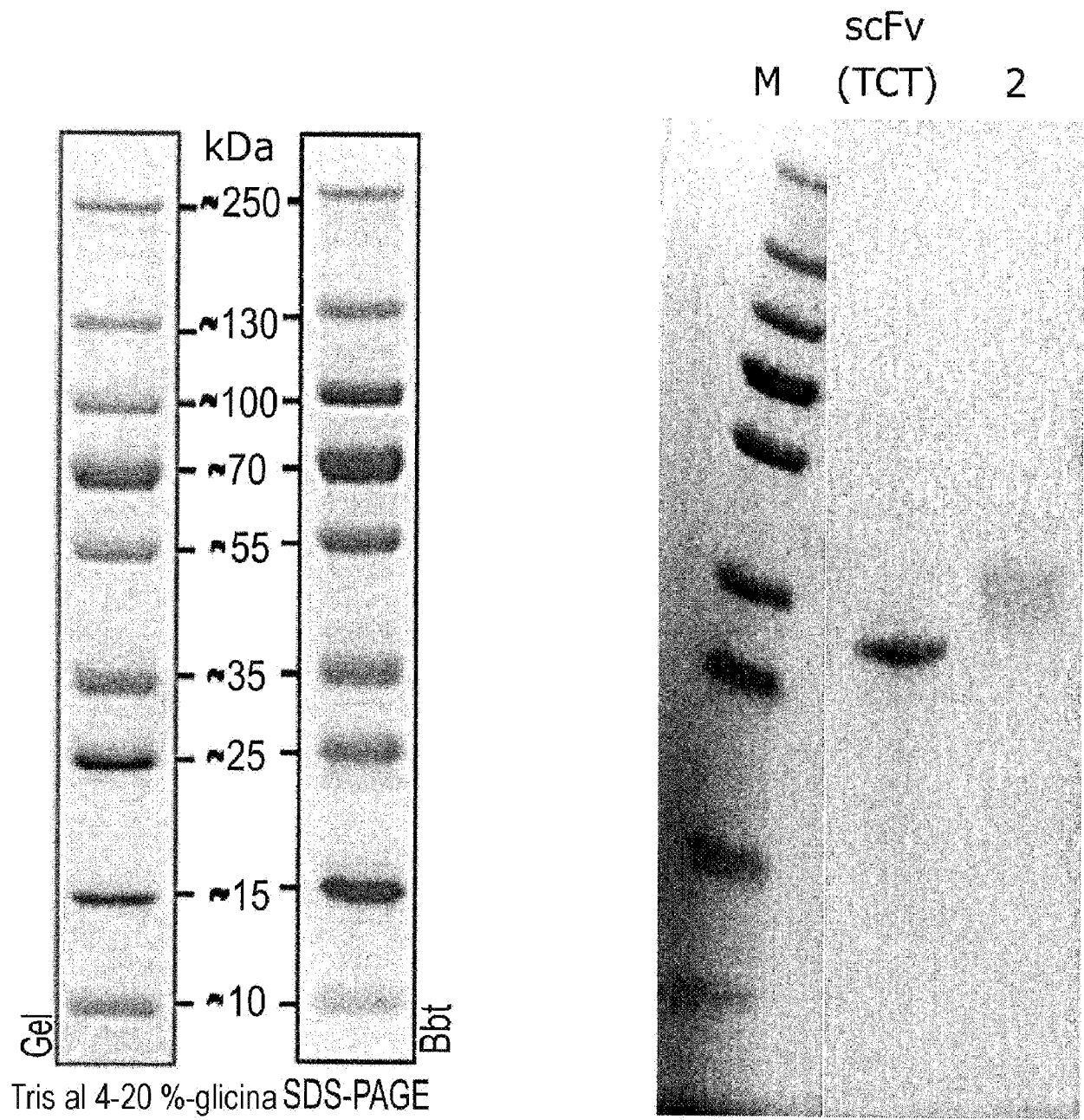


Figura 48

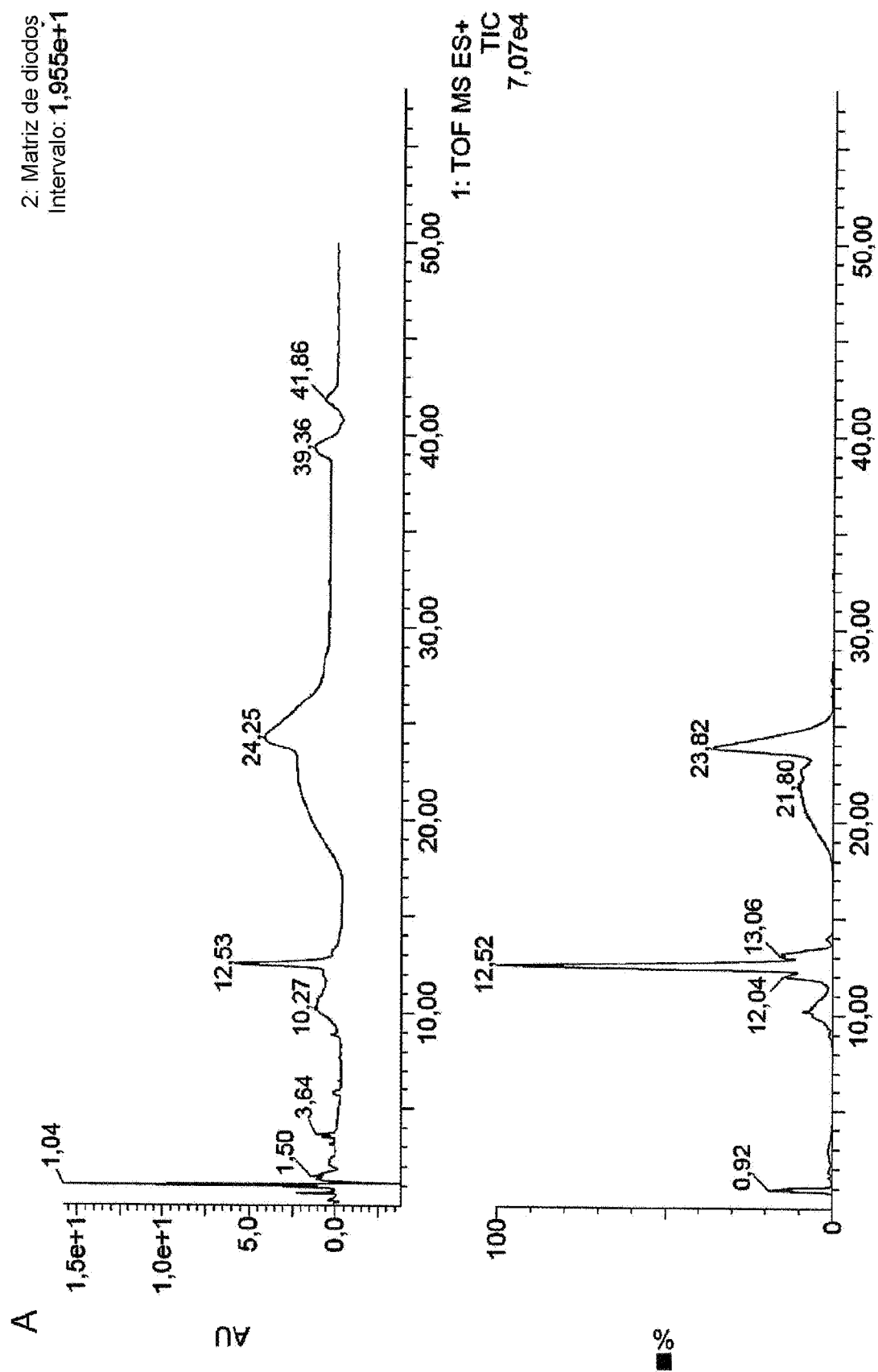


Figura 49

B

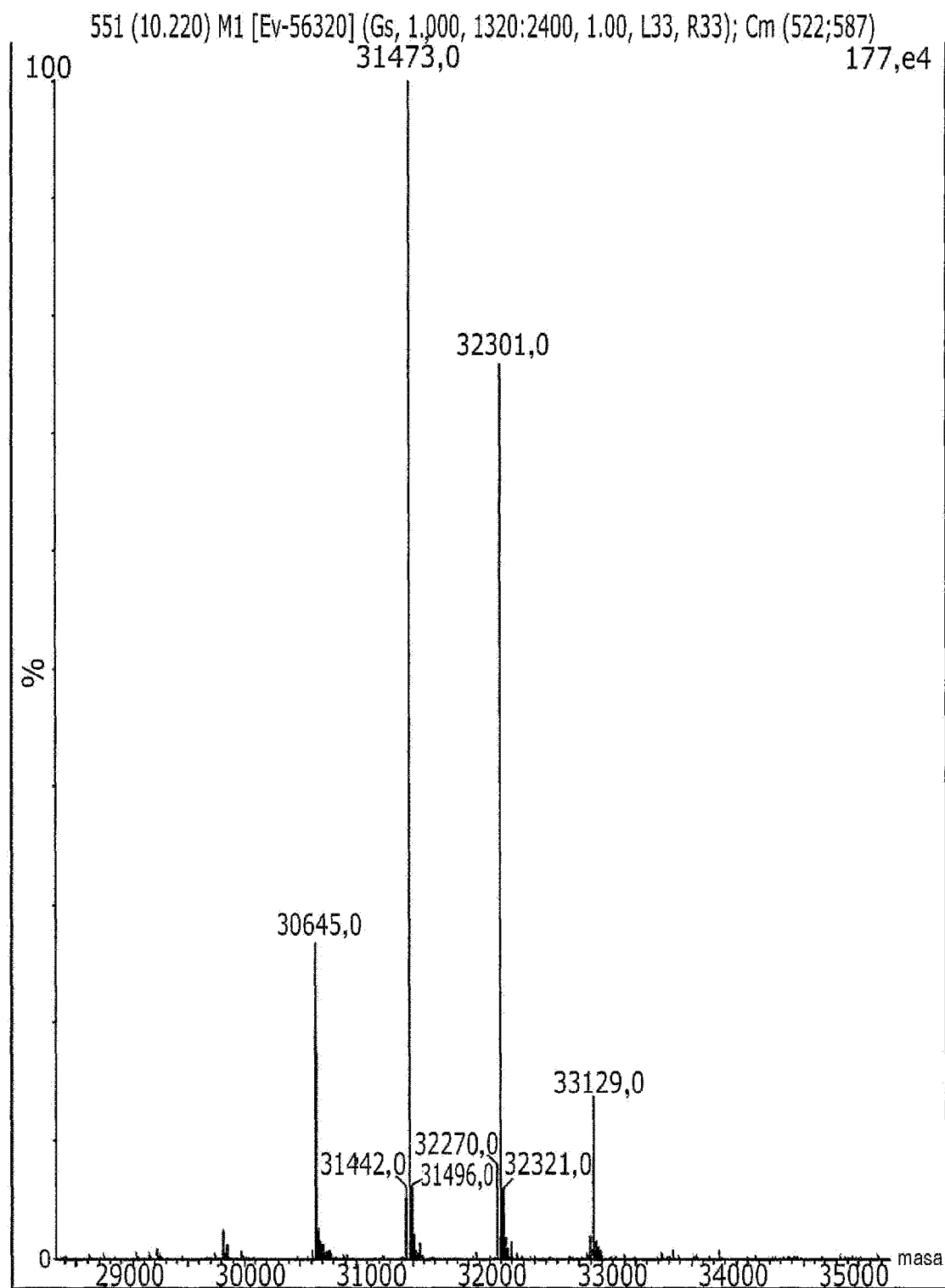


Figura 49 (continuación)

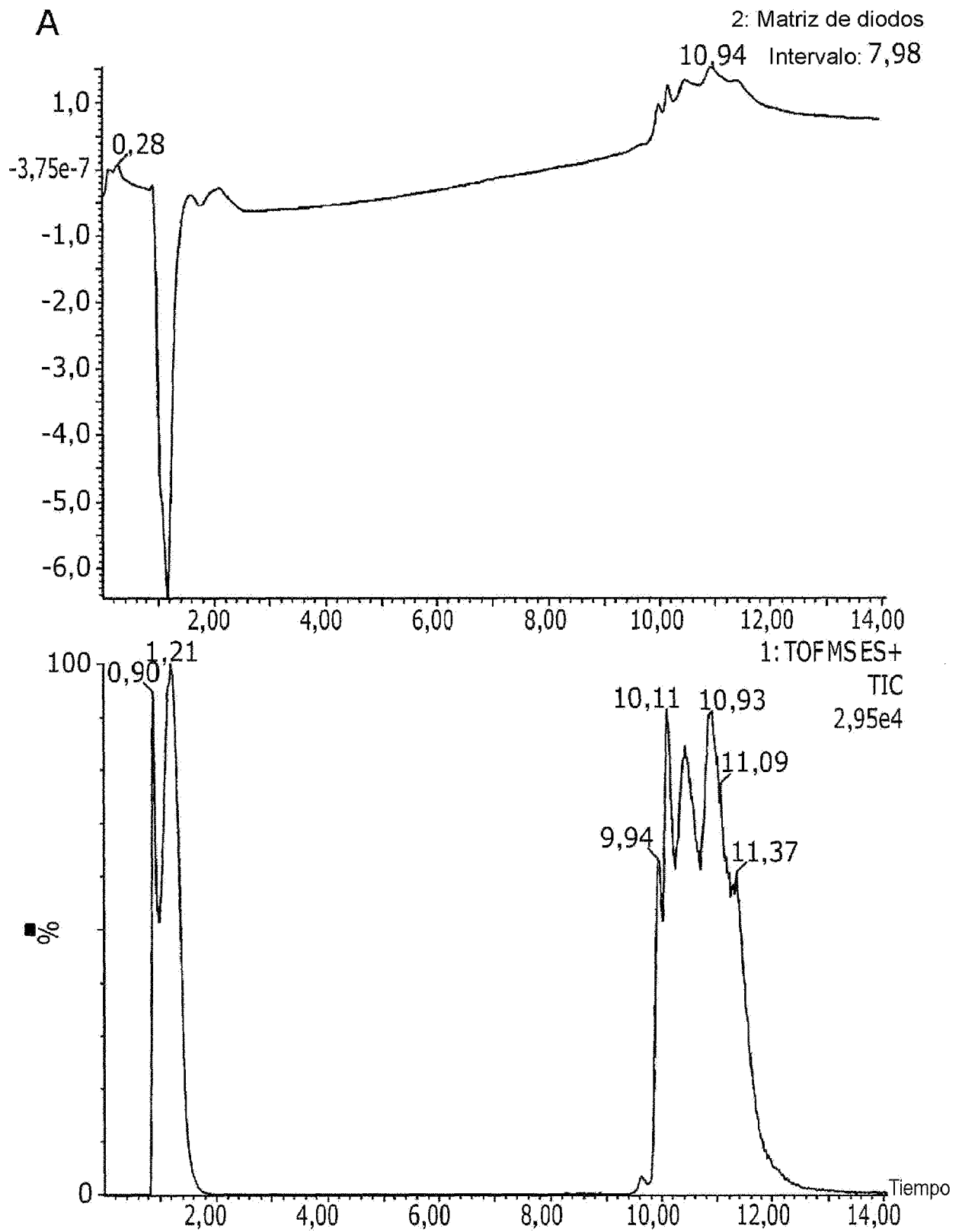


Figura 50

B

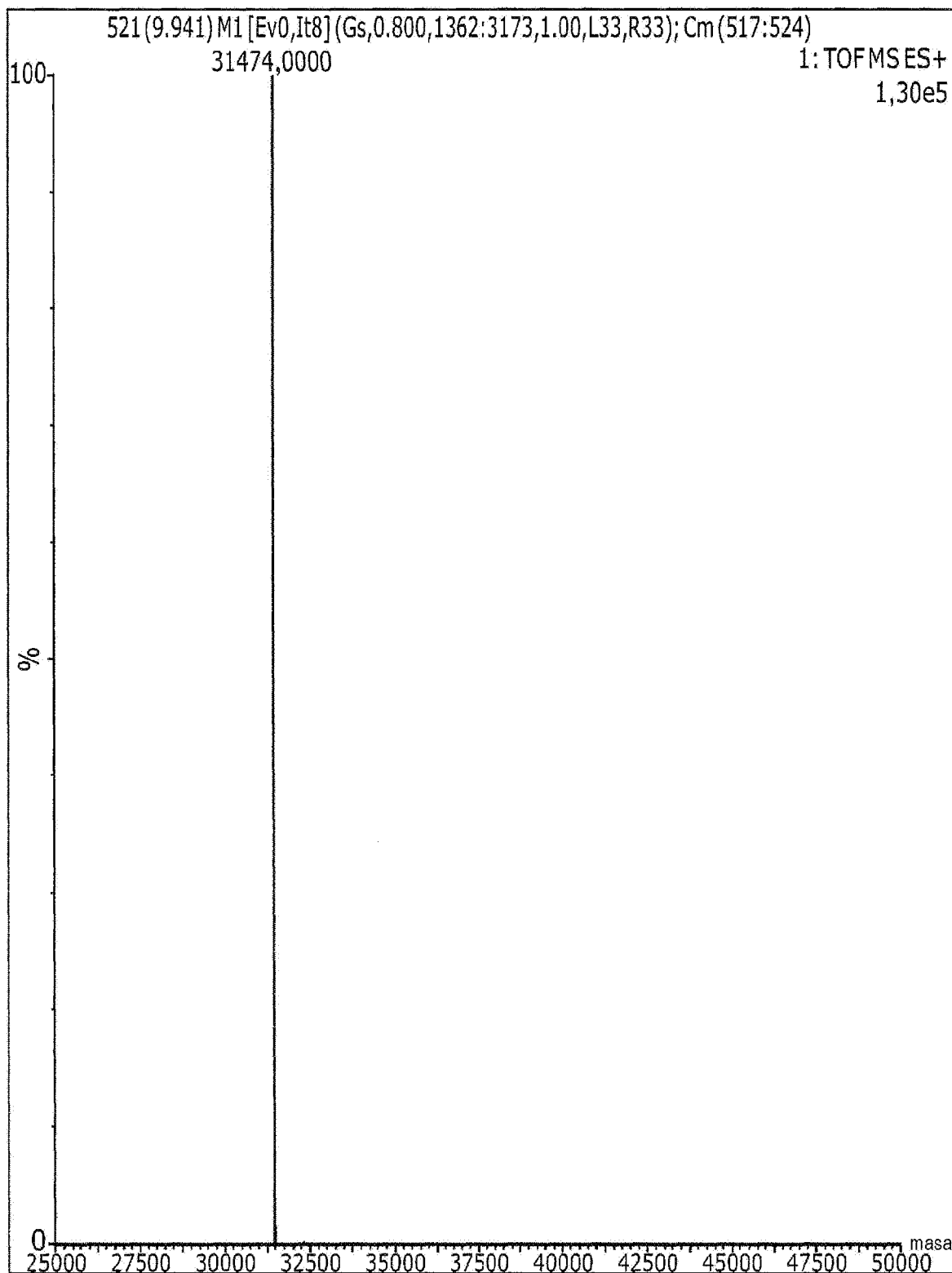


Figura 50 (continuación)

C

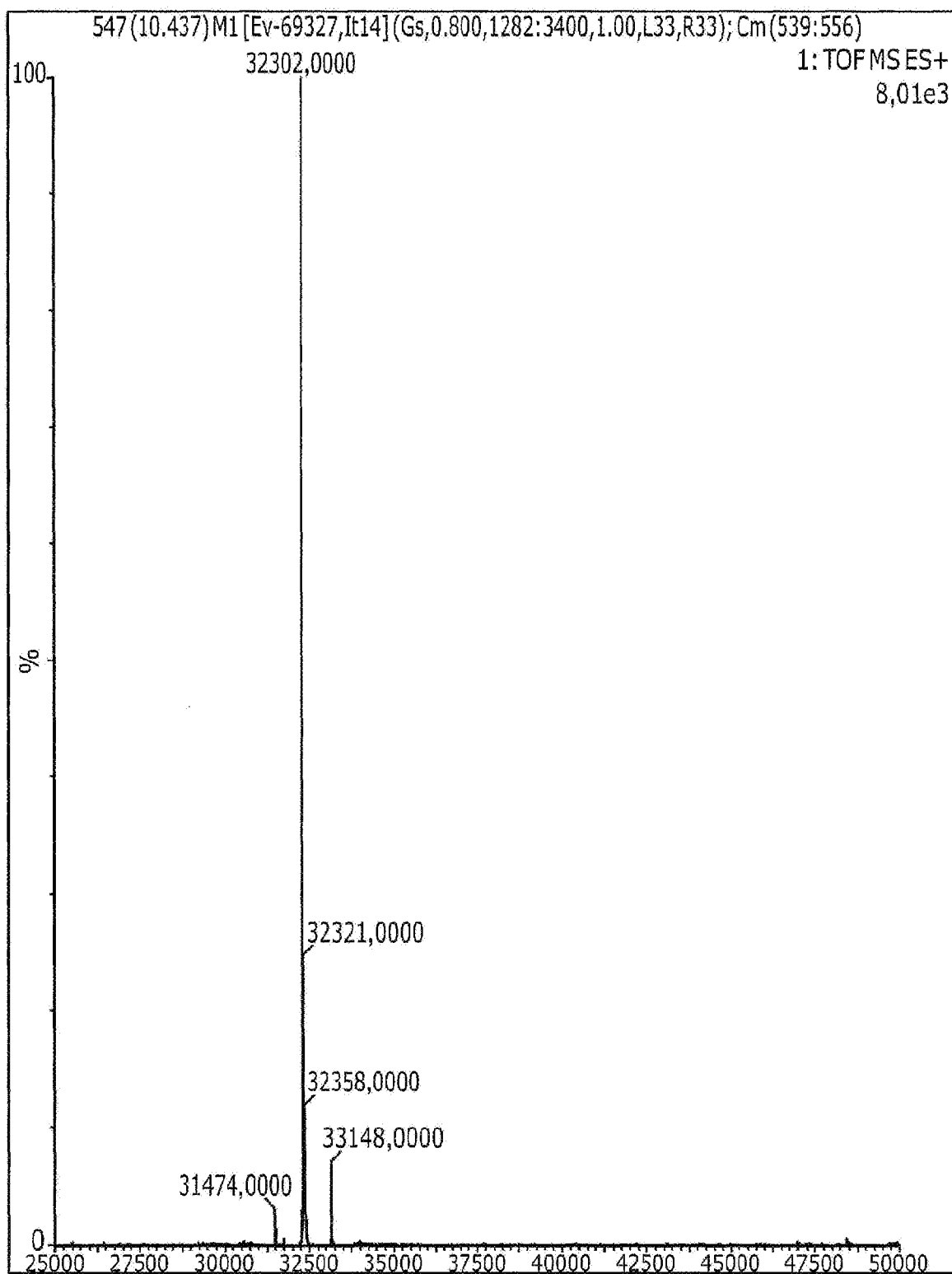


Figura 50 (continuación)

D

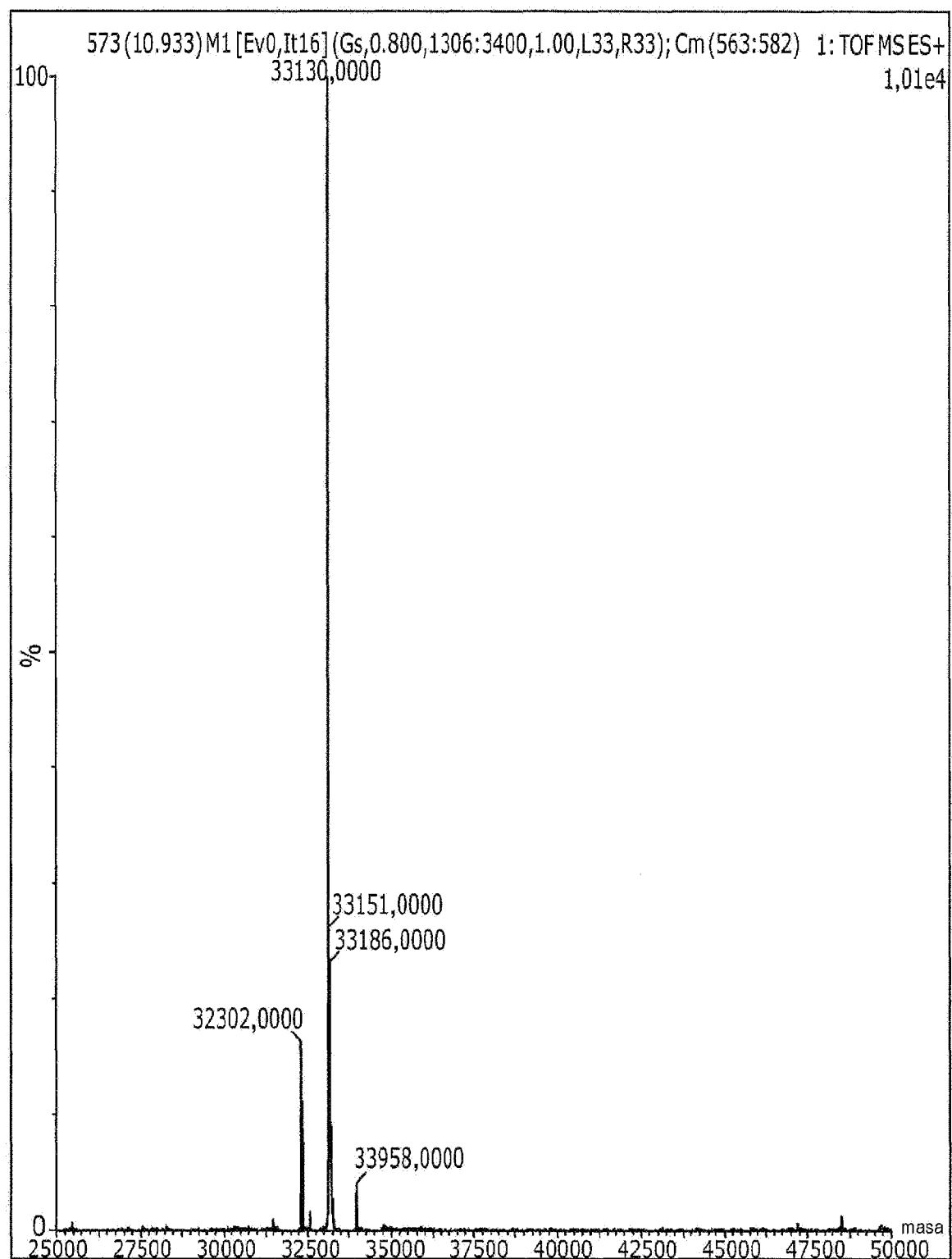


Figura 50 (continuación)

E

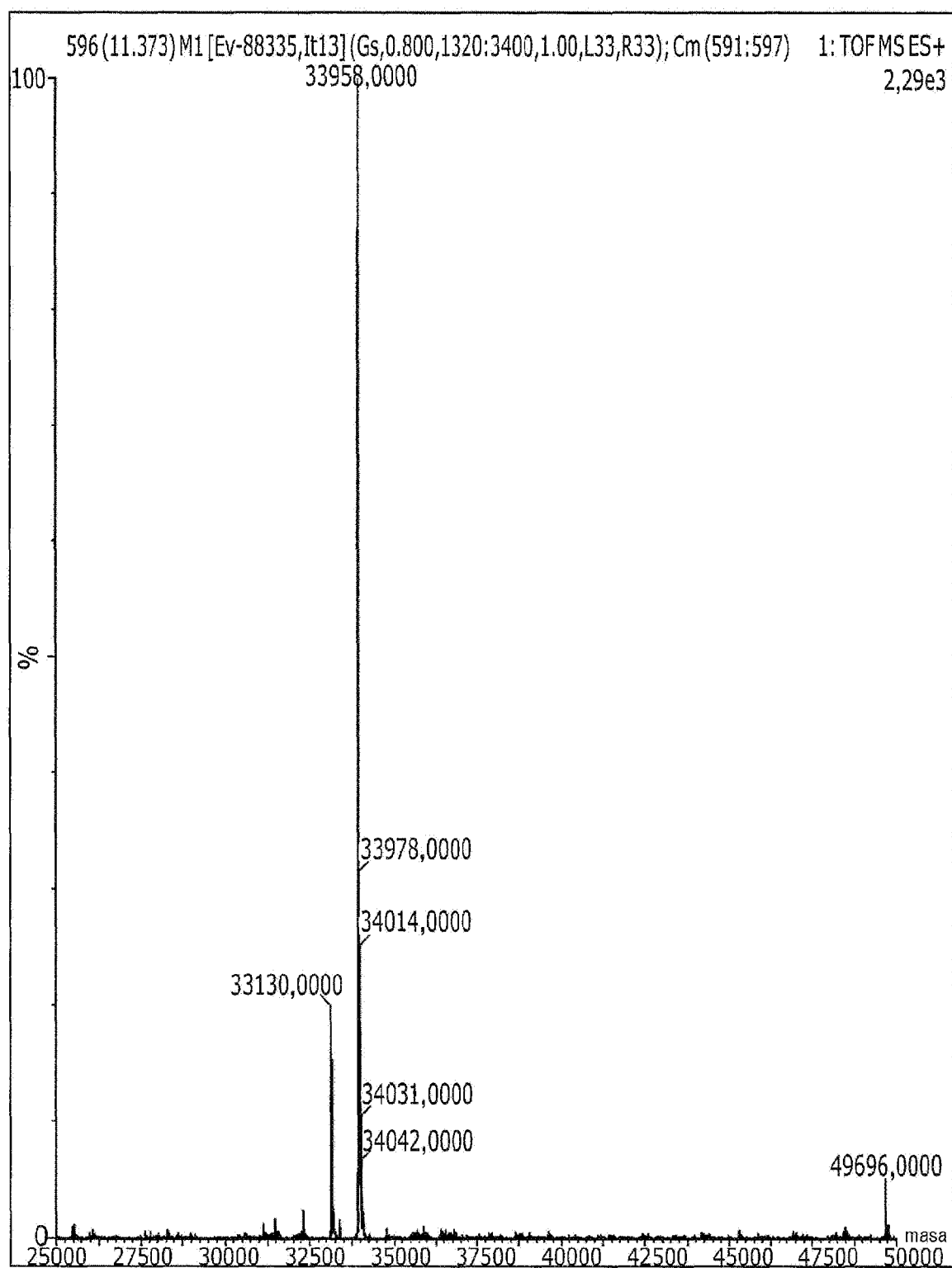


Figura 50 (continuación)

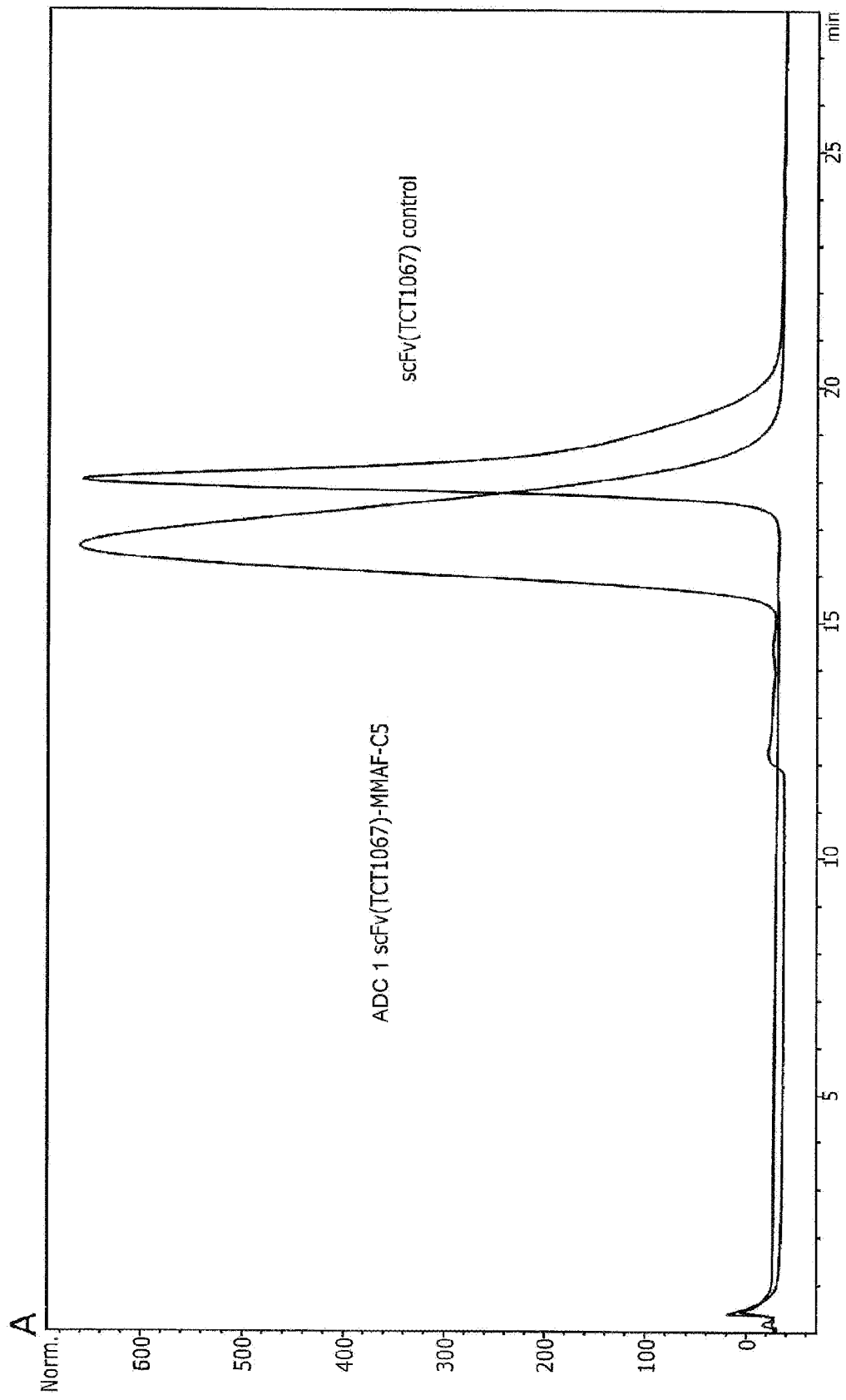


Figure 51

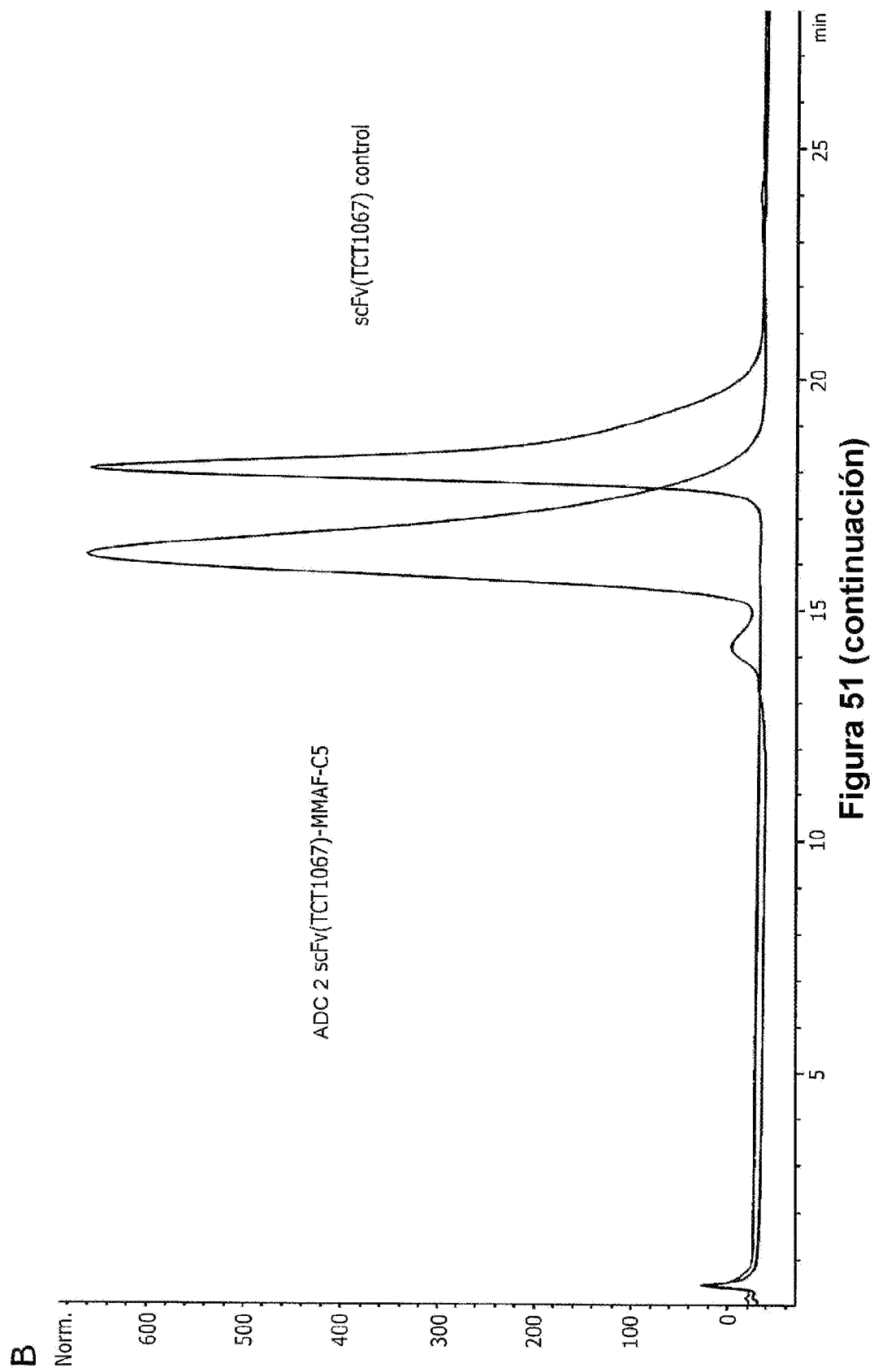


Figura 51 (continuación)

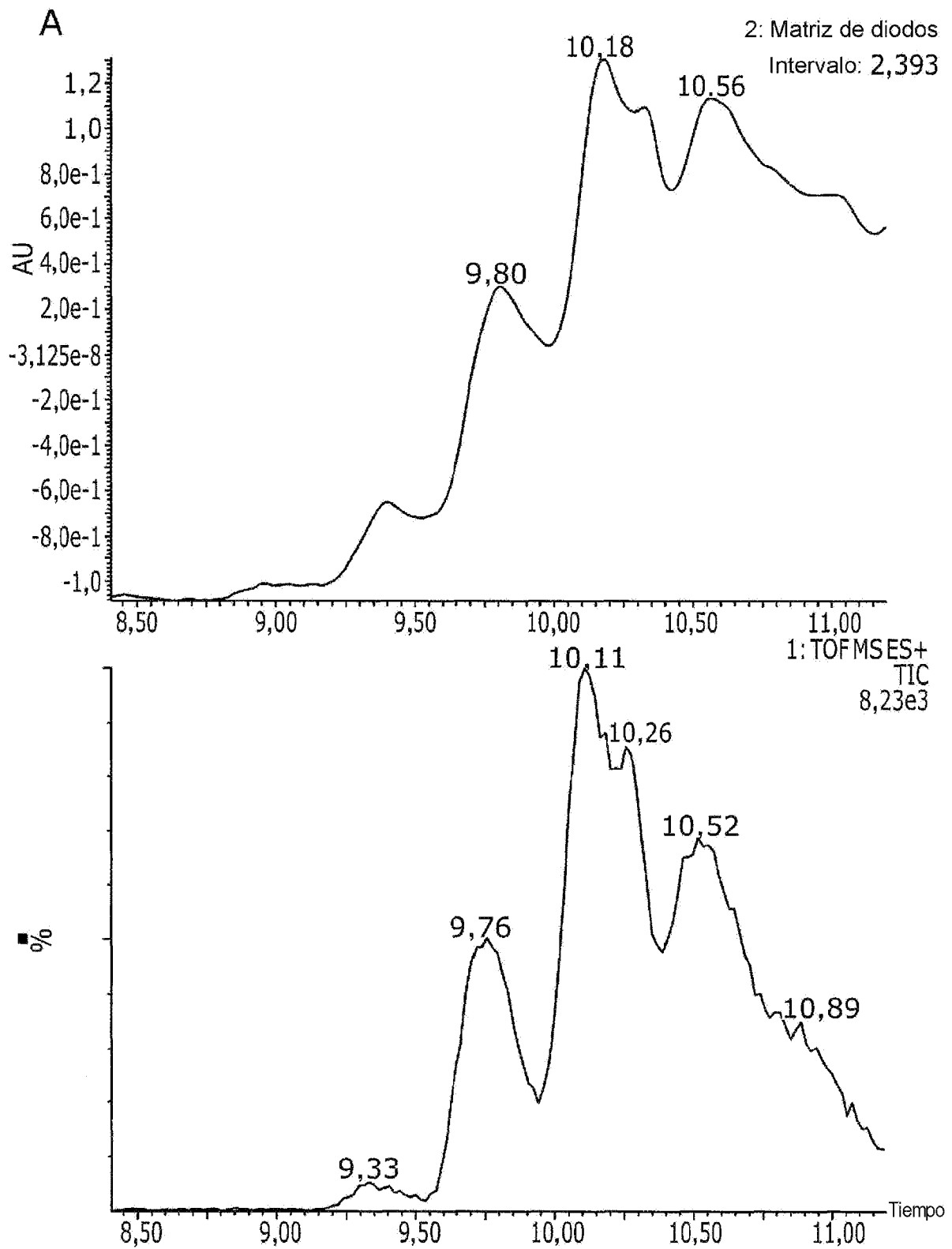
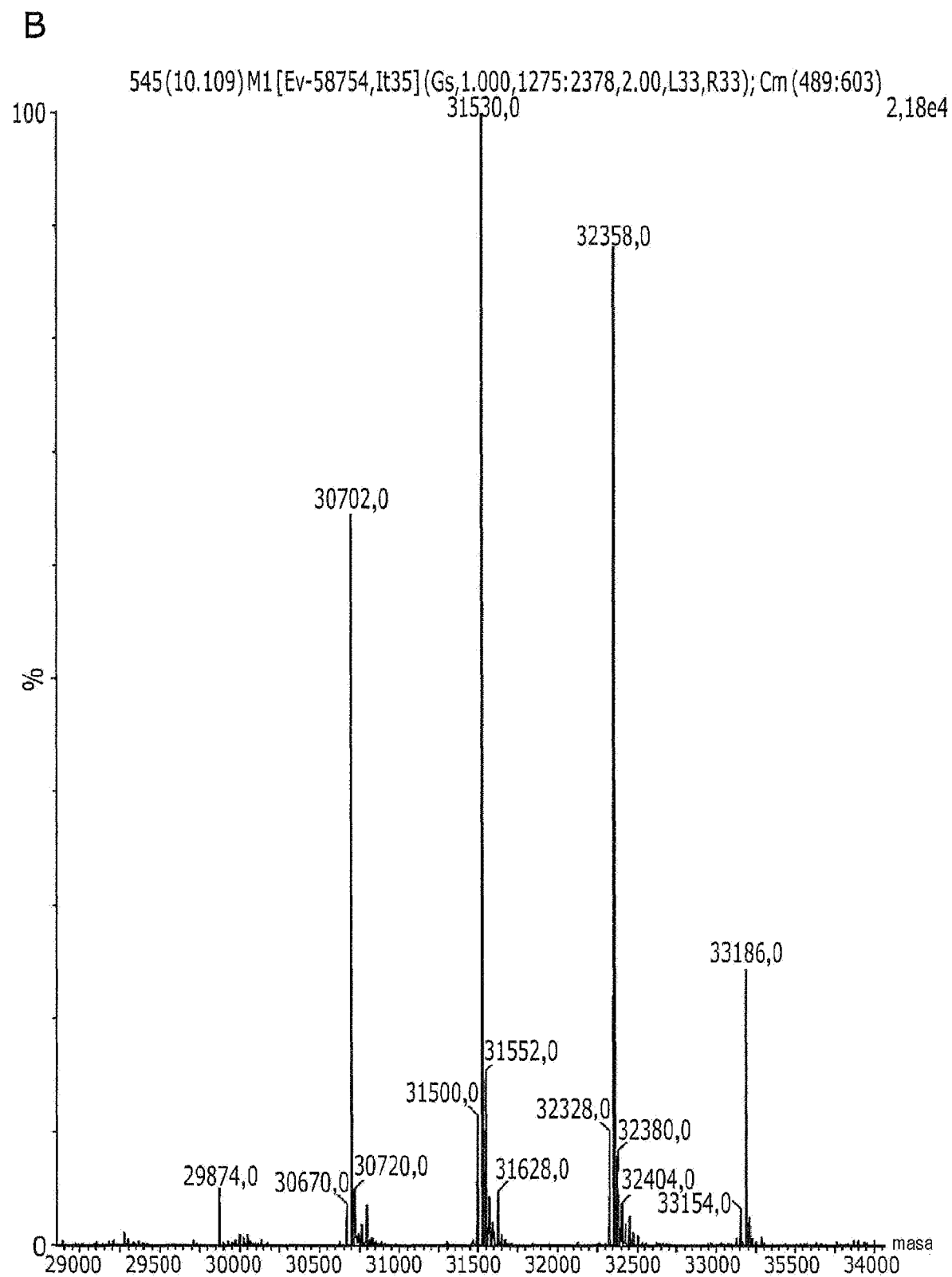


Figura 52

**Figura 52 (continuación)**

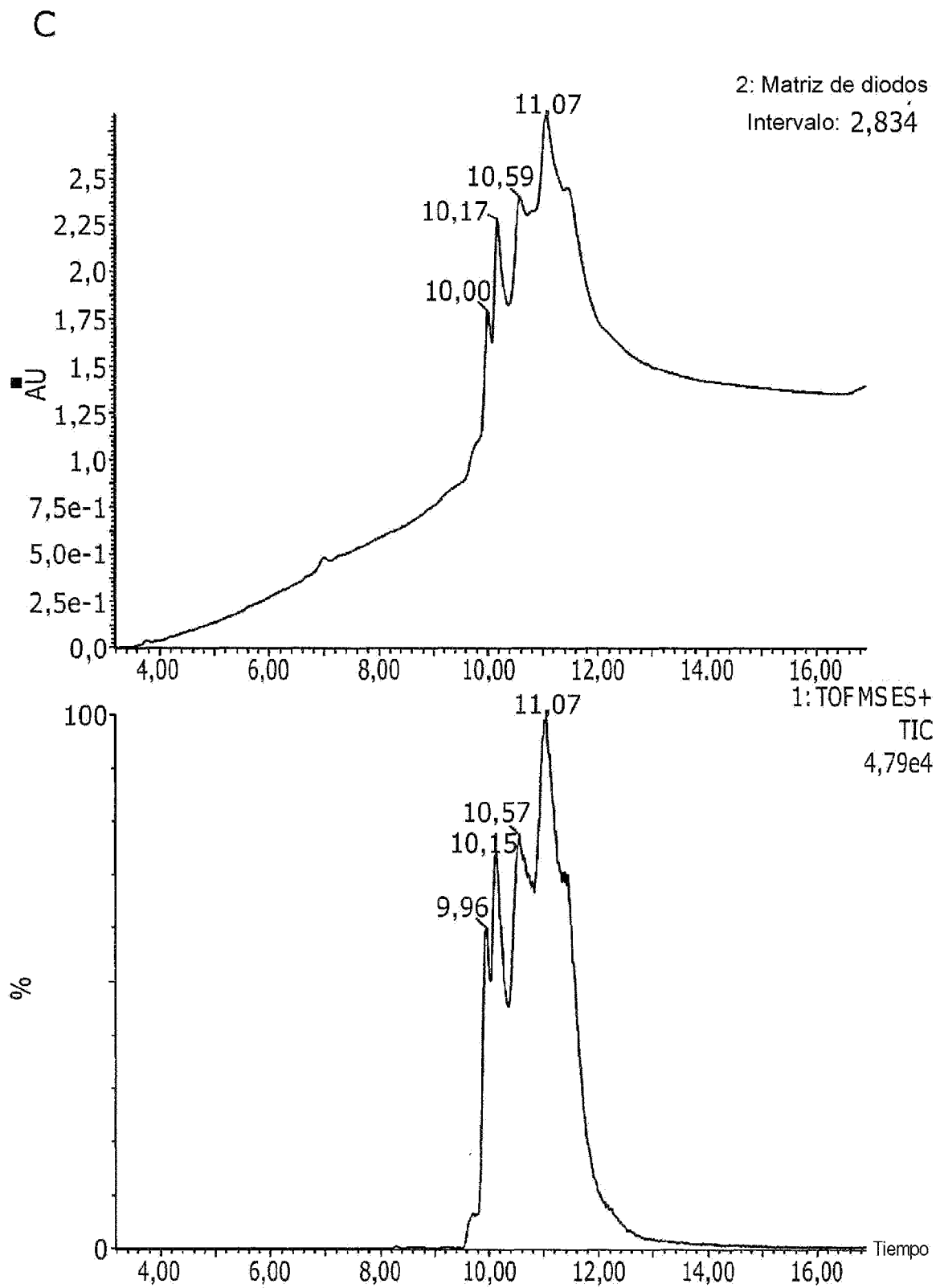


Figura 52 (continuación)

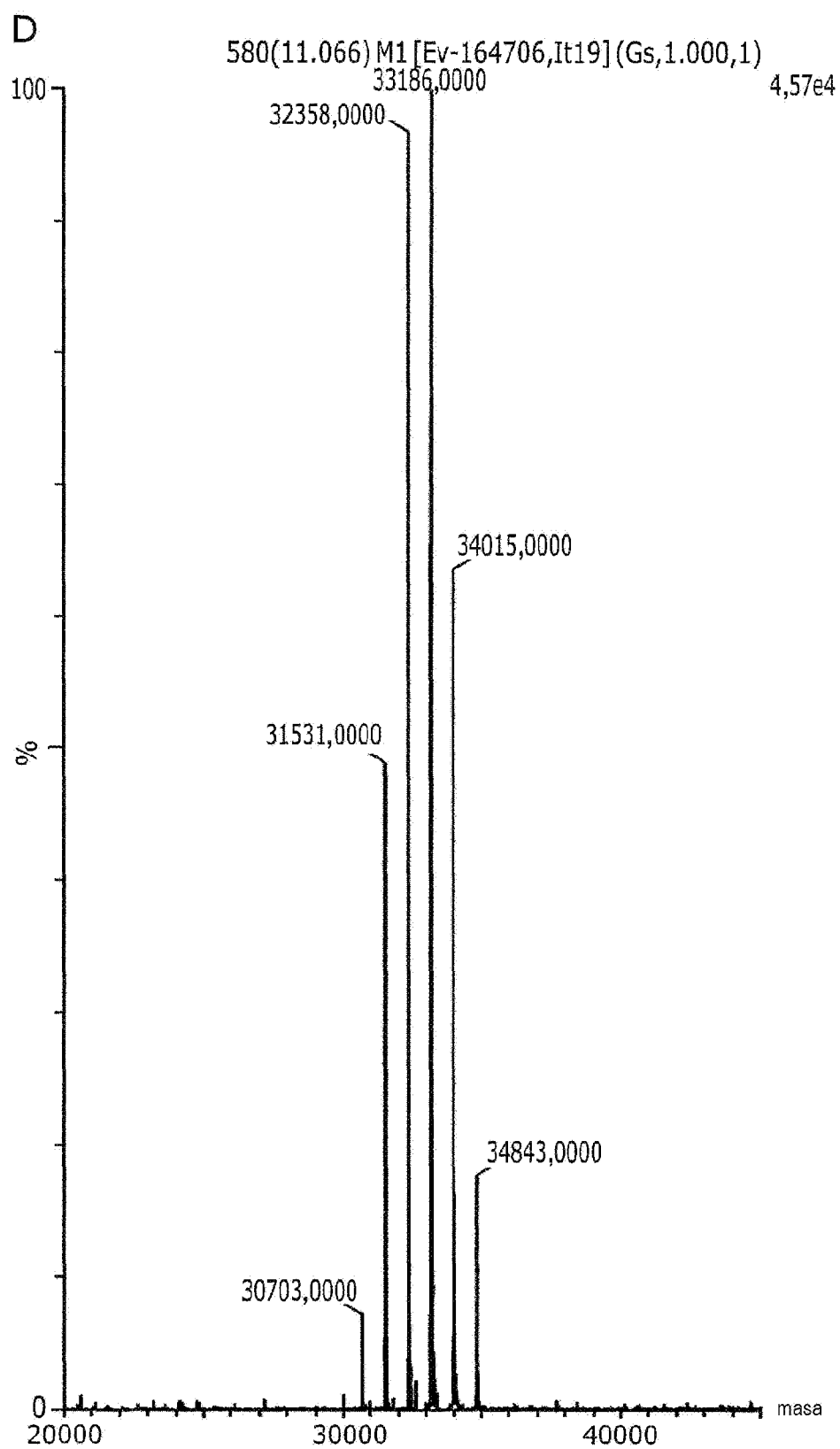


Figura 52 (continuación)

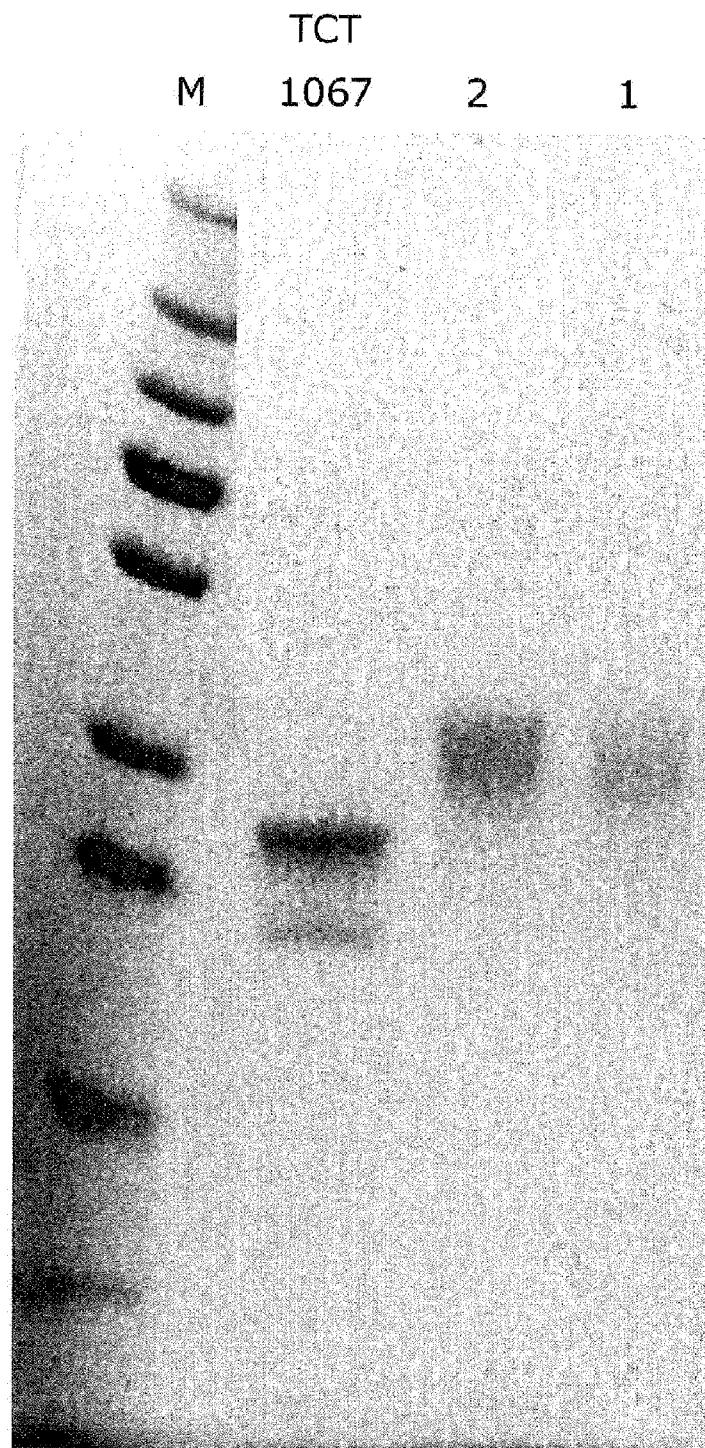


Figura 53

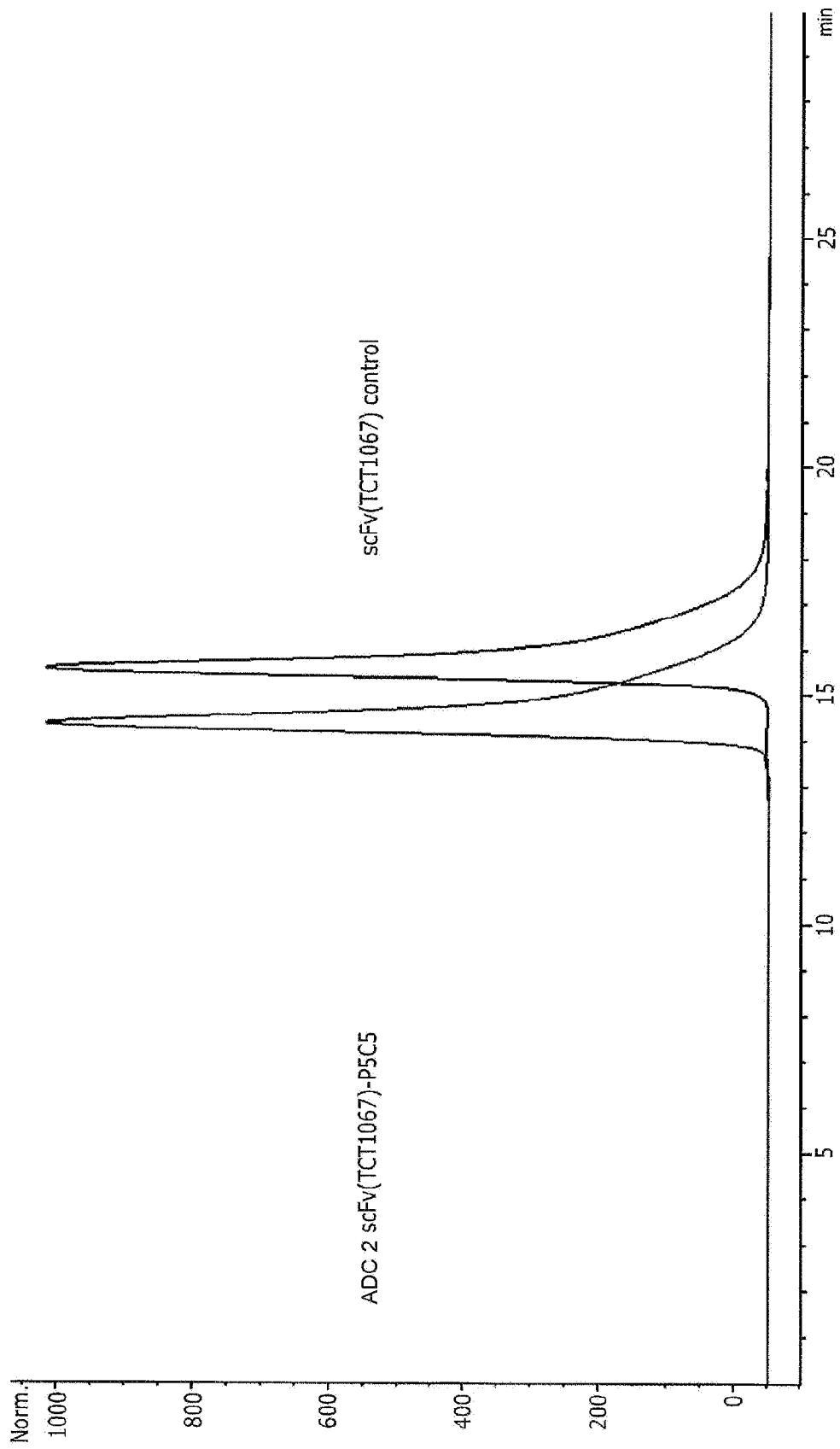
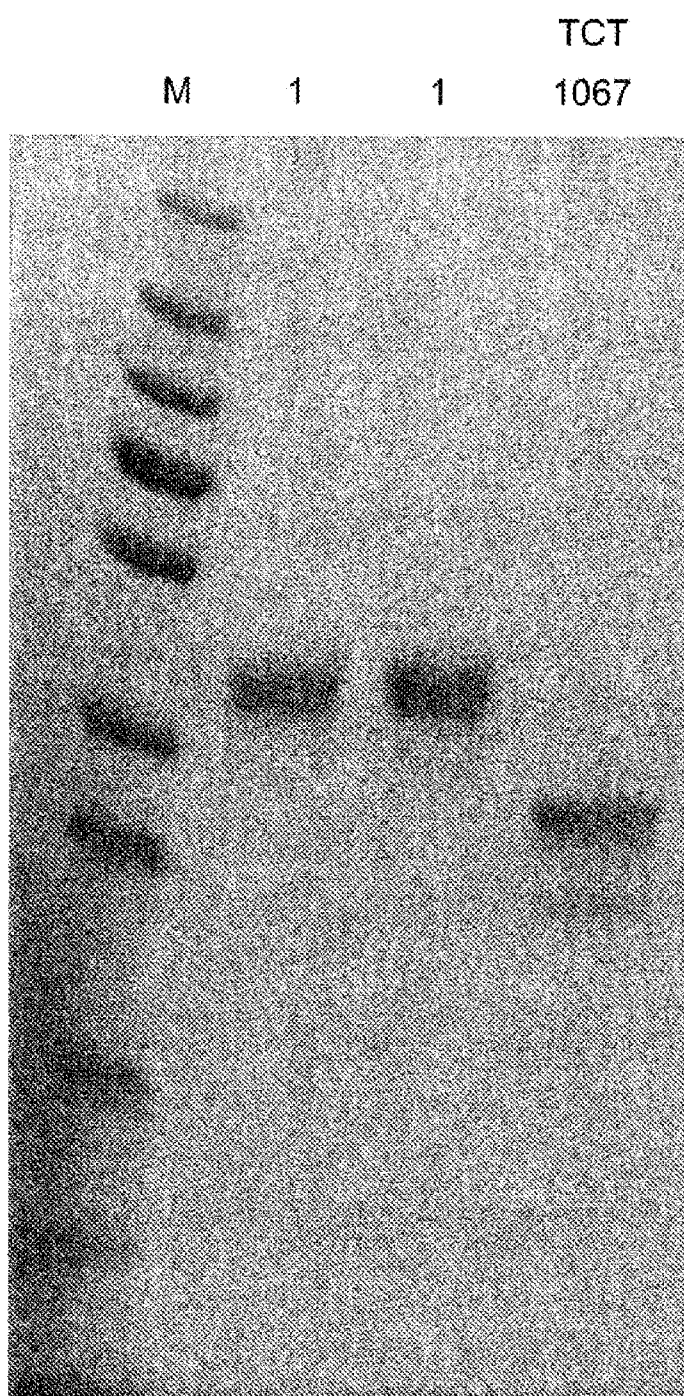


Figura 54

**Figura 55**

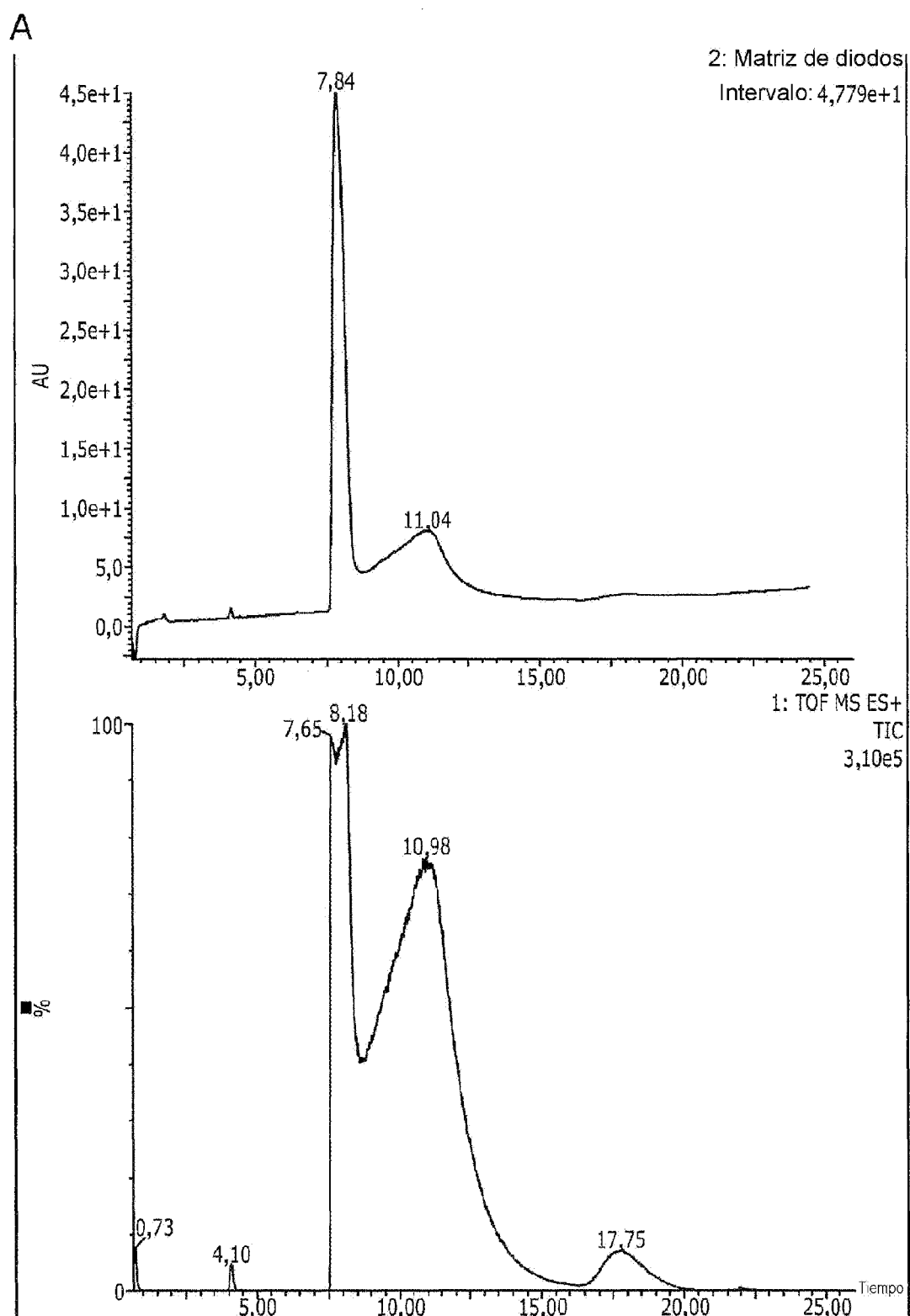


Figura 56

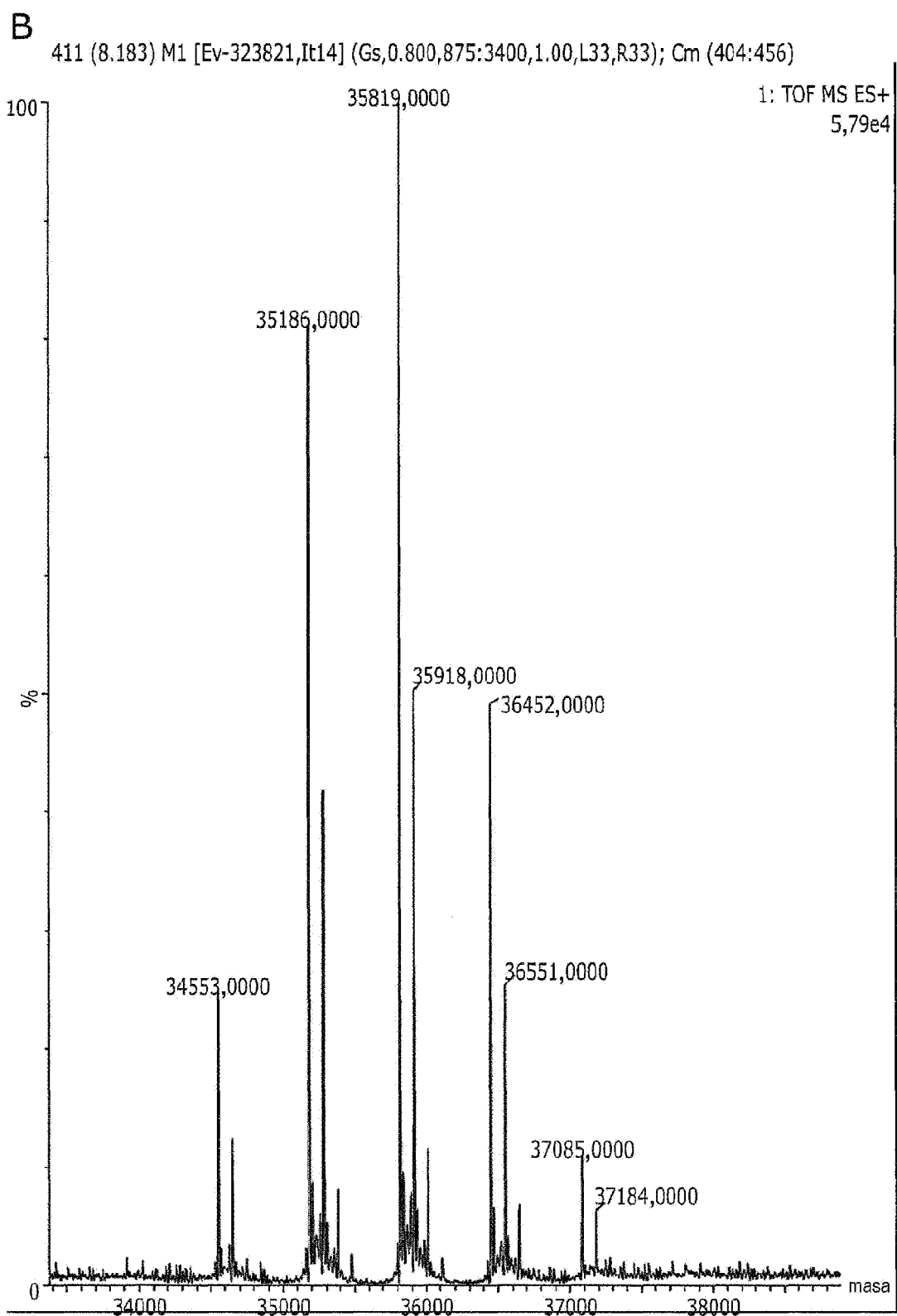


Figura 56 (continuación)

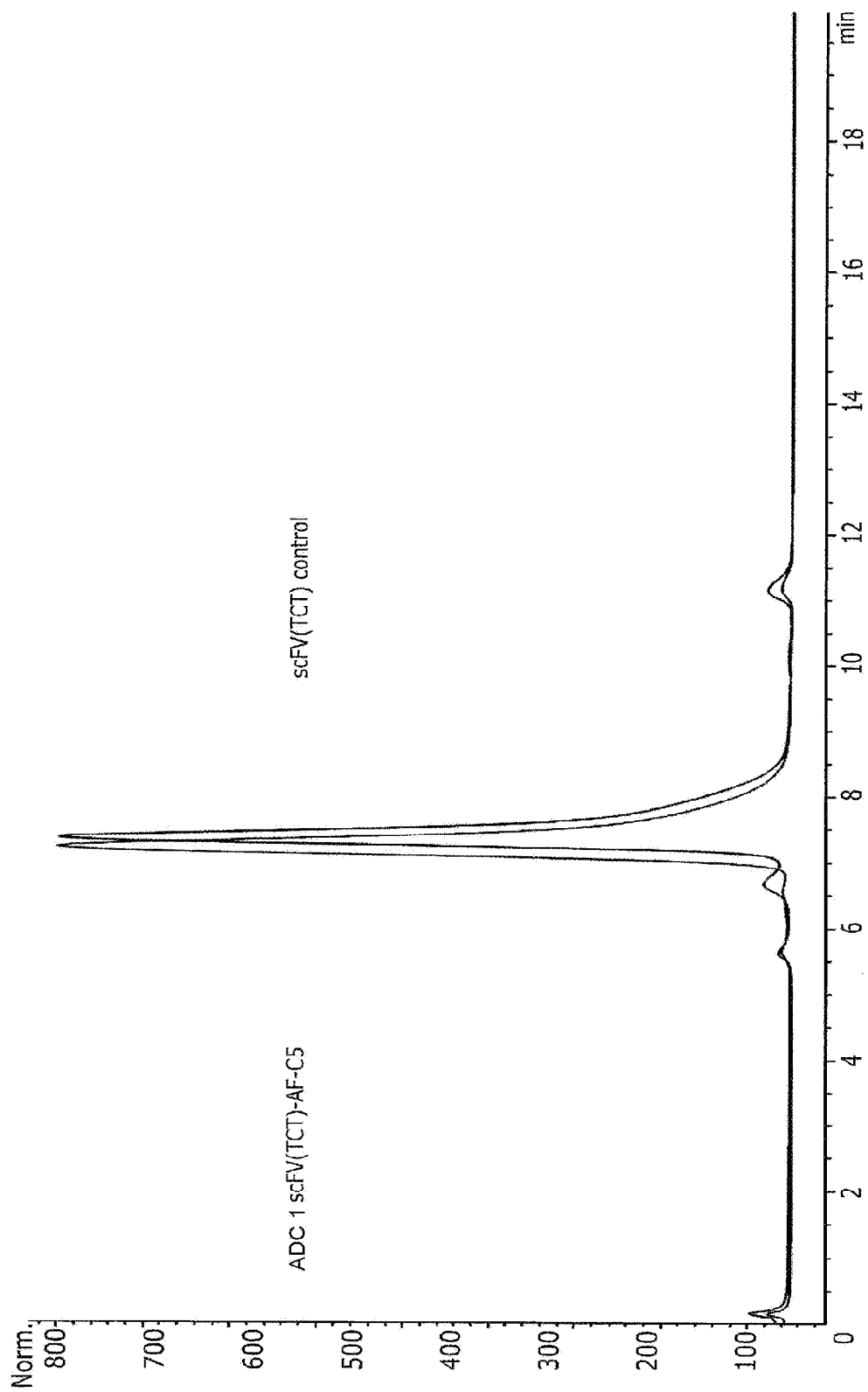


Figure 57

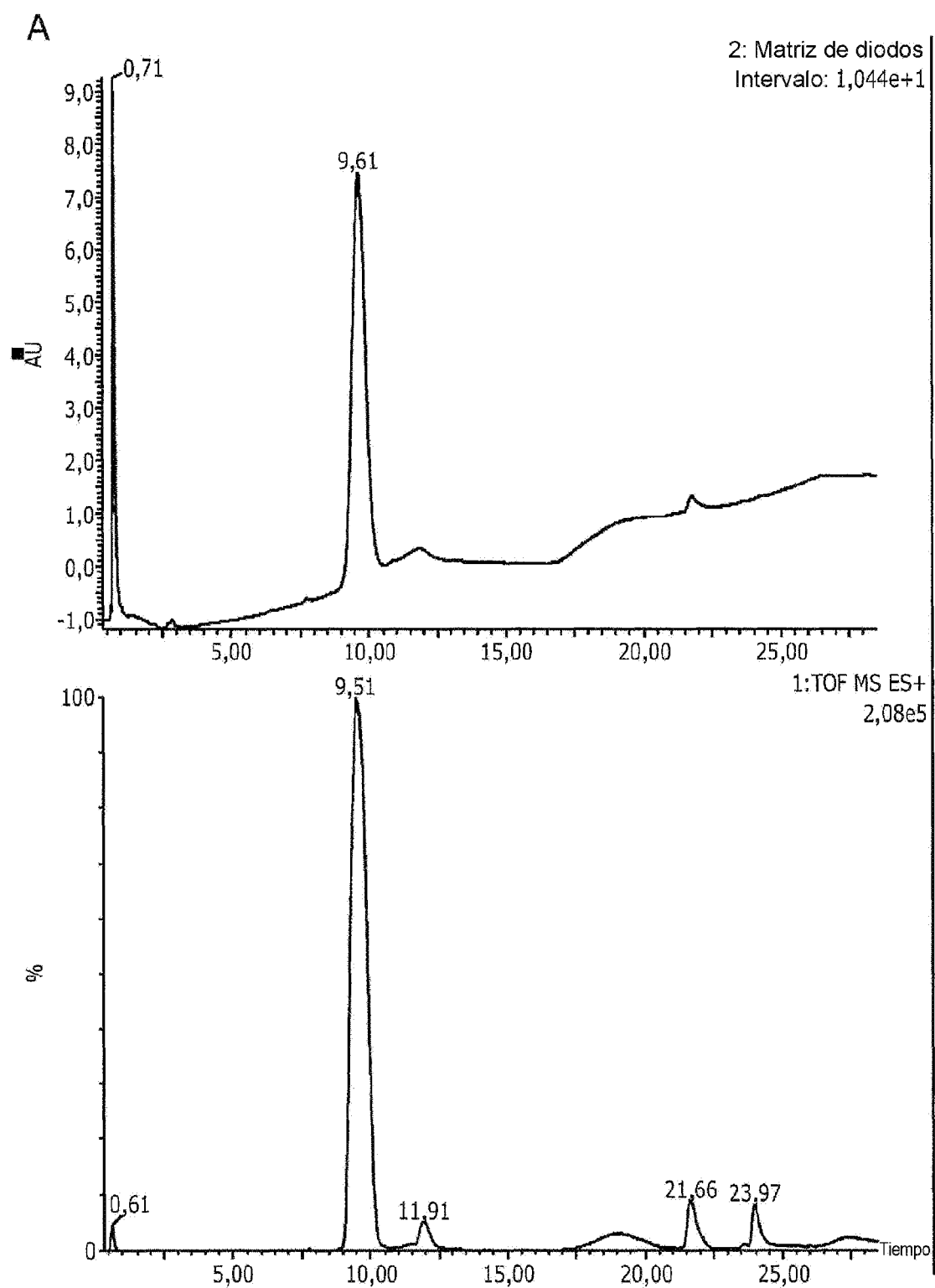


Figura 58

B

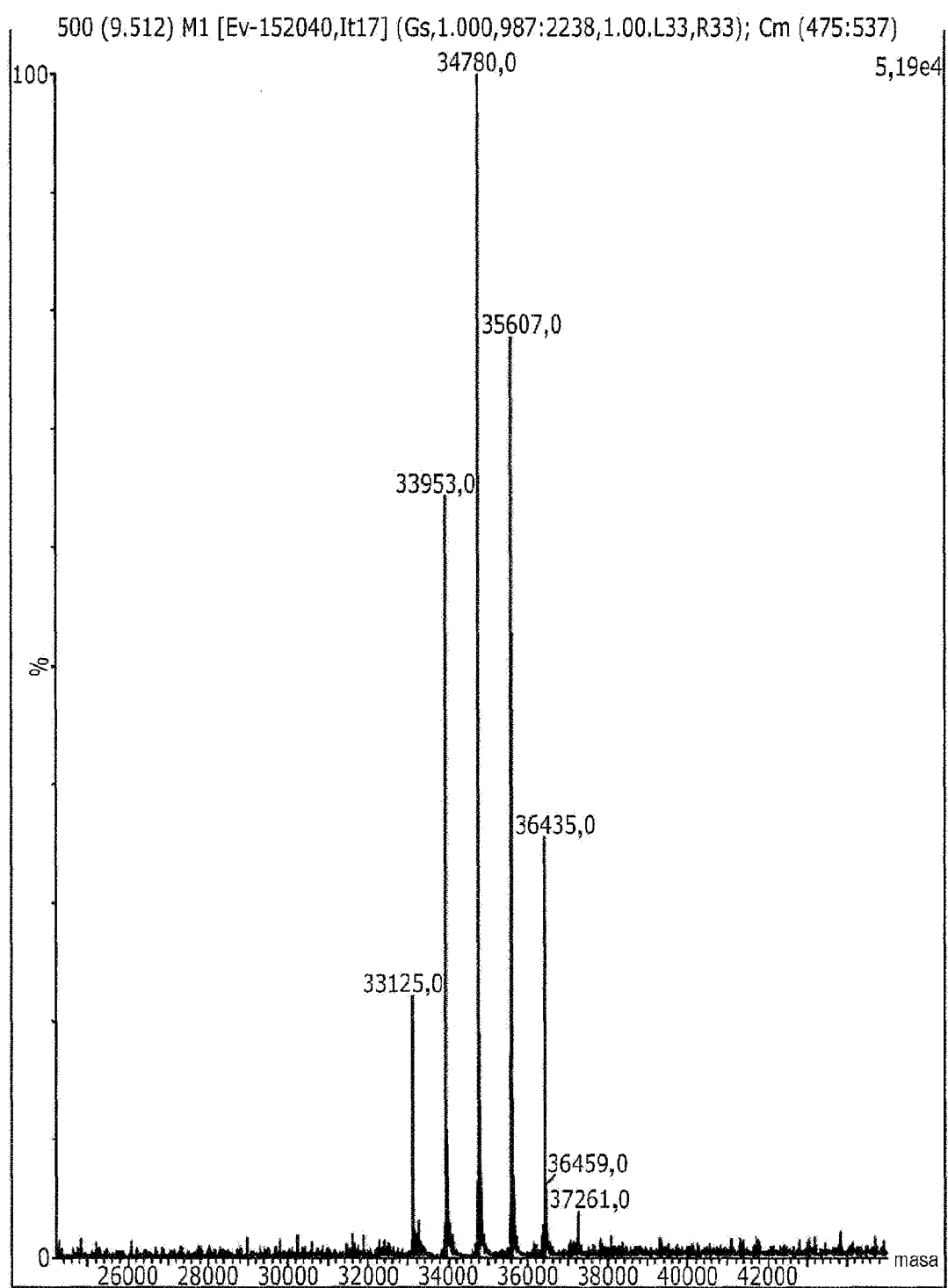


Figura 58 (continuación)

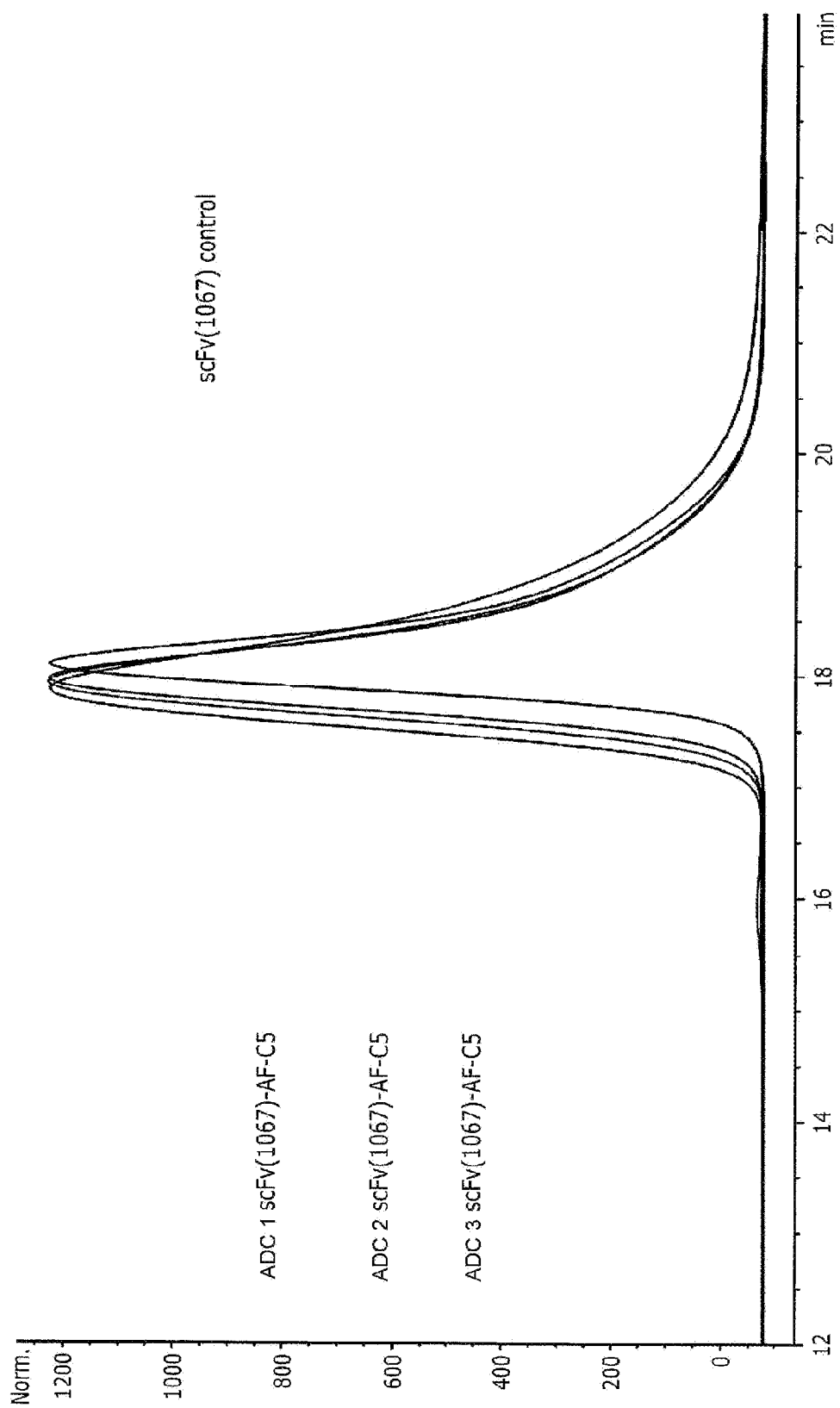


Figure 59

A

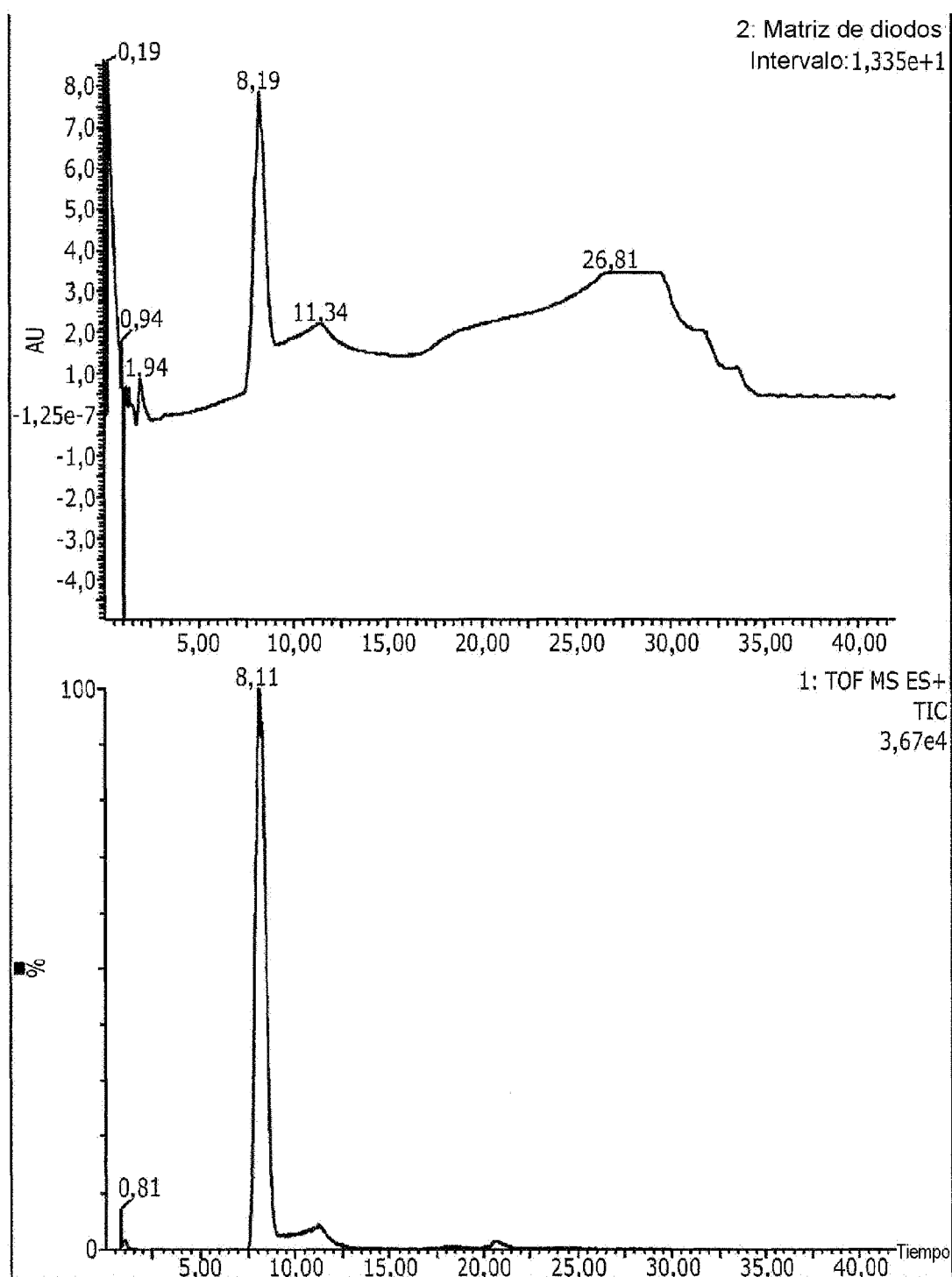


Figura 60

B

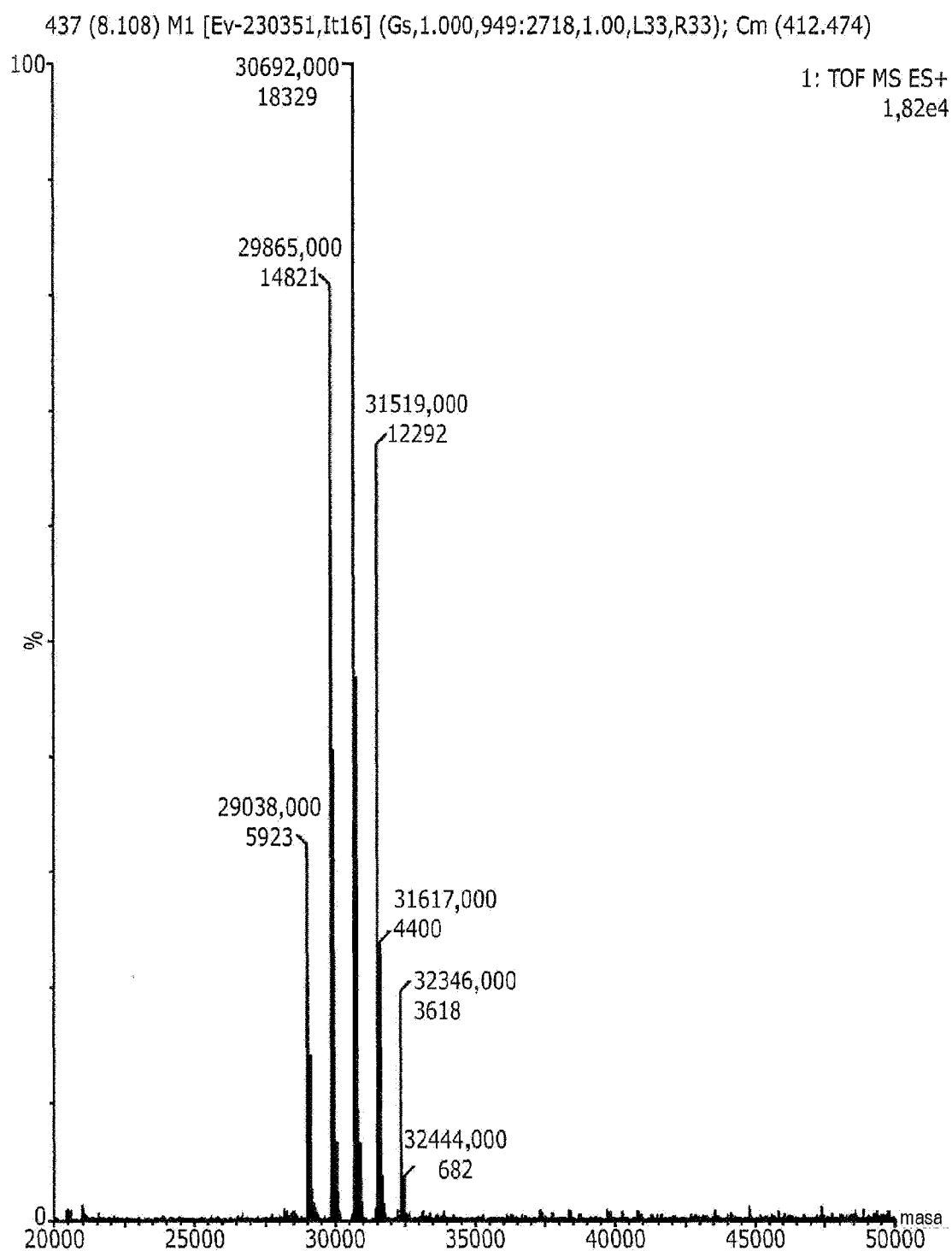


Figura 60 (continuación)

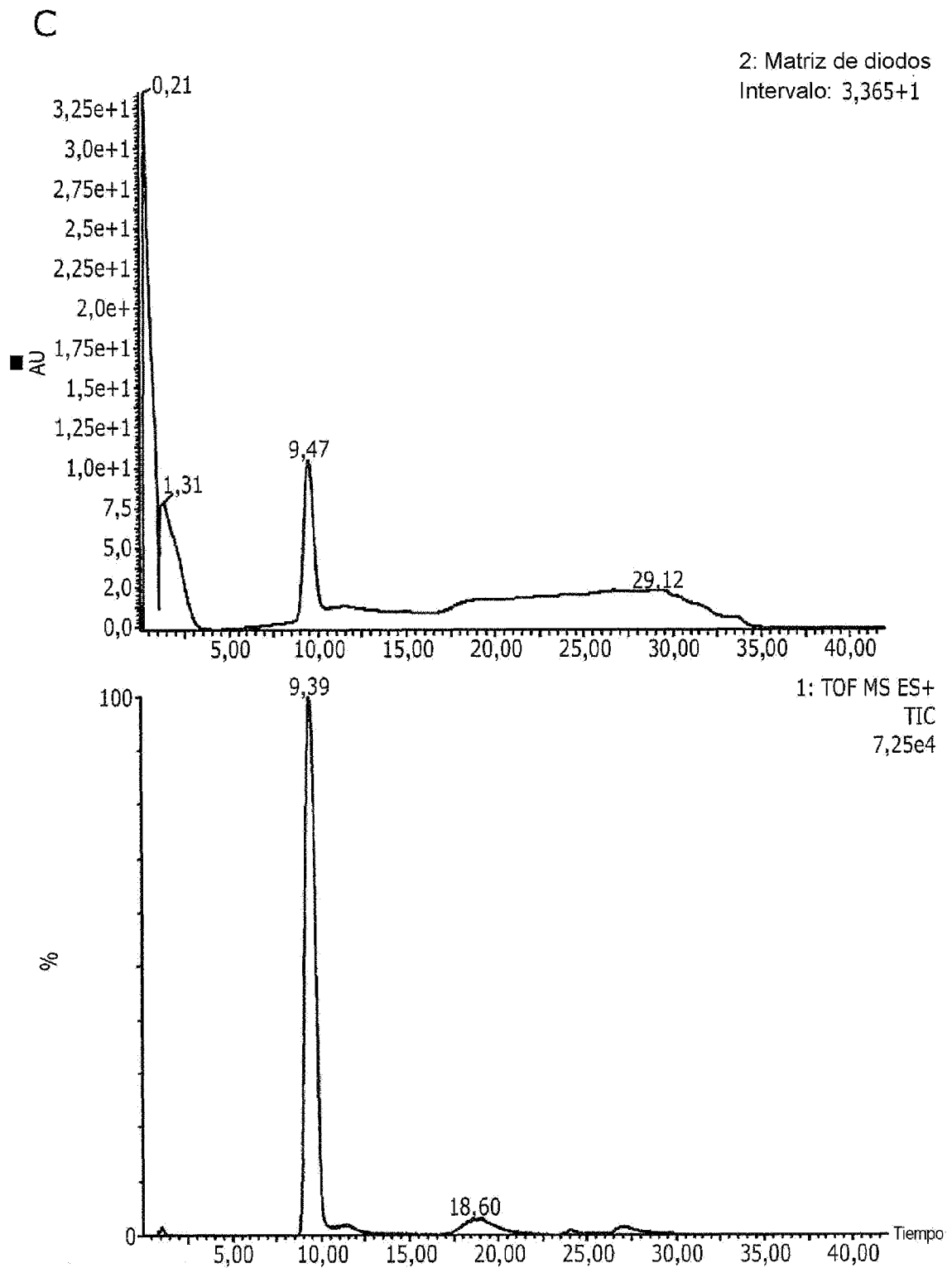


Figura 60 (continuación)

D

506 (9.387) M1 [Ev0-It24] (Gs,1.000,1039;2840,1.00,L33,R33); Cm (466.566)

1: TOF MS ES+
7,01e4

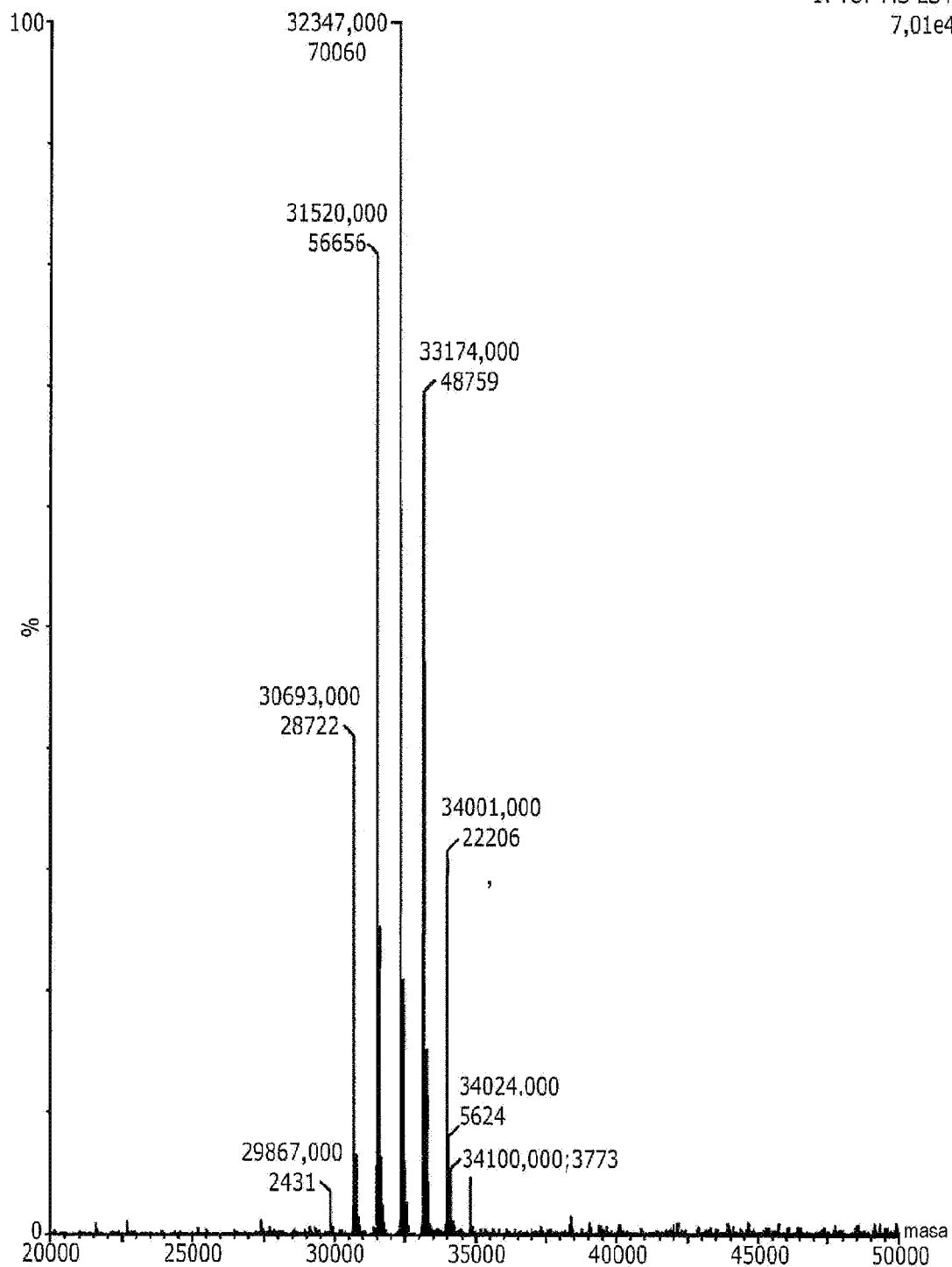


Figura 60 (continuación)

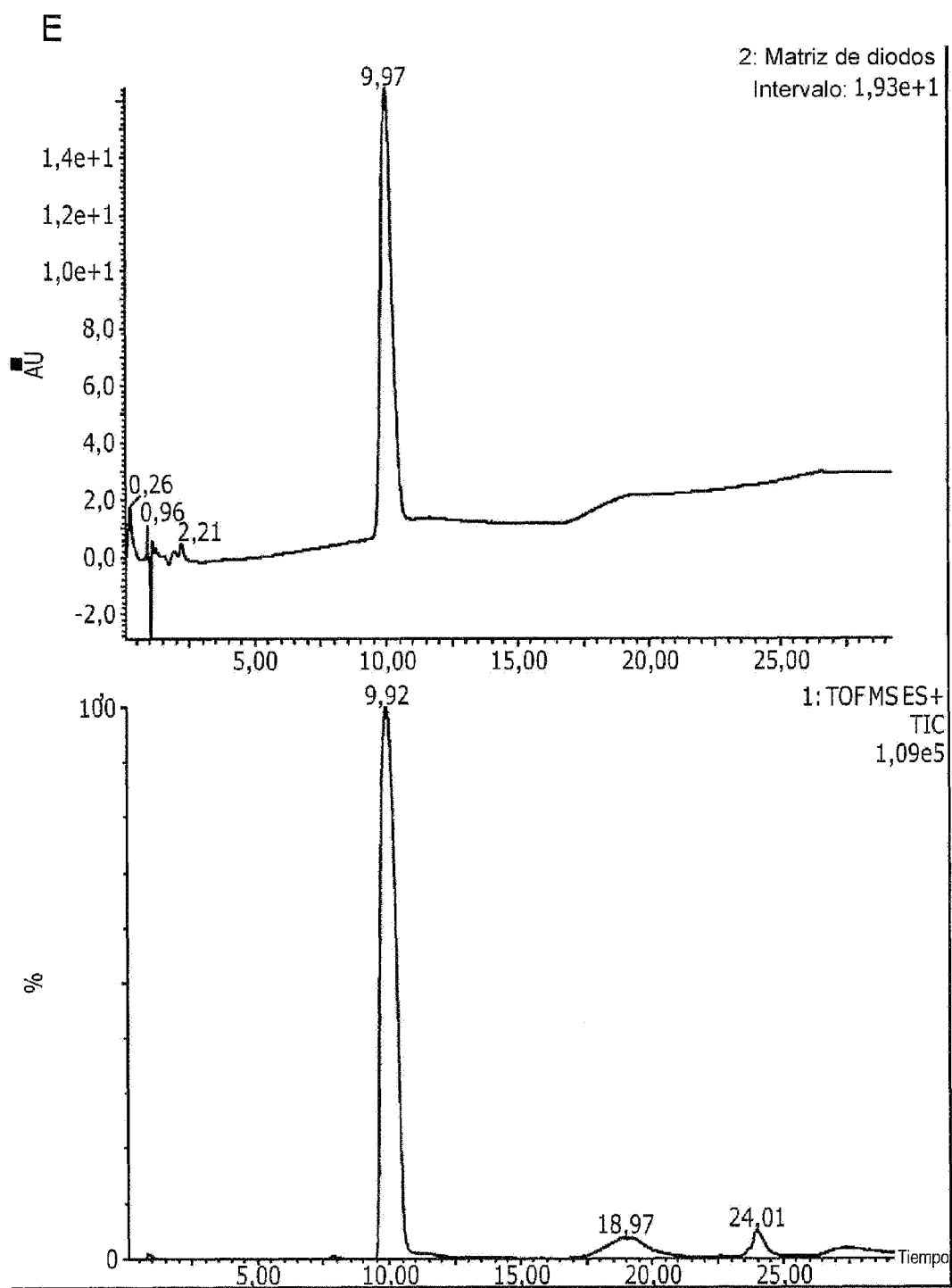


Figura 60 (continuación)

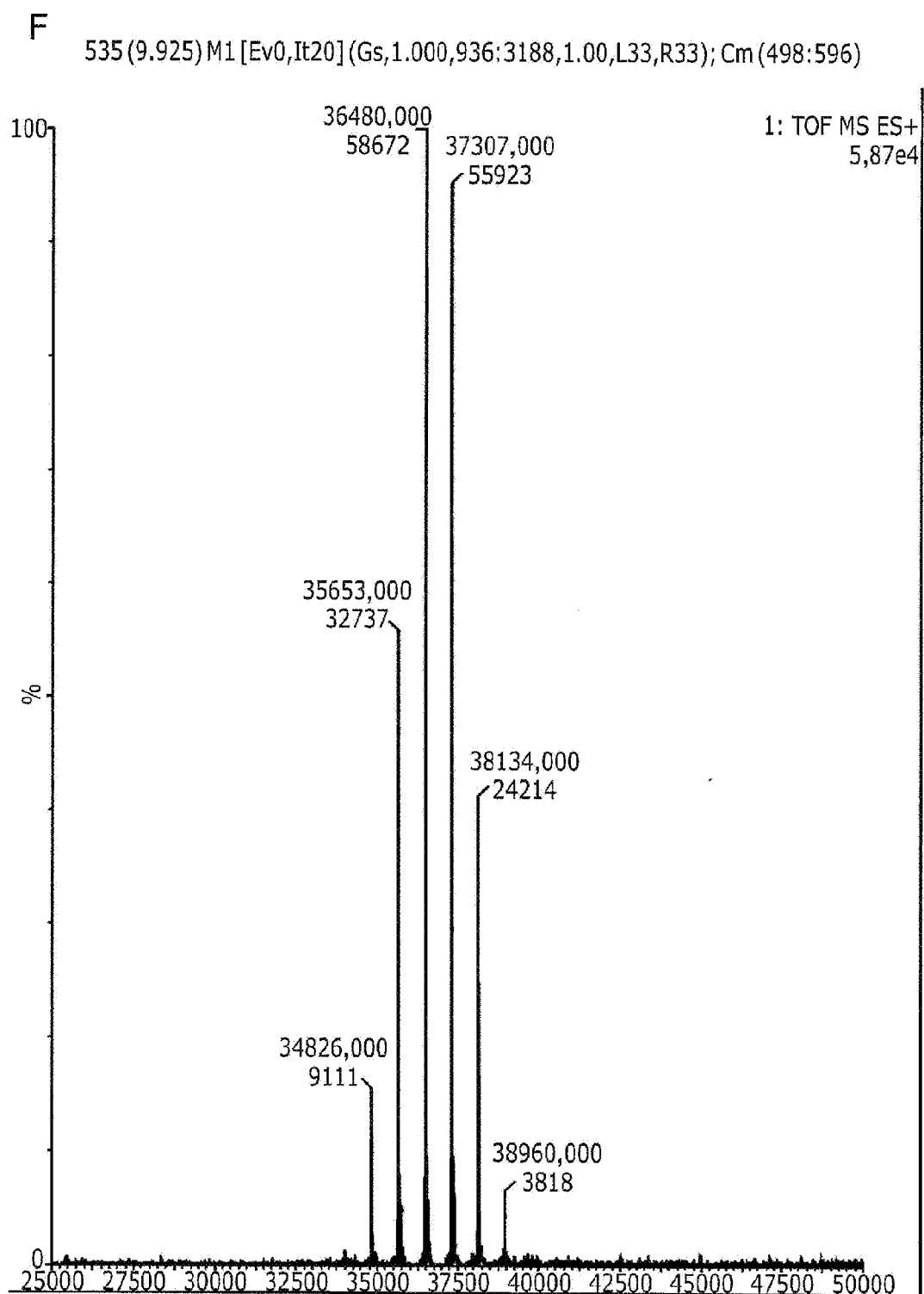


Figura 60 (continuación)

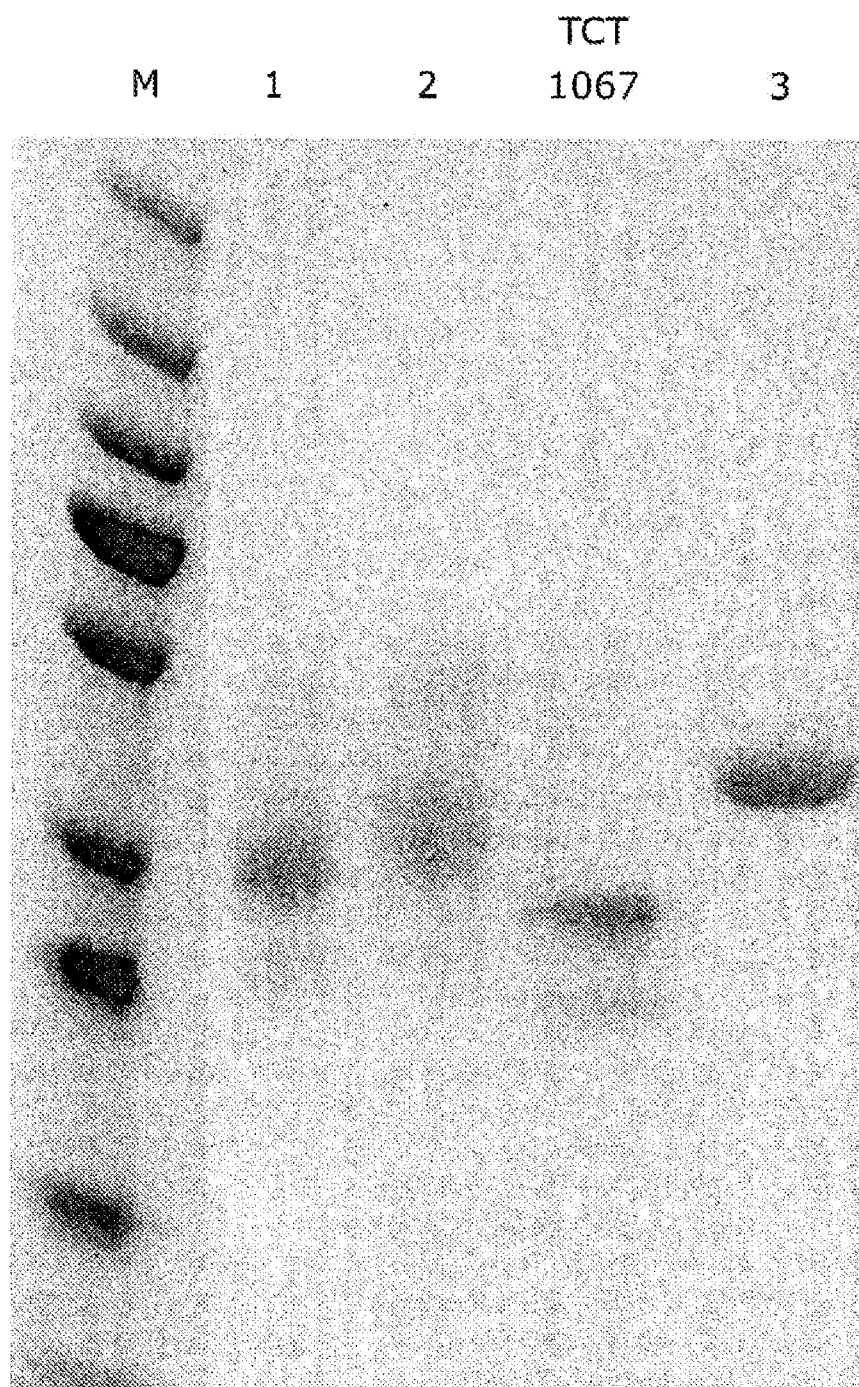


Figura 61

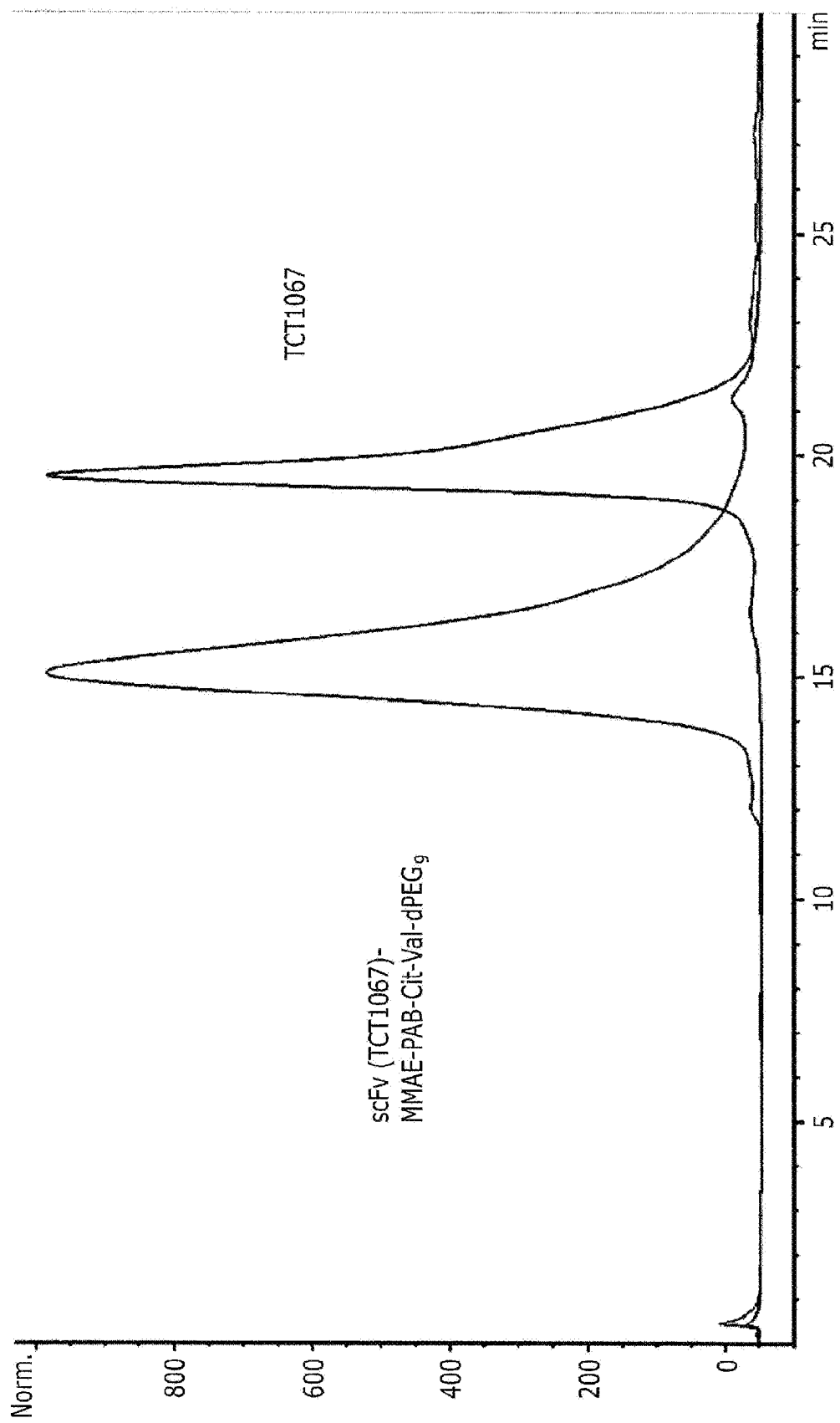


Figura 62

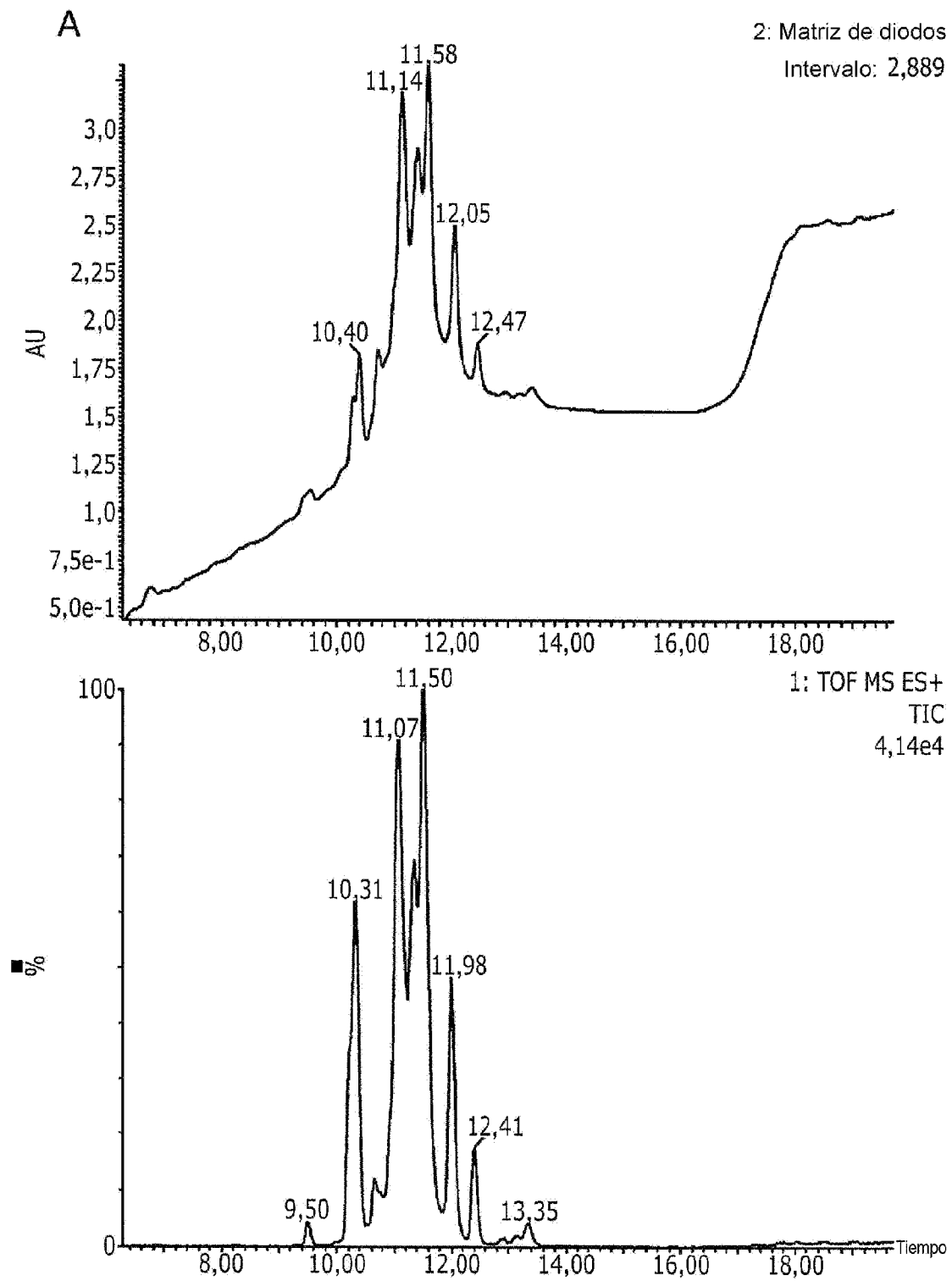


Figura 63

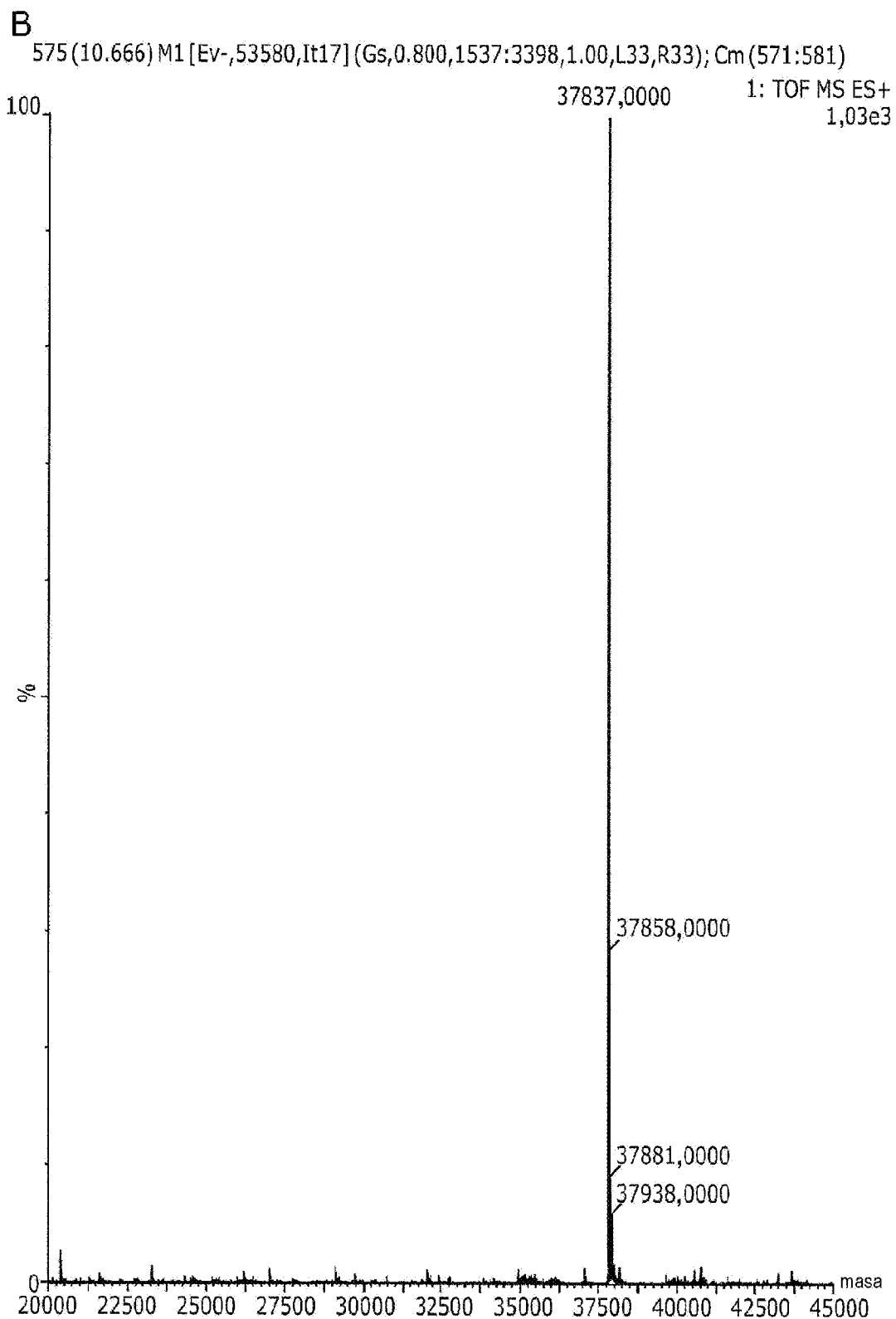


Figura 63 (continuación)

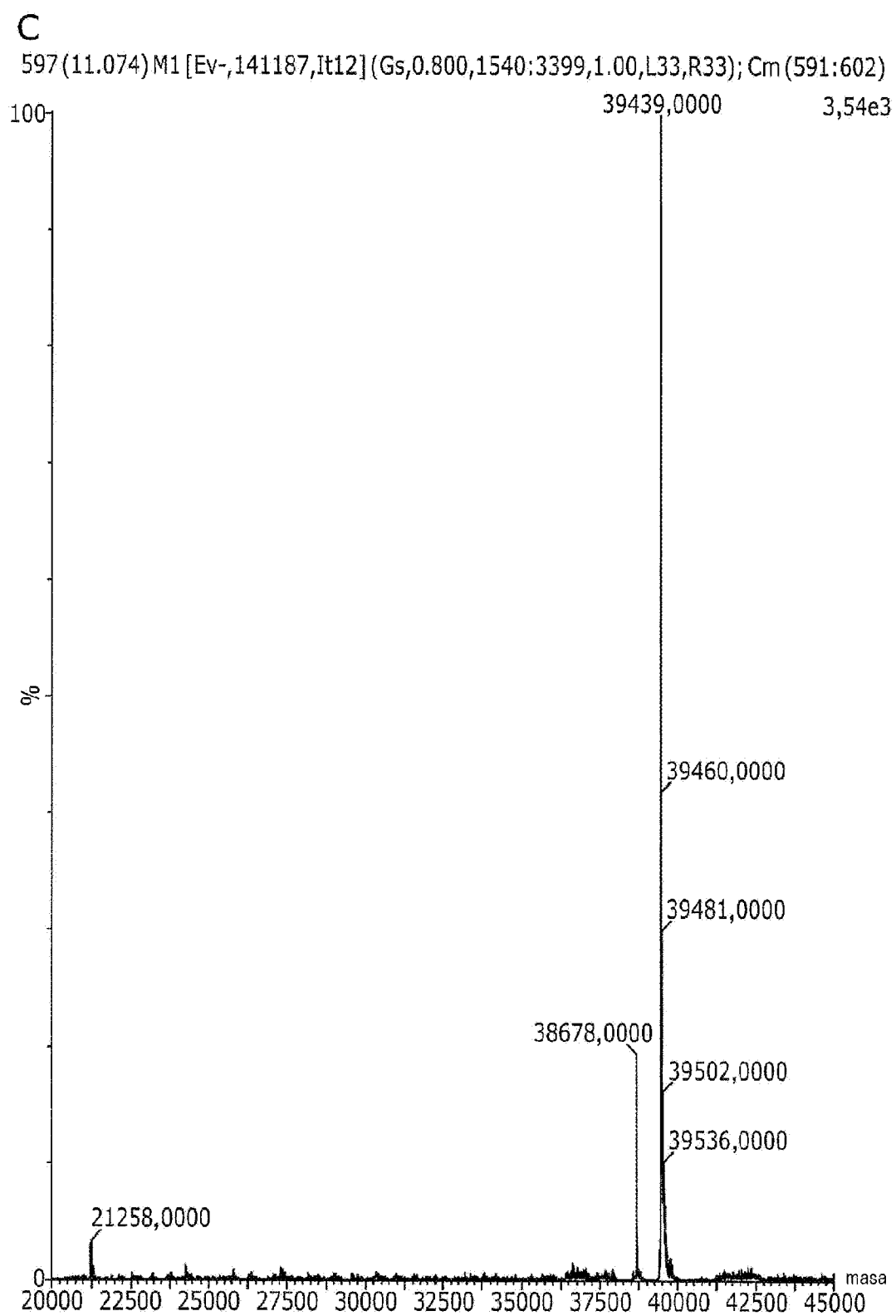


Figura 63 (continuación)

D

612 (11.352) M1 [Ev-,81091,It14] (Gs,0.800,1464:3400,1.00,L33,R33); Cm (608:614)

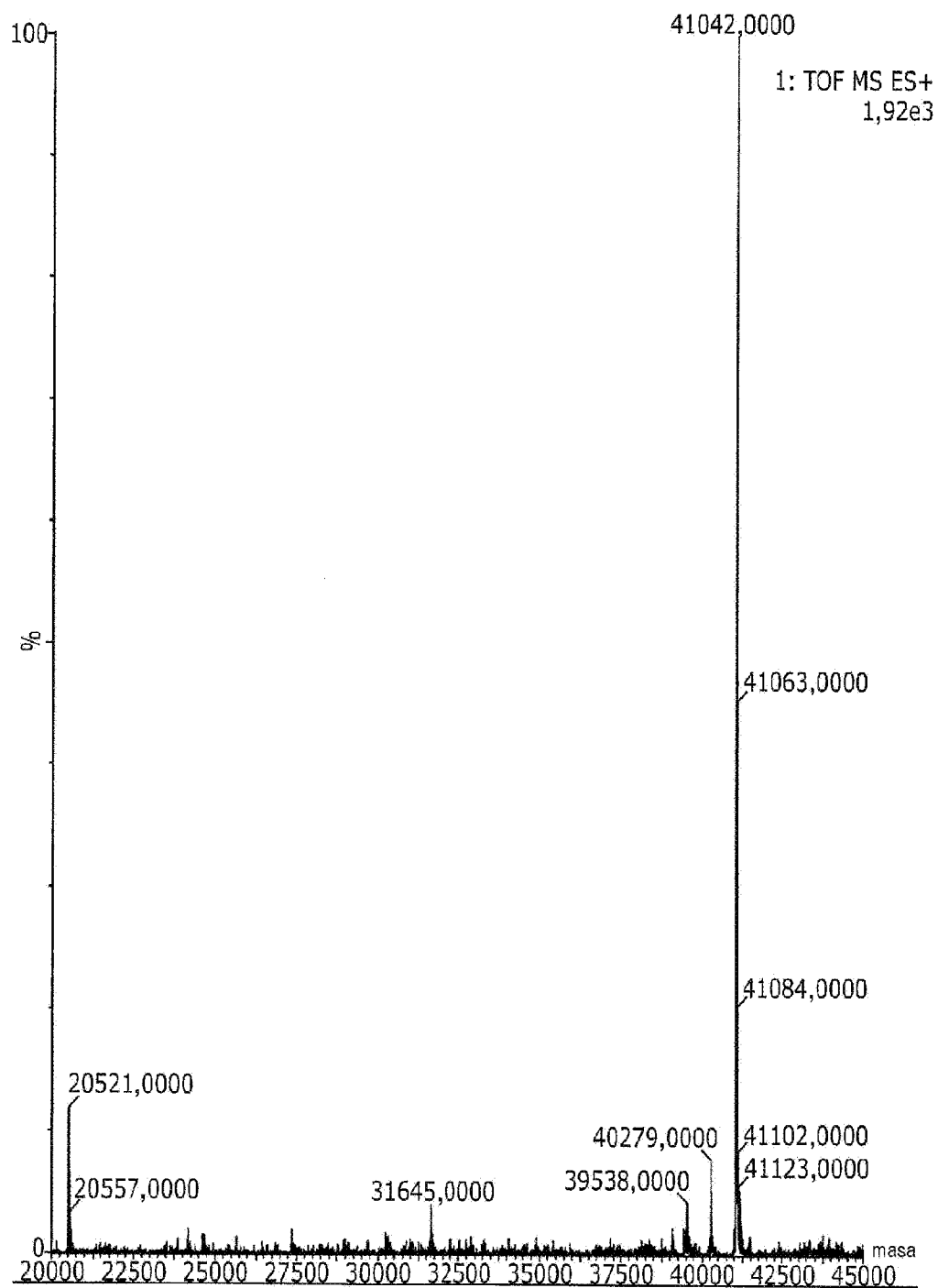


Figura 63 (continuación)

E

646 (11.983) M1 [Ev-28624,It9] (Gs,0.800,1779:3392,1.00,L33,R33); Cm (642:651)

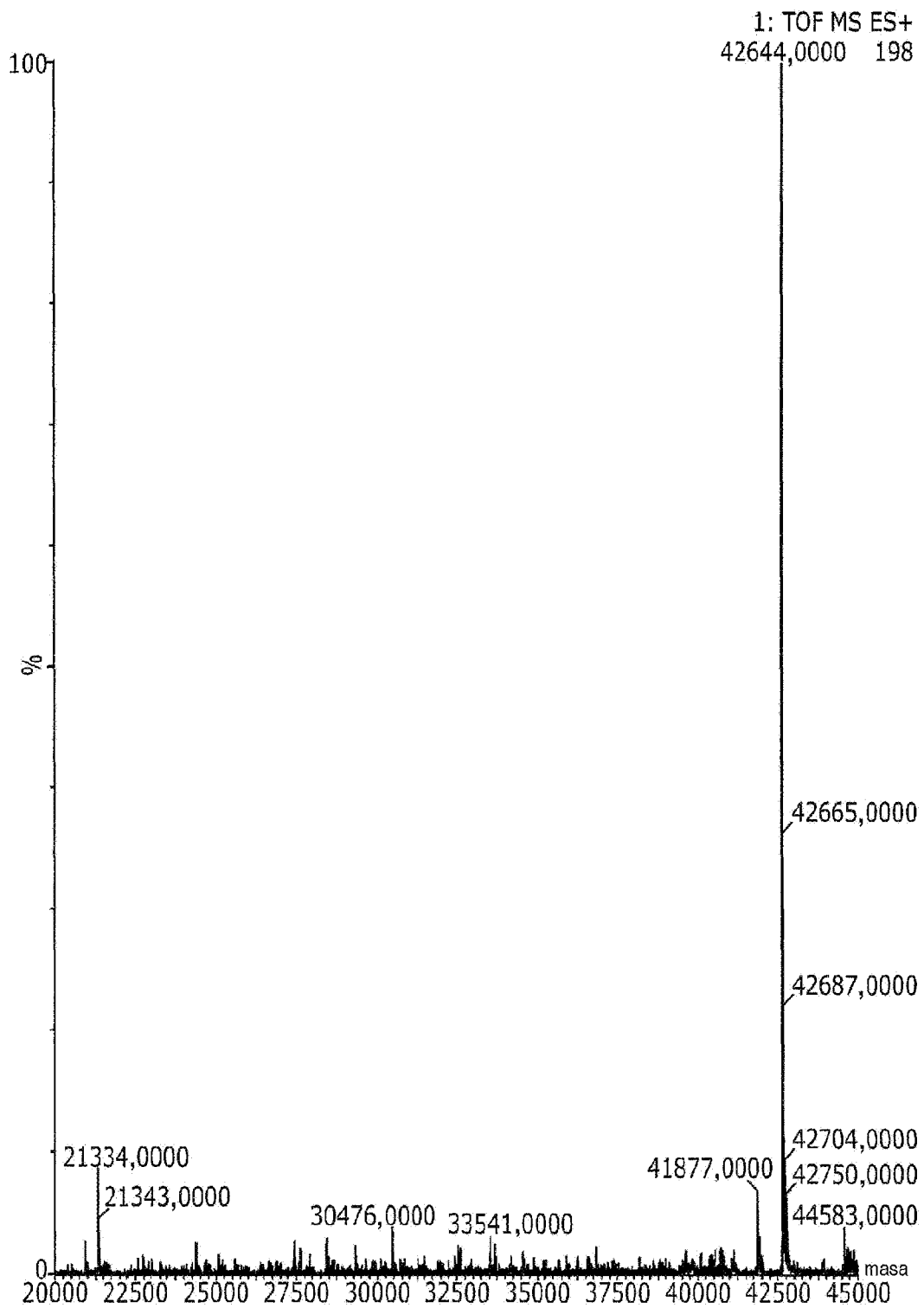


Figura 63 (continuación)

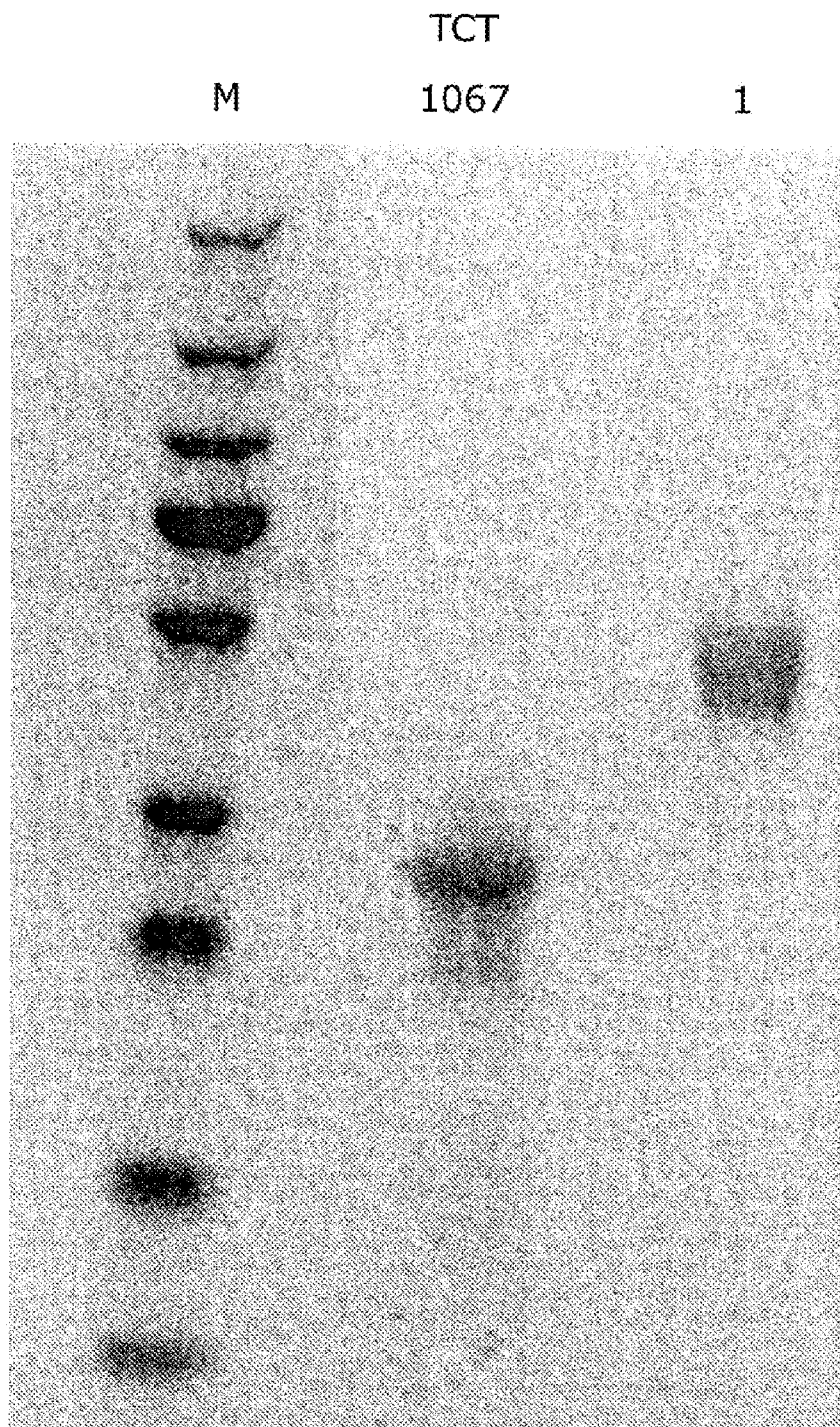


Figura 64

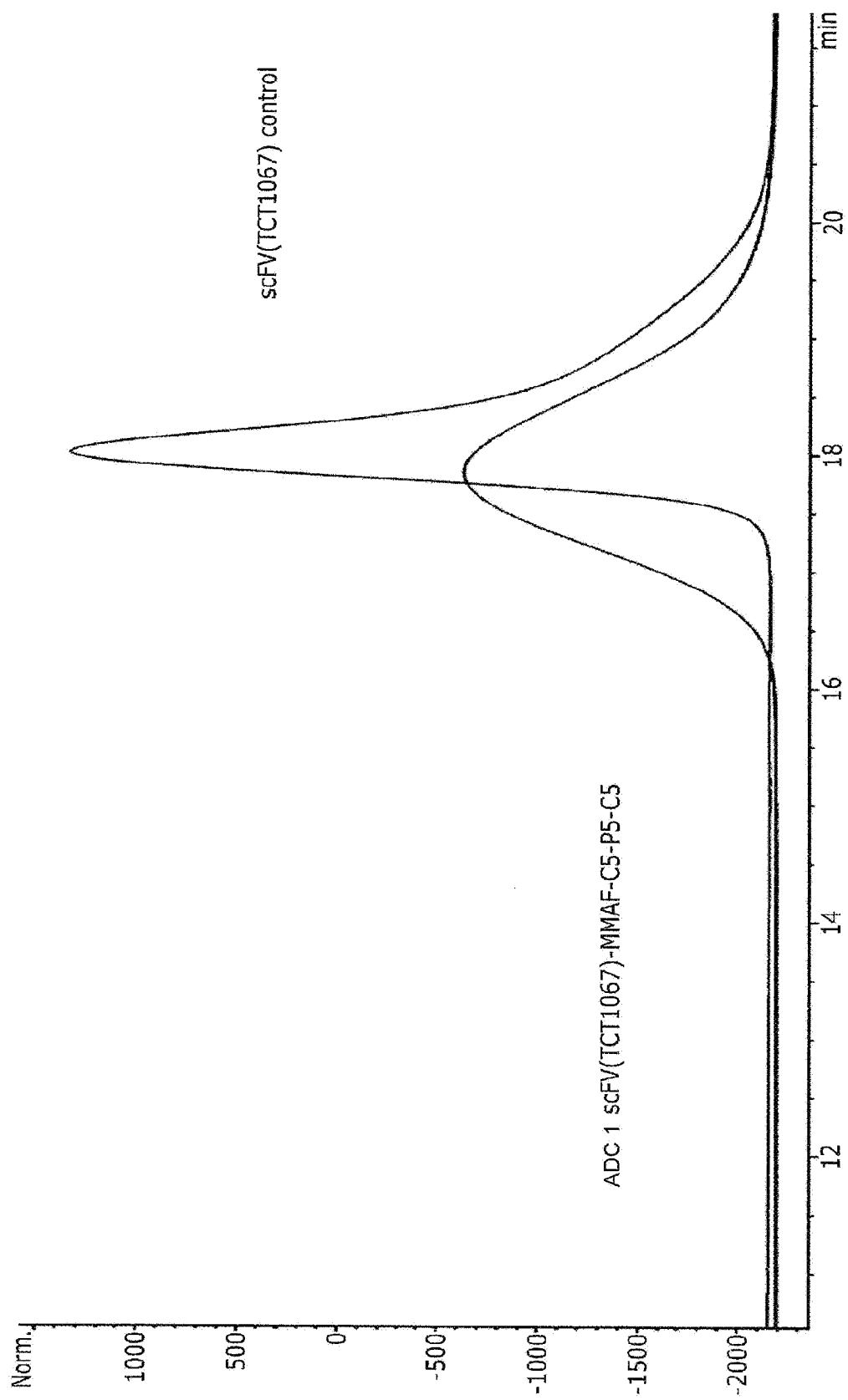


Figure 65

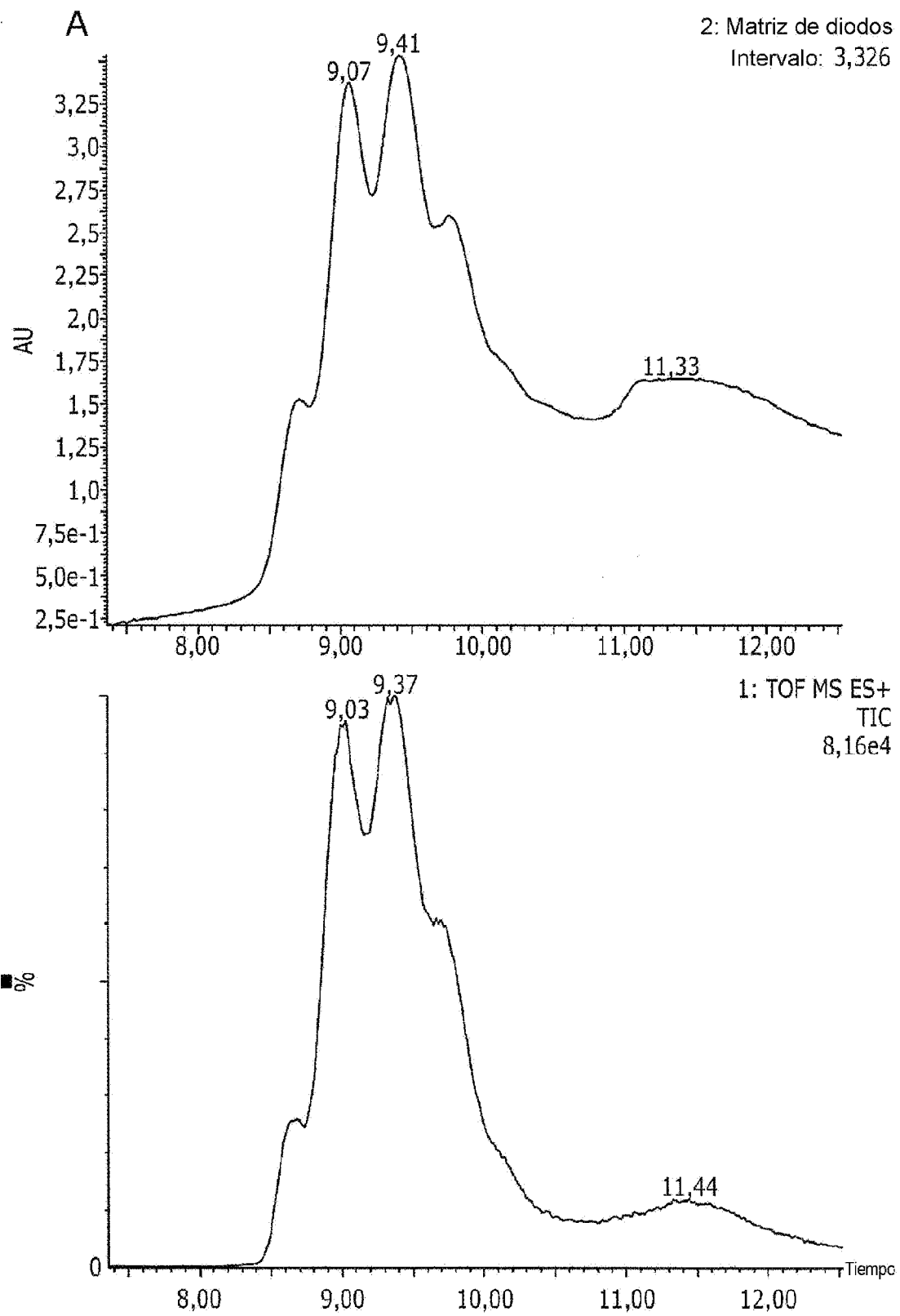


Figura 66

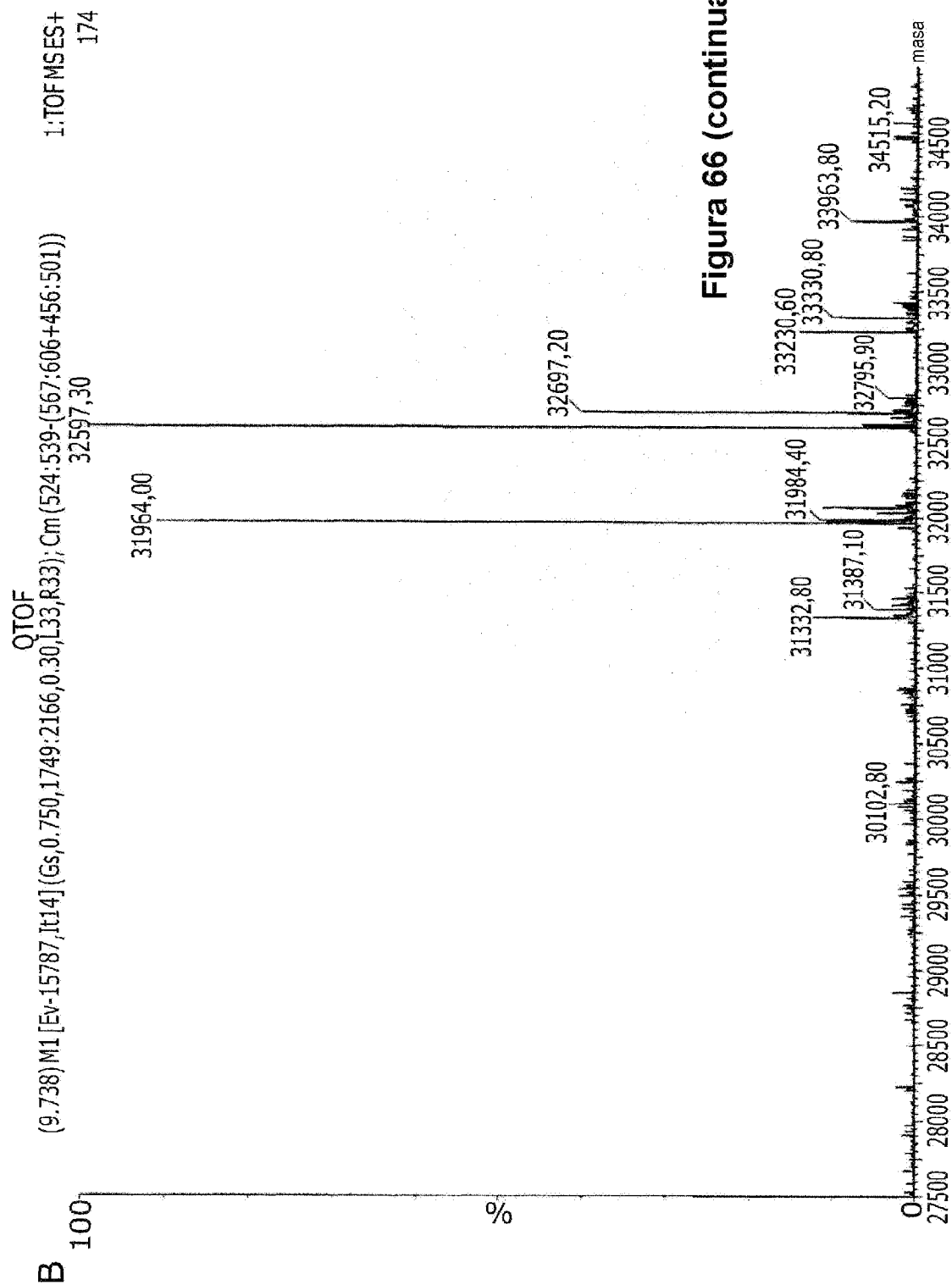


Figura 66 (continuación)

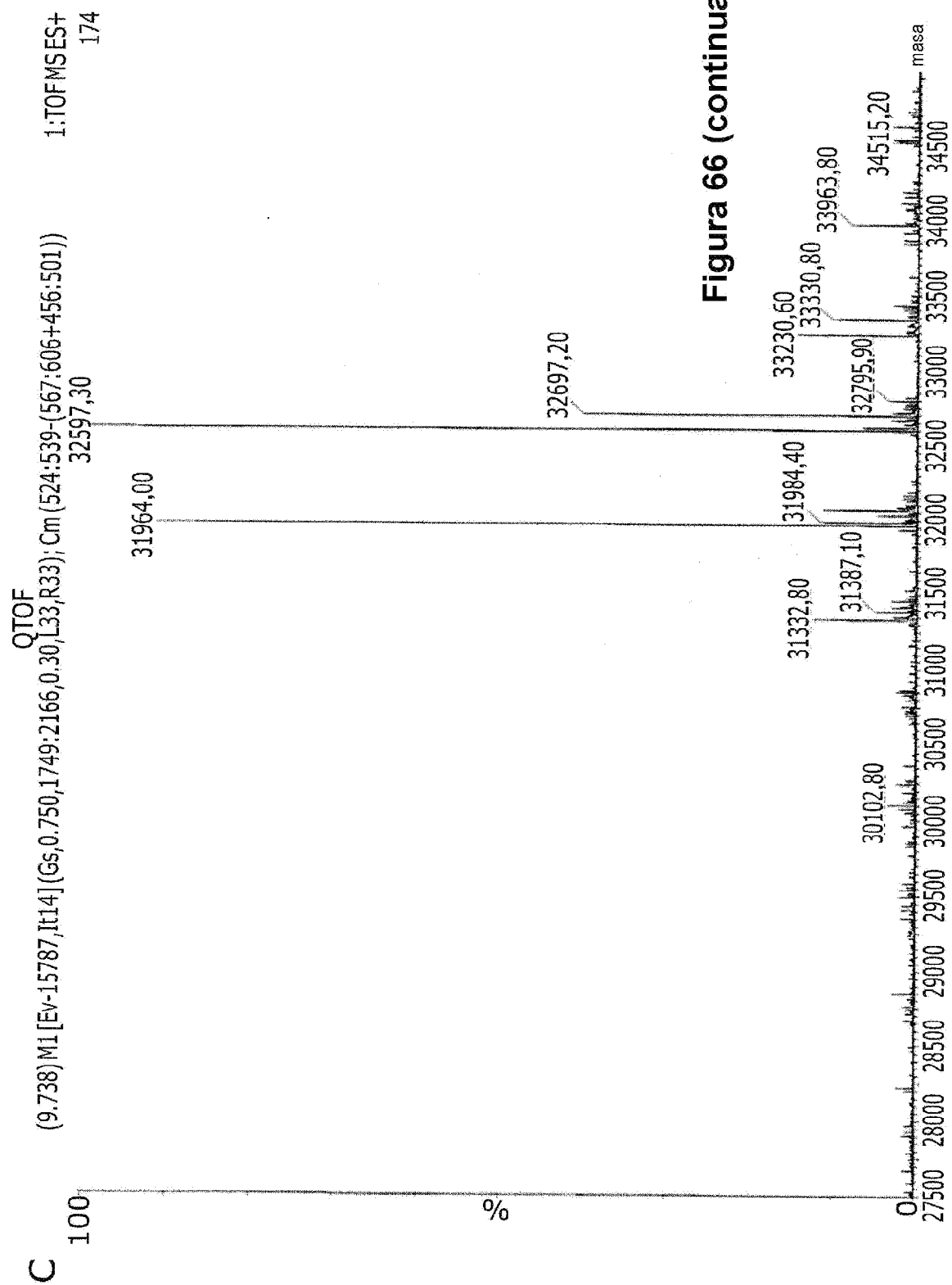


Figura 66 (continuación)

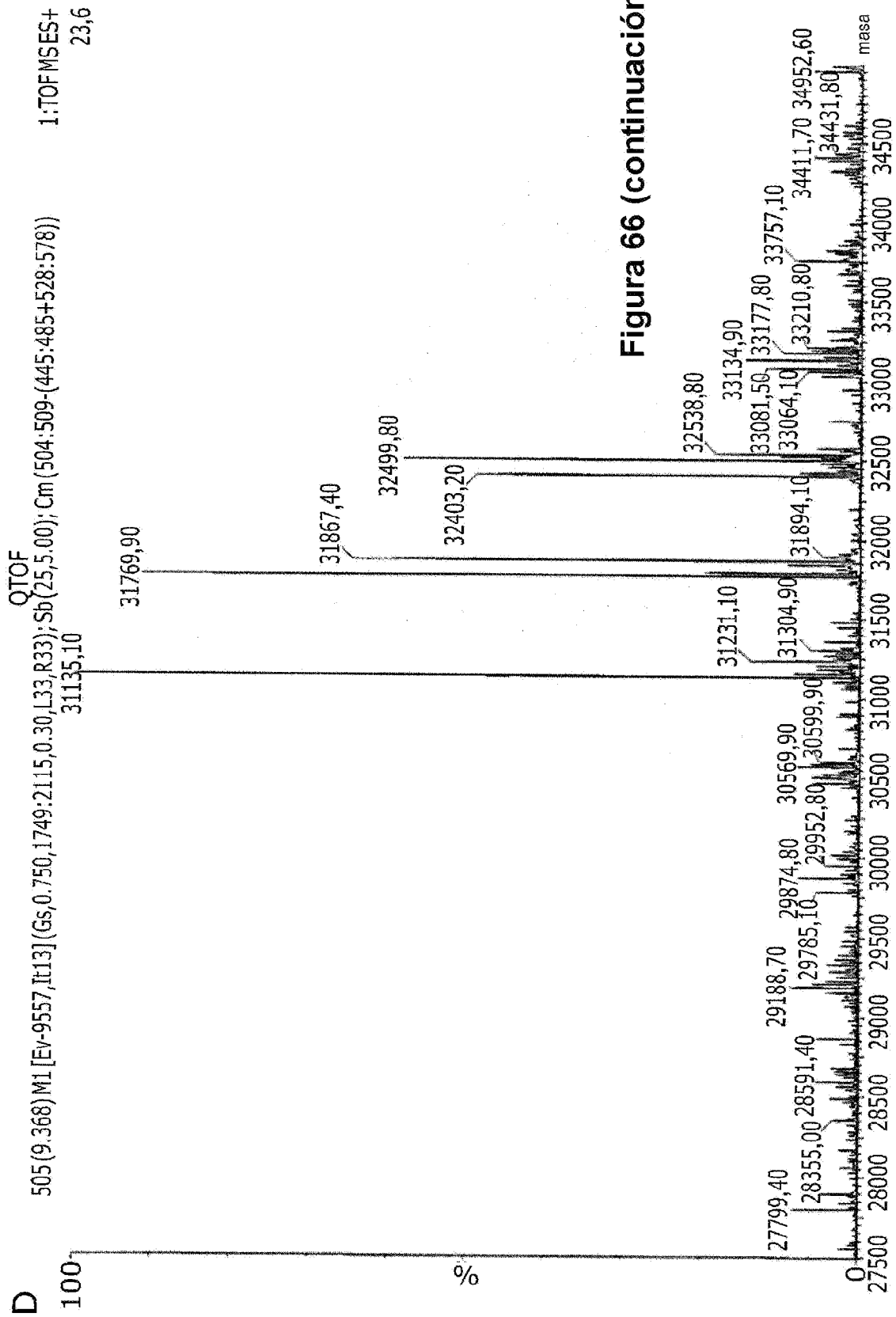
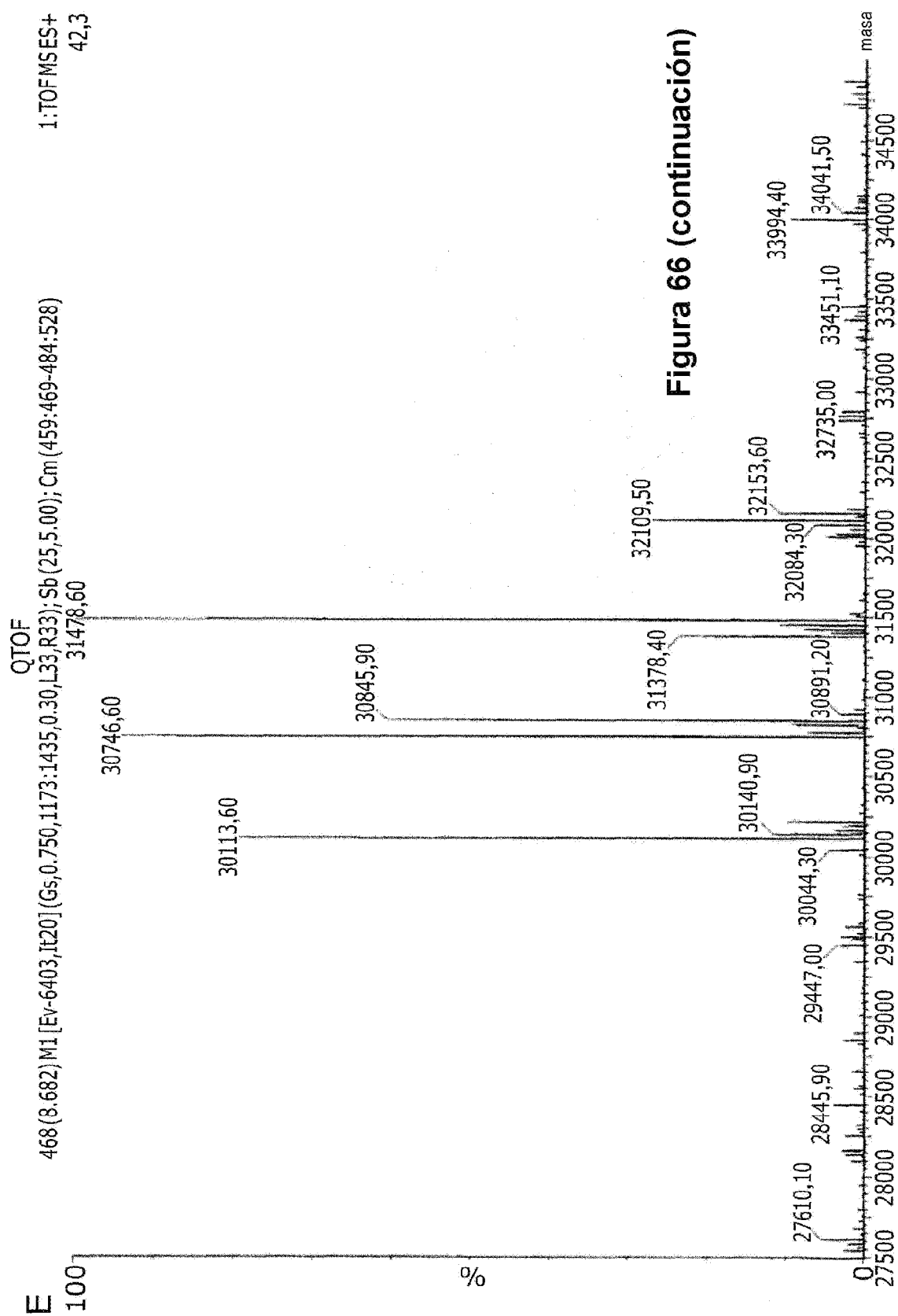
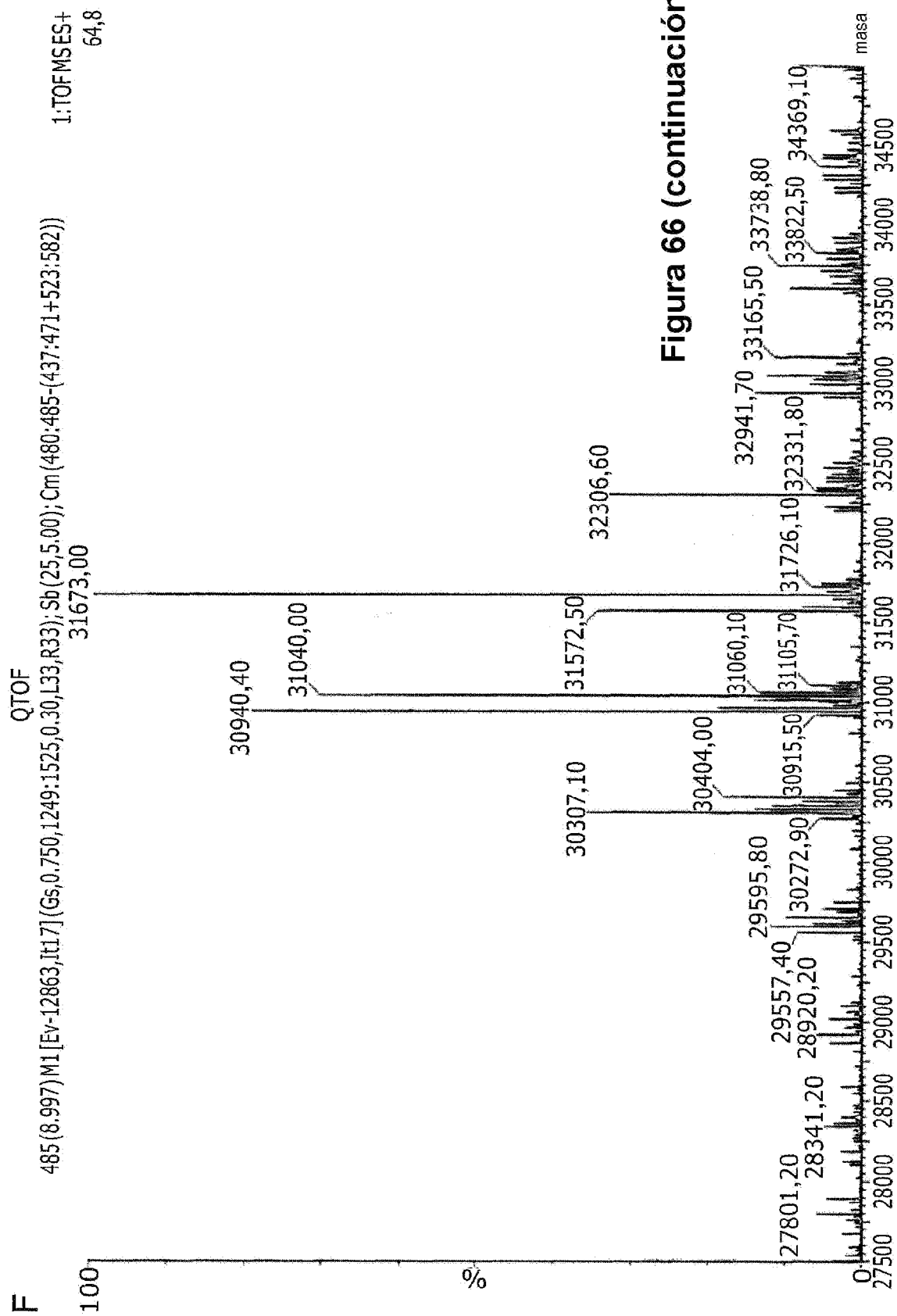


Figura 66 (continuación)





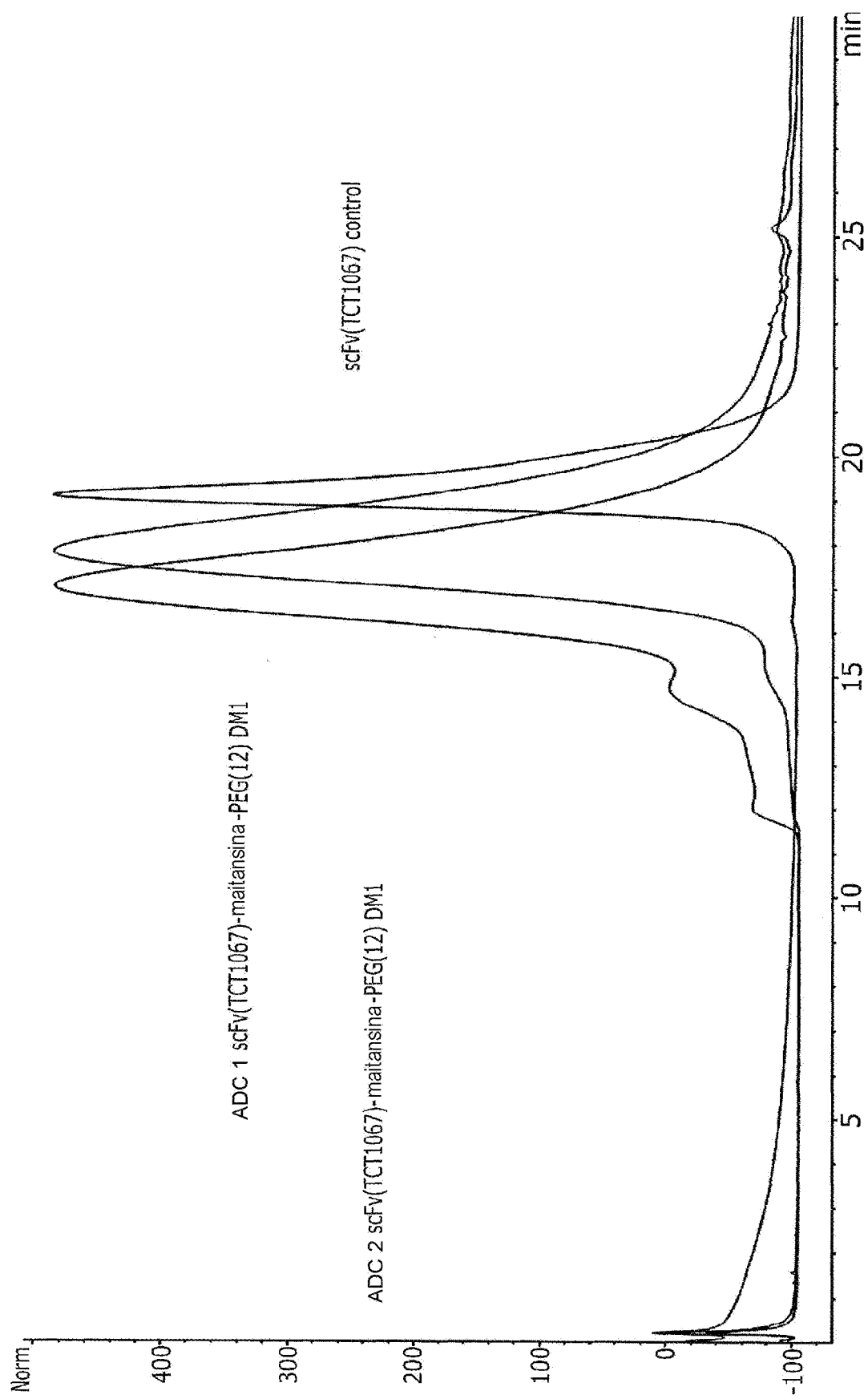


Figure 67

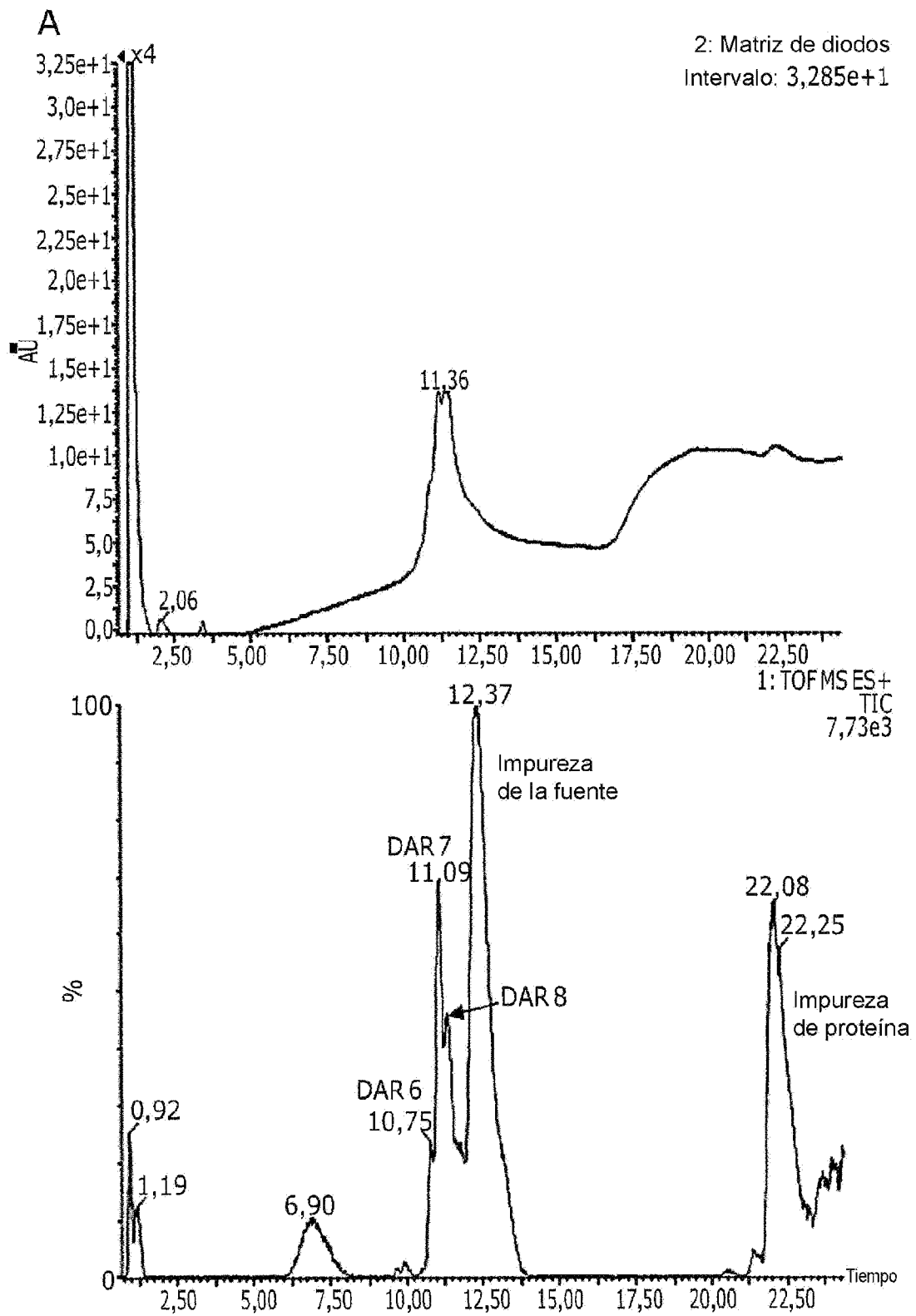


Figura 68

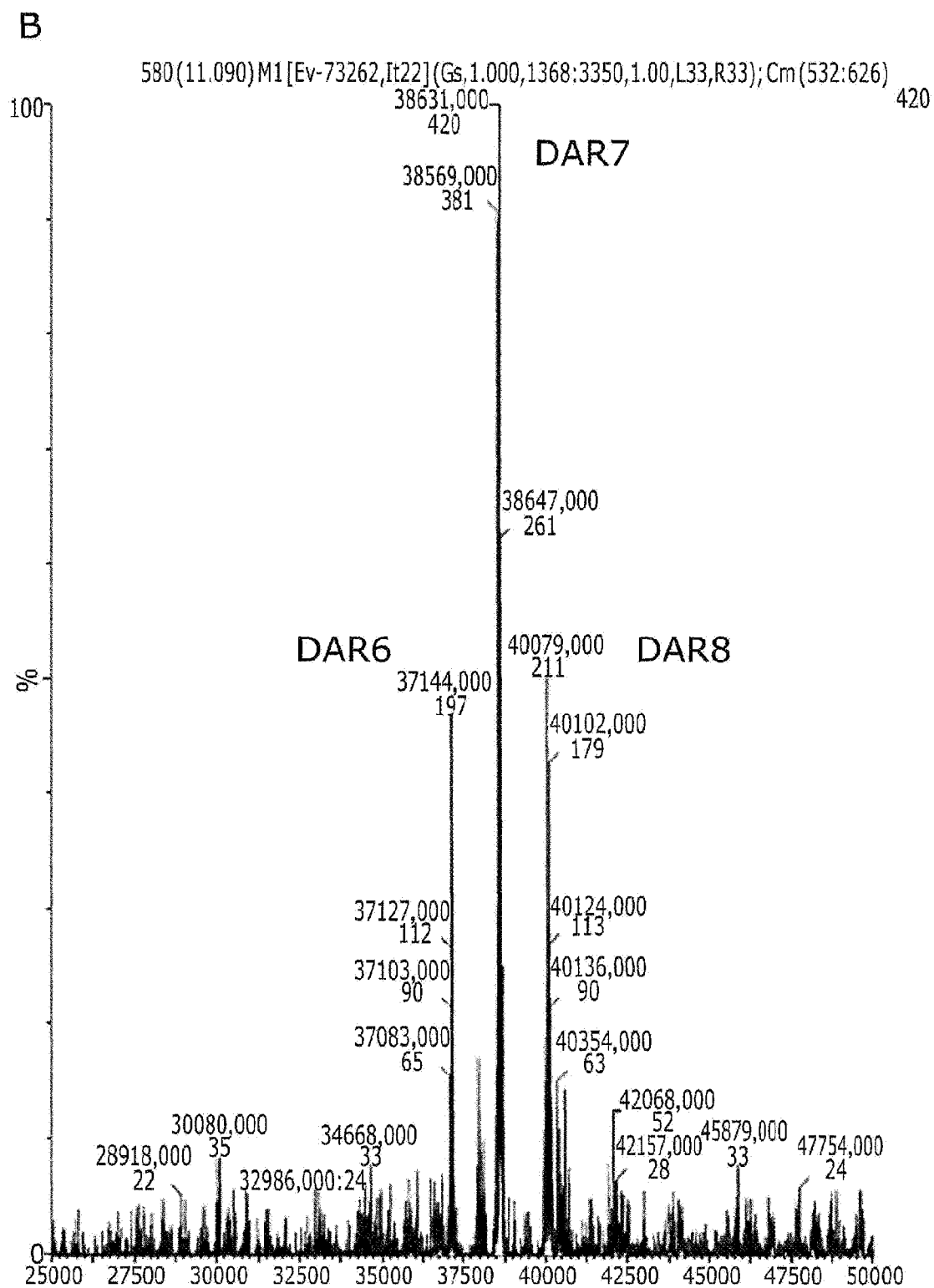


Figura 68 (continuación)

2: Matriz de diodos
Intervalo: 2,125

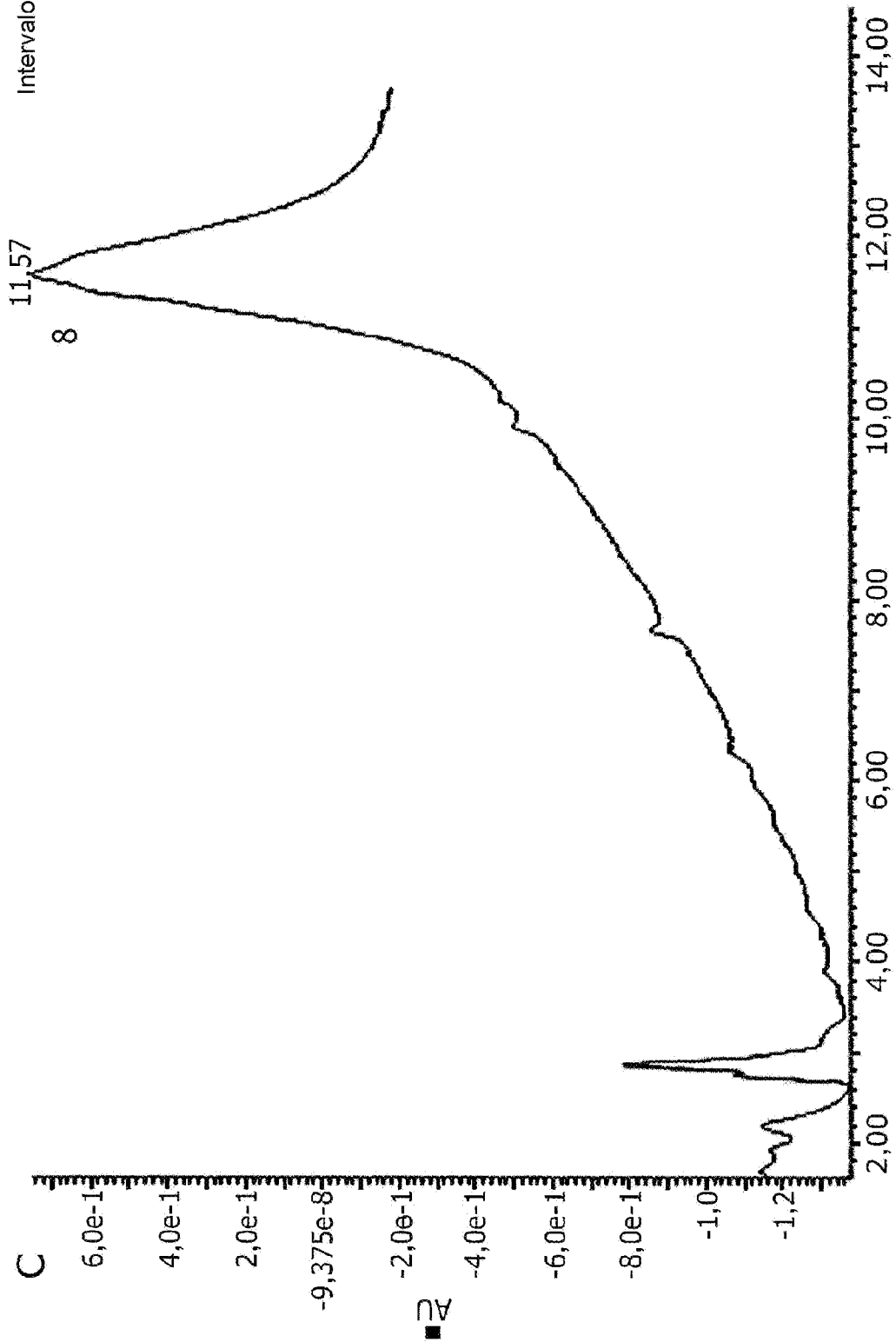


Figura 68 (continuación)

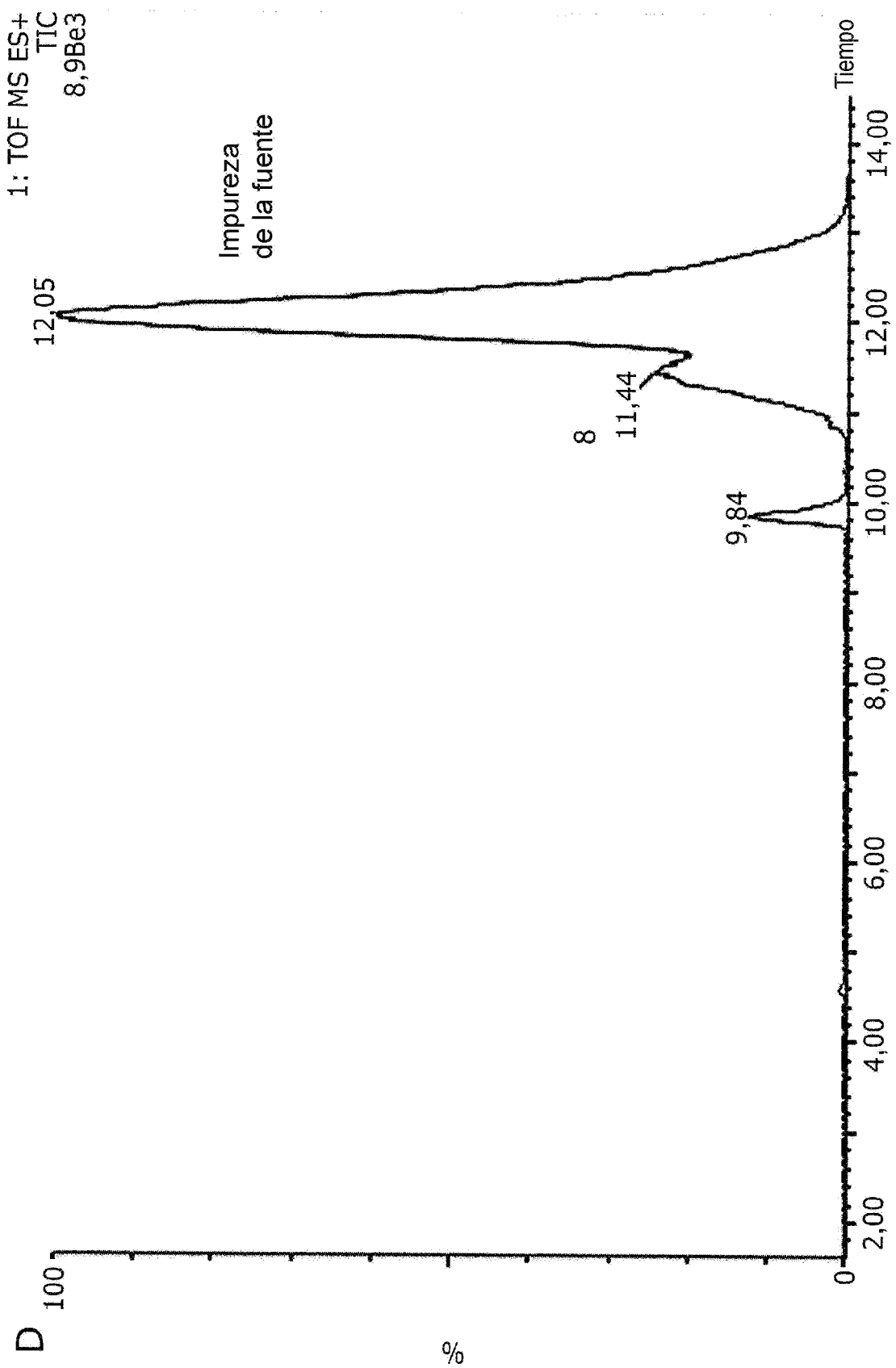


Figura 68 (continuación)

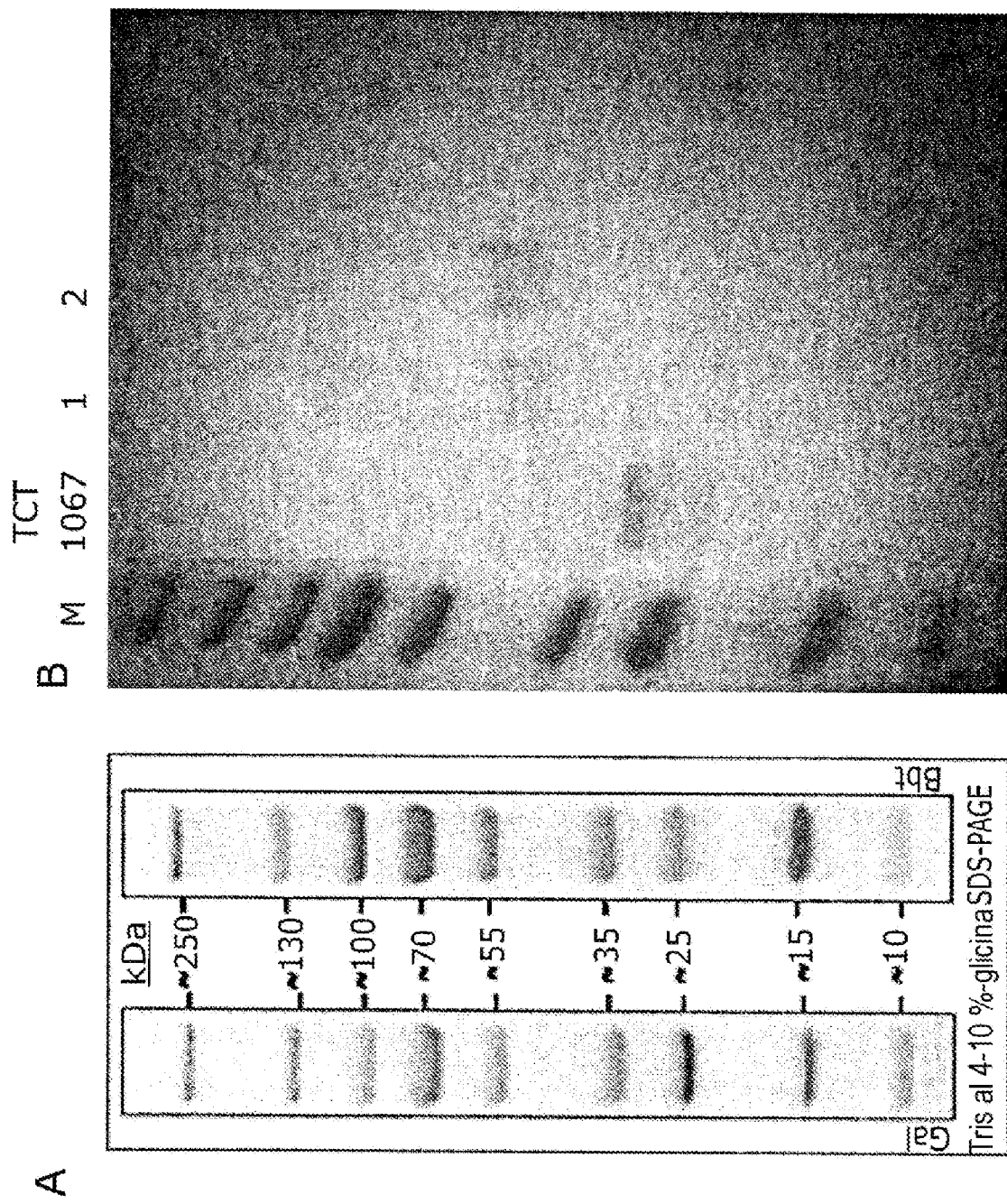


Figura 69A

Figura 69B

Conjugaciones de Pani SDS PAGE

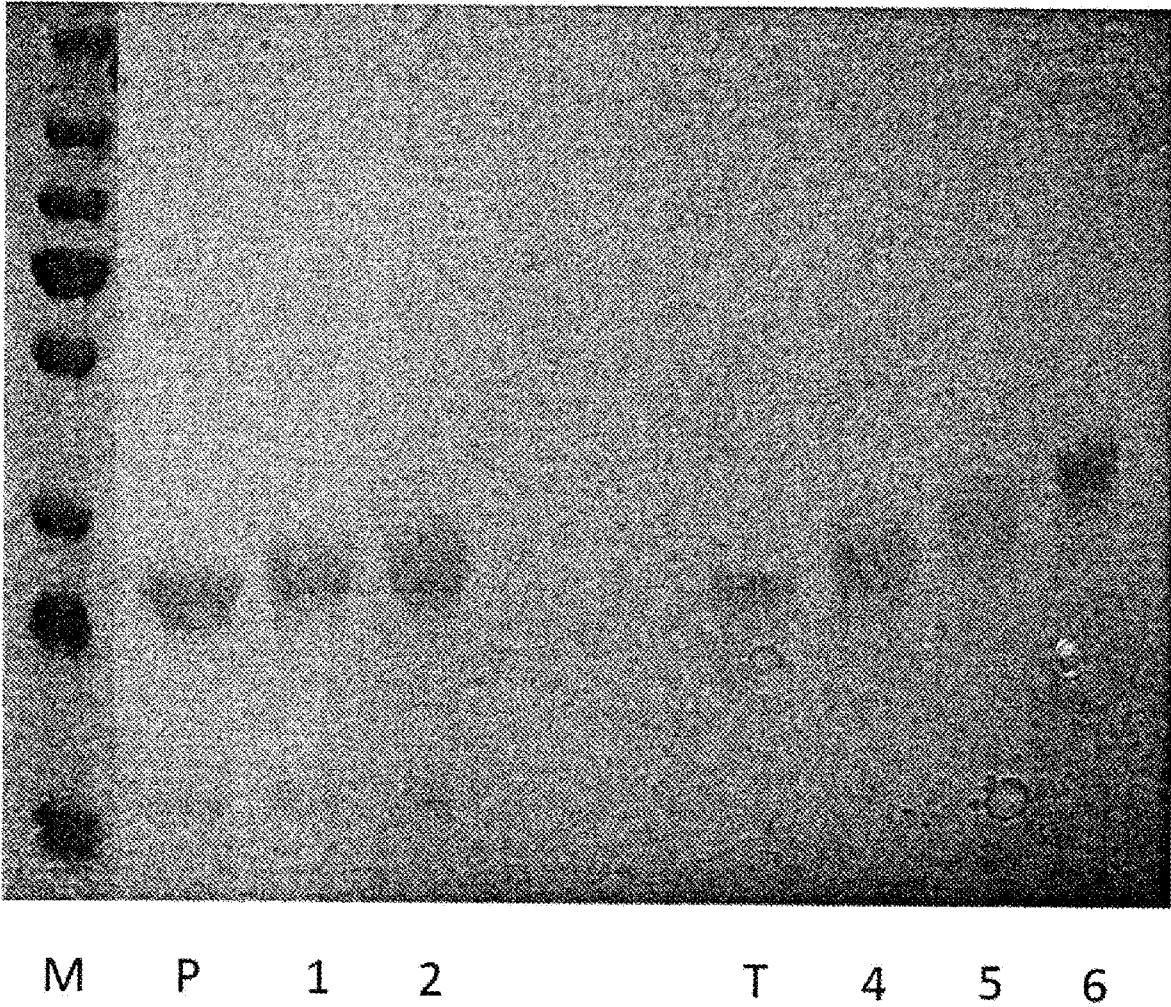


Figura 70

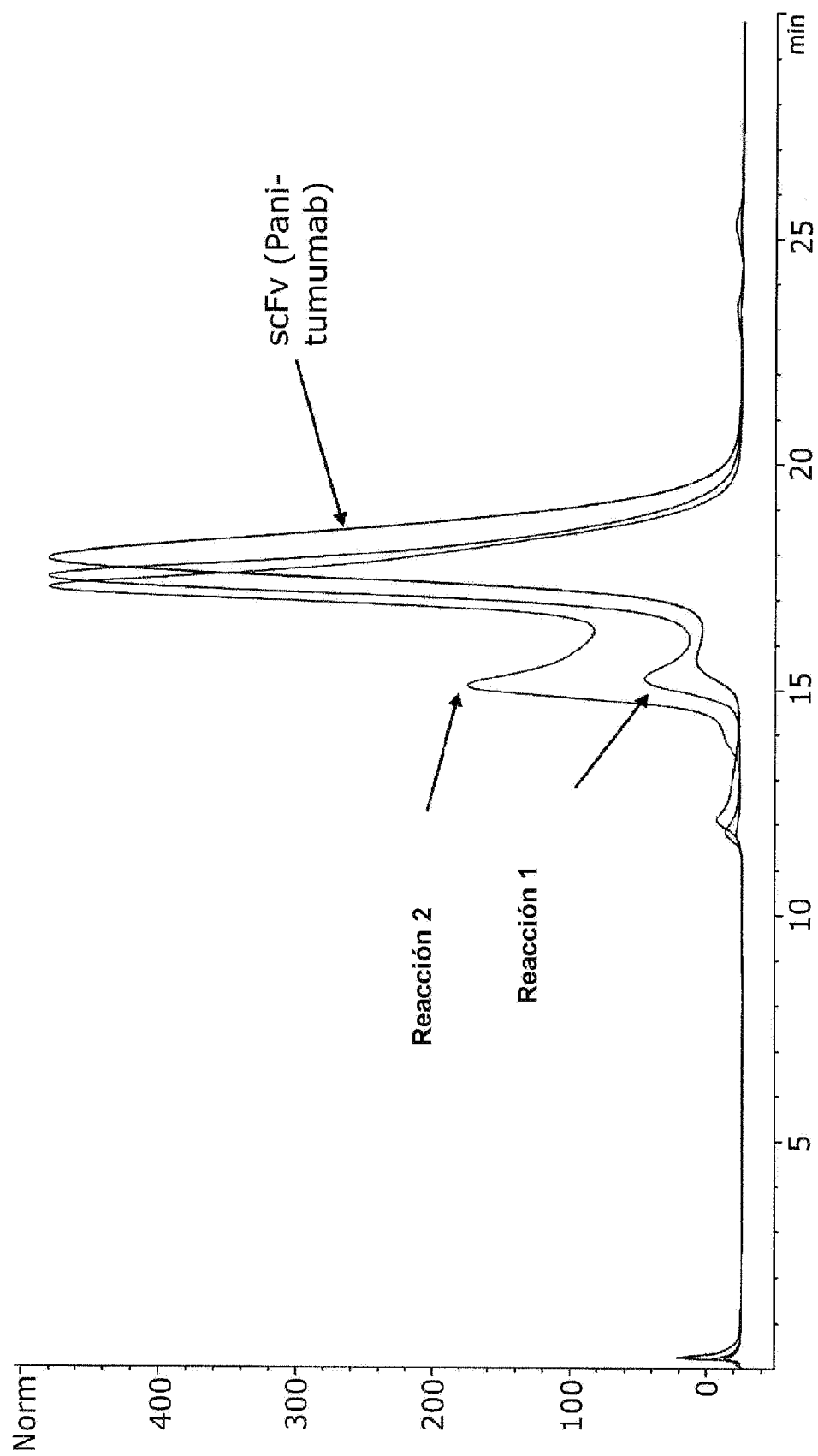


Figura 71

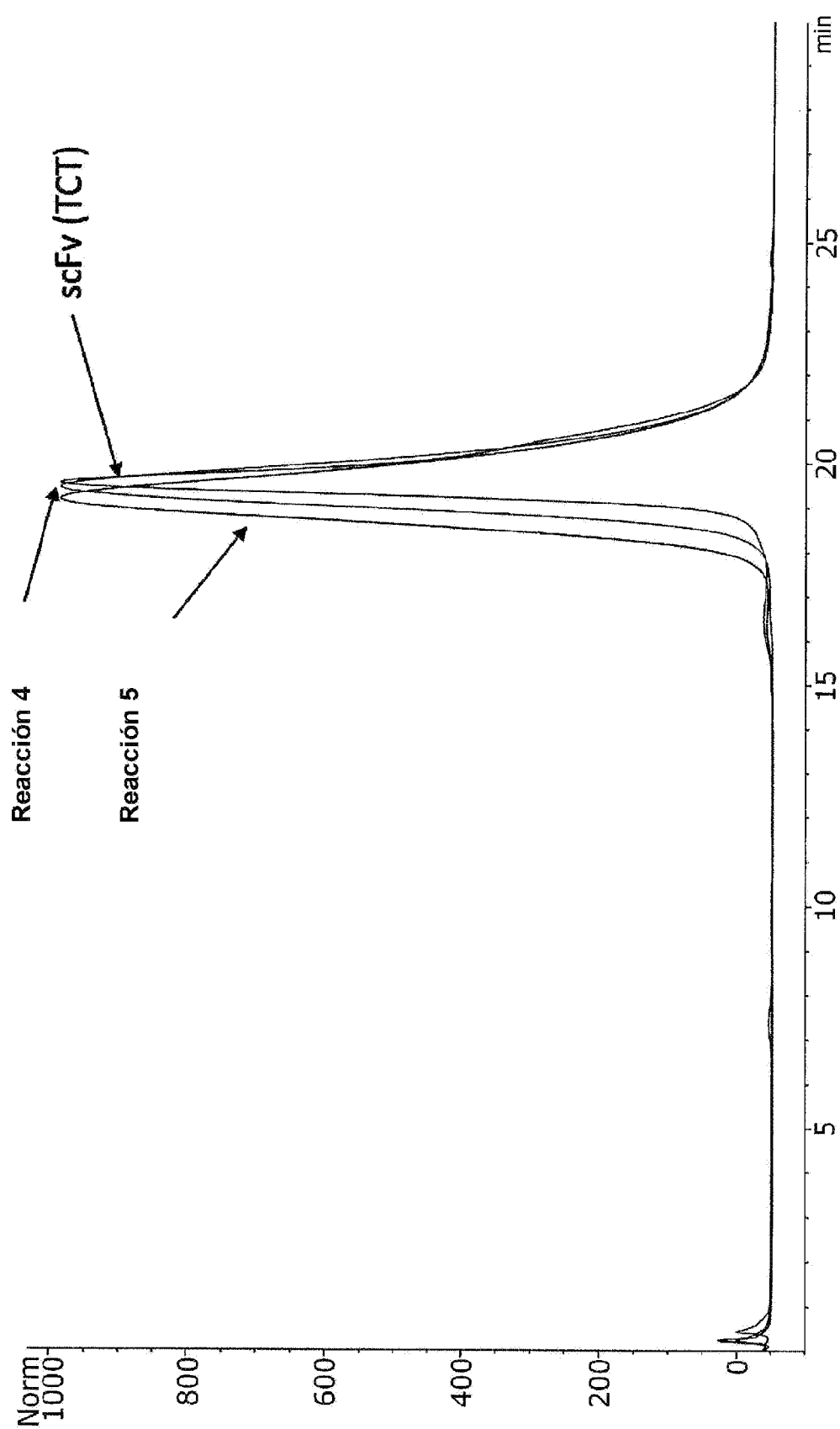


Figura 71 (continuación)

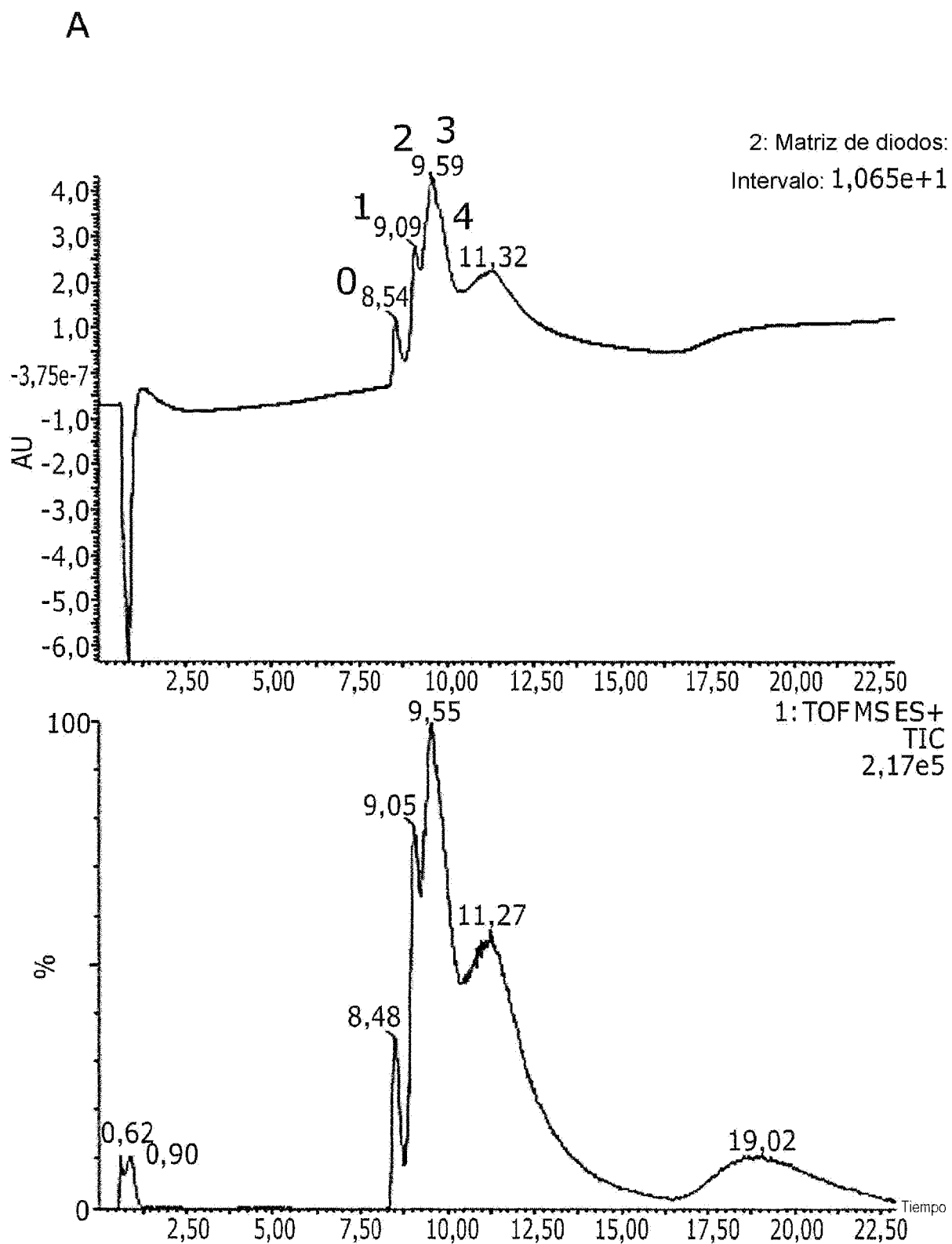


Figura 72

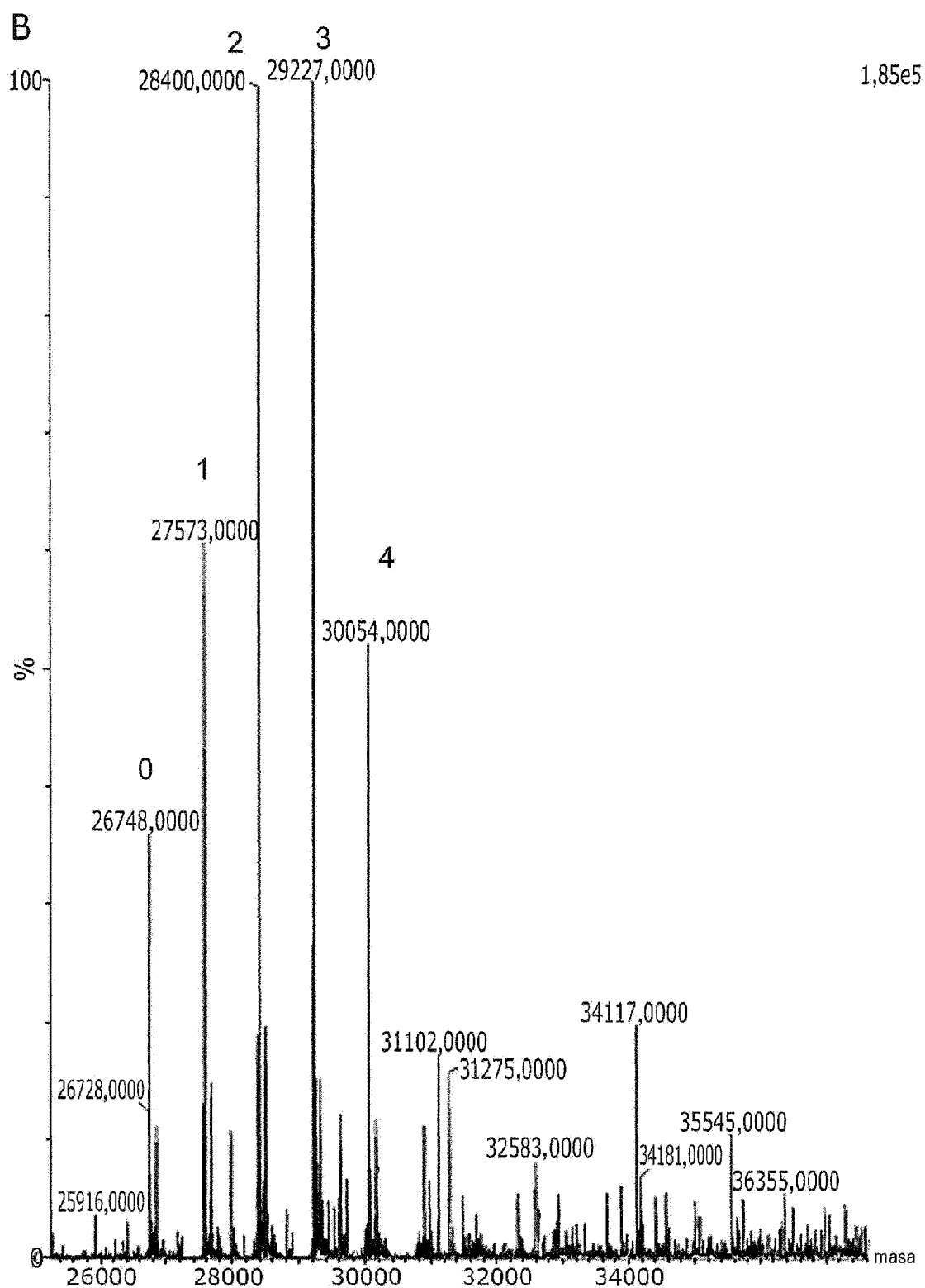


Figura 72 (continuación)

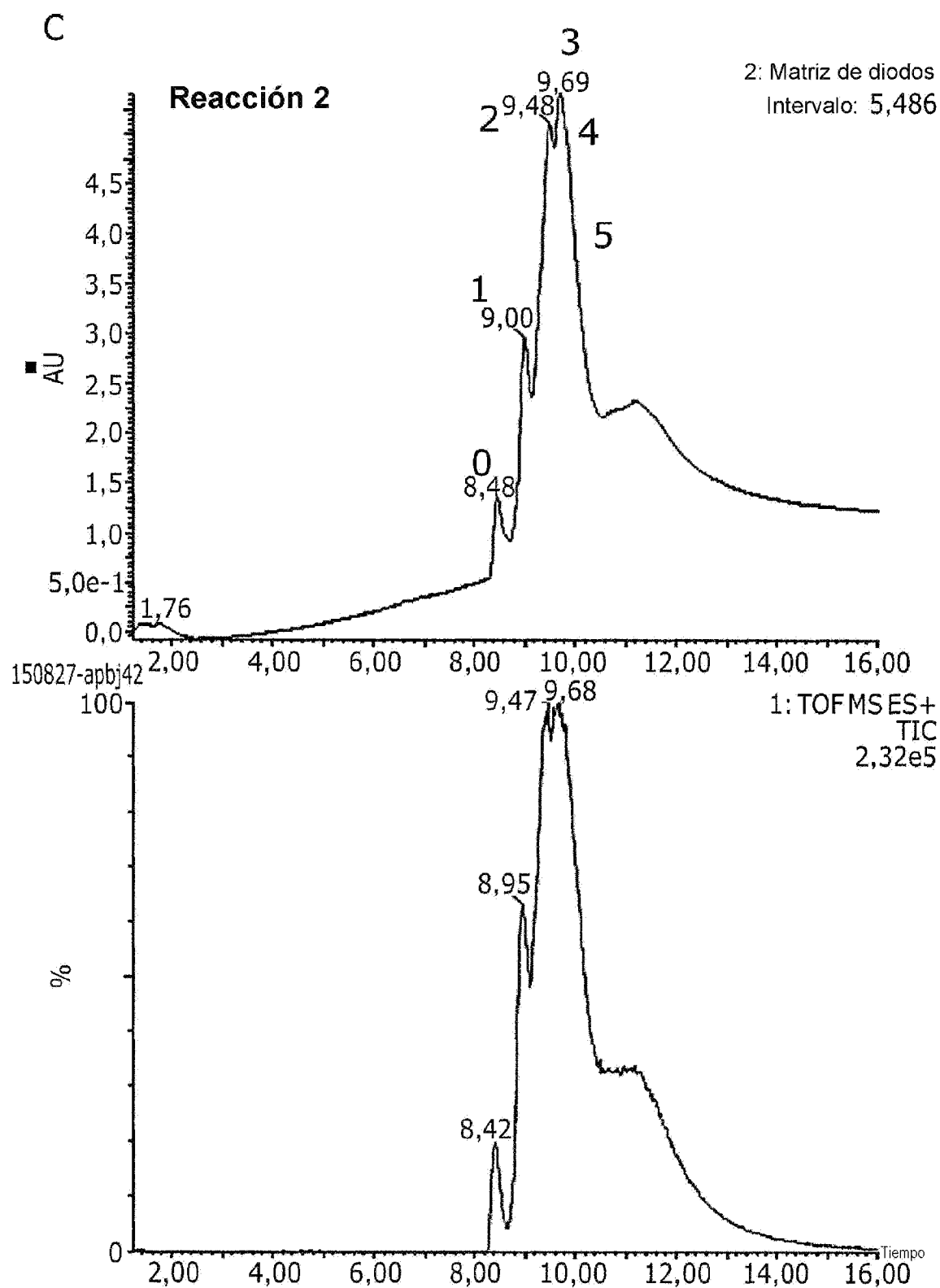


Figura 72 (continuación)

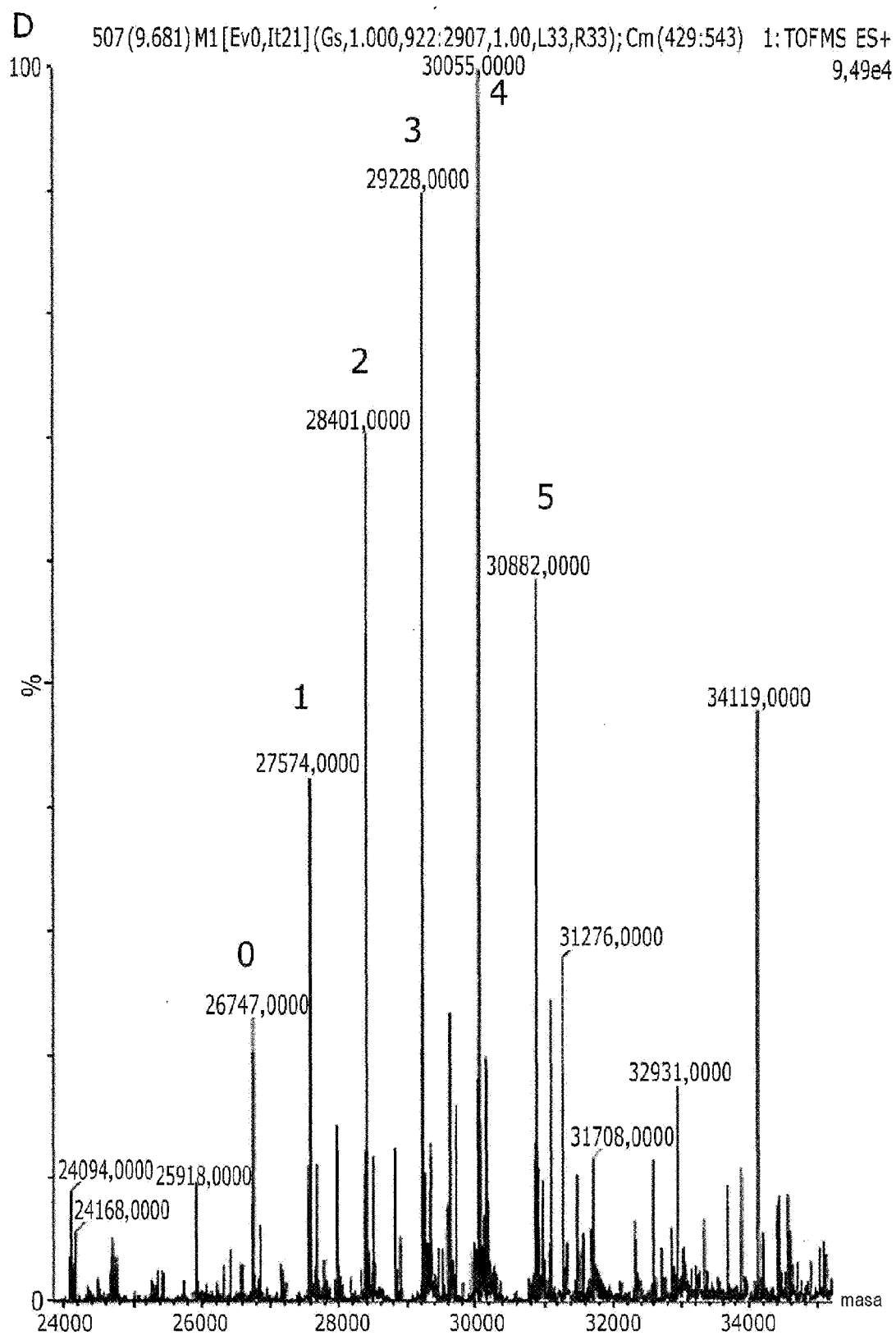


Figura 72 (continuación)

E

Reacción 4

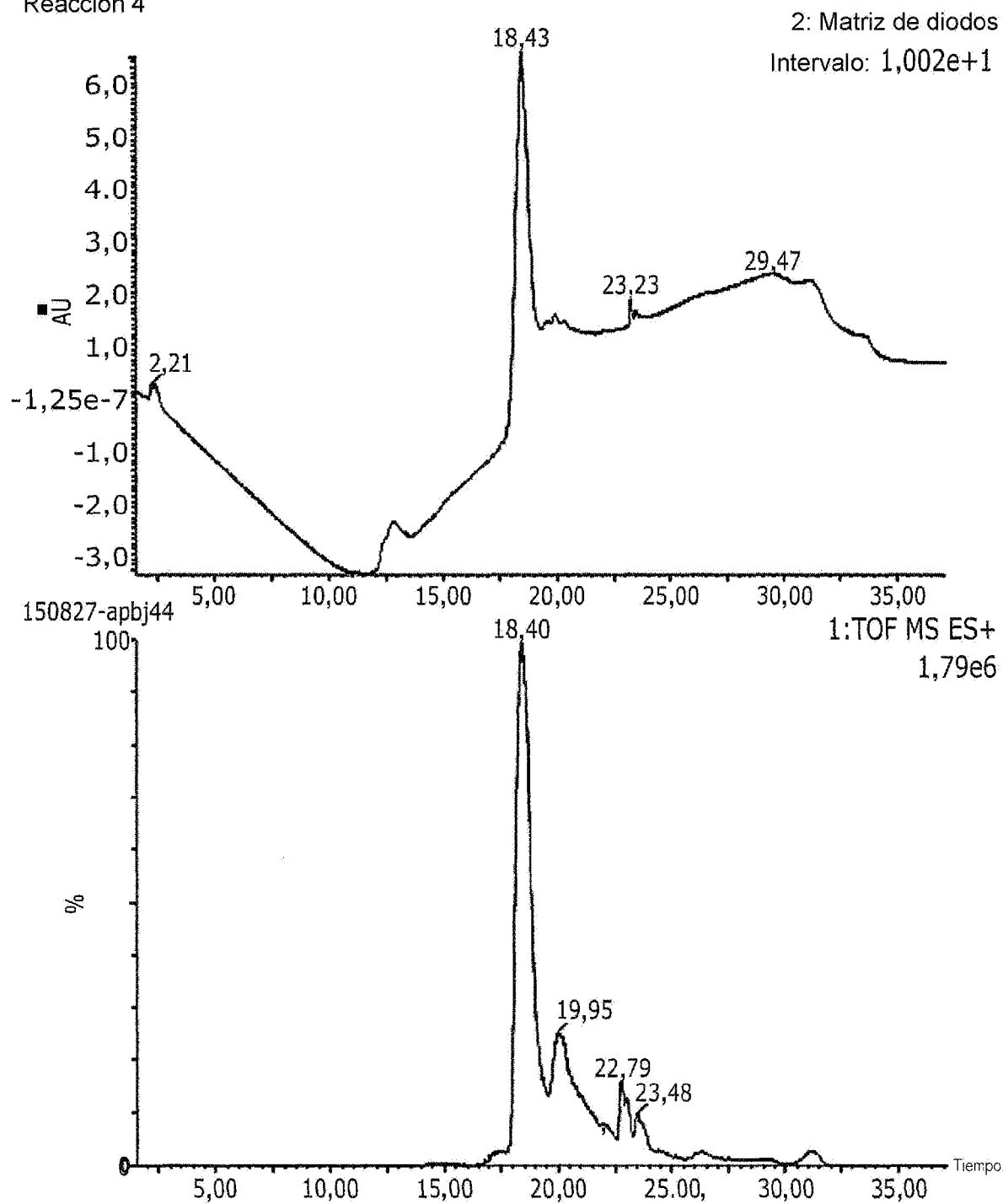


Figura 72 (continuación)

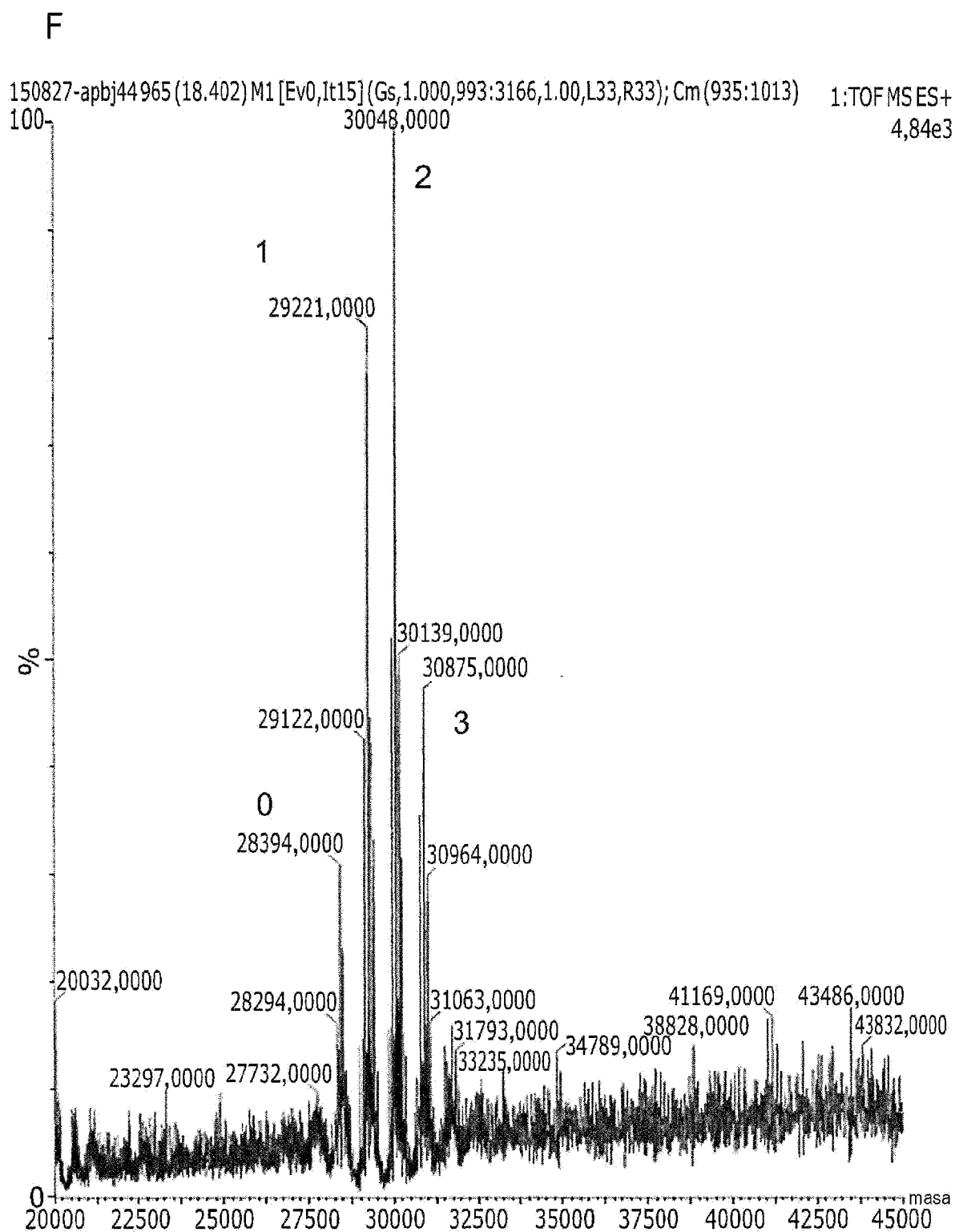


Figura 72 (continuación)

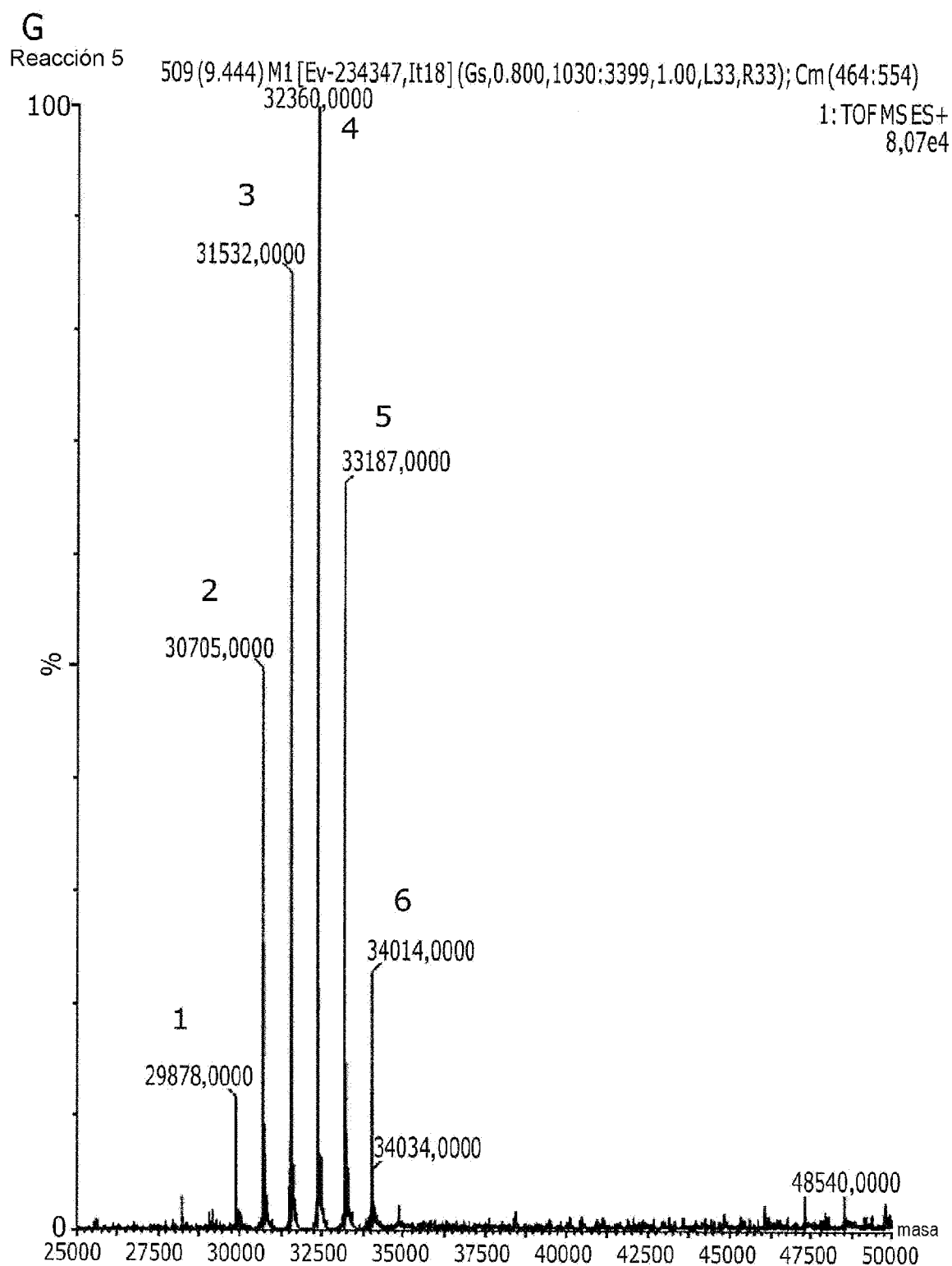


Figura 72 (continuación)

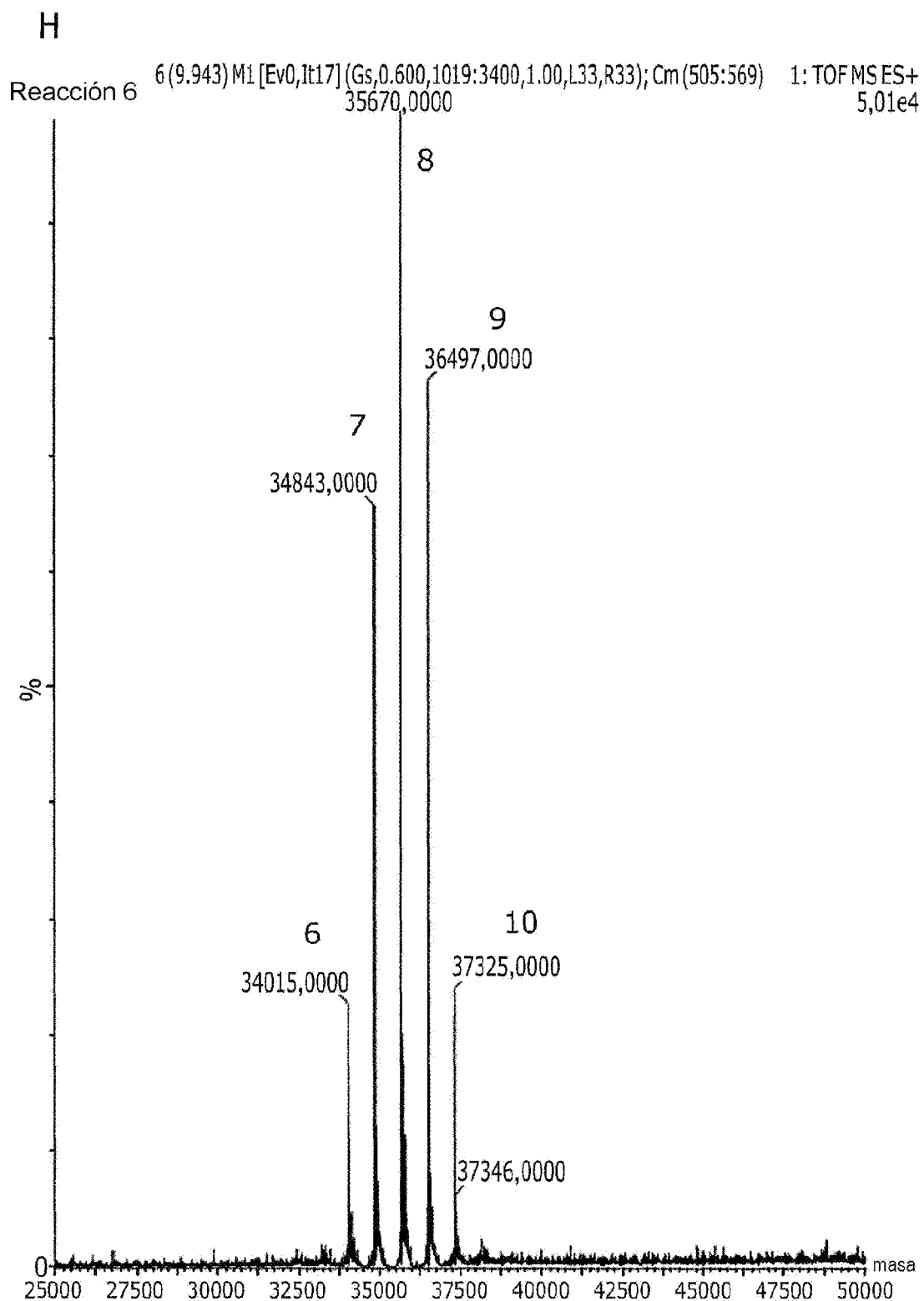


Figura 72 (continuación)

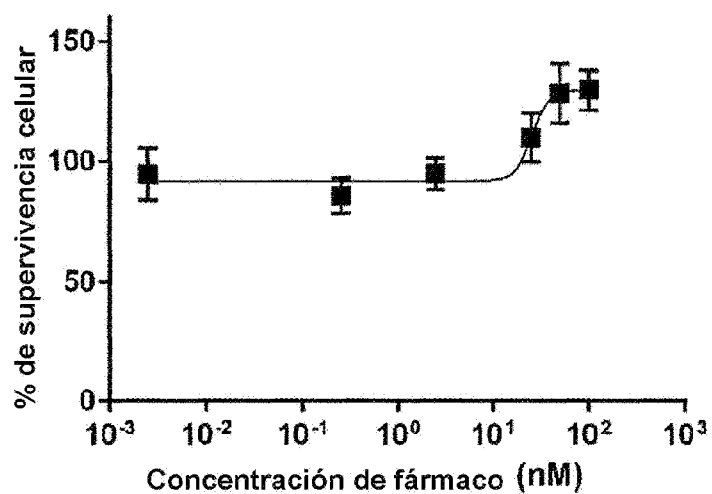


Figura 73A

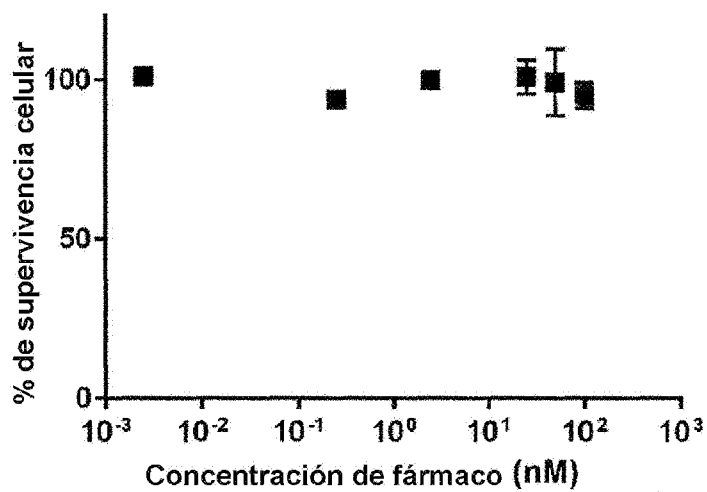


Figura 73B

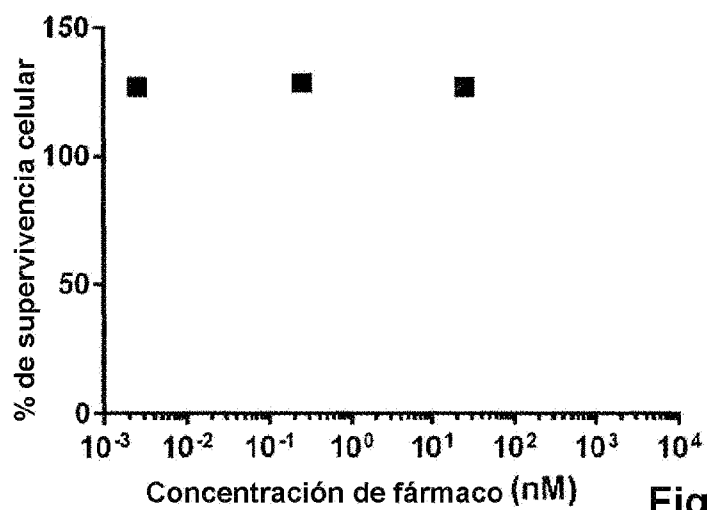


Figura 73C

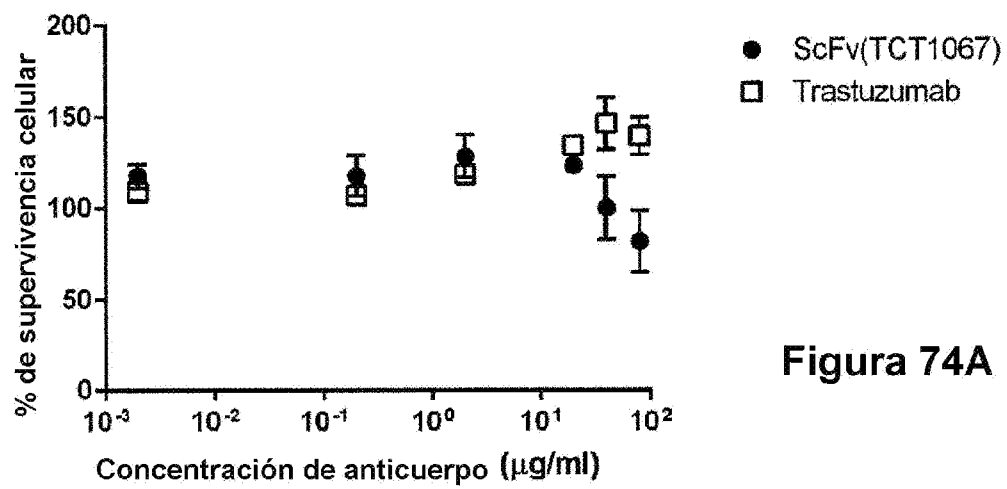


Figura 74A

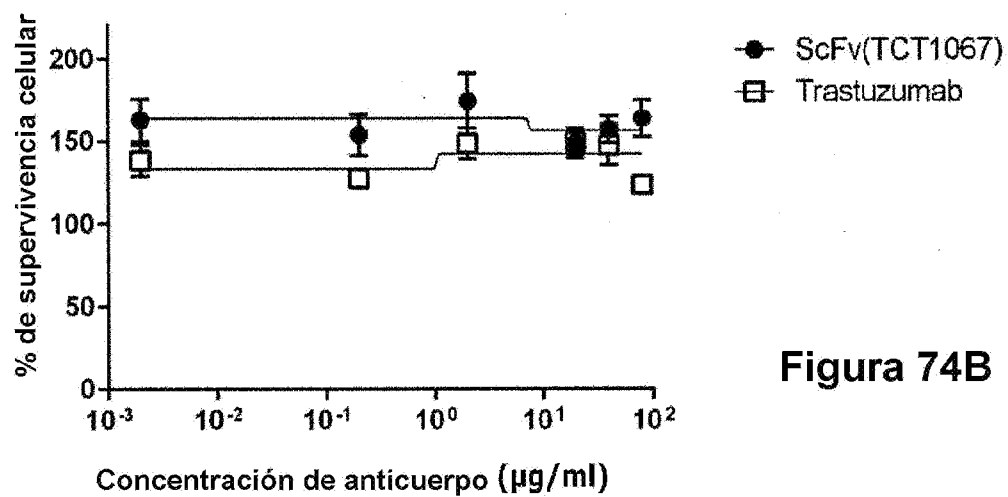


Figura 74B

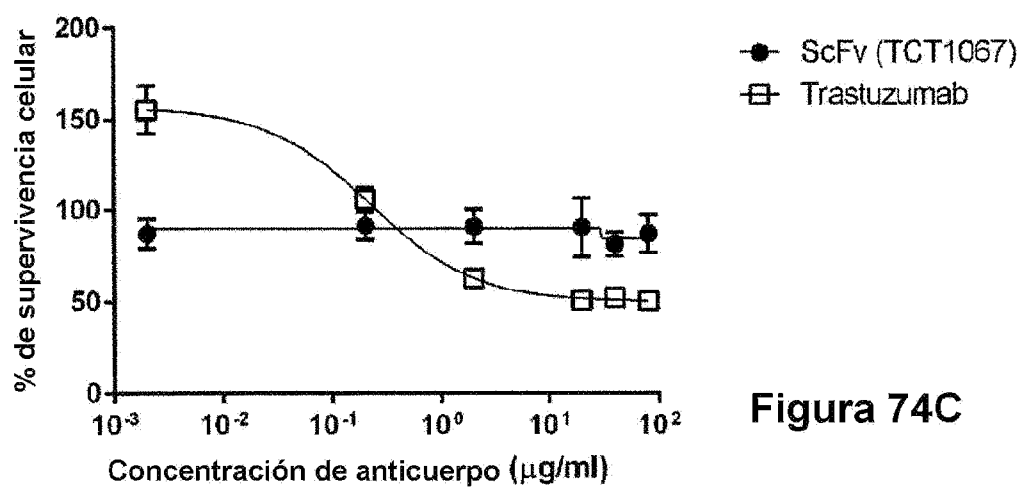


Figura 74C

TCT vs BT474

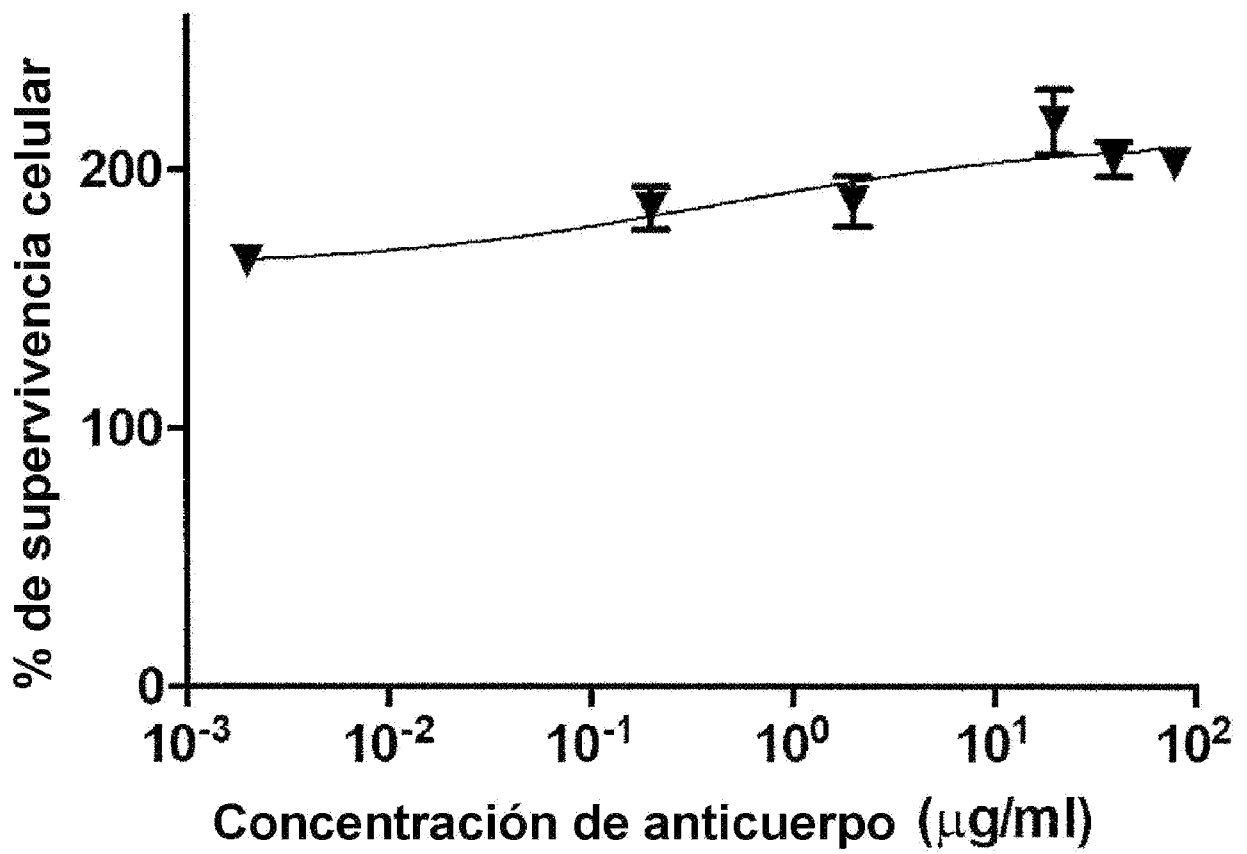


Figura 75

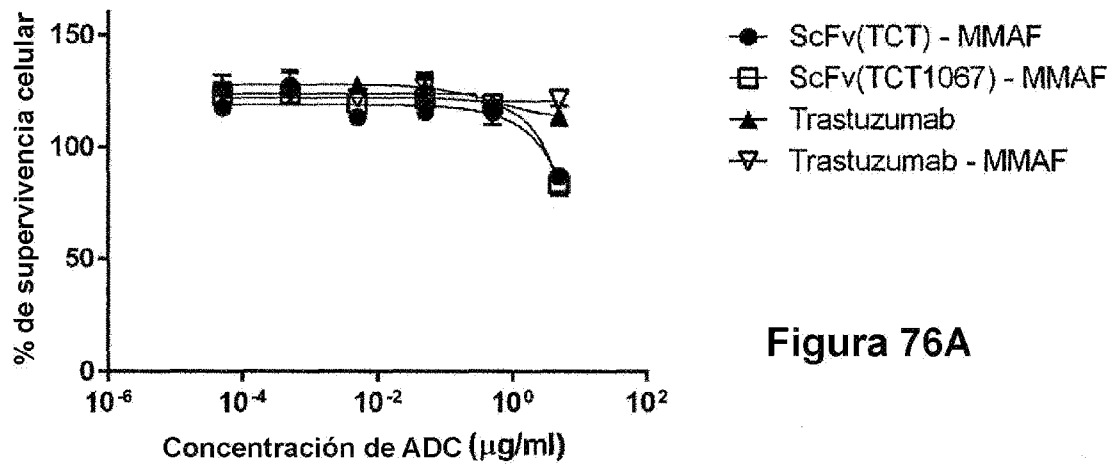


Figura 76A

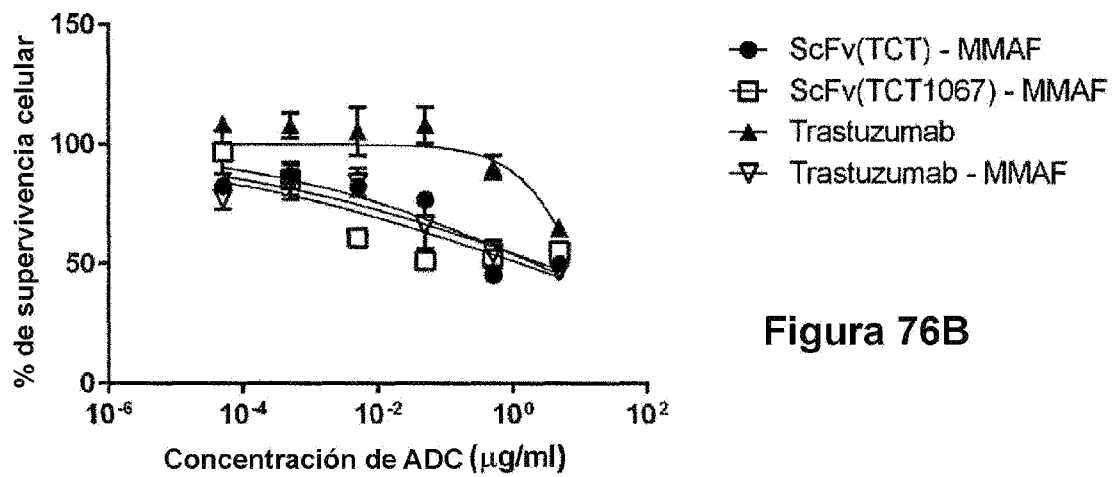


Figura 76B

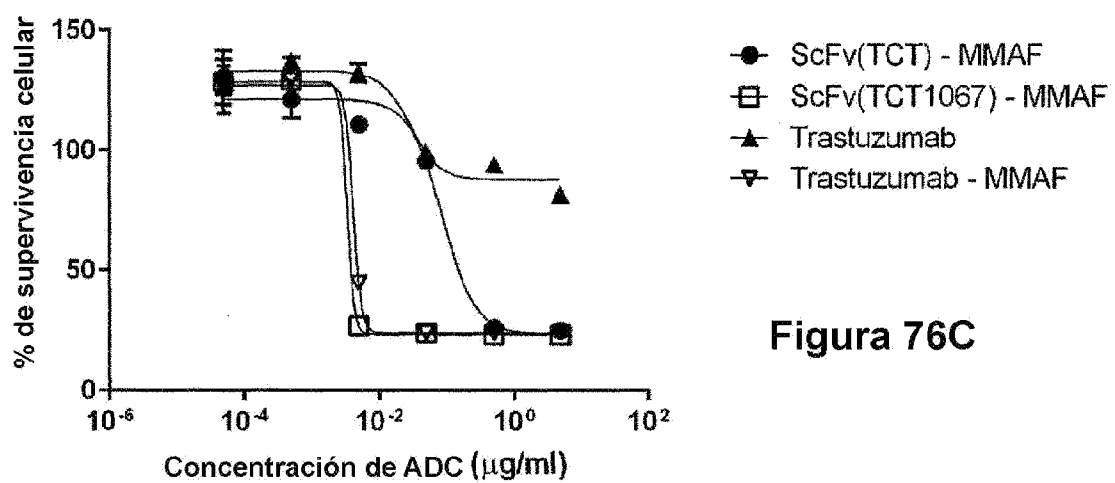


Figura 76C

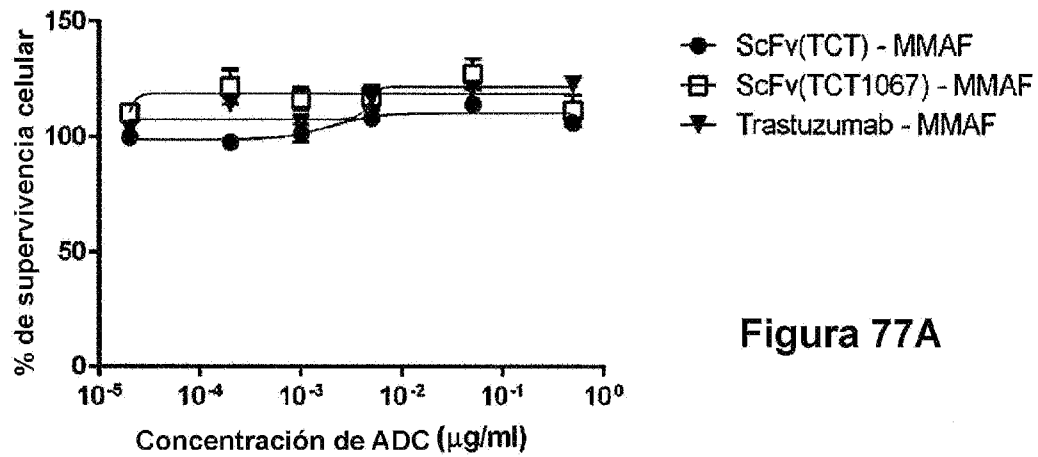


Figura 77A

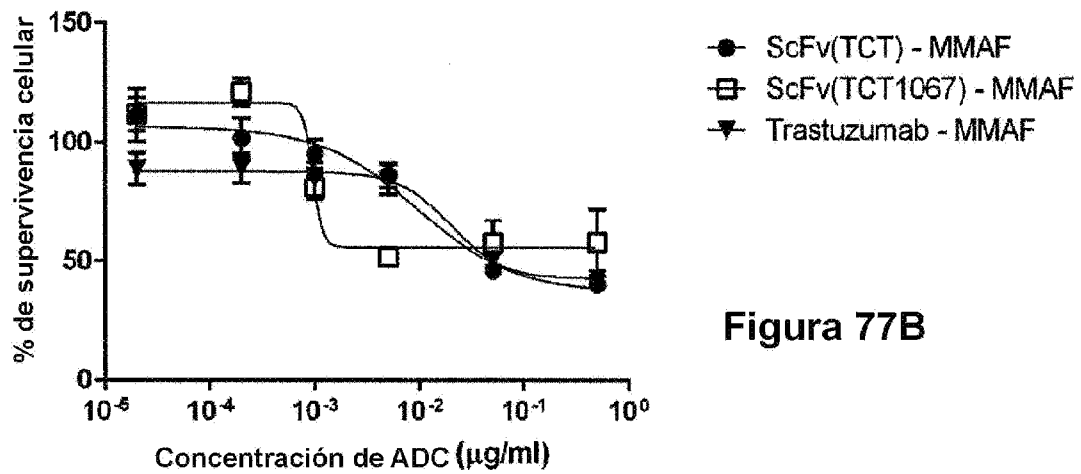


Figura 77B

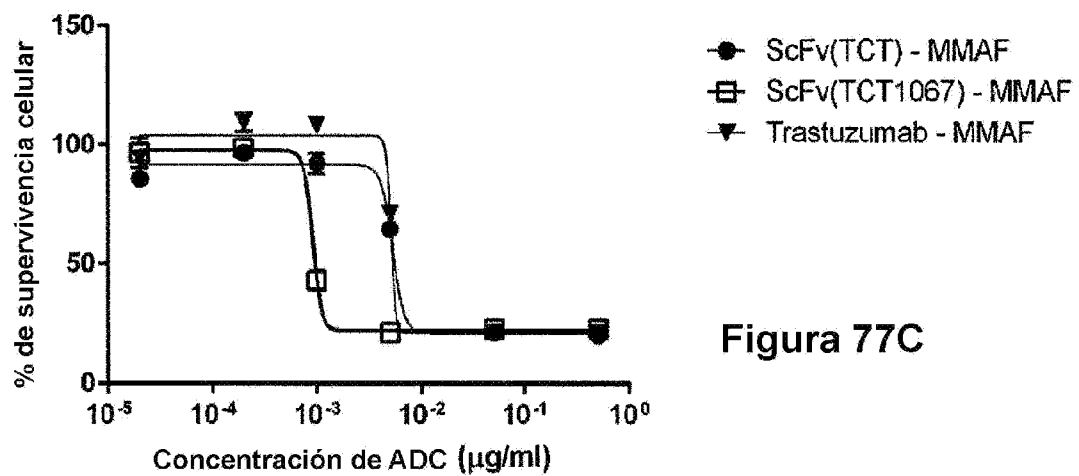


Figura 77C

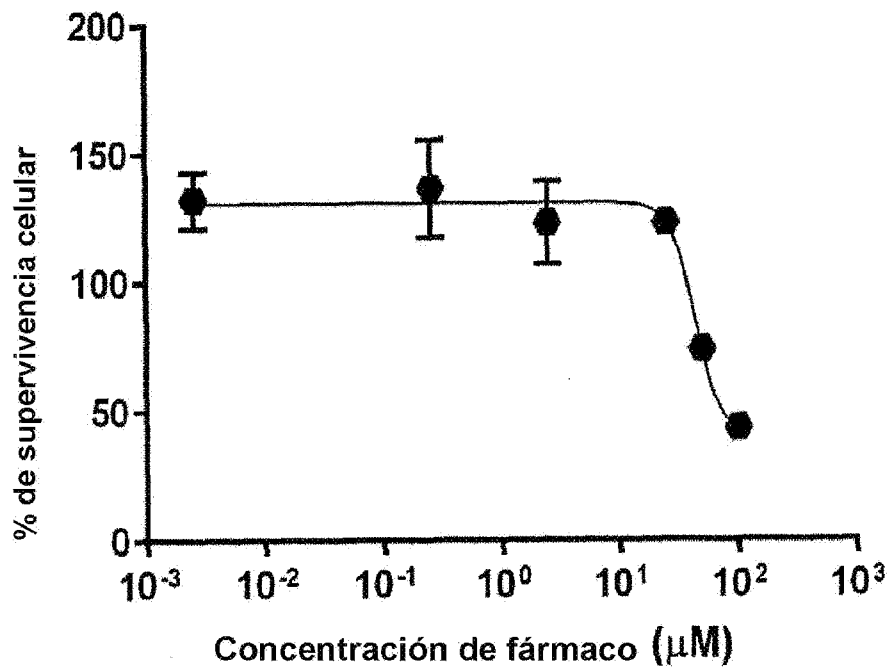


Figura 78A

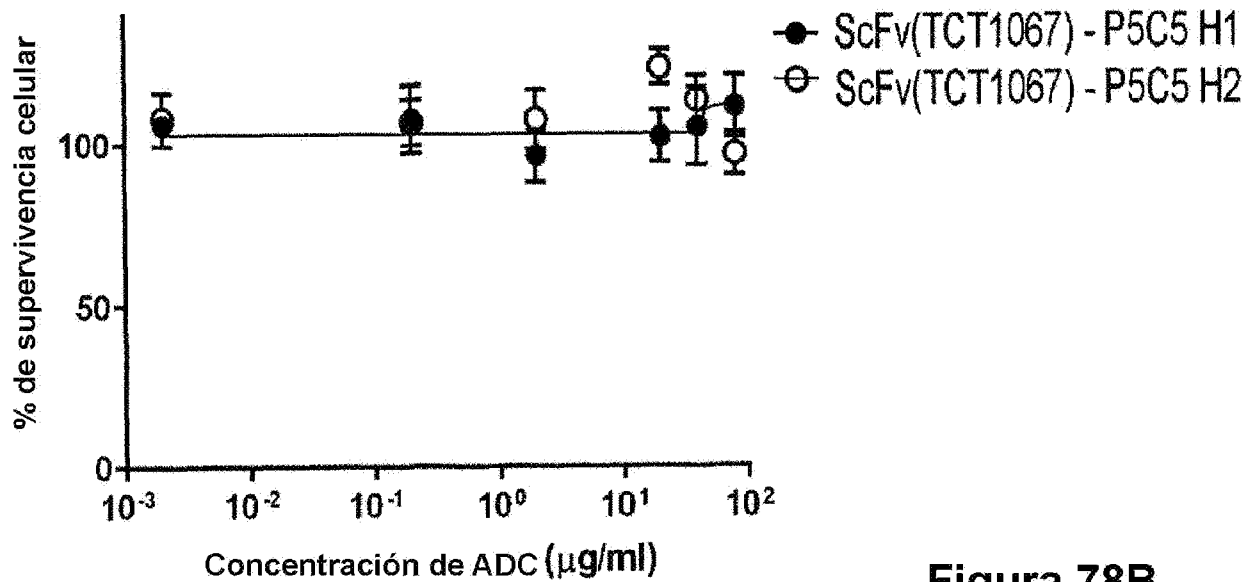


Figura 78B

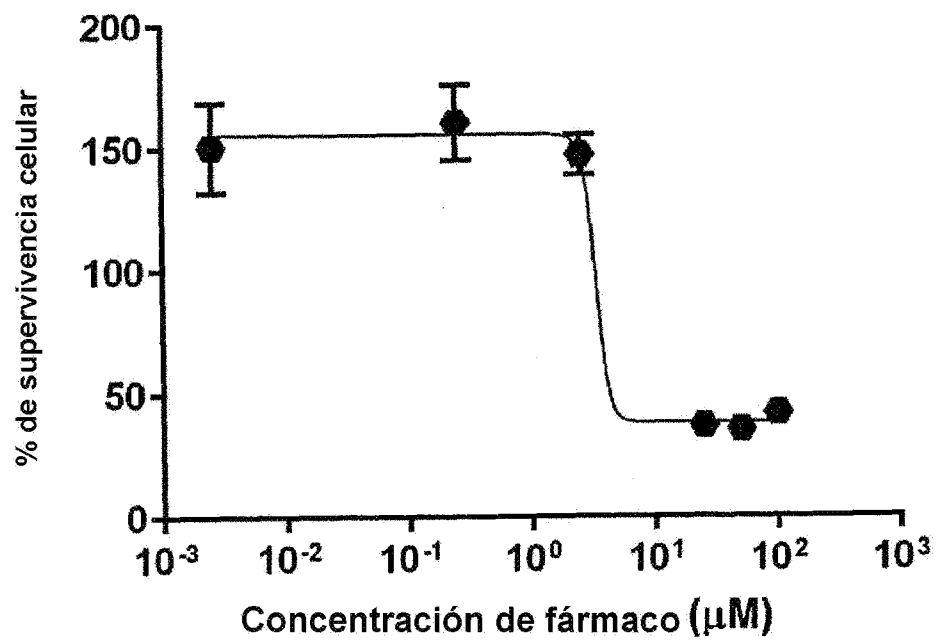


Figura 79A

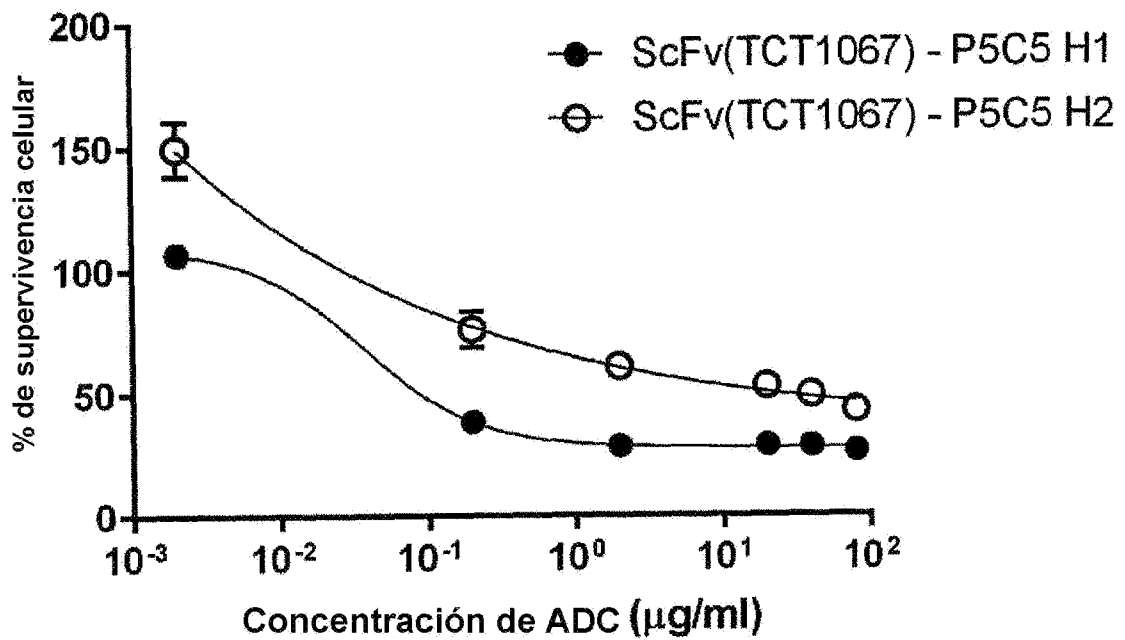


Figura 79B

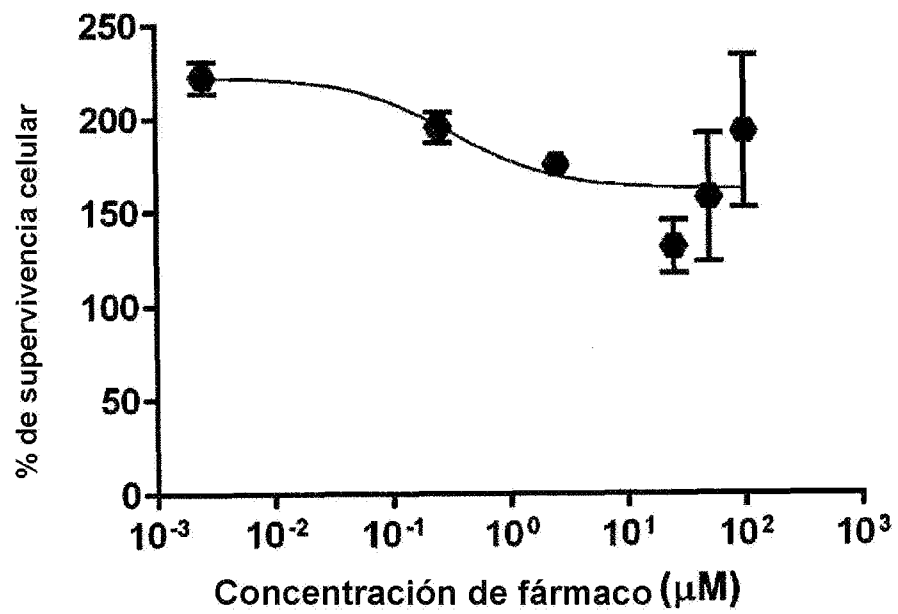


Figura 80A

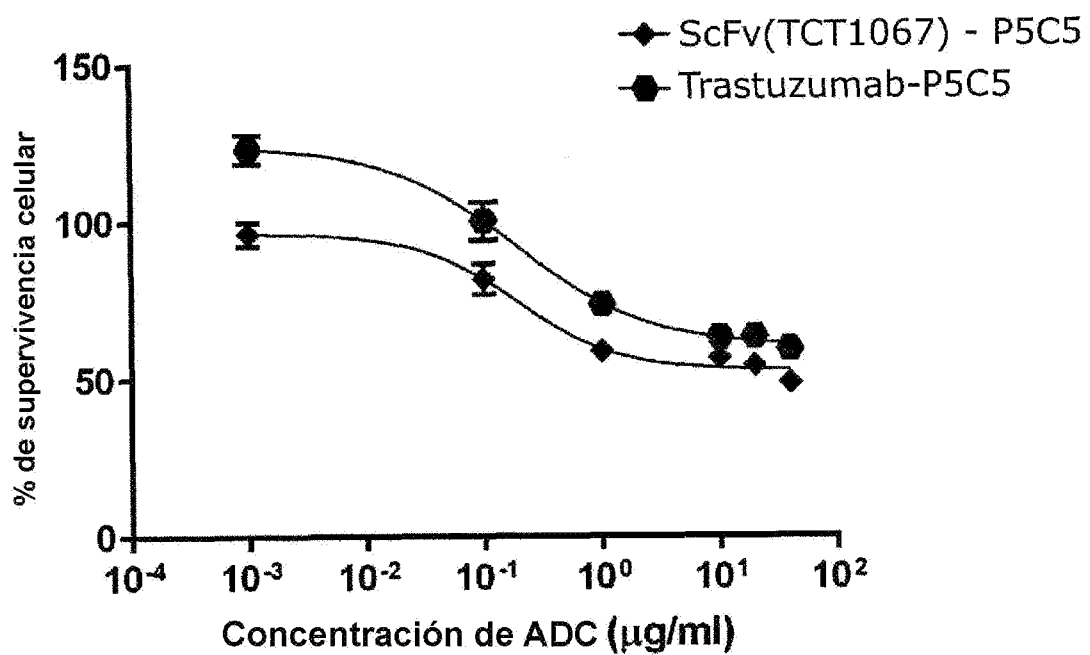
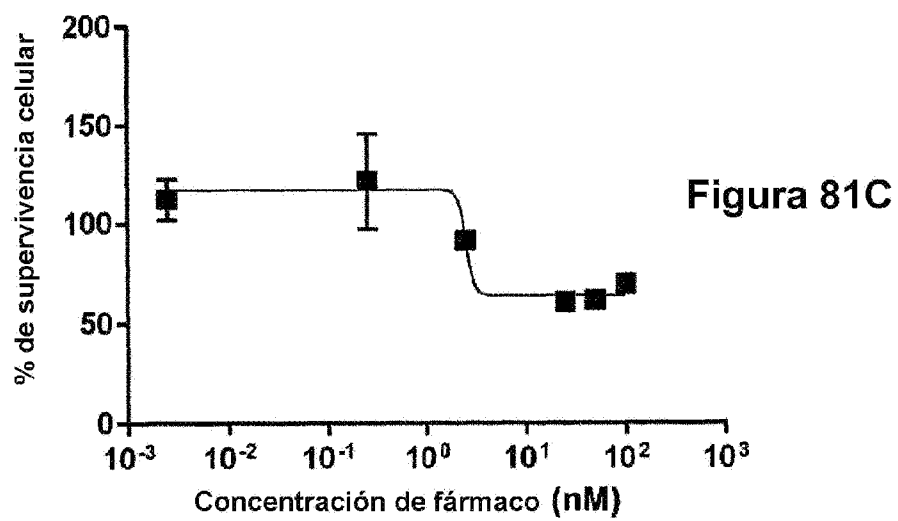
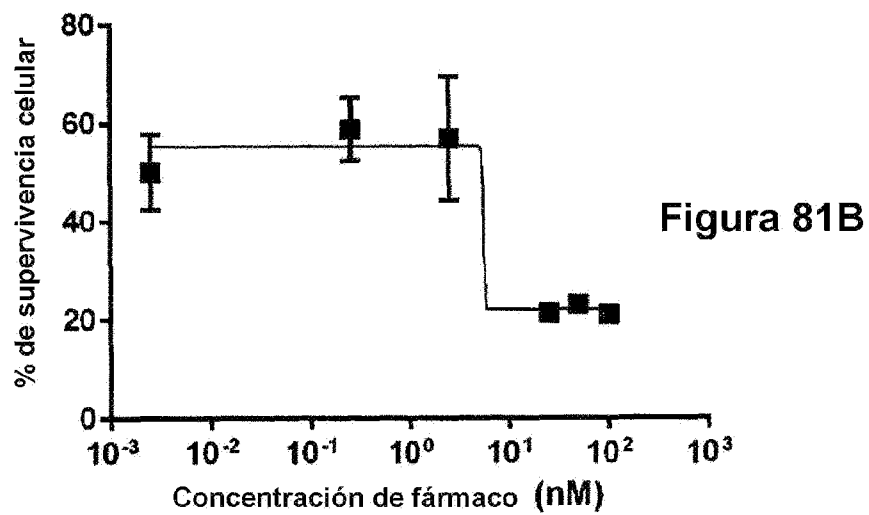
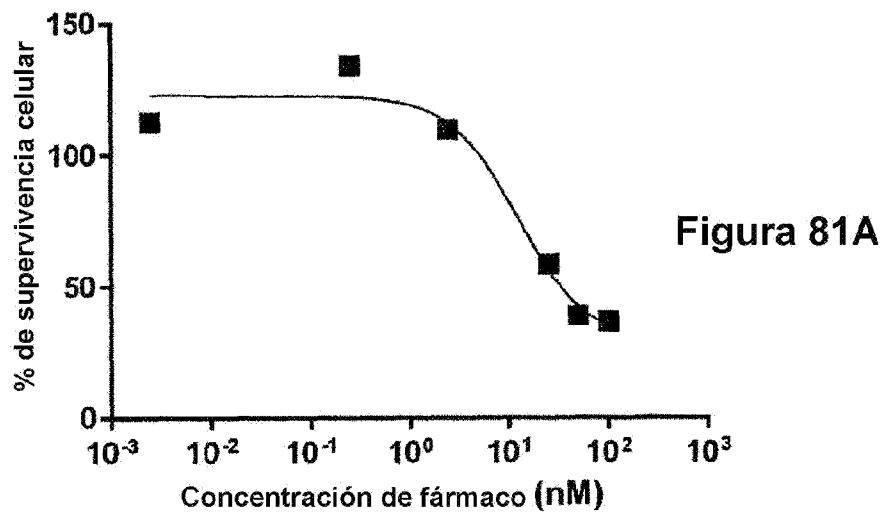


Figura 80B



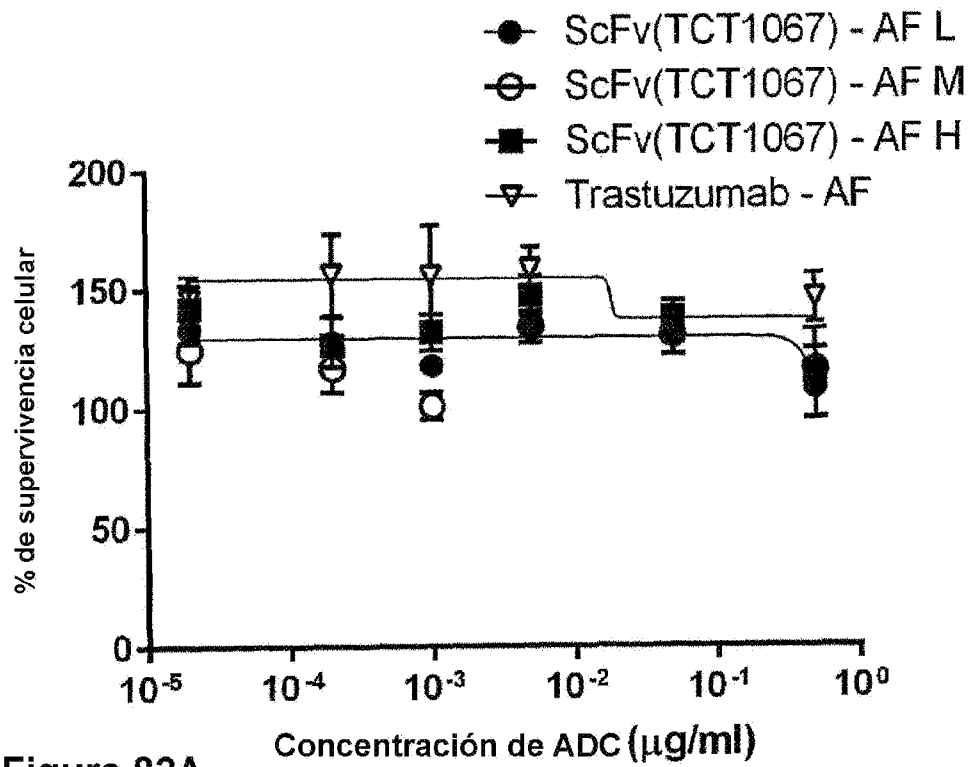


Figura 82A

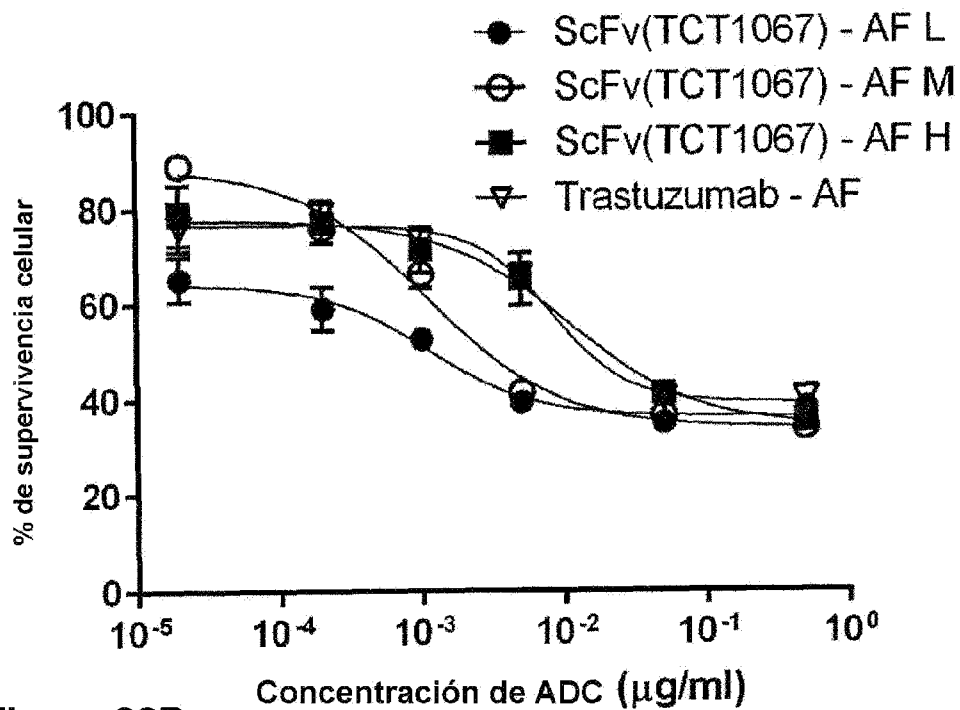


Figura 82B

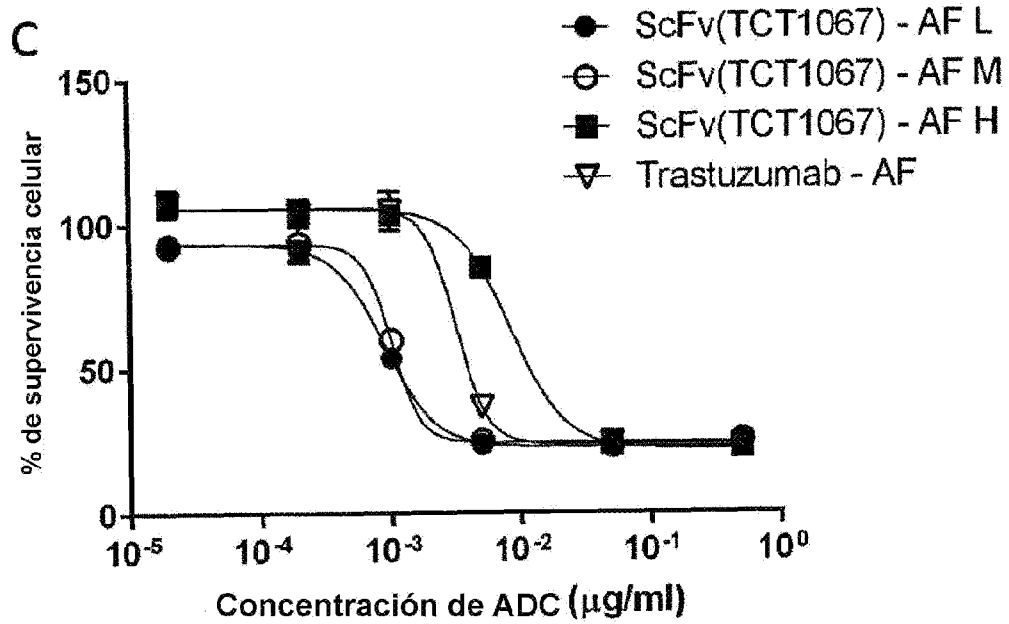


Figura 82 (continuación)

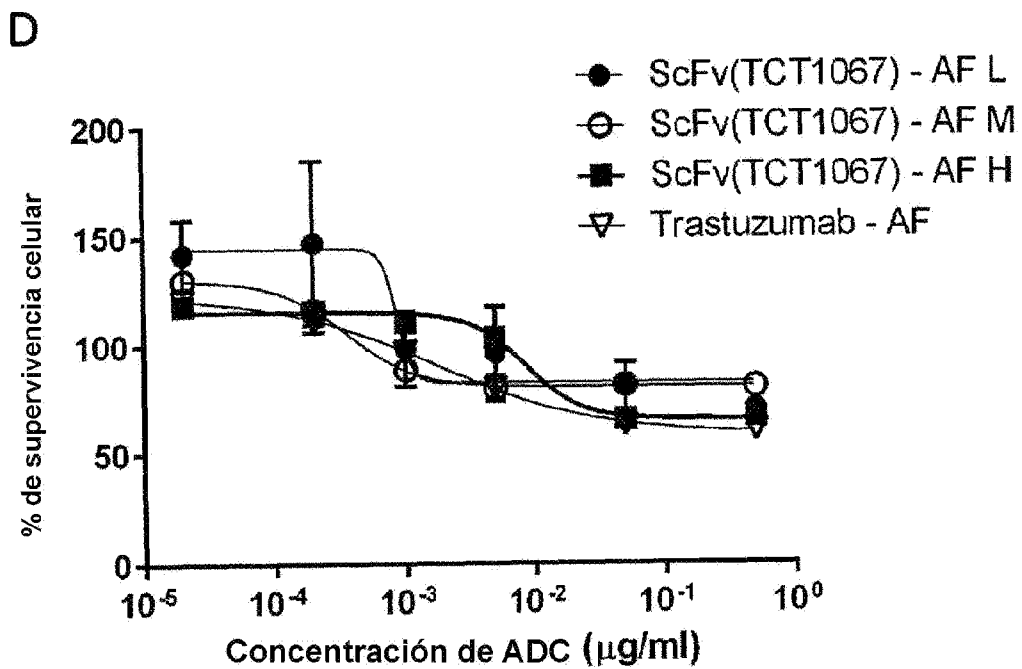


Figura 82 (continuación)

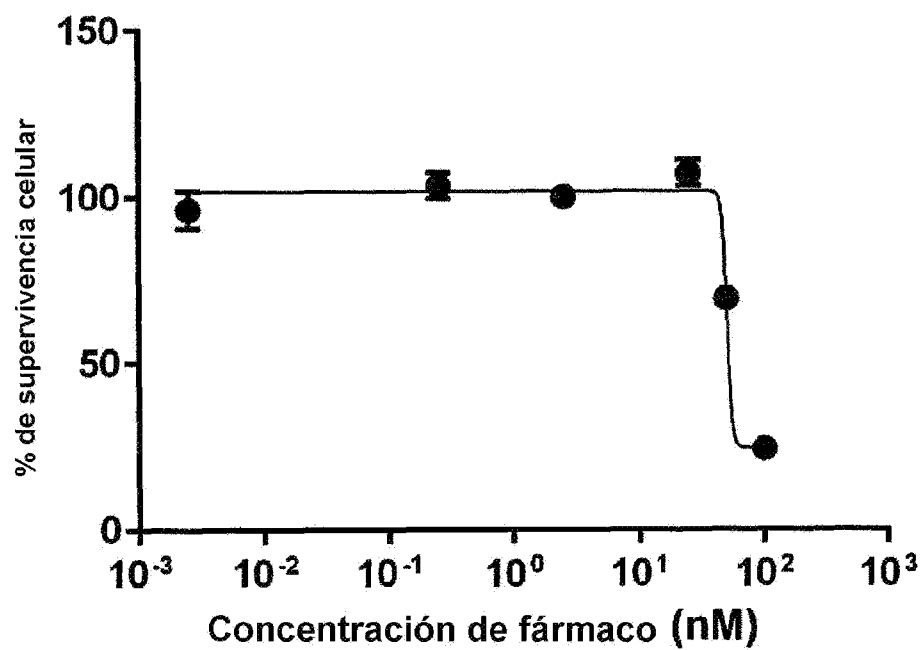


Figura 83A

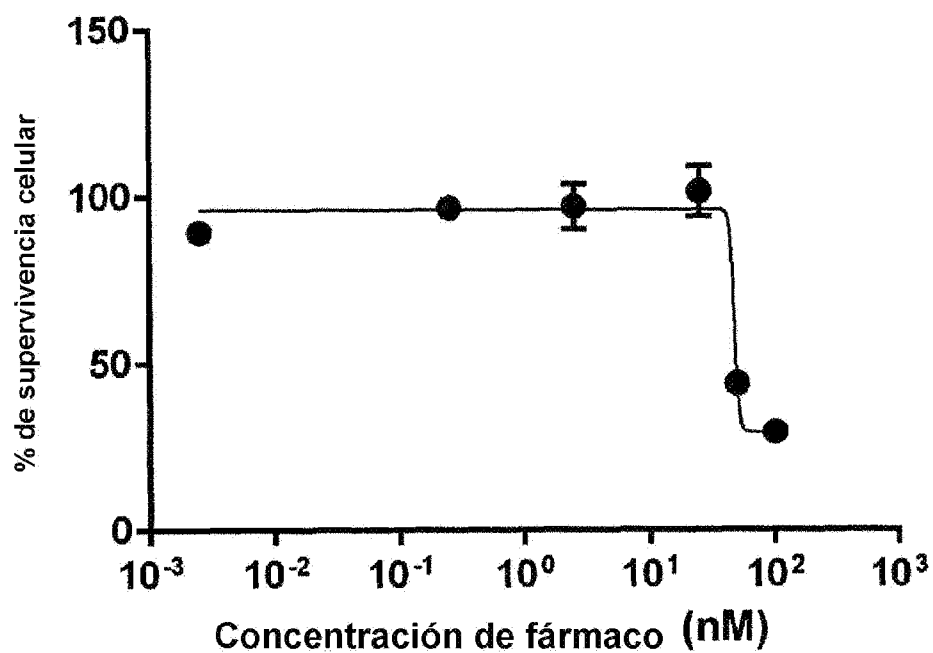


Figura 83B

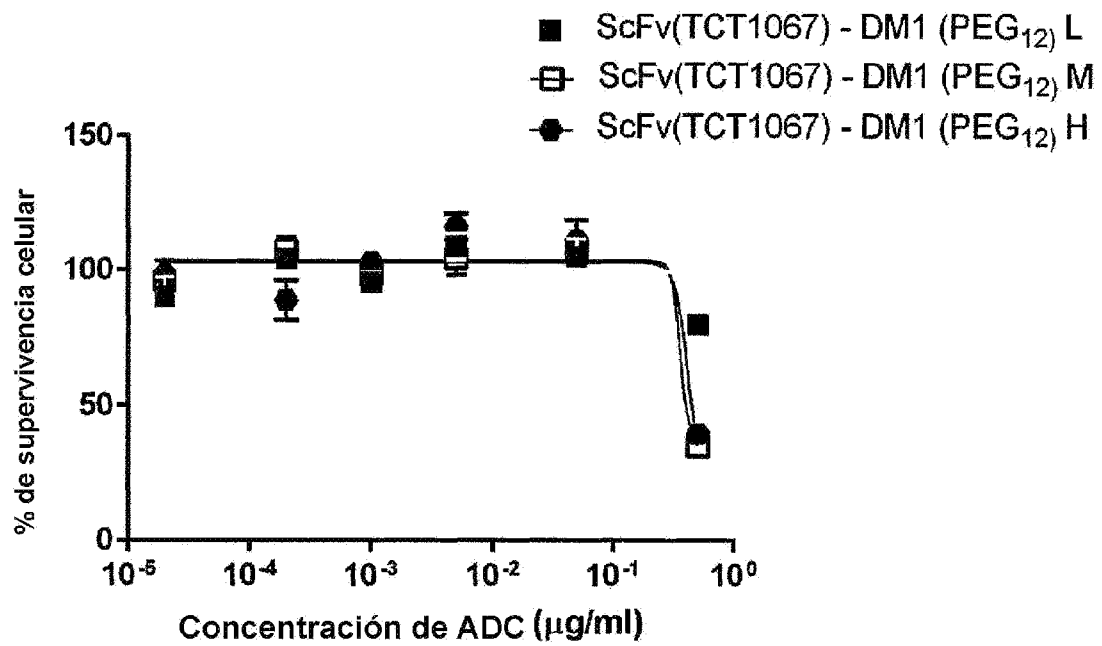


Figura 84A

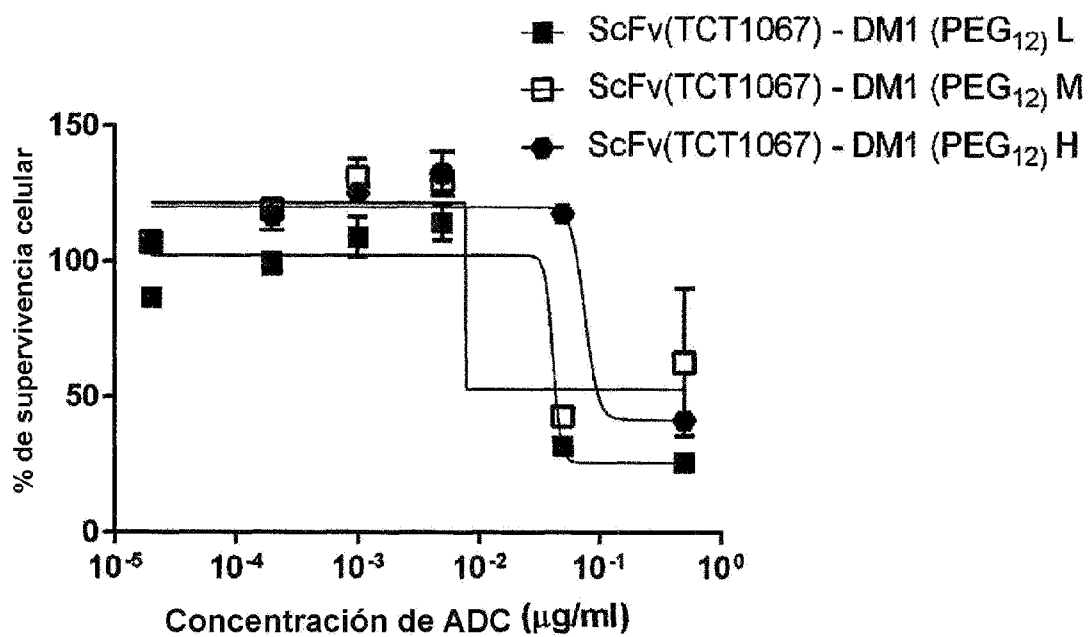


Figura 84B

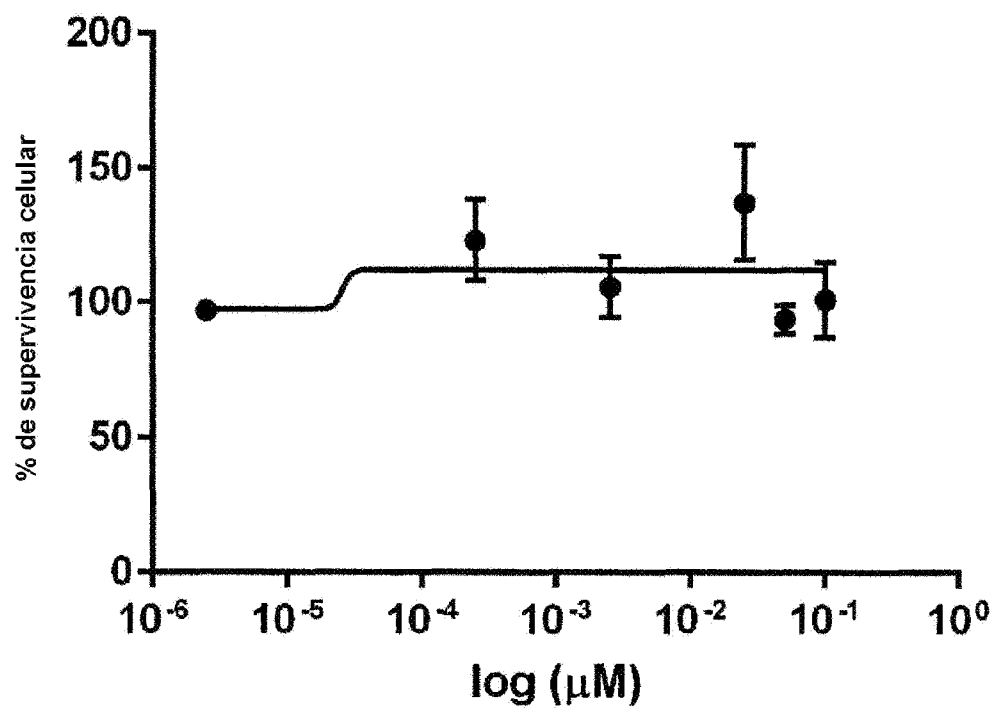


Figura 85A

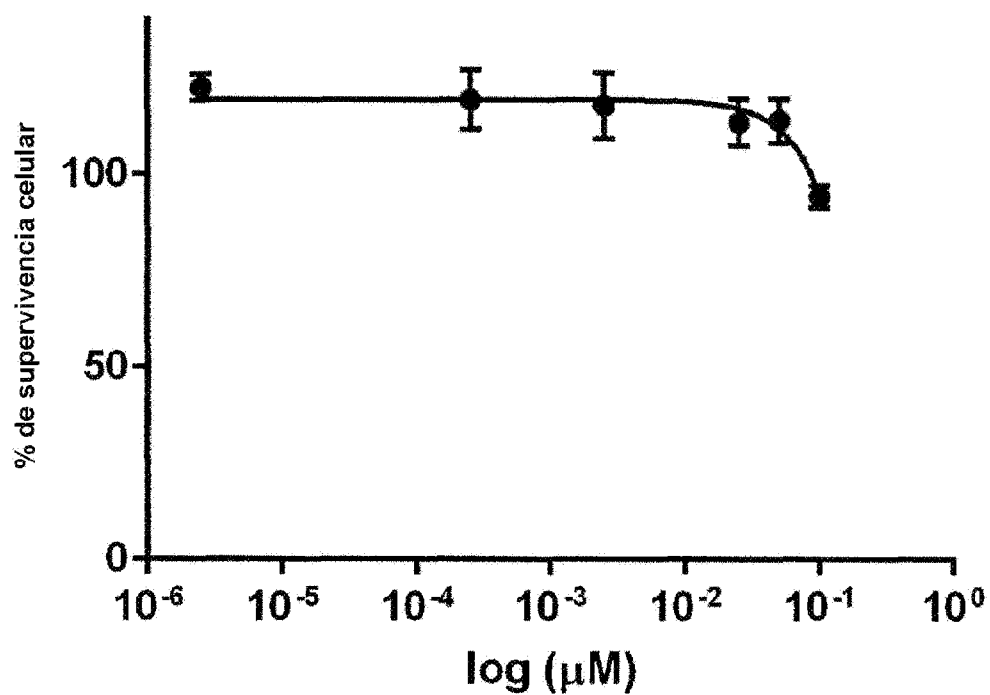
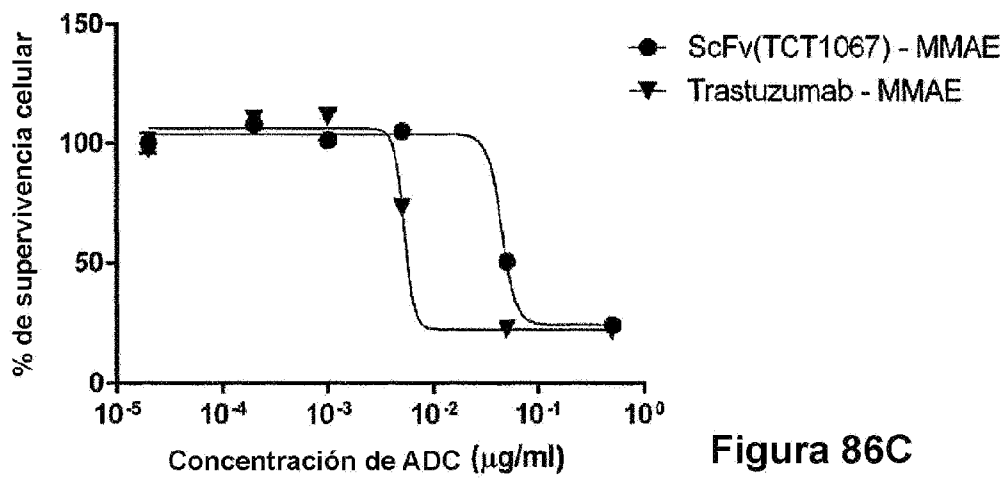
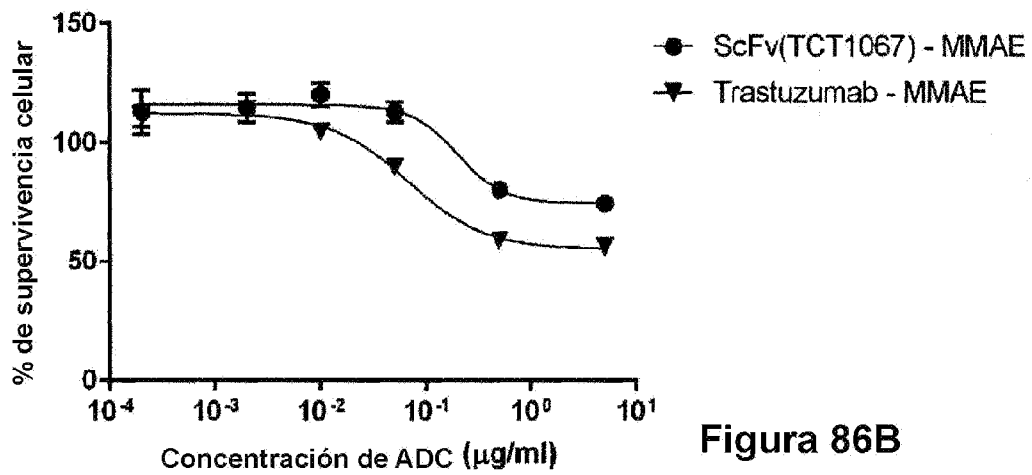
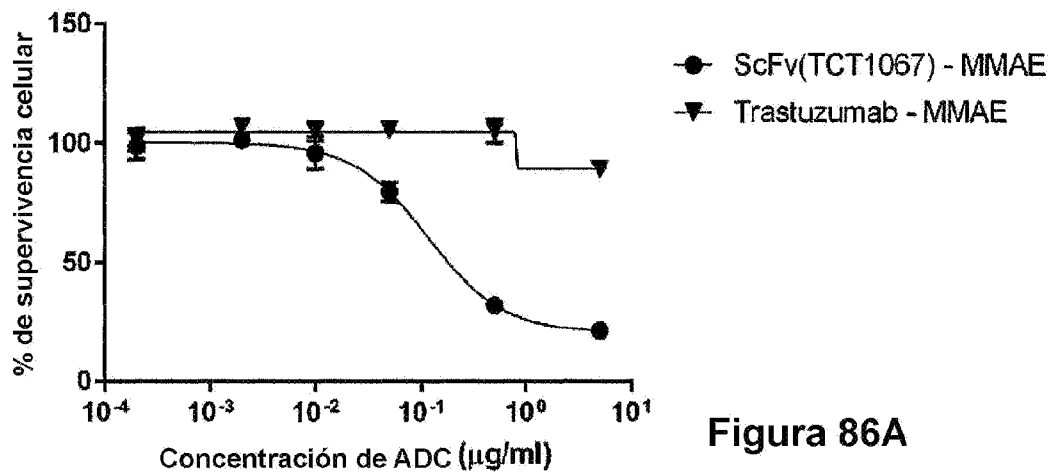


Figura 85B



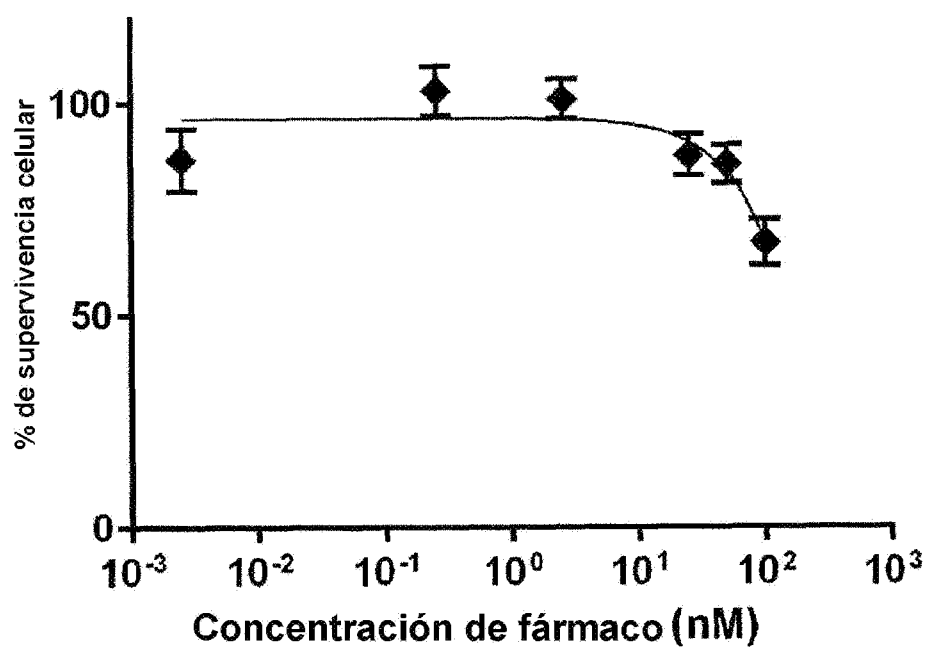


Figura 87A

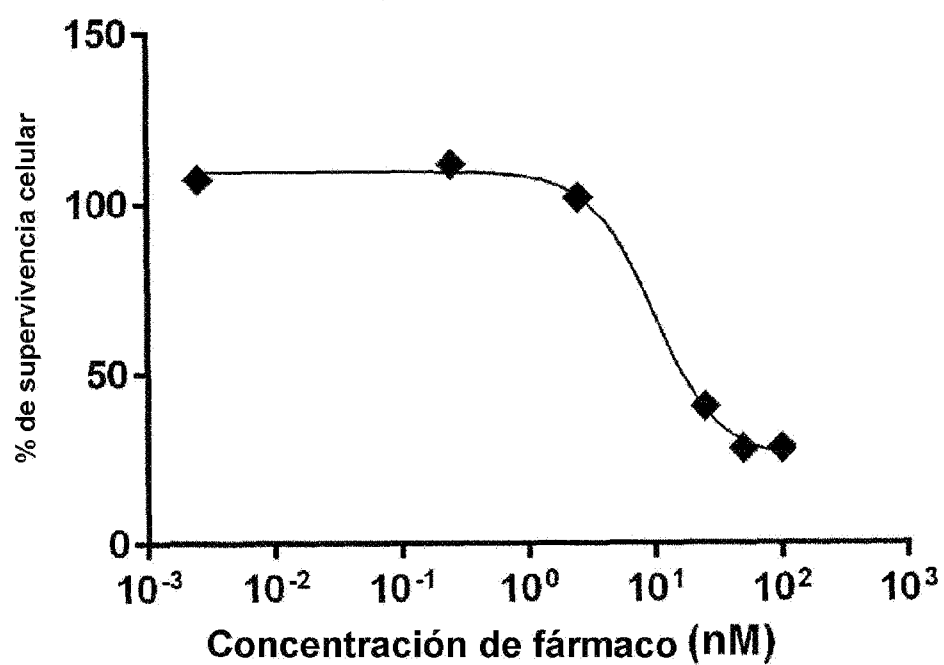


Figura 87B

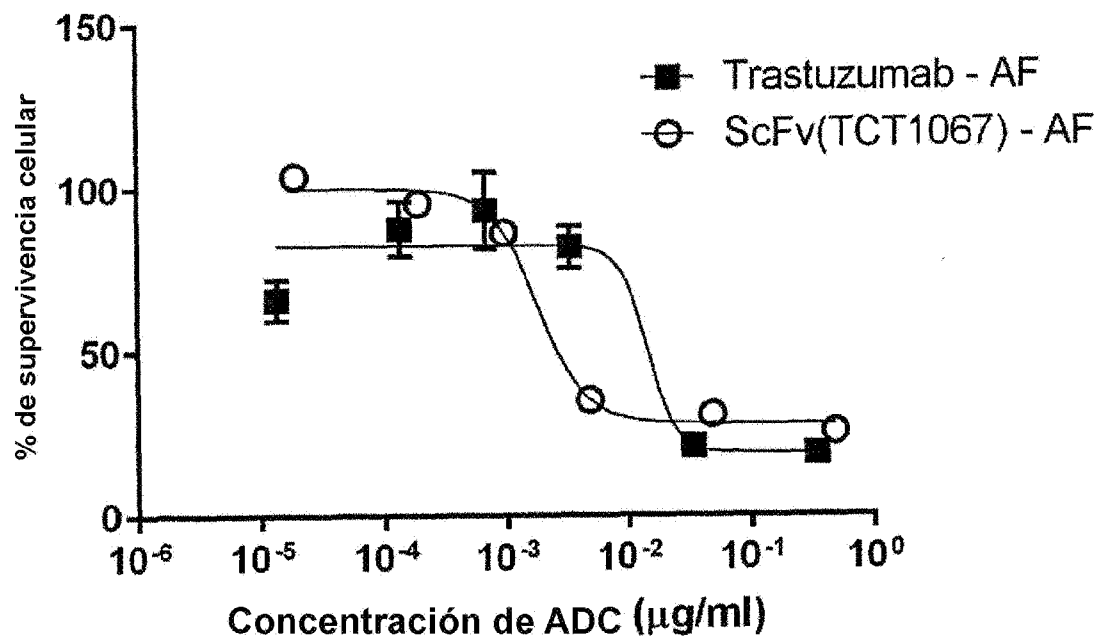


Figura 88A

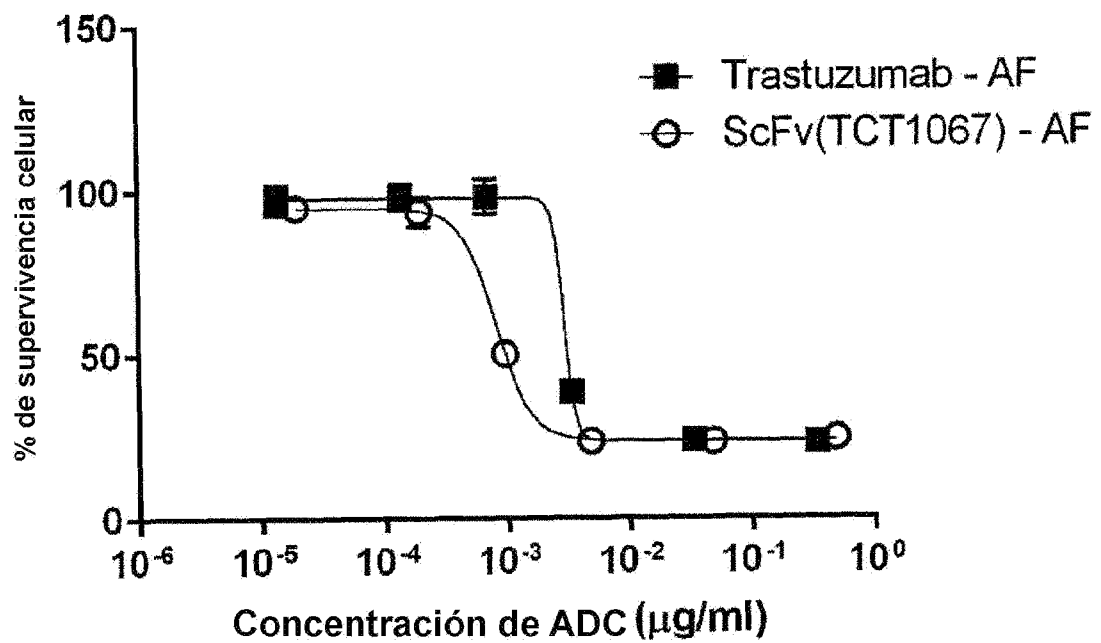


Figura 88B

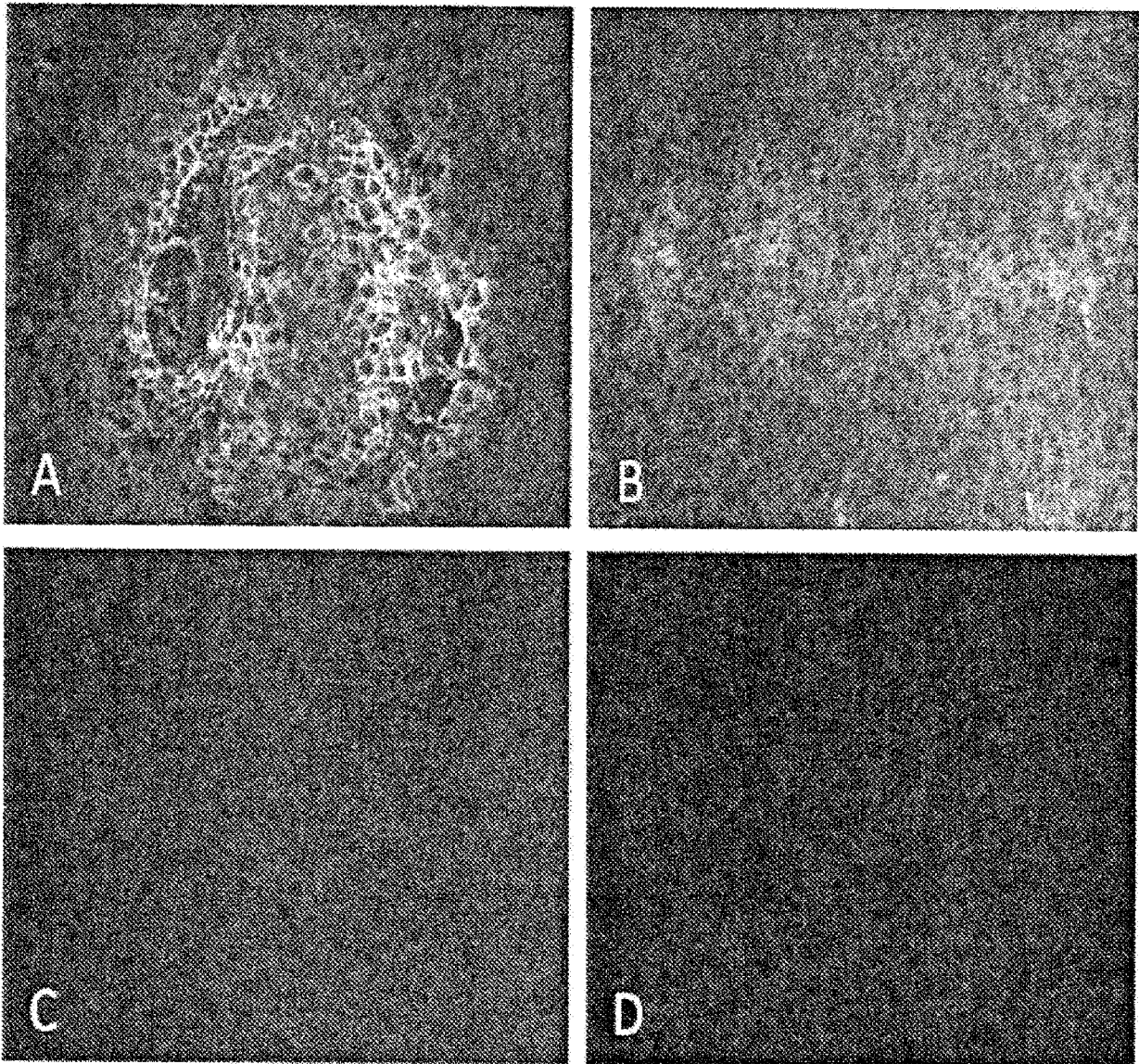
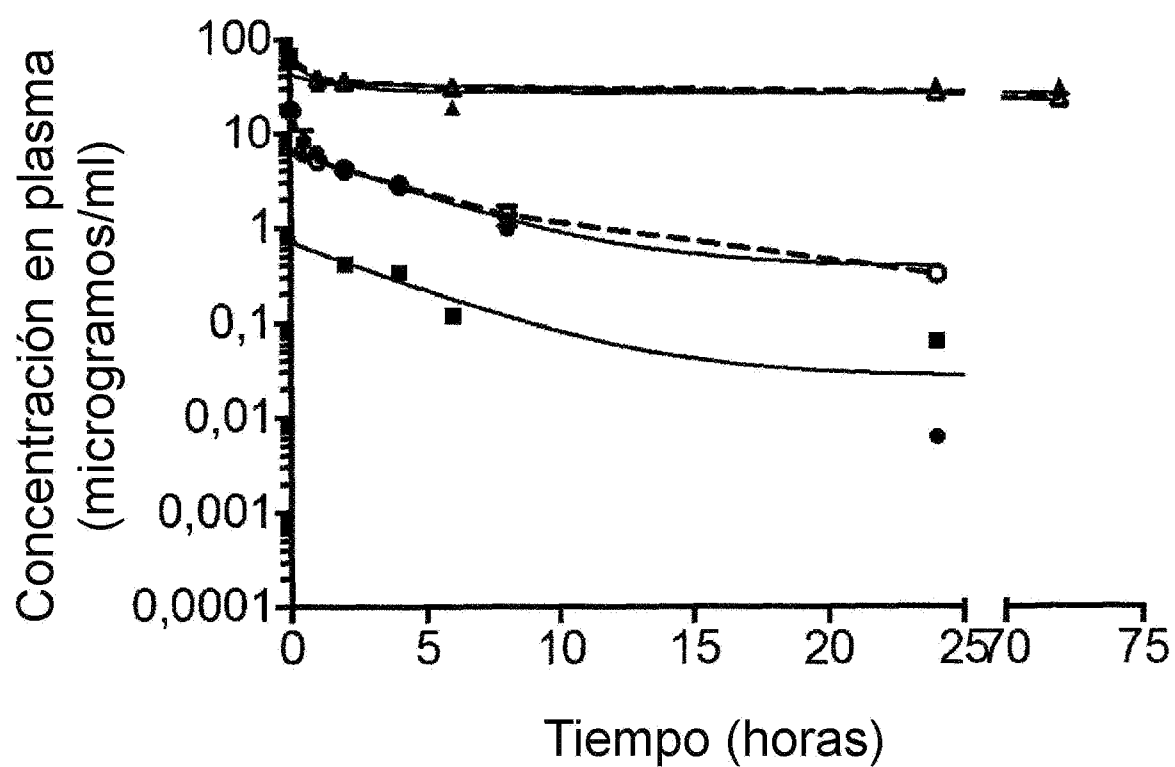
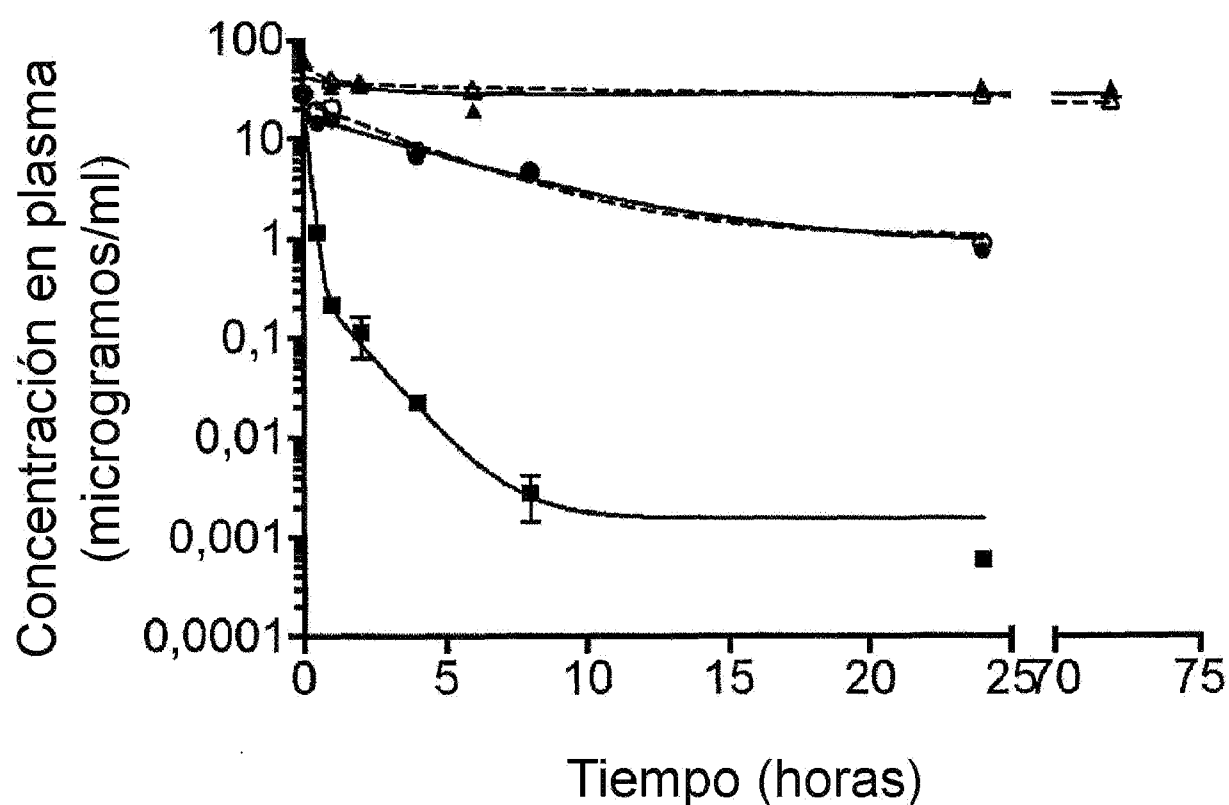


Figura 89



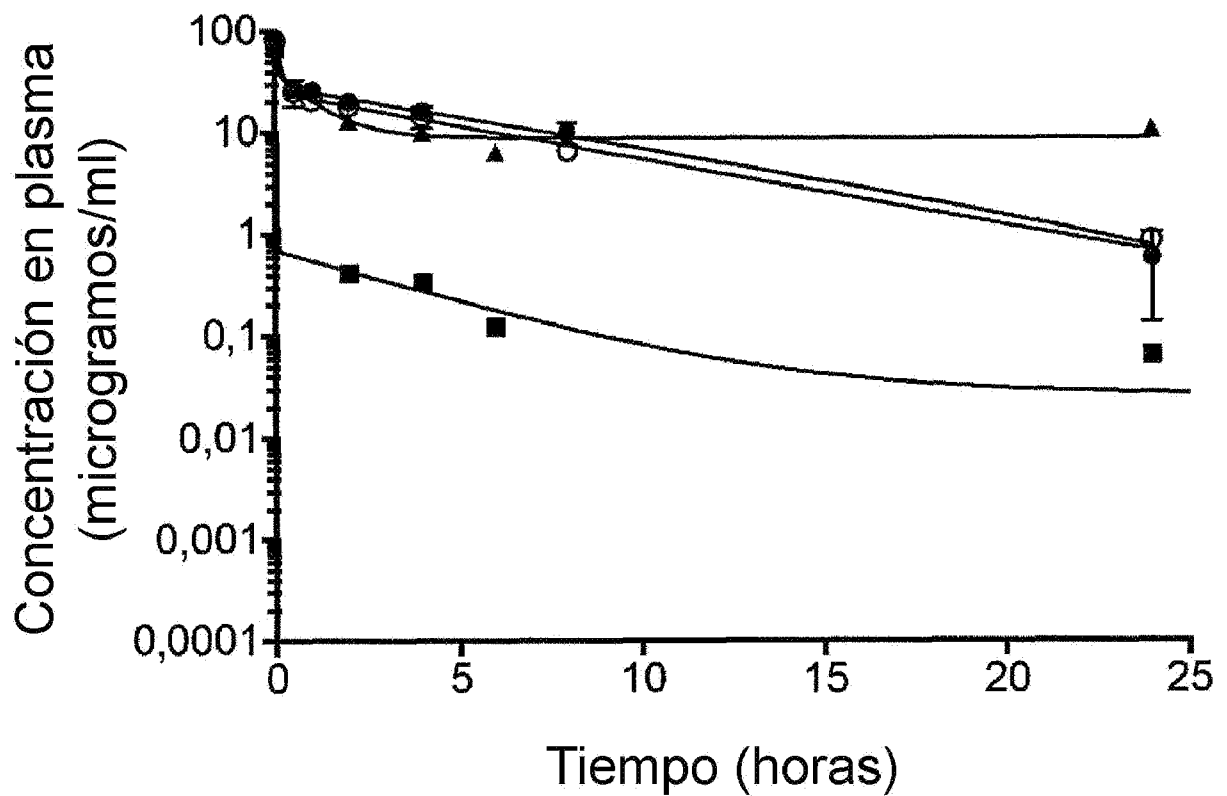
- ▲ Trastuzumab-MMAF-C5(Proteína total)
- ▲ Trastuzumab-MMAF-C5 (Total ADC)
- scFv (TCT)-MMAF-C5 (Proteína total)
- scFv (TCT)-MMAF-C5 (Total ADC)
- scFv (TCT) (Proteína total)

Figura 90



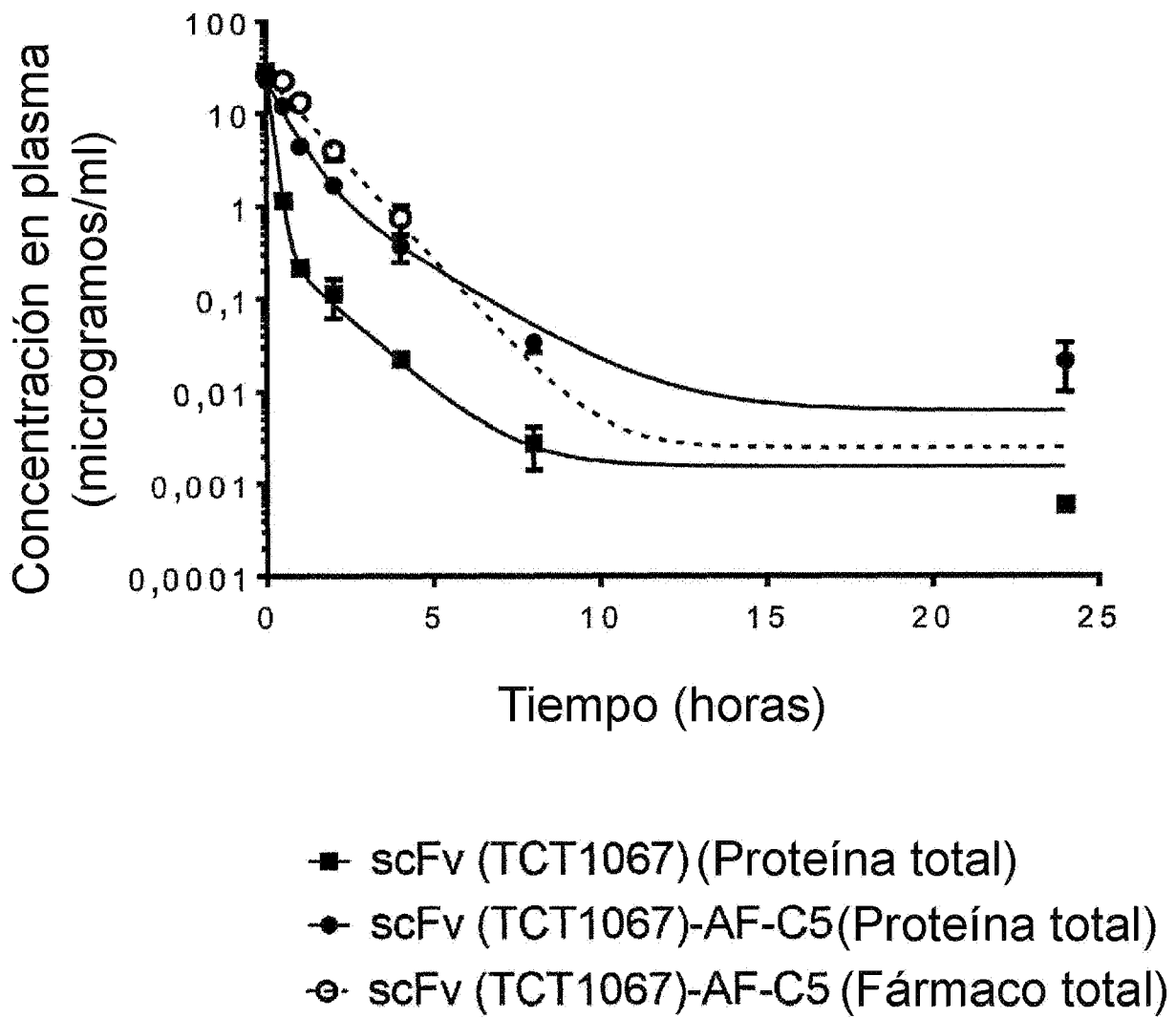
- ▲— Trastuzumab-MMAF-C5 (Proteína total)
- ▲- Trastuzumab-MMAF-C5 (Total ADC)
- scFv (TCT1067)-MMAF-C5 (Proteína total)
- scFv (TCT1067)-MMAF-C5 (Total ADC)
- scFv (TCT1067) (Proteína total)

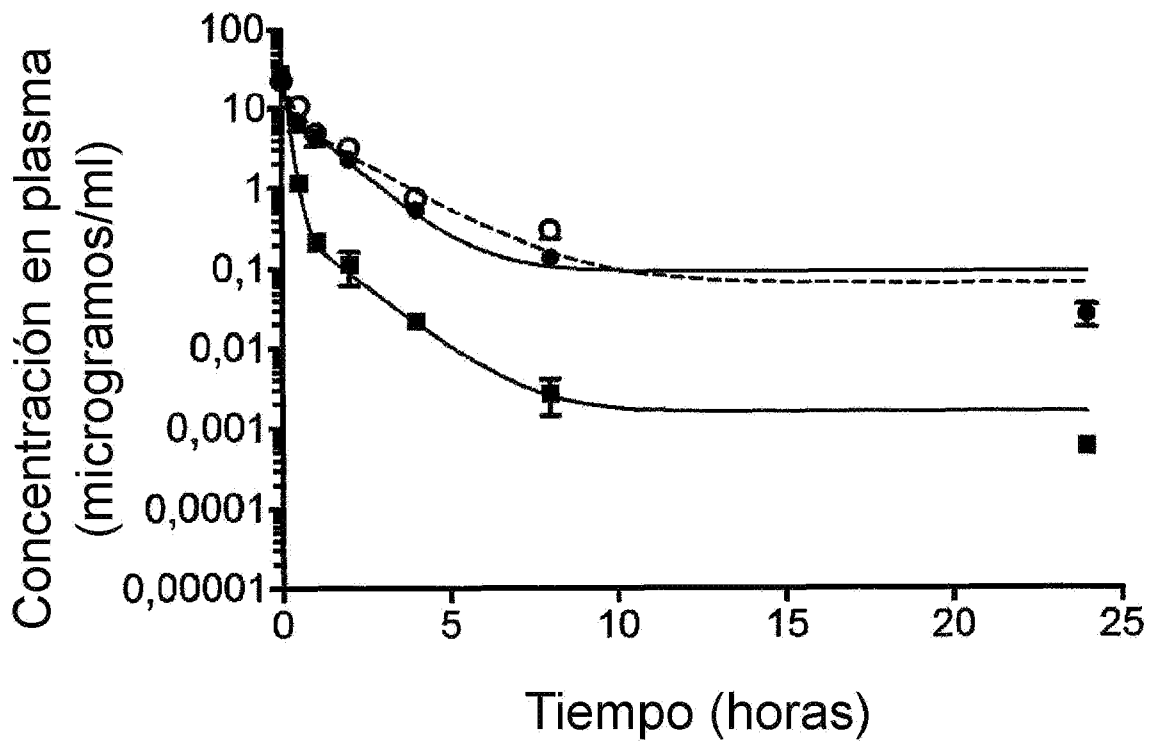
Figura 91



- ▲ Trastuzumab-P5C5 (Proteína total)
- scFv (TCT)-P5C5 (Total ADC)
- scFv (TCT)-P5C5 (Proteína total)
- scFv (TCT) (Proteína total)

Figura 92

**Figura 93**



- scFv (TCT1067)-DM1(dPEG₁₂) (Proteína total)
- scFv (TCT1067)-DM1(dPEG₁₂) (Fármaco total)
- scFv (TCT1067) (Proteína total)

Figura 94

A

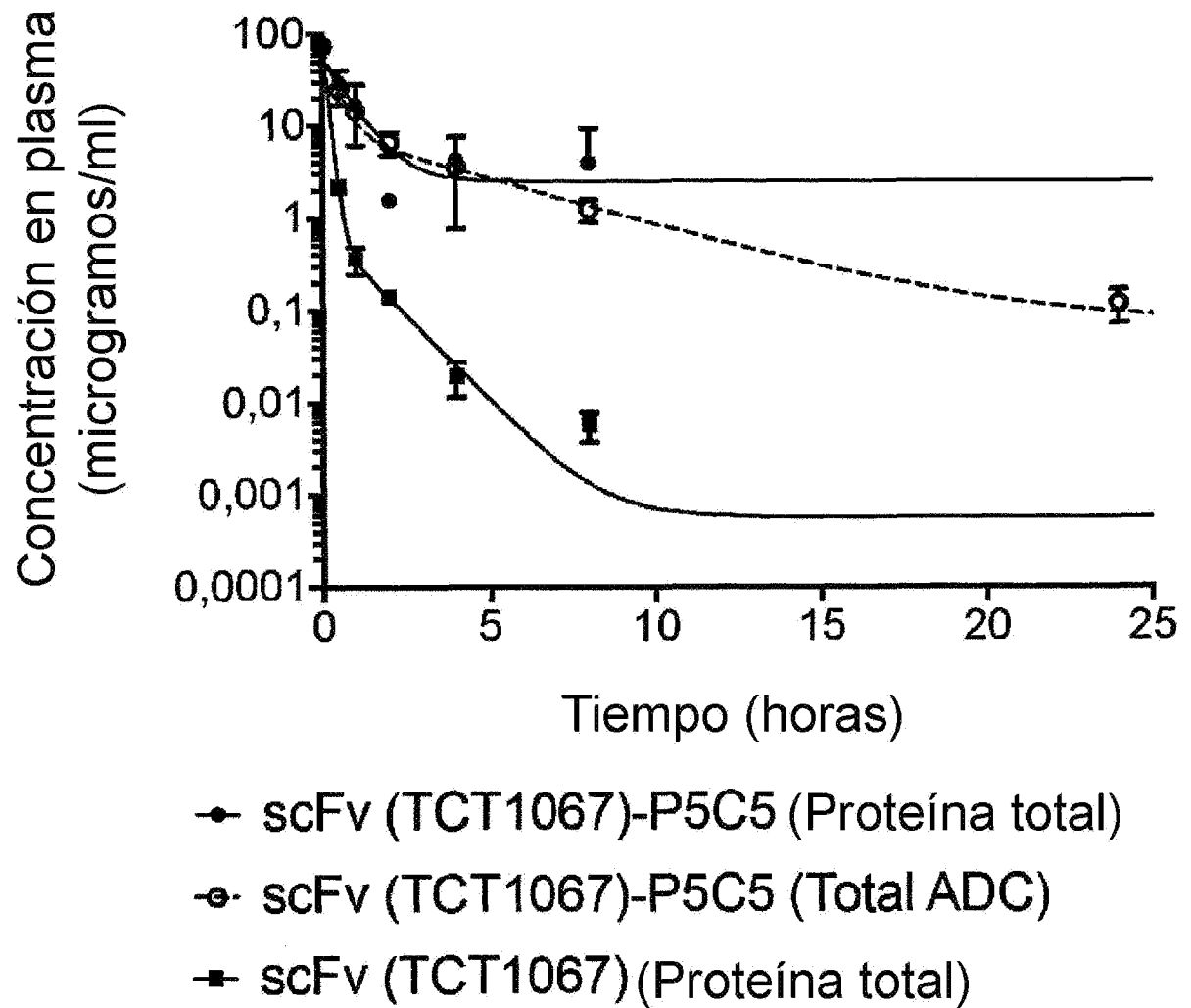


Figura 95

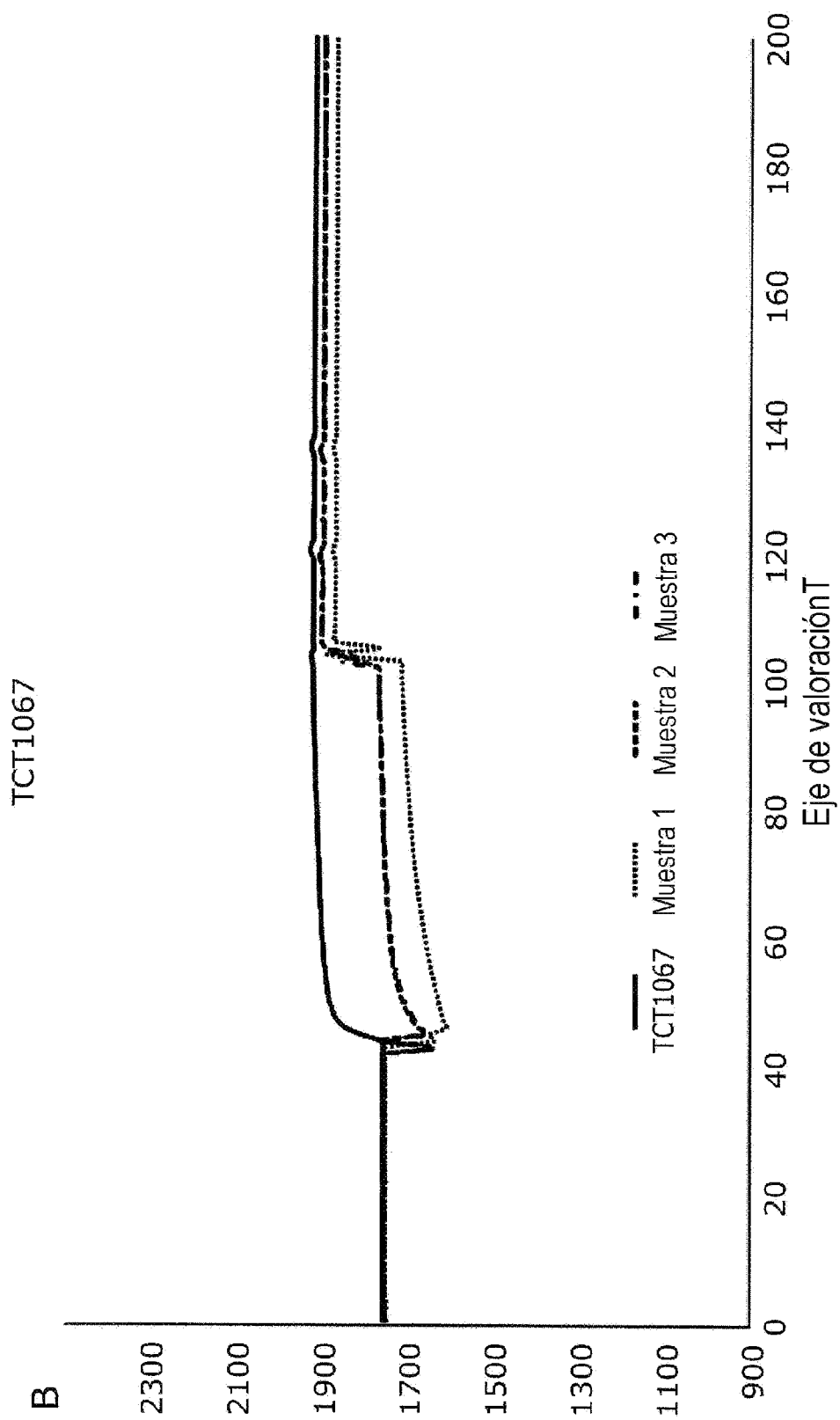


Figura 95 (continuación)

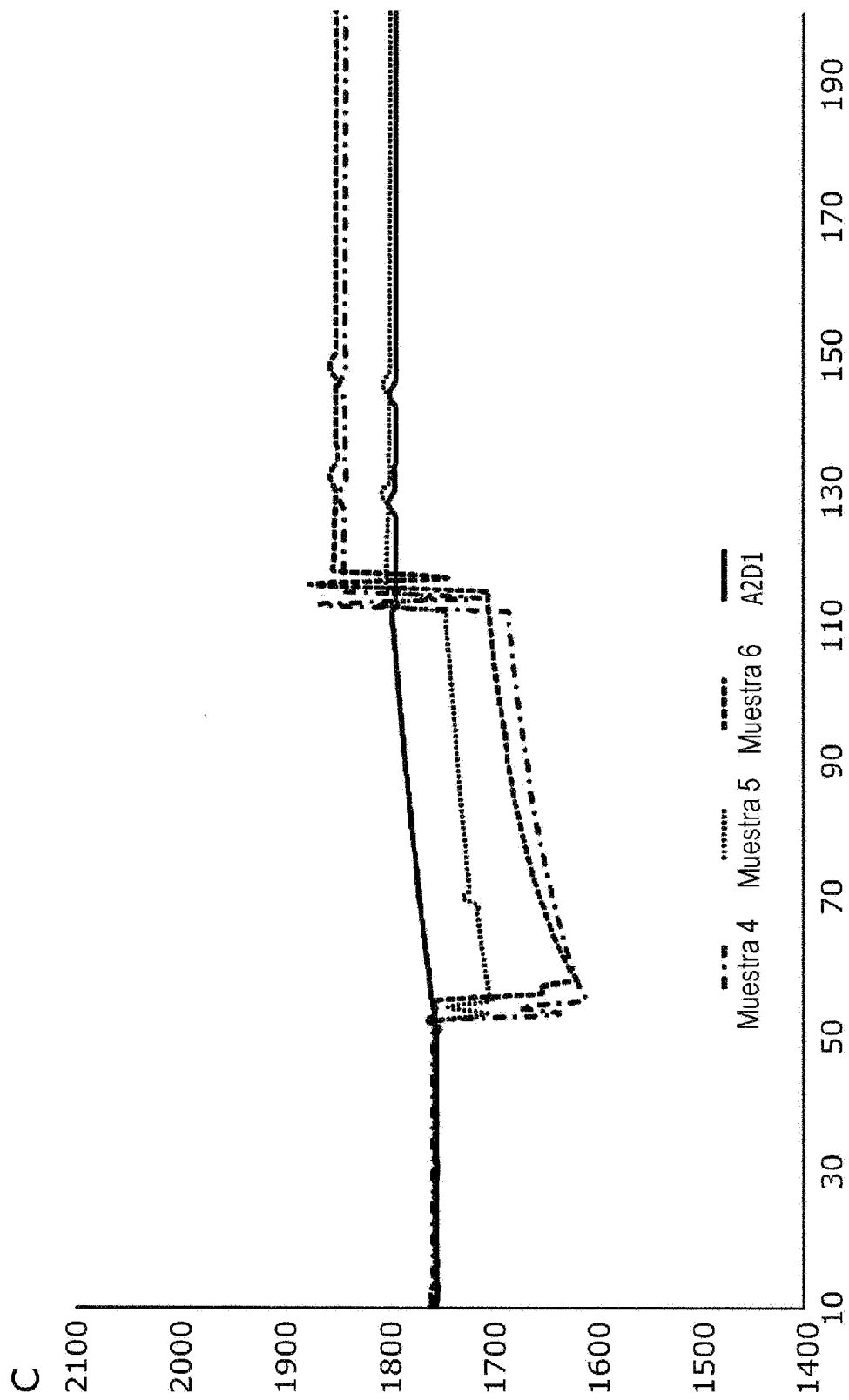


Figura 95 (continuación)

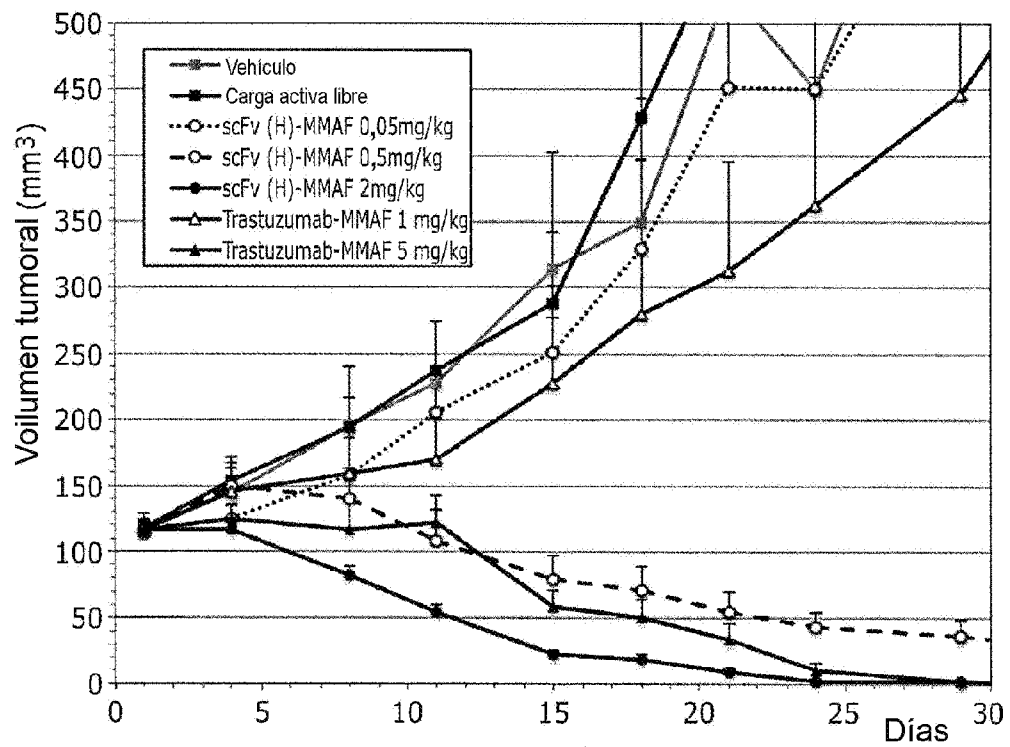
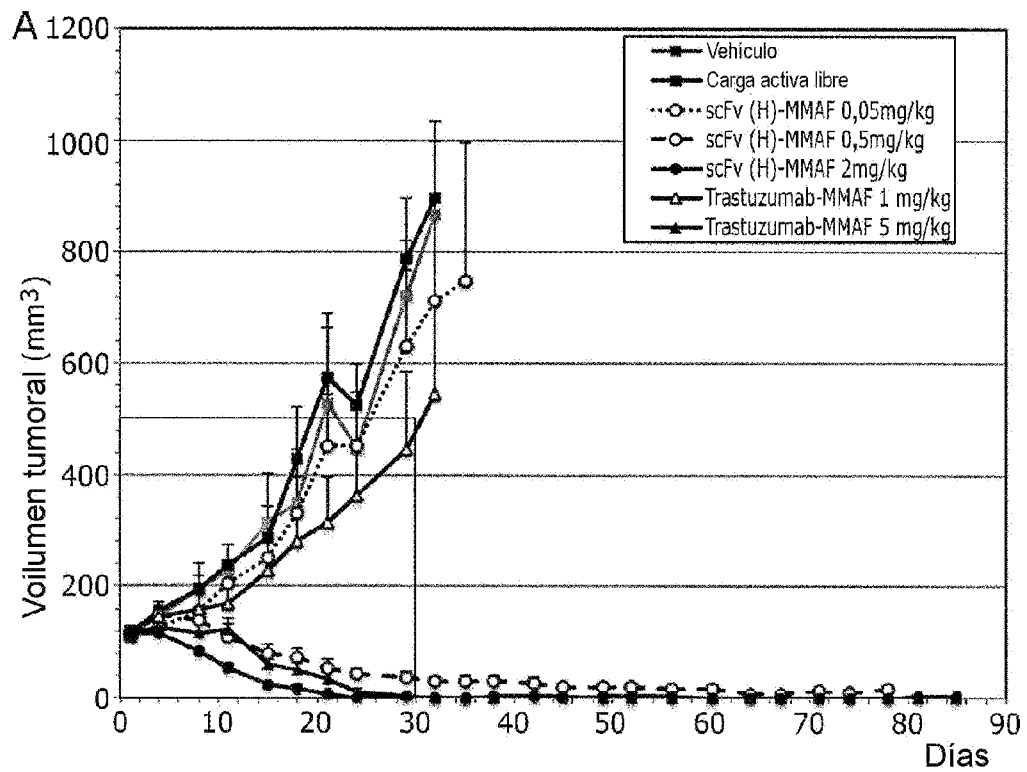
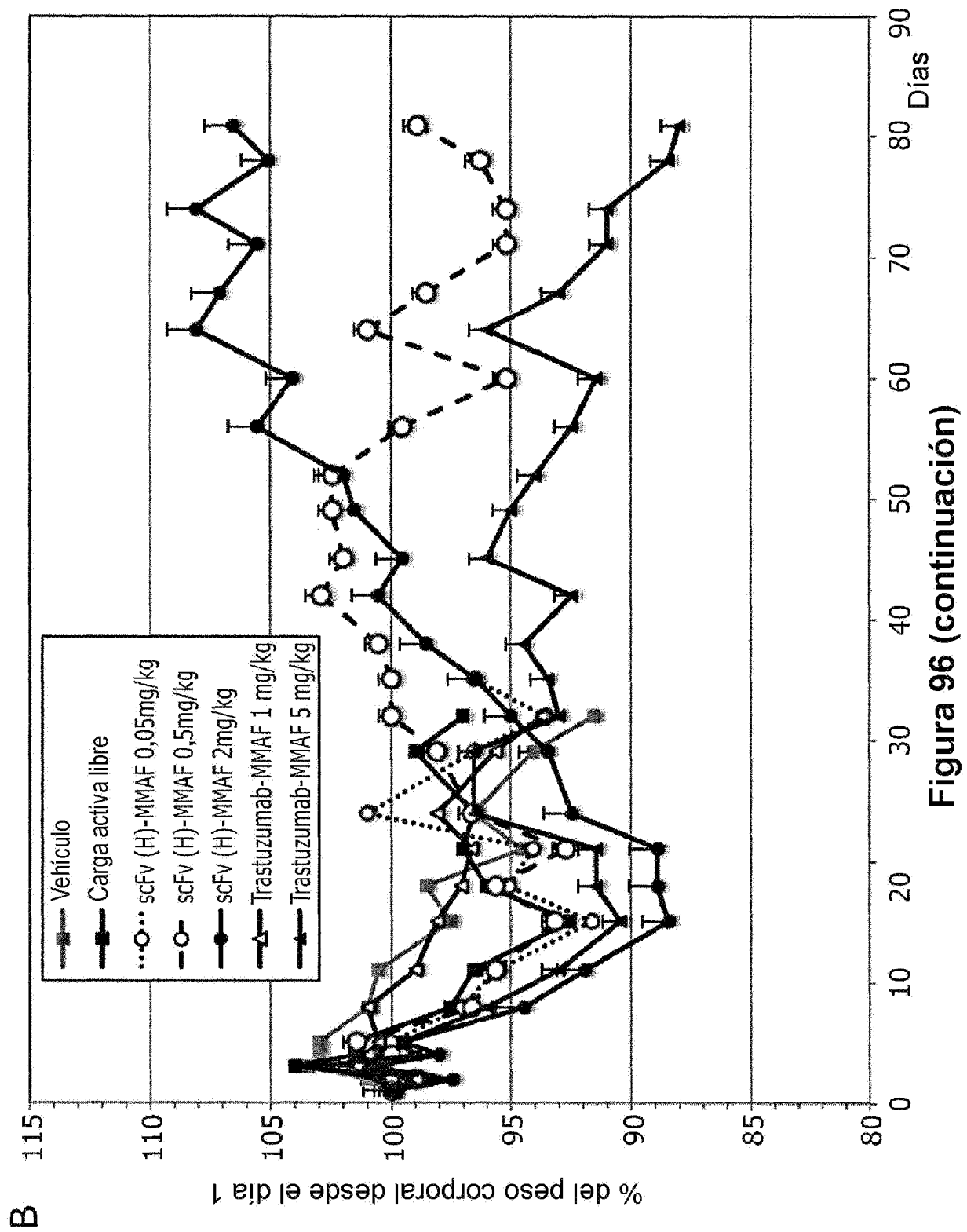


Figura 96



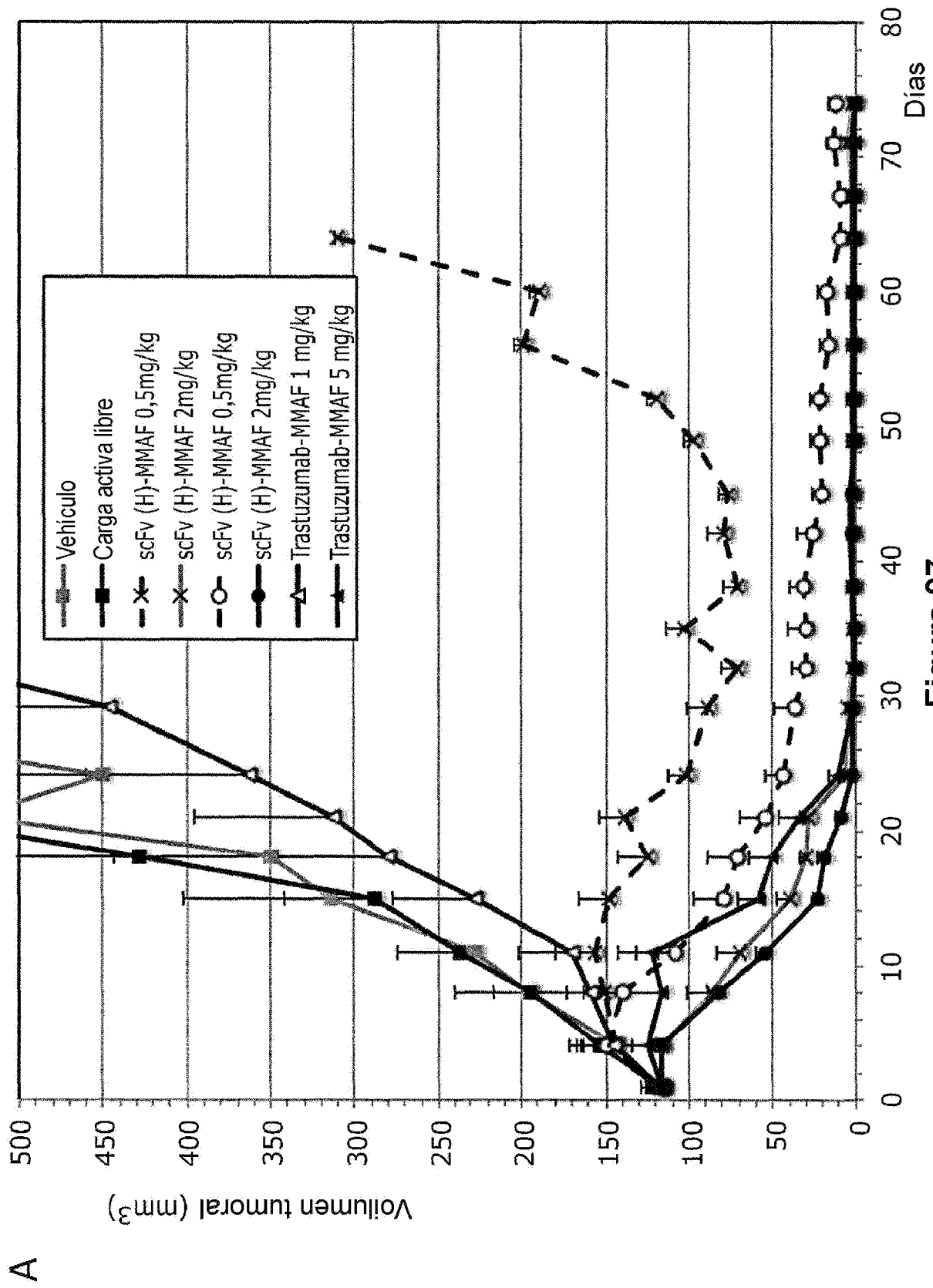
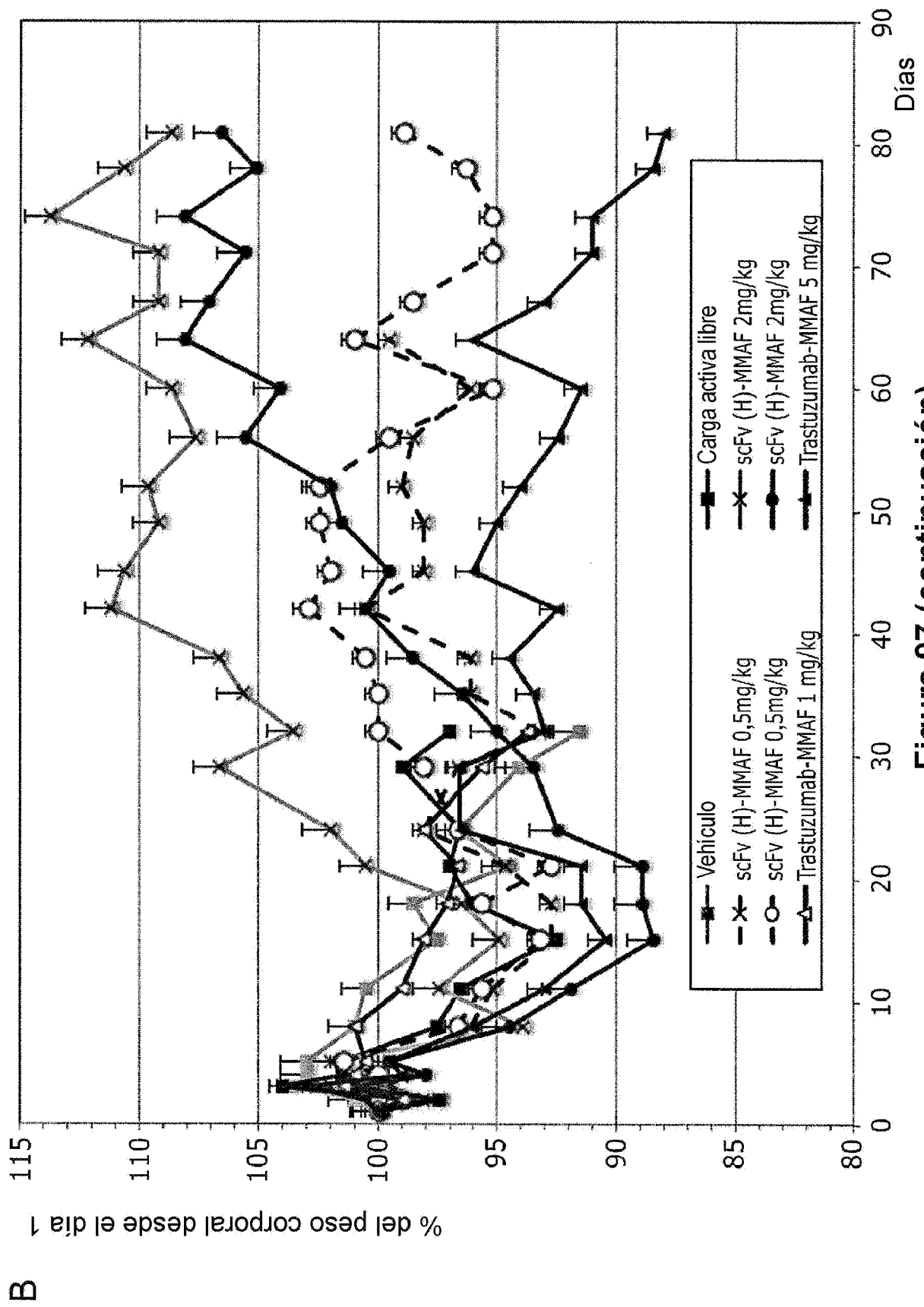
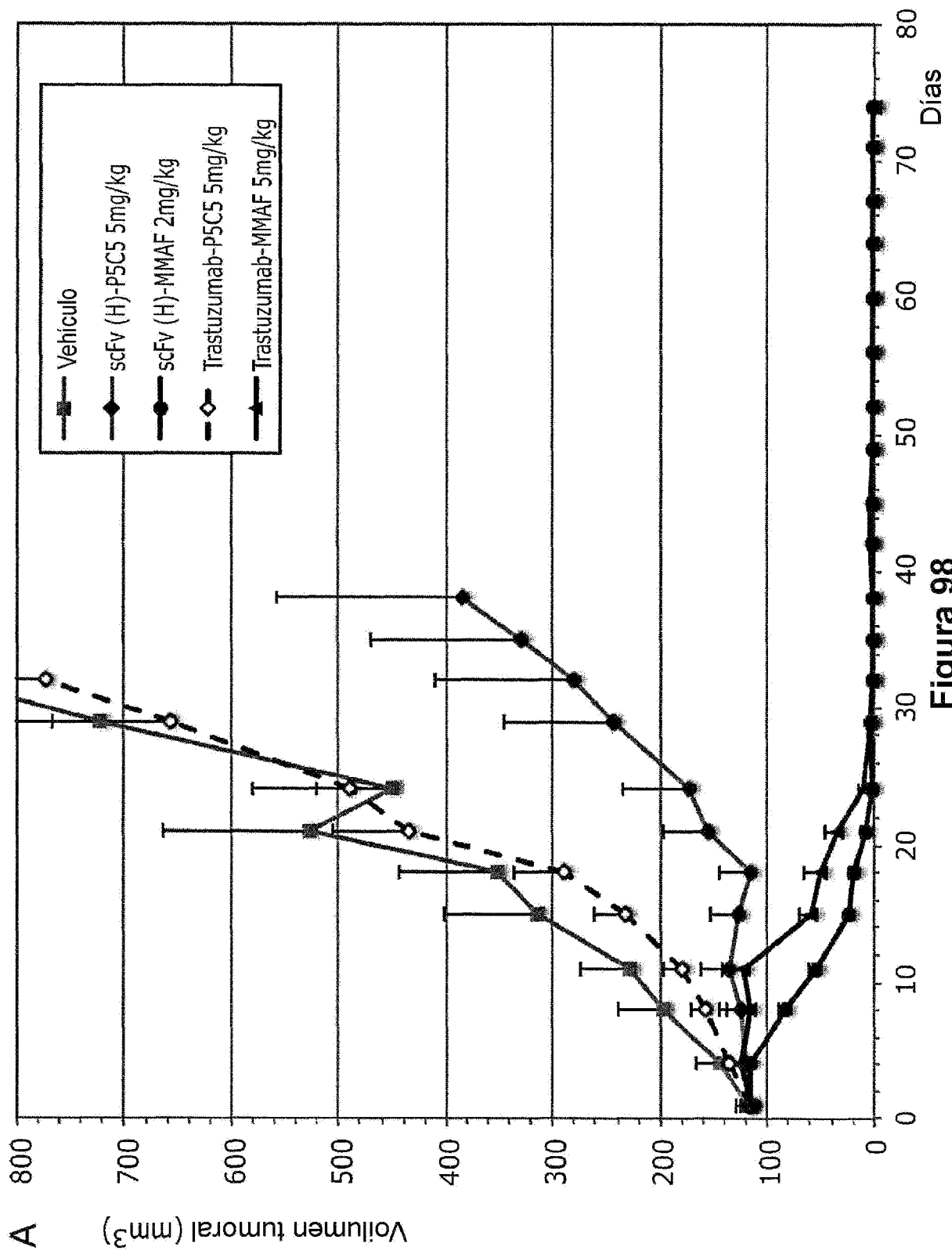


Figura 97





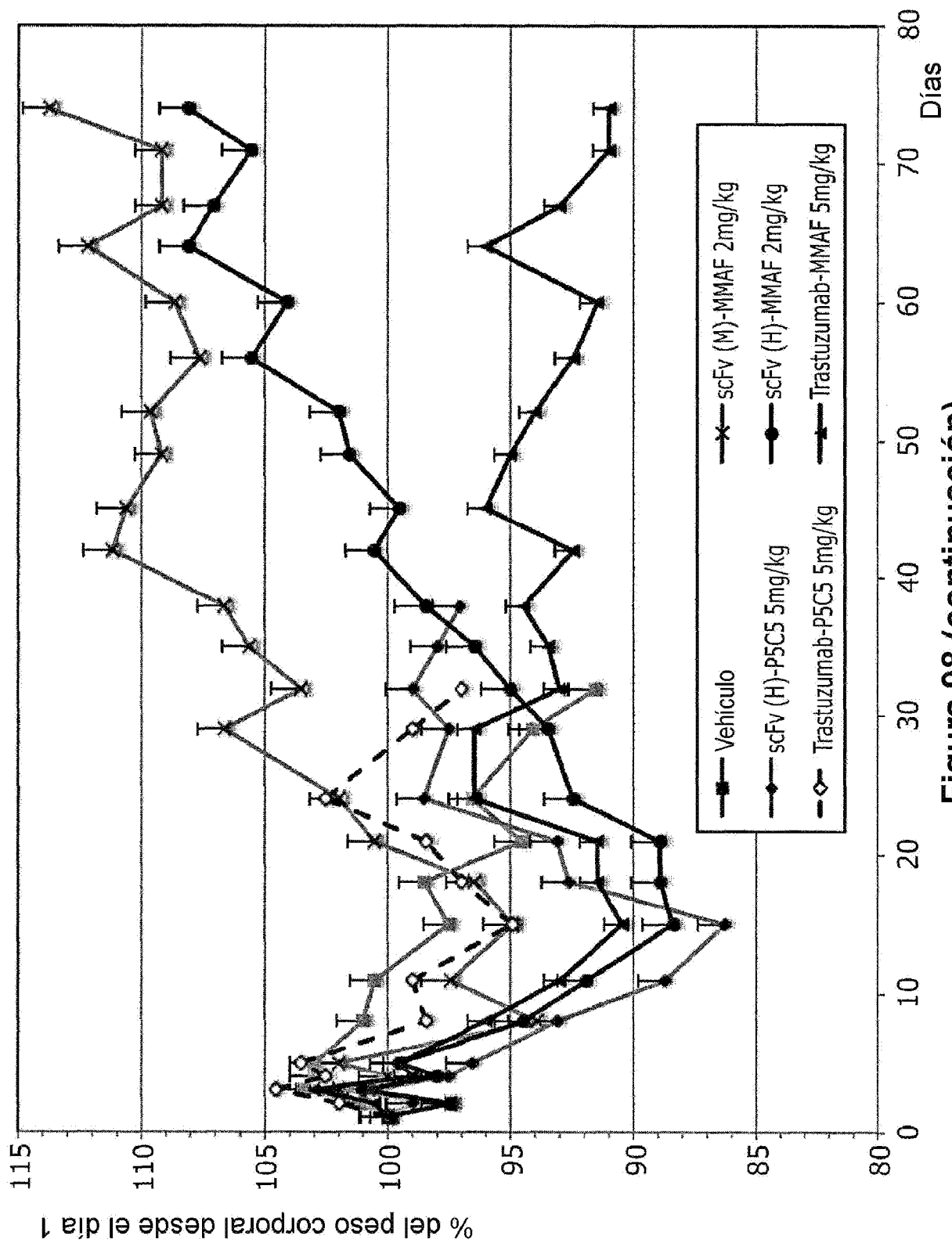
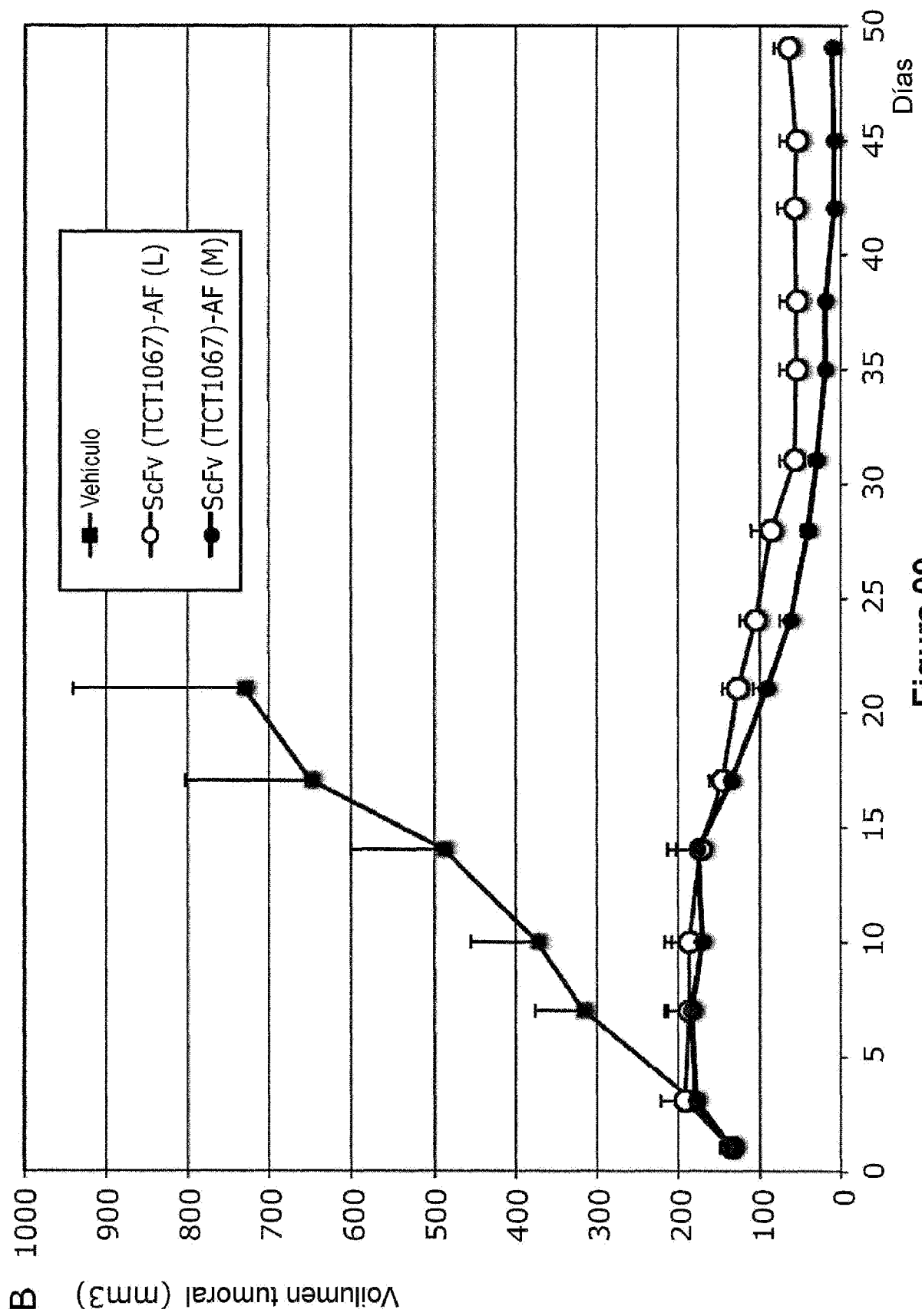


Figura 98 (continuación)



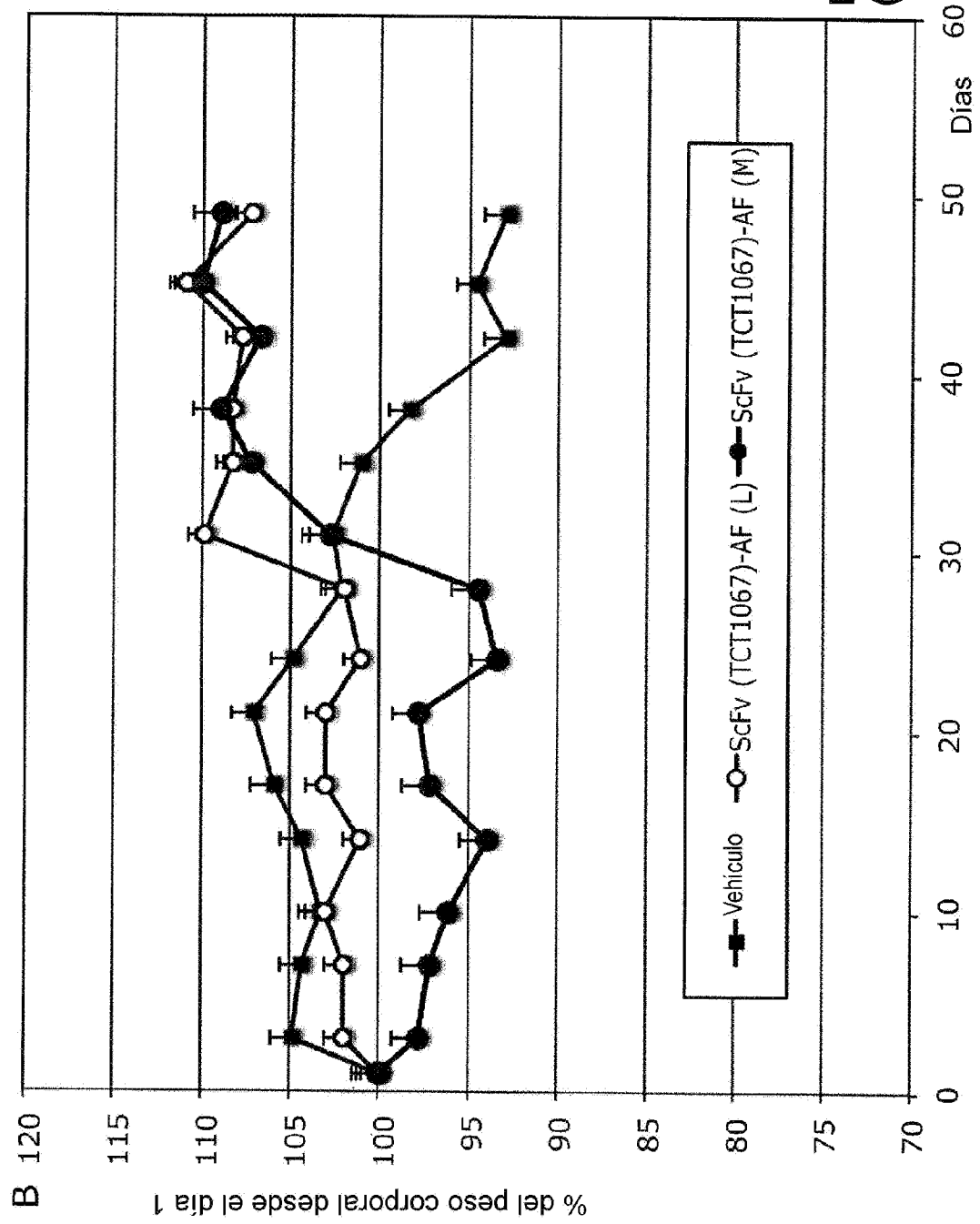


Figura 99
(continuación)

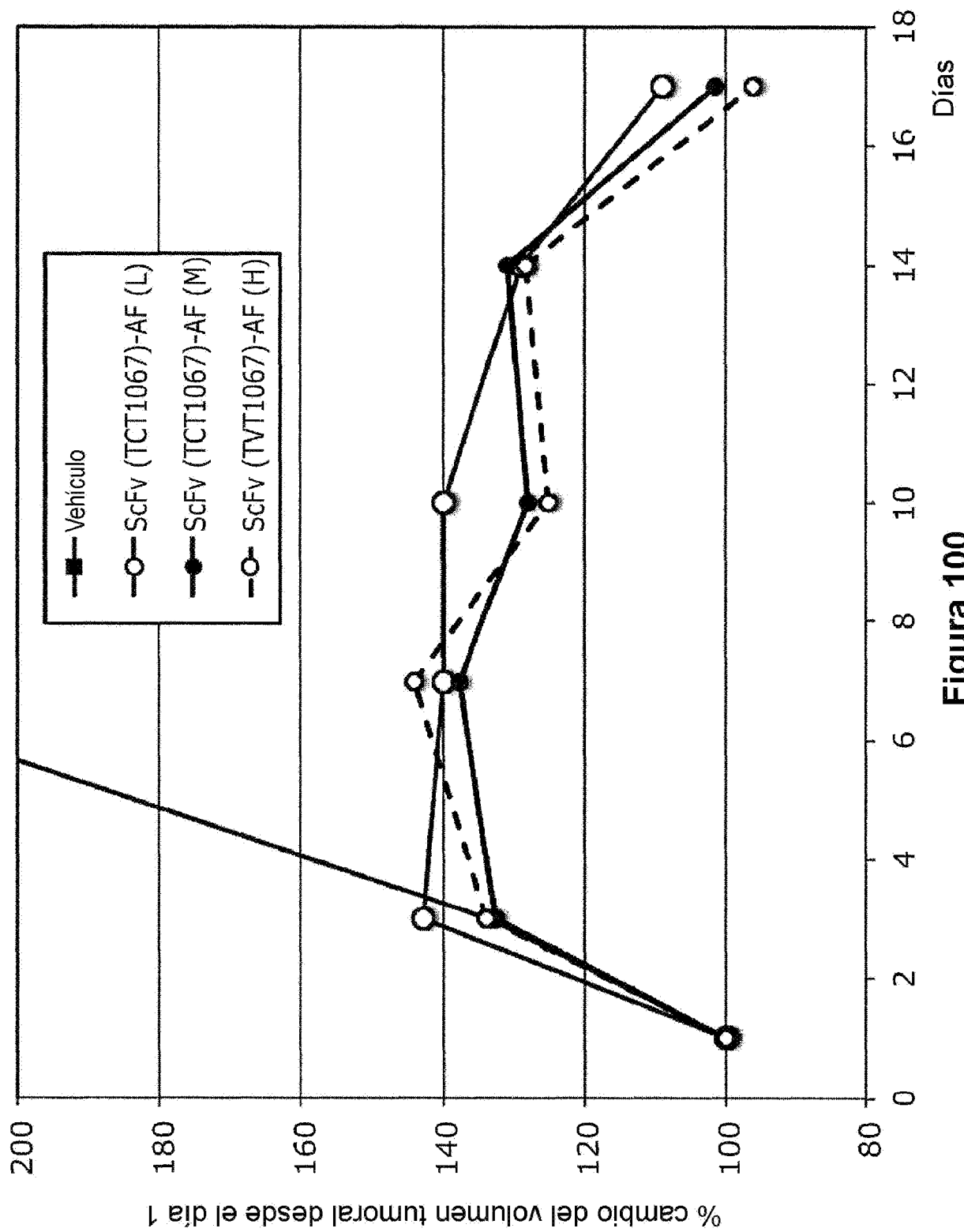


Figura 100

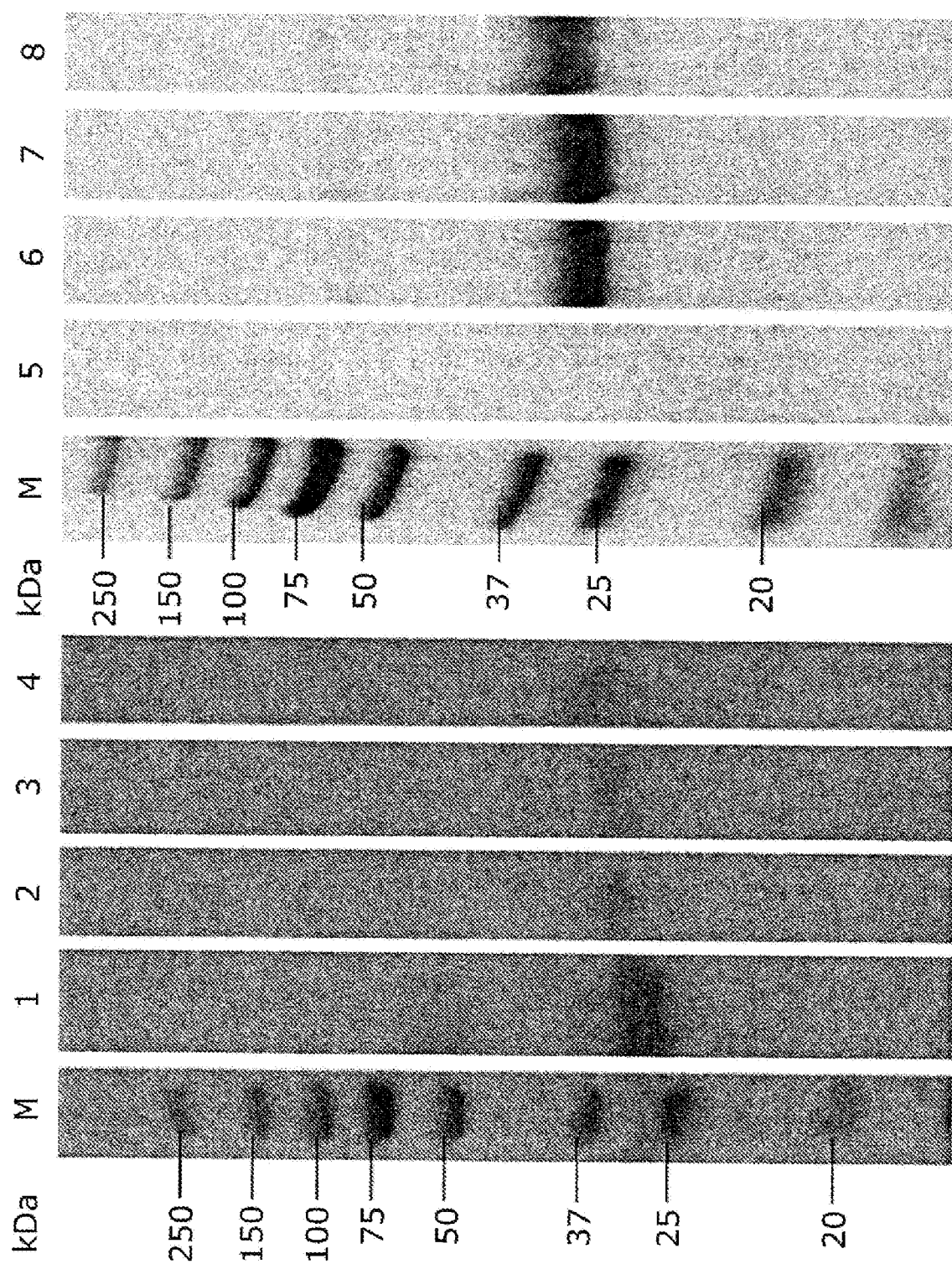


Figura 101

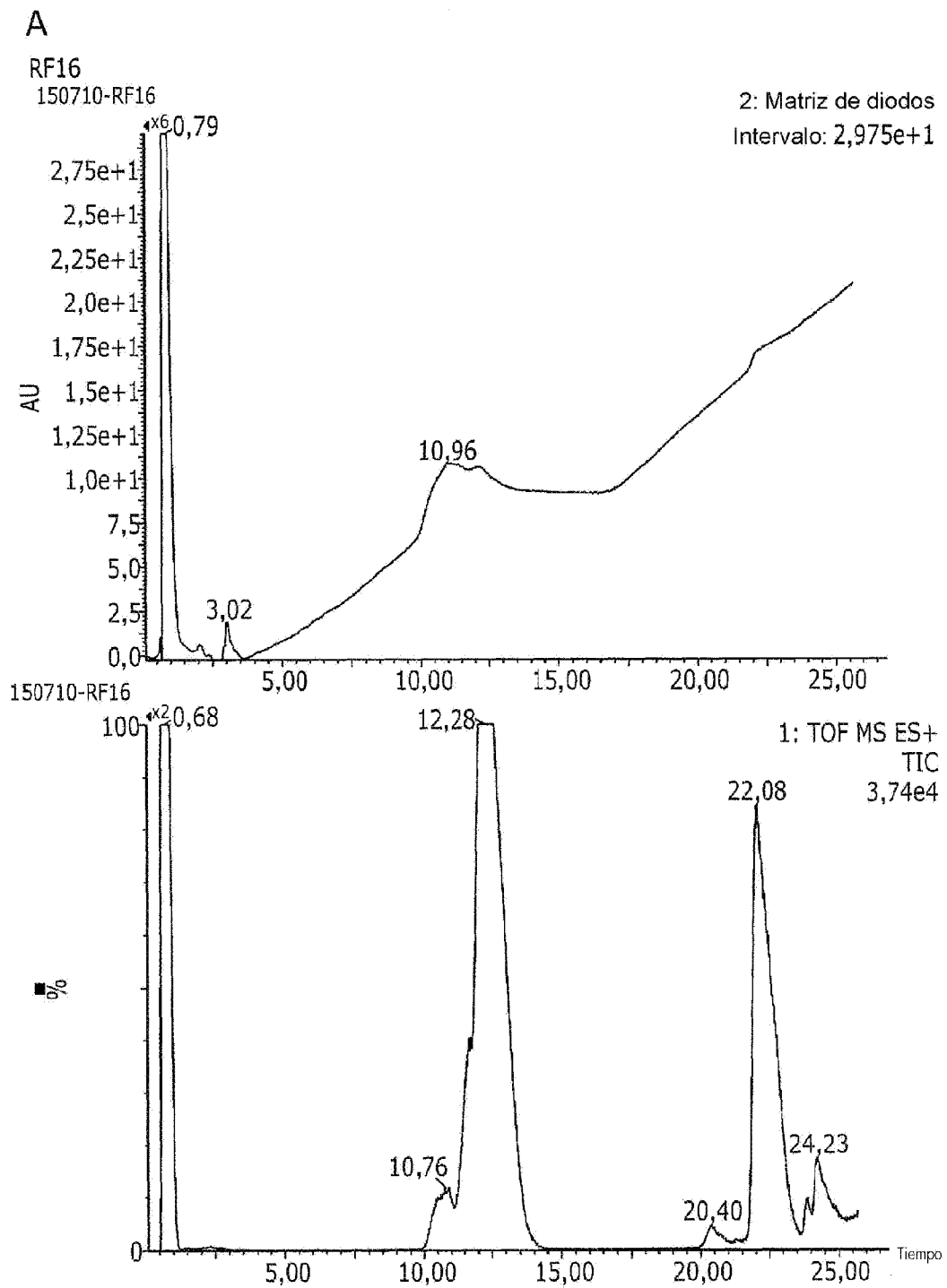


Figura 102

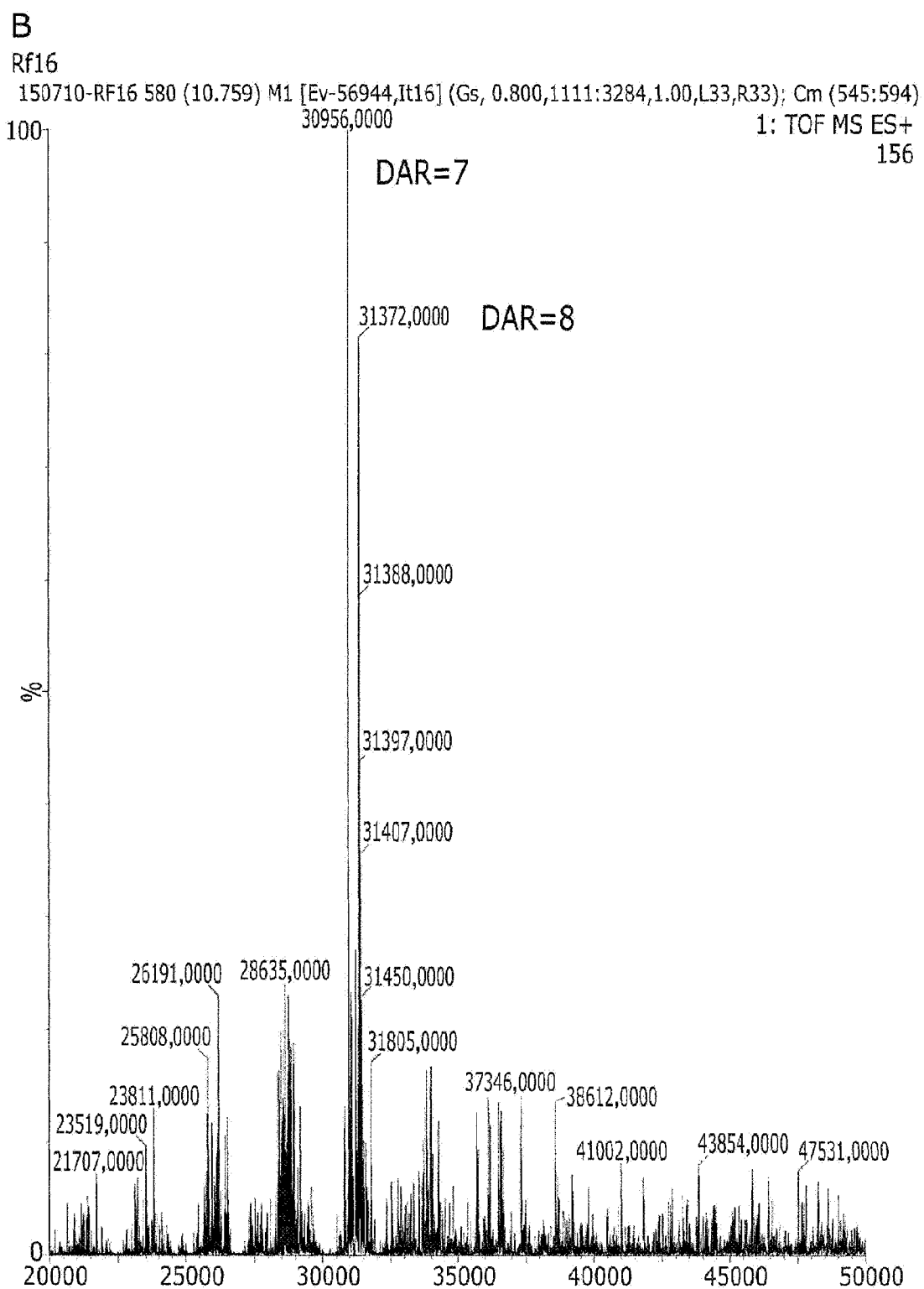


Figura 102 (continuación)

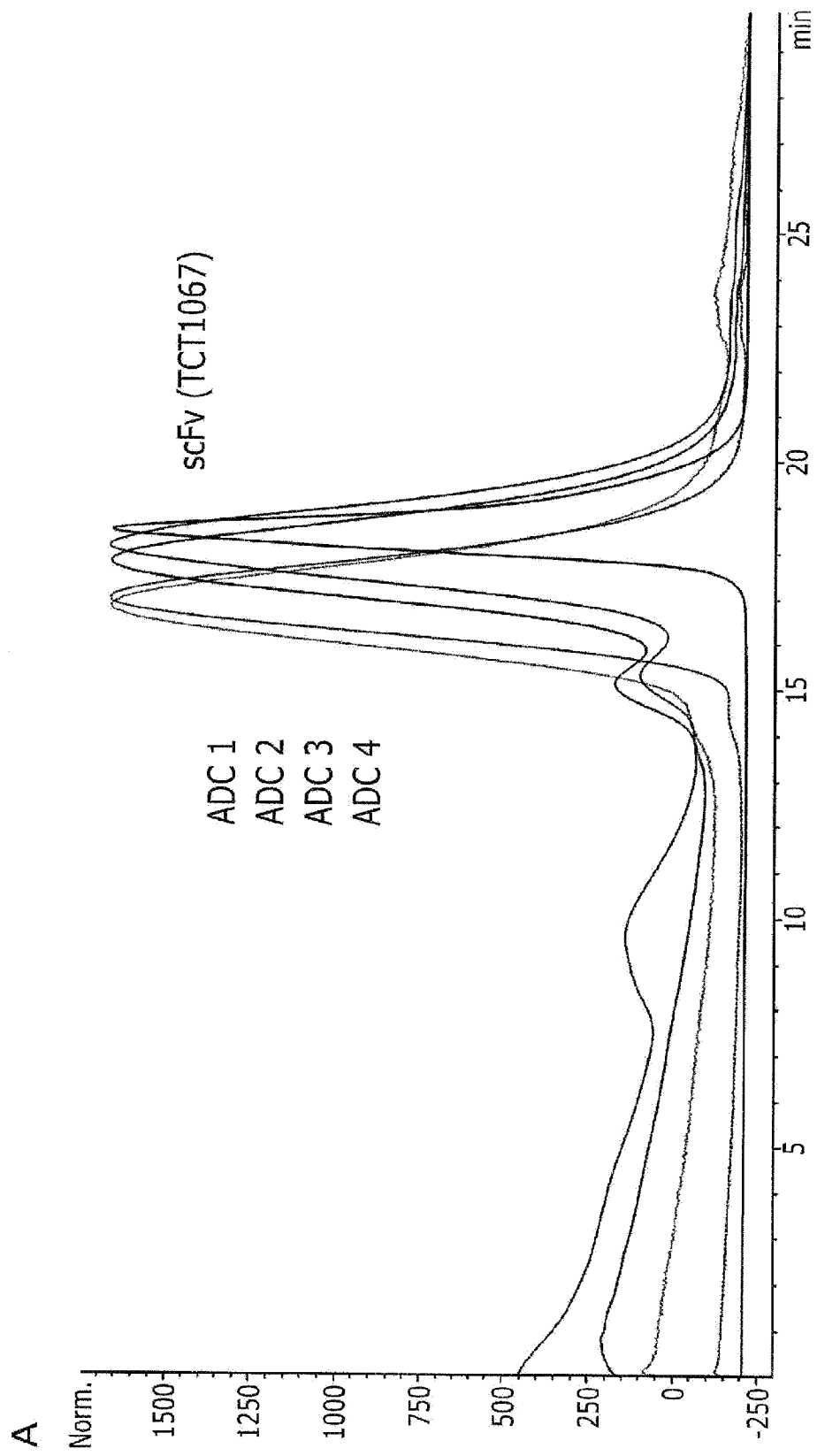


Figure 103

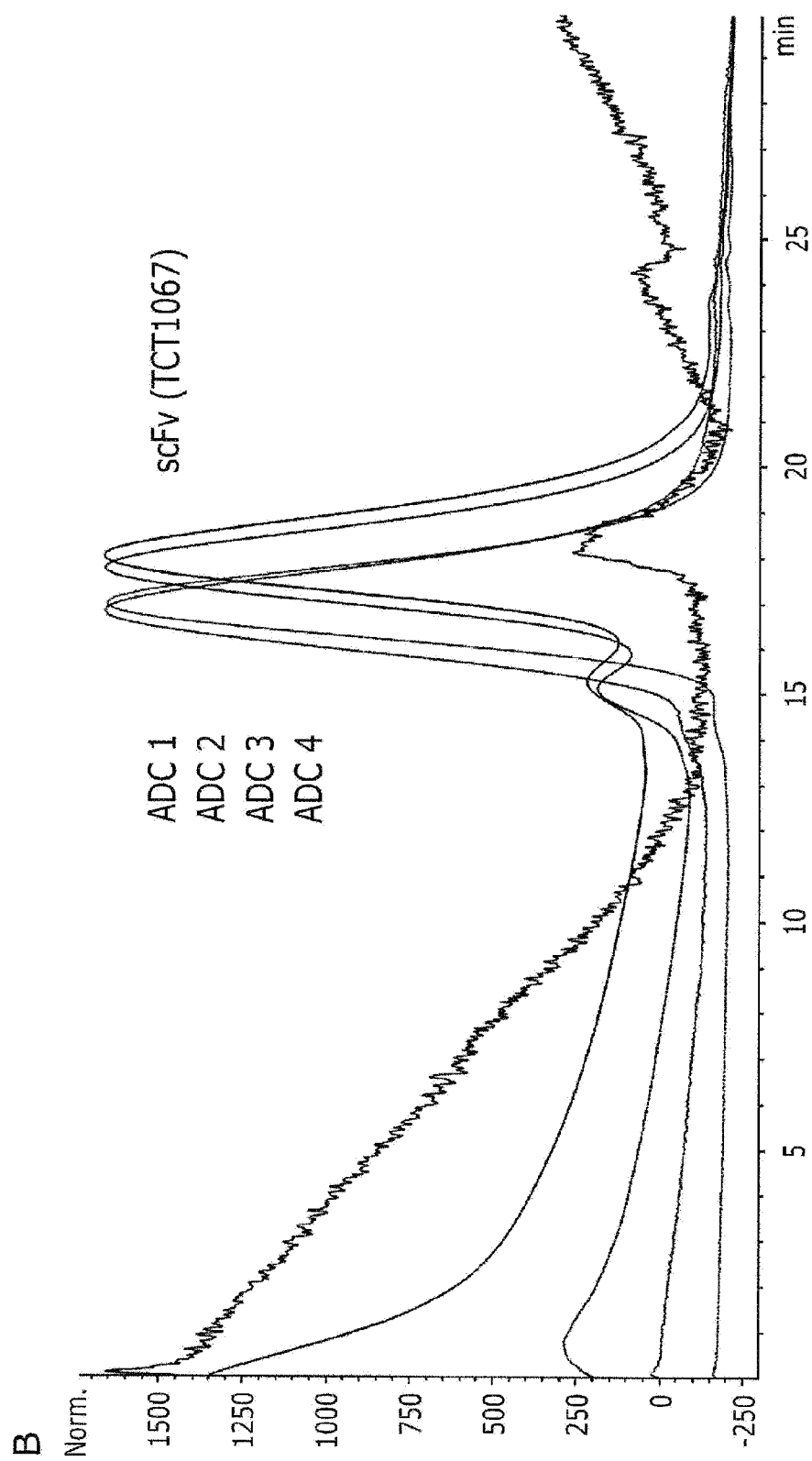


Figura 103 (continuación)

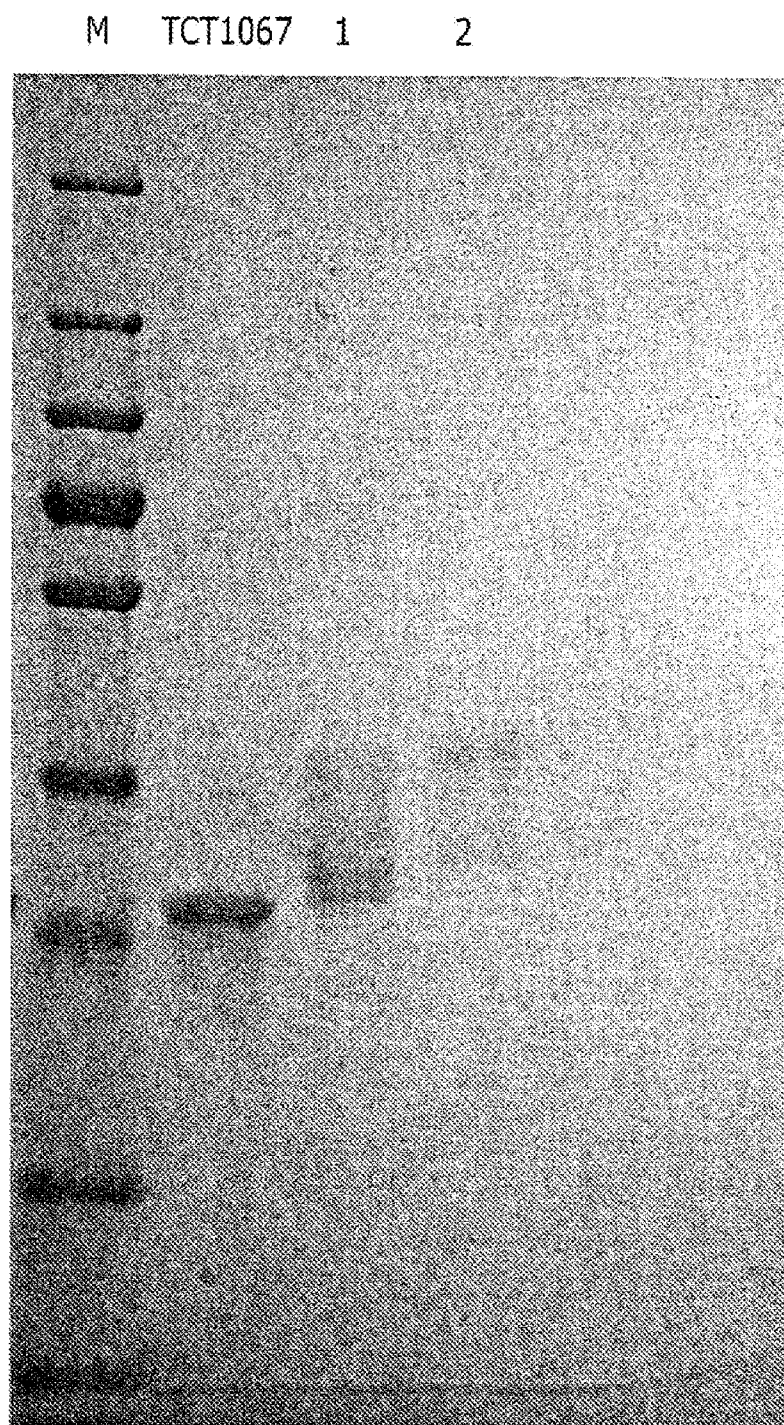


Figura 104

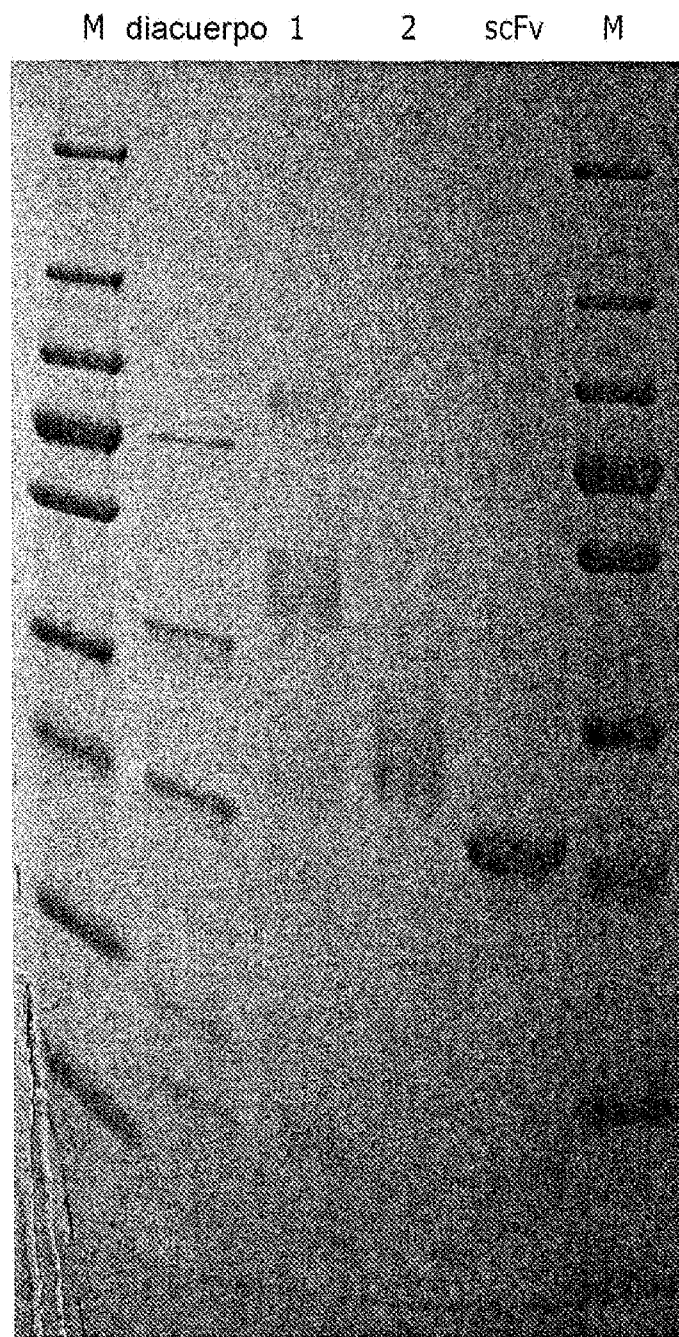


Figura 105