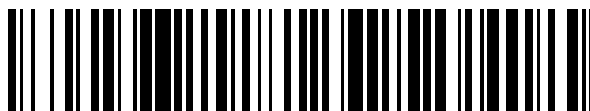


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 304**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2004 E 04793896 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 1689846**

54 Título: **Conjugados de maitansinoide DM1 con anticuerpo trastuzumab, unidos mediante un conector no escindible, y su uso en el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

10.10.2003 US 509901 P

08.10.2004 US 960602

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

27.05.2013

73 Titular/es:

IMMUNOGEN, INC. (100.0%)

830 WINTER STREET

WALTHAM, MA 02451, US

72 Inventor/es:

STEEVES, RITA;

LUTZ, ROBERT;

CHARI, RAVI;

XIE, HONGSHENG y

KOVTUN, YELENA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 404 304 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

Conjugados de maitansinoide DM1 con anticuerpo trastuzumab, unidos mediante un conector no escindible, y su uso en el tratamiento de tumores

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a conjugados de agente de unión a células maitansinoide unidos mediante un conector no escindible.

Antecedentes de la invención

10 Los maitansinoides son fármacos altamente citotóxicos. La maitansina fue aislada por primera vez por Kupchan et al. a partir del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* y se mostró que era 100 a 1.000 veces más citotóxico que los agentes quimioterapéuticos para el cáncer convencionales como metotrexato, daunorrubicina y vincristina (Pat. U.S. No. 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que algunos microbios también producen maitansinoides, tal como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (Pat. U.S. No. 4.151.042). También se han reportado ésteres C-3 sintéticos del maitansinol y análogos del maitansinol (Kupchan et al., 21 J. Med. Chem. 31-37 (1978); Higashide et al. 270 Nature 721-722 (1977); Kawai et al., 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984)). Los ejemplos de análogos del maitansinol a partir de los que se han preparado ésteres C-3 incluyen maitansinol con modificación en el anillo aromático (por ejemplo, descloro) o en el C-9, C-14 (por ejemplo, grupo metilo hidroxilado), C-15, C-18, C-20 y C-4,5.

Los ésteres C-3 naturales y sintéticos pueden clasificarse en dos grupos:

- (a) ésteres C-3 con ácidos carboxílicos simples (Pat. U.S. Nos. 4.248.870; 4.265.814; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.317.821; 4.322.348; y 4.331.598), y
- 20 (b) ésteres C-3 con derivados de N-metil-L-alanina (Pat. U.S. Nos. 4.137.230 y 4.260.608; y Kawai et al., 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984)).

Se encontró que los ésteres del grupo (b) eran mucho más citotóxicos que los ésteres del grupo (a).

25 La maitansina es un inhibidor mitótico. Se ha reportado que el tratamiento de células L1210 *in vivo* con maitansina resulta en el 67% de las células acumulándose en mitosis. Se reportó que las células control no tratadas demuestran un índice mitótico que varía entre 3,2 a 5,8% (Sieber et al., 43 Bibl. Haematol. 495-500 (1976)). Los experimentos con huevos de erizo de mar y huevos de almeja han sugerido que la maitansina inhibe la mitosis interfiriendo con la formación de microtúbulos mediante la inhibición de la polimerización de la proteína de microtúbulos, tubulina (Remillard et al., 189 Science 1002-1005 (1975)).

30 *In vitro*, se ha encontrado que las suspensiones de células leucémicas murinas P388, L1210 y LY5178 son inhibidas por maitansina a dosis de 10^{-3} a 10^{-1} $\mu\text{g/ml}$ siendo la línea P388 la más sensible. También se ha mostrado que la maitansina es un inhibidor activo del crecimiento *in vitro* de células de carcinoma nasofaríngeo humano y se reportó que la línea de leucemia linfoblástica C.E.M. se inhibía por concentraciones tan bajas como 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ (Wolpert-DeFillippes et al., 24 Biochem. Pharmacol. 1735-1738 (1975)).

35 También se ha mostrado que la maitansina es activa *in vivo*. Se mostró que el crecimiento tumoral en el sistema de leucemia linfocítica P388 se inhibía sobre un intervalo de dosificación de 50 a 100 veces, lo que sugirió un alto índice terapéutico; también pudo demostrarse una actividad inhibidora significativa con el sistema de leucemia de ratón L1210, el sistema de carcinoma de pulmón de Lewis humano y el sistema de melanocarcinoma humano B-16 (Kupchan, 33 Ped. Proc 2288-2295 (1974)).

40 Como los maitansinoides son altamente citotóxicos, se esperaba que fueran útiles en el tratamiento de muchas enfermedades tal como el cáncer. Esta expectativa todavía debe llevarse a cabo. Los ensayos clínicos con maitansina no fueron favorables debido a varios efectos secundarios (Issel et al., 5 Cancer Treat. Rev. 199-207 (1978)). Los efectos adversos en el sistema nervioso central y los síntomas gastrointestinales fueron los responsables de que algunos pacientes rechazaran más terapia (Issel en 204) y pareció que la maitansina estaba asociada con neuropatía periférica que podría ser acumulativa (Issel en 207).

45 De acuerdo con esto, se emplearon técnicas de direccionamiento para administrar selectivamente los fármacos a la célula diana. Se han investigado tanto conectores escindibles como no escindibles para varios fármacos, pero en la mayor parte de los casos, incluyendo el caso de los maitansinoides, los ensayos de citotoxicidad *in vitro* han revelado que los conjugados anticuerpo-fármaco pocas veces consiguen la misma potencia de citotoxicidad que los fármacos

libres no conjugados. Así, se ha aceptado generalmente que para que la administración dirigida de maitansinoides sea eficaz, la unión entre el maitansinoide y el agente de unión a células debe ser escindible.

Además, en el área de las inmunotoxinas, se mostró que los conjugados que contienen conectores con puentes disulfuro entre anticuerpos monoclonales y toxinas proteicas catalíticamente activas son más citotóxicos que los conjugados que contienen otros conectores. Véase, Lambert et al., 260 J. Biol. Chem. 12035-12041 (1985); Lambert et al., en Immunotoxins 175-209 (A. Frankel, ed. 1988), y Ghetie et al., 48 Cancer Res. 2610-2617 (1988). Esto se atribuyó a la alta concentración intracelular de glutatión que contribuye a la escisión eficaz del enlace disulfuro entre una molécula de anticuerpo y una toxina. Más recientemente, se mostró que un conjugado de maitansinoides unido al anticuerpo TA.1 anti-Her2 de cáncer de mama mediante el conector no escindible SMCC es 200 veces menos potente que un conjugado de maitansinoides unido a TA.1 mediante un conector que tiene un enlace disulfuro escindible (Chari et al., 52 Cancer Res. 127-133 (1992)).

Así, se han buscado conjugados citotóxicos unidos mediante conectores escindibles que contienen disulfuro. Shen et al. describieron la conversión de metotrexato en un derivado mercaptoetilamida seguido de la conjugación con poli-D-lisina mediante un enlace disulfuro (260 J. Biol. Chem. 10905-10908 (1985)). También se describió la preparación de un conjugado del fármaco tóxico que contiene trisulfuro caliqueamicina con un anticuerpo (Menendez et al., Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer, San Diego, Resumen 81 (1989)).

Las Patentes U.S. Nos. 5.208.020 y 5.416.064 describen conjugados citotóxicos que comprenden agentes de unión a células unidos a derivados maitansinoide específicos mediante conectores escindibles, tales como conectores que contienen grupos disulfuro, conectores que contienen grupos lábiles a ácidos, conectores que contienen grupos foto lábiles, conectores que contienen grupos lábiles a peptidasas y conectores que contienen grupos lábiles a esterases.

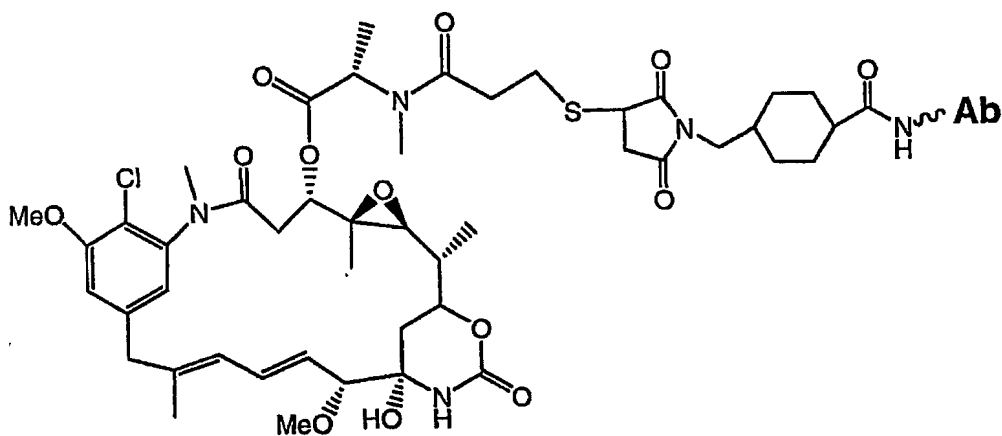
La Patente U.S. No. 6.333.410 B1 describe un proceso para preparar y purificar maitansinoides que contienen tiol para unión a agentes de unión a células y la Patente U.S. No. 6.441.163 B1 describe un método de una etapa para preparar conjugados citotóxicos de maitansinoides y agentes de unión a células, en los que el conector es un conector escindible que contiene disulfuro.

Además, la Patente U.S. No. 5.208.020 enseña conjugados anticuerpo-maitansinoide con conectores no escindibles, en los que el conector comprende un grupo maleimido. Sin embargo, la referencia no contiene datos experimentales que demuestren que dichos conjugados son eficaces para tratar enfermedades.

Ahora se ha encontrado, inesperadamente, que conjugados citotóxicos de maitansinoides y agentes de unión a células unidos mediante conectores no escindibles son extremadamente potentes y en muchos casos tienen ventajas inesperadas sobre conjugados de maitansinoides y agentes de unión a células con conectores escindibles.

Resumen de la invención

Tomando como base la descripción que está contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona un conjugado agente de unión a células maitansinoide que tiene la fórmula siguiente:



en la que Ab es trastuzumab.

La presente invención y realizaciones de ésta se muestran en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción breve de los dibujos

- La FIG. 1 muestra la estructura de SMCC.
- La FIG. 2 muestra la estructura de DM1.
- 5 La FIG. 3 muestra gráficamente los resultados de un ensayo de unión FACS que compara el anticuerpo huC242 con el conjugado anticuerpo-maitansinoide huC242-SMCC-DM1.
- La FIG. 4 muestra gráficamente la citotoxicidad de huC242-SMCC-DM1.
- La FIG. 5 muestra la cromatografía de exclusión por tamaño para huC242-SMCC-DM1.
- Las FIGS. 6A-C y la FIG. 7 muestran gráficamente la citotoxicidad de huC242-SMCC-DM1 comparada con conjugados preparados con conectores que contienen disulfuro.
- 10 Las FIGS. 8A-D muestran gráficamente la citotoxicidad de conjugados SMCC-DM1 unidos a varios agentes de unión a células.
- La FIG. 9 muestra gráficamente la citotoxicidad del conjugado anticuerpo-maitansinoide huC242-SIAB-DM1.
- La FIG. 10A muestra gráficamente la actividad antitumoral de huC242-SMCC-DM1 frente a xenoinjertos de cáncer de colon humano COLO205 en ratones SCID.
- 15 La FIG. 10B muestra gráficamente la actividad antitumoral de huC242-SMCC-DM1 frente a xenoinjertos de tumor gástrico humano SNU16 en ratones SCID.
- La FIG. 10C muestra gráficamente la eficacia anti-tumoral de trastuzumab-SMCC-DM1 frente a xenoinjertos de tumor humano MCF7 en ratones SCID.
- 20 La FIG. 11 muestra gráficamente las velocidades de aclaramiento plasmático de huC242-SMCC-DM1 comparadas con conjugados preparados con conectores que contienen disulfuro.
- Las FIGS. 12A-C muestran gráficamente los resultados de estudios de toxicidad aguda de huC242-SMCC-DM1 comparados con conjugados preparados con conectores que contienen disulfuro.
- La FIG. 13 muestra la durabilidad de la parada del ciclo celular y la actividad destructora de células demostradas por huC242-SMCC-DM1 comparadas con conjugados preparados con conectores que contienen disulfuro.
- 25 Las FIGS. 14A-C muestran la actividad de efecto presencial mínima de huC242-SMCC-DM1 comparada con conjugados preparados con conectores que contienen disulfuro.
- La FIG. 15 muestra estructuras representativas de agentes de entrecruzamiento basados en maleimido.
- La FIG. 16 muestra estructuras representativas de agentes de entrecruzamiento basados en haloacetilo.
- La FIG. 17 muestra la estructura de conjugados anticuerpo-SMCC-DM1.
- 30 La FIG. 18 muestra la estructura de conjugados anticuerpo-SIAB-DM1.
- La FIG. 19 muestra la estructura de conjugados anticuerpo-SMCC-DM4.
- La FIG. 20 muestra la estructura de conjugados anticuerpo-SIAB-DM4.
- La FIG. 21 muestra la síntesis de un conjugado maitansinoide agente de unión a células unido mediante un conector no escindible que no contiene S.
- 35 La FIG. 22 muestra gráficamente la citotoxicidad de huC242-conector no escindible que no contiene S-DM1.
- La FIG. 23 muestra gráficamente los resultados de un ensayo de unión FACS de huC242-conector no escindible que no contiene S-DM1.
- La FIG. 24 muestra gráficamente los resultados de un ensayo de unión en placa HER2 ECD que compara el anticuerpo trastuzumab con el conjugado de anticuerpo-maitansinoide trastuzumab-SMCC-DM1.
- 40 La FIG. 25 muestra gráficamente la citotoxicidad y especificidad de trastuzumab-SMCC-DM1.

La FIG. 26 muestra la cromatografía de exclusión por tamaño para trastuzumab-SMCC-DM1.

La FIG. 27 muestra gráficamente los resultados de un ensayo de unión en placa HER2 ECD que compara el anticuerpo trastuzumab con el conjugado anticuerpo-maitansinoide trastuzumab-SIAB-DM1.

La FIG. 28 muestra gráficamente la citotoxicidad y especificidad de trastuzumab-SIAB-DM1.

5 La FIG. 29 muestra la cromatografía de exclusión por tamaño para trastuzumab-SIAB-DM1.

Descripción detallada de la descripción

10 La técnica revela que es extremadamente difícil modificar fármacos existentes sin disminuir su potencial citotóxico. Sin embargo, las Pat. U.S. Nos. 6.441.163 B1, 6.333.410 B1, 5.416.064 y 5.208.020 demuestran que pueden crearse agentes citotóxicos potentes uniendo maitansinoides a agentes de unión a células apropiados mediante conectores escindibles, especialmente conectores escindibles que contienen grupos disulfuro. Los conjugados agente de unión a células maitansinoide permiten que se aplique la totalidad de la acción citotóxica de los maitansinoides de una manera dirigida sólo frente a células no deseadas, evitando de esta manera los efectos secundarios debidos al daño a células sanas que no son diana.

15 Los presentes inventores han descubierto inesperadamente que los maitansinoides unidos a agentes de unión a células mediante conectores no escindibles son superiores en varios aspectos importantes a los maitansinoides unidos mediante conectores escindibles. En particular, cuando se comparan con conjugados que contienen conectores escindibles, los conjugados con conectores no escindibles muestran una actividad antitumoral equivalente tanto *in vitro* como *in vivo*, pero demuestran una disminución importante en la velocidad de aclaramiento plasmático y en la toxicidad.

20 Así, esta descripción proporciona un método mejorado para tomar como diana células, especialmente células que quieren destruirse, tales como células tumorales (particularmente células de tumores sólidos), células infectadas por virus, células infectadas por microorganismos, células infectadas por parásitos, células autoinmunes (células que producen autoanticuerpos), células activadas (aquellas implicadas en el rechazo de injertos o enfermedad de injerto frente a huésped) o cualquier otro tipo de células enfermas o anormales, a la vez que presenta un mínimo de efectos secundarios.

25 El conjugado usado en el método descrito tiene uno o más maitansinoides unidos a un agente de unión a células mediante un conector no escindible. En un método para preparar el conjugado, un agente de unión a células, por ejemplo un anticuerpo, se modifica en primer lugar con un reactivo de entrecruzamiento tal como SMCC. En una segunda etapa, un maitansinoide reactivo que tiene un grupo tiol, tal como DM1, se hace reaccionar con el anticuerpo modificado para producir conjugados anticuerpo-maitansinoide. Alternativamente, el maitansinoide puede modificarse con un reactivo de entrecruzamiento antes de hacerlo reaccionar con un agente de unión a células. Véase, por ejemplo, 30 la patente U.S. no. 6.441.163 B1.

Maitansinoides adecuados

35 Los maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden aislarse de fuentes naturales según métodos conocidos, producirse usando técnicas de ingeniería genética (véase Yu et al., 99 PNAS 7968-7973 (2002) o prepararse sintéticamente según métodos conocidos.

Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

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

- 40 (1) C-19-descloro (Pat. U.S. No. 4.256.746) (preparado por reducción LAH de ansamitocina P2);
- (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo) +/- C-19-descloro (Pat. U.S. Nos. 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración usando LAH); y
- (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/- descloro (Pat. U.S. No. 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo).

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

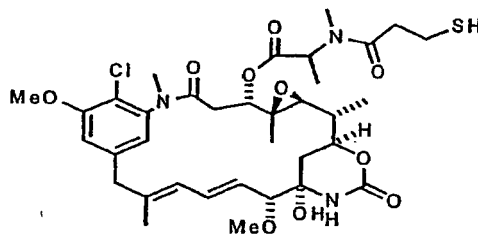
- (1) C-9-SH (Pat. U.S. No. 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅);

- (2) C-14-alcoximetil(desmetoxi/CH₂ OR) (Pat. U.S. No. 4.331.598);
- (3) C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH₂OH o CH₂OAc) (Pat. U.S. No. 4.450.254) (preparado a partir de Nocardia);
- (4) C-15-hidroxi/aciloxi (Pat. U.S. No. 4.364.866) (preparado por la conversión de maitansinol por Streptomyces);
- (5) C-15-metoxi (Pat. U.S. Nos. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de Trewia nudiflora);
- 5 (6) C-18-N-desmetilo (Pat. U.S. Nos. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por Streptomyces); y
- (7) 4,5-desoxi (Pat. U.S. No. 4.371.533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

Se sabe que muchas posiciones en el maitansinol son útiles como la posición de unión, dependiendo del tipo de unión. Por ejemplo, para formar una unión éster, son adecuadas la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. Sin embargo, se prefiere la posición C-3 y se prefiere especialmente la posición C-3 del maitansinol.

Según la presente descripción, un maitansinoide preferido tiene un grupo tiol libre. Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden un grupo tiol libre incluyen ésteres que contienen N-metil-alanina y ésteres que contienen N-metil-cisteína de maitansinol son ésteres C-3 de maitansinol y sus análogos. Los ésteres preferidos incluyen ésteres que contienen N-metil-alanina y ésteres que contienen N-metil-cisteína de maitansinol. La síntesis de los ésteres de maitansinol que tienen un grupo tiol libre se ha descrito previamente, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 5.208.020, Chari et al., 52 Cancer Res., 127-131 (1992) y Liu et al., 93 Proc Natl. Acad. Sci., 8618-8623 (1996). Además, la Patente U.S. No. 6.333.410 B1 proporciona un proceso mejorado para la preparación y purificación de maitansinoides que contienen tiol adecuados para la unión a agentes de unión a células.

20 Muchos de los conjugados de la presente descripción ejemplificados más adelante utilizan el maitansinoide que contiene tiol DM1, denominado formalmente *N*²-desacetil-*N*²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina. DM1 se representa por la fórmula estructural siguiente:



DM1

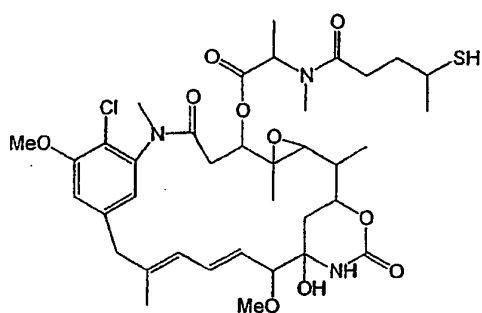
La síntesis del maitansinoide que contiene tiol DM1 se ha descrito previamente (Pat. U.S. No. 5.208.020).

25 La Solicitud de Patente U.S. 10/849.136 describe maitansinoides que contienen tiol con impedimento estérico que portan uno o dos sustituyentes alquilo en el carbono α que porta la funcionalidad tiol. Además, el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido acilada del maitansinoide que porta el grupo sulfhidrilo posee una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre el grupo carbonilo de la amida y el átomo de azufre. Estos nuevos maitansinoides son adecuados para uso en la presente descripción.

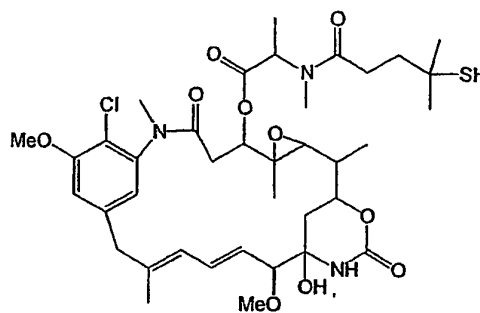
30 La síntesis de maitansinoides que tienen un grupo tiol con impedimento estérico puede describirse por referencia a la Solicitud de Patente U.S. 10/849.136, especialmente a la Fig. 3 de ésta.

Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden una cadena lateral que contiene un enlace tiol con impedimento estérico son los maitansinoides *N*²-desacetil-*N*²-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominado DM3) y *N*²-desacetil-*N*²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominado DM4). DM3 y DM4 se representan por las fórmulas estructurales siguientes:

35



DM3



DM4

Agentes de unión a células

La eficacia de los compuestos de la descripción como agentes terapéuticos depende de la selección cuidadosa de un agente de unión a células apropiado. Los agentes de unión a células pueden ser de cualquier tipo conocido actualmente, o que llegue a ser conocido, e incluyen péptidos y no péptidos. Generalmente, éstos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales), linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (tales como transferrina) o cualquier otra molécula o sustancia de unión a células que se una específicamente a una diana.

Los ejemplos más específicos de agentes de unión a células que pueden usarse incluyen:

- 5 anticuerpos policlonales y monoclonales, incluyendo anticuerpos totalmente humanos; anticuerpos de cadena única (policlonales y monoclonales); fragmentos de anticuerpos (policlonales y monoclonales) tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv (Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983); Spring et al., 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff et al., 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960));
- 15 anticuerpos quiméricos y fragmentos de unión a antígeno de éstos; anticuerpos con un solo dominio (dAb) y fragmentos de unión a antígeno de éstos, incluyendo anticuerpos de camélido (Desmyter et al., 3 Nature Struct. Biol, 752, 1996); anticuerpos de tiburón denominados nuevos receptores de antígeno (IgNAR) (Greenberg et al., 374 Nature, 168, 1995; Stanfield et al. 305 Science 1770-1773, 2004);
- 20 interferones (por ejemplo, alfa, beta, gamma); linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; hormonas tales como insulina, TRH (hormona liberadora de tirotrópina), MSH (hormona estimuladora de melanocitos), hormonas esteroides, tales como andrógenos y estrógenos;
- 25 factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias tales como EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF y GM-CSF (Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984)); transferrina (O'Keefe et al., 260 J. Biol. Chem. 932-937 (1985)); y vitaminas, tales como folato.

30 Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes de unión a células extremadamente específicos en la forma de anticuerpos monoclonales específicos. En la técnica son particularmente bien conocidas las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos por ratones, ratas, hámsters o cualquier otro mamífero inmunizados con el antígeno de interés tal como la célula diana intacta, antígenos aislados de la célula diana, virus

completos, virus completos atenuados y proteínas virales tales como las proteínas de la cubierta viral. También pueden usarse células humanas sensibilizadas. Otro método para crear anticuerpos monoclonales es el uso de bibliotecas de fago de scFv (región variable de cadena única), específicamente scFv humana (véase, por ejemplo, Griffiths et al., Patentes U.S. Nos. 5.885.793 y 5.969.108; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587). Además, también pueden usarse anticuerpos modificados en superficie descritos en la Patente U.S. No. 5.639.641, así como anticuerpos humanizados.

La selección del agente de unión a células apropiado es una elección que depende de la población celular particular que se quiere tomar como diana, pero en general se prefieren los anticuerpos monoclonales humanos si está disponible uno apropiado.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal J5 es un anticuerpo IgG2a murino que es específico para el Antígeno de la Leucemia Linfoblástica Aguda Común (CALLA) (Ritz et al, 283 Nature 583-585 (1980)) y puede usarse si las células diana expresan CALLA tal como en la enfermedad de la leucemia linfoblástica aguda.

El anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG₁ murino que se une específicamente al antígeno CD33 (J.D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)) y puede usarse si las células diana expresan CD33 como en la enfermedad de la leucemia mielógena aguda (AML).

De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 denominado también indistintamente B4, es una IgG₁ murina que se une al antígeno CD19 en las células B (Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)) y puede usarse si las células diana son células B o células enfermas que expresan este antígeno tal como en el linfoma no Hodgkin o en la leucemia linfoblástica crónica.

Además, el anticuerpo monoclonal C242 que se une al antígeno CanAg (Patente U.S. No. 5.552.293) puede usarse para tratar tumores que expresan CanAg, tales como cánceres colorrectal, pancreático, de pulmón de células no pequeñas y gástrico. HuC242 es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal C242 que está descrita en la patente U.S. No. 5.552.293 y para el que el hibridoma está depositado con el Número de identificación ECACC 90012601. Una forma humanizada puede prepararse aplicando la metodología de injerto de CDR (Patentes U.S. Nos. 5.585.089; 5.693.761; y 5.693.762) o la metodología de modificación de superficie (Patente U.S. No. 5.639.641). HuC242 también puede usarse para tratar tumores que expresan CanAg, tales como cánceres colorrectal, pancreático, de pulmón de células no pequeñas y gástrico.

Además, el anticuerpo trastuzumab puede usarse para tratar cáncer de mama y otros cánceres, tales como cánceres de próstata y de ovario que expresan el antígeno Her2.

Los anticuerpos anti-IGF-IR que se unen al receptor del factor de crecimiento insulina también son útiles.

El cáncer de ovario y el cáncer de próstata pueden ser tomados como diana con éxito, por ejemplo, con un anticuerpo anti-MUC1, tal como anti-HMFG-2 (Taylor-Papadimitriou et al., 28 Int. J. Cancer 17-21, 1981) o hCTM01 (56 Cancer Res. 5179-5185, 1996) y un anti-PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), tal como J591 (Liu et al. 57 Cancer Res. 3629-3634, 1997) respectivamente.

También pueden usarse moléculas distintas de anticuerpos para tomar como diana poblaciones celulares específicas. Por ejemplo, GM-CSF, que se une a células mieloides, puede usarse como un agente de unión a células para tomar como diana células enfermas de leucemia mielógena aguda. Además, IL-2, que se une a células T activadas, puede usarse para la prevención del rechazo de injertos trasplantados, para terapia y prevención de la enfermedad de injerto frente a huésped y para el tratamiento de leucemia de células T aguda. MSH, que se une a los melanocitos, puede usarse para el tratamiento del melanoma. El ácido fólico puede usarse para tomar como diana el receptor de folato expresado en el tumor de ovario y otros tumores. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) puede usarse para tomar como diana cánceres escamosos tales como de pulmón y de cabeza y cuello. La somatostatina puede usarse para tomar como diana neuroblastomas y otros tipos de tumores. Los cánceres de mama y de testículos pueden ser tomados como diana con éxito con estrógeno (o análogos de estrógeno) o andrógeno (o análogos de andrógeno) respectivamente como agentes de unión a células.

Reactivos de Entrecruzamiento

El maitansinoide se une al agente de unión a células mediante un reactivo de entrecruzamiento que, cuando reacciona, forma un conector no escindible entre el maitansinoide y el agente de unión a células.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "conector" es cualquier resto químico que une un agente de unión a células covalentemente a un maitansinoide. En algunos casos, el maitansinoide proporciona parte del conector. Por ejemplo, DM1, un maitansinoide que contiene tiol (Fig. 2), es un derivado del maitansinoide natural, maitansina, y

proporciona parte del conector. La cadena lateral en el grupo hidroxilo C-3 de la maitansina termina en $-\text{CO}-\text{CH}_3$, la cadena lateral de DM1 termina en $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$. Por lo tanto, el conector final se ensambla a partir de dos piezas, el reactivo de entrecruzamiento introducido en el agente de unión a células y la cadena lateral del DM1.

5 Los conectores escindibles son conectores que pueden escindirse en condiciones suaves, es decir, condiciones en las cuales la actividad del fármaco maitansinoide no se ve afectada. Muchos conectores conocidos entran en esta categoría y se describen más adelante.

Los conectores que contienen disulfuro con conectores escindibles a través de intercambio de disulfuro, que puede ocurrir en condiciones fisiológicas.

10 Los conectores lábiles a ácido con conectores escindibles a pH ácido. Por ejemplo, determinados compartimentos intracelulares, tales como los endosomas y los lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5) y proporcionan condiciones adecuadas para escindir los conectores lábiles a ácido.

Los conectores que son foto-lábiles son útiles en la superficie corporal y en muchas cavidades corporales que son accesibles para la luz. Además, la luz infrarroja puede penetrar los tejidos.

15 Algunos conectores pueden escindirse por peptidasas. Sólo determinados péptidos se escinden fácilmente en el interior o exterior de las células, véase por ejemplo, Trouet et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) y Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Además, los péptidos están compuestos por α -aminoácidos y enlaces peptídicos, que químicamente son enlaces amida entre el carboxilato de un aminoácido y el grupo α -amino de un segundo aminoácido. Otros enlaces amida, tal como el enlace entre un carboxilato y el grupo ϵ -amino de la lisina, se entiende que no son enlaces peptídicos y se consideran no escindibles.

20 Algunos conectores pueden escindirse por esterases. De nuevo, sólo determinados ésteres pueden escindirse por esterases presentes en el interior o exterior de las células. Los ésteres se forman por la condensación de un ácido carboxílico y un alcohol. Los ésteres simples son ésteres producidos con alcoholes simples, tales como alcoholes alifáticos, y alcoholes pequeños cíclicos y pequeños aromáticos. Por ejemplo, los presentes inventores no encontraron ninguna esterasa que escindiera el éster en C-3 de maitansina, ya que el componente de alcohol del éster, maitansinol, es muy grande y complejo.

25 Un conector no escindible es cualquier resto químico que es capaz de unir un maitansinoide a un agente de unión a células de una manera estable, covalente y que no entra en las categorías listadas anteriormente como conectores escindibles. Así, los conectores no escindibles son sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácidos, escisión inducida por la luz, escisión inducida por peptidasas, escisión inducida por esterases y escisión de enlace disulfuro.

30 "Sustancialmente resistente" a la escisión significa que el enlace químico en el conector o adyacente al conector en al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 99% de la población de conjugado agente de unión a células maitansinoide permanece no escindible por un ácido, un agente de escisión foto-lábil, una peptidasa, una esterasa o un compuesto químico o fisiológico que escinde el enlace químico (tal como un enlace disulfuro) en un conector escindible, durante unas pocas horas a varios días de tratamiento con cualquiera de los agentes descritos anteriormente.

35 Además, "no escindible" se refiere a la capacidad del enlace químico en el conector o adyacente al conector de soportar la escisión inducida por un ácido, un agente de escisión foto-lábil, una peptidasa, una esterasa o un compuesto químico o fisiológico que escinde un enlace disulfuro, en condiciones en las cuales el maitansinoide o el agente de unión a células no pierde su actividad.

40 Un experto en la técnica distinguirá fácilmente los conectores no escindibles de los escindibles.

45 Un ejemplo de un control apropiado para ensayar si un conector es sustancialmente resistente a la escisión es un conector con un enlace químico, tal como un enlace disulfuro, que es susceptible a la escisión por cualquiera de los agentes descritos anteriormente. Se puede ensayar si un conector es sustancialmente resistente a la escisión midiendo la estabilidad de los conjugados por ELISA, HPLC u otro medio adecuado, durante un periodo de tiempo que se extiende desde entre unas pocas horas a varios días, típicamente 4 horas a 5 días. Los ensayos ELISA pueden usarse para medir el nivel de conjugado estable en la concentración plasmática.

50 Los conectores no escindibles también se caracterizan porque la vida media *in vivo* de los conjugados que comprenden conectores no escindibles es generalmente aproximadamente 20% mayor que la de los conjugados que comprenden conectores escindibles. En ratones, la vida media *in vivo* de conjugados IgG-maitansinoide unidos mediante conectores no escindibles es al menos 4 días.

Los reactivos de entrecruzamiento adecuados que forman conectores no escindibles entre el maitansinoide y el agente de unión a células son muy conocidos en la técnica y pueden formar conectores no escindibles que comprenden un átomo de azufre (tal como SMCC) o que carecen de un átomo de azufre.

5 Los reactivos de entrecruzamiento preferidos que forman conectores no escindibles entre el maitansinoide y el agente de unión a células comprenden un resto basado en maleimido o haloacetilo. Según la presente descripción, dichos conectores no escindibles se dice que derivan de un resto basado en maleimido o haloacetilo. Los reactivos de entrecruzamiento que comprenden un resto basado en maleimido incluyen *N*-succinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-
10 amidocaproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), *N*-succinimidil éster del ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), *N*-succinimidil éster del ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster *N*-hidroxisuccinimida del ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), éster de *N*-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida [AMAS], succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), *N*-succinimidil 4-(*p*-maleimidofenil)-butirato (SMPB) y *N*-(*p*-maleimidofenil)isocianato (PMPI) (véase la Fig. 15 para estructuras representativas de reactivos de entrecruzamiento basados en maleimido). Estos reactivos de entrecruzamiento forman
15 conectores no escindibles derivados de restos basados en maleimido.

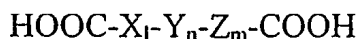
Los reactivos de entrecruzamiento que comprenden un resto basado en haloacetilo incluyen *N*-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), *N*-succinimidil yodoacetato (SIA), *N*-succinimidil bromoacetato (SBA) y *N*-succinimidil 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP) (véase la Fig. 16 para estructuras representativas de agentes de entrecruzamiento basados en haloacetilo). Estos reactivos de entrecruzamiento forman conectores no escindibles
20 derivados de restos basados en haloacetilo.

Aunque los ésteres activos descritos en las Figs. 15 y 16 están comprendidos por *N*-succinimidil y sulfosuccinimidil ésteres, también pueden usarse otros ésteres activos, tales como *N*-hidroxi ftalimidil ésteres, *N*-hidroxi sulfoftalimidil ésteres orto-nitrofenil ésteres, para-nitrofenil ésteres, 2,4-dinitrofenil ésteres, 3-sulfonil-4-nitrofenil ésteres, 3-carboxi-4-nitrofenil ésteres, pentafluorofenil ésteres y sulfonil tetrafluorofenil ésteres.

25 Los reactivos de entrecruzamiento particularmente preferidos forman conectores no escindibles que no contienen un átomo de azufre. La Fig. 21 muestra una molécula de maitansinoide derivatizada con un reactivo de entrecruzamiento que deriva de un ácido α,ω -dicarboxílico (un ácido alcano o alqueno en el que el alcano o alqueno tiene 3-24 átomos de carbono). Cuando reacciona con el agente de unión a células, el reactivo de entrecruzamiento formará un conector no escindible que no contiene azufre (conector no escindible que no contiene S).

30 La molécula de maitansinoide de la Fig. 21 se prepara como sigue. En primer lugar, se prepara un monoéster de ácido adípico (también conocido como ácido hexanodioico o ácido 1,6-hexanodicarboxílico) por tratamiento con un equivalente de 2-trimetilsililetanol en presencia de dicitlohexilcarbodiimida. La activación del grupo ácido carboxílico remanente con cloroformato de isobutilo, seguido de reacción con *N*-metil-L-alanina, proporciona la *N*-metil-L-alanina acilada. La reacción con maitansinol en presencia de dicitlohexilcarbodiimida y cloruro de cinc, seguido de la eliminación del grupo protector trimetilsililo con fluoruro de tetrabutilamonio, proporciona el éster maitansinoide que porta un grupo carboxi libre. La esterificación del grupo carboxilo por reacción con sulfo *N*-hidroxisuccinimida en presencia de dicitlohexilcarbodiimida proporciona el éster activo de maitansinol que puede reaccionar con un agente de unión a células para proporcionar un conjugado no escindible que no contiene un átomo de azufre.

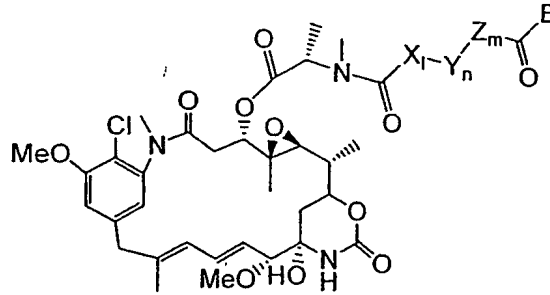
40 Los conectores no escindibles que no contienen un átomo de azufre también pueden derivar de otros restos basados en ácido dicarboxílico usando el método descrito anteriormente. Otros restos basados en ácido dicarboxílico adecuados incluyen pero no están limitados a ácidos α,ω -dicarboxílicos de fórmula general (IV):



(IV)

45 En la fórmula (IV), X es un grupo alquilo, alqueno o alquino lineal o ramificado que tiene 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalqueno que porta 3 a 10 átomos de carbono, Z es un grupo aromático sustituido o no sustituido que porta 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en el que el heteroátomo se selecciona de N, O o S, y en el que l, m y n son cada uno 0 ó 1, siempre que todos ellos no sean 0 al mismo tiempo.

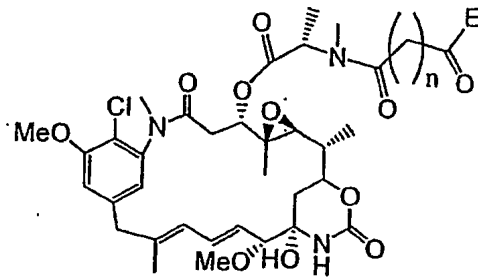
Los maitansinoides derivatizados para contener un éster activo que pueden hacerse reaccionar directamente con un agente de unión a células para formar un conjugado que tiene un conector no escindible que no contiene S pueden representarse por la fórmula 5:



5

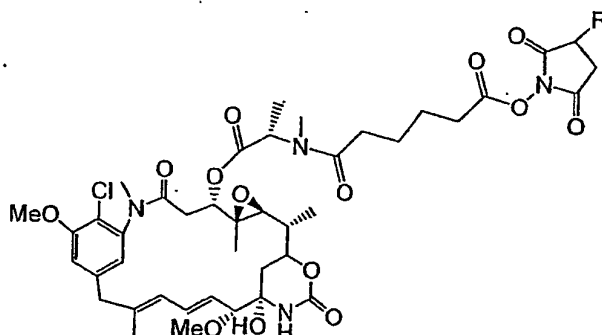
- 5 en la que X, Y, Z, I, m y n se definen todos como para la fórmula (IV) anterior, y en la que además E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como N-hidroxi succinimidil y sulfosuccinimidil ésteres, N-hidroxi ftalimidil éster, N-hidroxi sulfotalimidil éster orto-nitrofenil éster, para-nitrofenil éster, 2,4-dinitrofenil éster, 3-sulfonil-4-nitrofenil éster, 3-carboxi-4-nitrofenil éster, pentafluorofenil éster y sulfonil tetrafluorofenil éster.

Se prefiere un maitansinoide derivatizado representado por la fórmula 6:



6

- 10 en la que n representa un número entero de 3 a 24 y E tiene la misma definición que para el maitansinoide de fórmula 5.
Un caso más preferido es el maitansinoide derivatizado representado por la fórmula 7:



7

en la que R es H o $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$.

Los compuestos de las fórmulas 5, 6 y 7 son maitansinoides nuevos.

5 Los ejemplos de grupos alquilo, alqueno o alquino lineales que tienen 2 a 20 átomos de carbono incluyen, pero no están limitados a, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, propenilo, butenilo y hexenilo.

Los ejemplos de grupos alquilo, alqueno o alquino ramificados que tienen 2 a 20 átomos de carbono incluyen isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, isopentilo, 1-etil-propilo, isobutenilo, isopentenilo, etinilo, propinilo (propargilo), 1-butenilo, 2-butenilo y 1-hexinilo.

10 Los ejemplos de grupos cicloalquilo o cicloalqueno que tienen 3 a 10 átomos de carbono incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo y cicloheptadienilo.

Los ejemplos de grupos aromáticos que contienen 6 a 10 átomos de carbono incluyen fenilo y naftilo.

Los ejemplos de grupos aromáticos sustituidos incluyen nitrofenilo y dinitrofenilo.

Los grupos aromáticos heterocíclicos incluyen grupos que tienen un anillo de 3 a 10 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados de N, O o S.

15 Los ejemplos de grupos aromáticos heterocíclicos sustituidos y no sustituidos incluyen piridilo, nitro-piridilo, pirililo, oxazolilo, tienilo, tiazolilo y furilo.

Los radicales heterocicloalquilo incluyen compuestos cíclicos, que comprenden sistemas de anillos de 3 a 10 miembros, que contienen uno o dos heteroátomos, seleccionados de N, O o S.

20 Los ejemplos de radicales heterocicloalquilo incluyen dihidrofurilo, tetrahydrofurilo, tetrahydropirolilo, piperidinilo, piperazinilo y morfolino.

Los ejemplos de ácidos α,ω -dicarboxílicos de la fórmula general $\text{HOOC-X}_l\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$ incluyen ácido adípico, ácido glutárico, ácido pimélico, ácido hexeno-1,6-dioico, ácido penteno-1,5-dioico, ácido ciclohexano-dioico y ácido ciclohexeno-dioico.

Síntesis de conjugados citotóxicos

25 Los conjugados de agentes de unión a células y maitansinoides pueden formarse usando cualquiera de las técnicas conocidas actualmente o desarrolladas más tarde.

30 Los métodos de conjugación de agentes de unión a células con maitansinoides implican generalmente dos etapas de reacción. En un método, descrito en la Patente U.S. No. 5.208.020, un agente de unión a células, tal como un anticuerpo, puede modificarse con un reactivo de entrecruzamiento para introducir uno o más, habitualmente 1-10, grupos reactivos. El agente de unión a células modificado se hace reaccionar con uno o más maitansinoides que contienen tiol para producir un conjugado.

Alternativamente, como se describe en la Patente U.S. No. 6.441.163 B1, un maitansinoide que contiene tiol puede modificarse en primer lugar con un reactivo de entrecruzamiento, seguido de la reacción del maitansinoide modificado

con un agente de unión a células. Por ejemplo, el maitansinoide que contiene tiol puede hacerse reaccionar con los compuestos maleimido descritos en la Fig. 15 o con los compuestos haloacetilo descritos en la Fig. 16, para proporcionar un maitansinoide tioéter que porta un succinimidil o sulfosuccinimidil éster activo. La reacción de estos maitansinoides que contienen un resto conector activado con un agente de unión a células proporciona otro método para producir un conjugado agente de unión a células maitansinoide no escindible.

En otro caso, como se ha descrito anteriormente, un maitansinoide que no contiene un átomo de azufre puede derivatizarse en primer lugar con un reactivo de entrecruzamiento basado en ácido dicarboxílico, seguido de reacción con el agente de unión a células, para formar un conjugado en el que el maitansinoide está unido al agente de unión a células mediante un conector no escindible que no contiene S.

Típicamente, se une una media de 1-10 maitansinoides por anticuerpo. El conjugado puede purificarse a través de una columna de Sephadex G-25.

Los conjugados representativos de la descripción son derivados anticuerpo-maitansinoide, derivados fragmento de anticuerpo-maitansinoide, conjugados factor de crecimiento-maitansinoide, tales como derivados factor de crecimiento epidérmico (EGF)-maitansinoide, conjugados hormona-maitansinoide, tales como derivados hormona estimuladora de melanocitos (MSH)-maitansinoide, derivados hormona estimuladora del tiroides (TSH)-maitansinoide, derivados estrógeno-maitansinoide, derivados análogo de estrógeno-maitansinoide, derivados andrógeno-maitansinoide, derivados análogo de andrógeno-maitansinoide y conjugados vitamina-maitansinoide, tales como folato maitansinoide.

Los conjugados de maitansinoide de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, hormonas proteicas, factores de crecimiento proteicos y otras proteínas se preparan de la misma manera. Por ejemplo, los péptidos y anticuerpos pueden modificarse con los reactivos de entrecruzamiento no escindibles mencionados anteriormente. Una disolución de un anticuerpo en tampón acuoso puede incubarse con un exceso molar de un reactivo de entrecruzamiento que modifica el anticuerpo tal como succinimidil 4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), sulfo-SMCC, éster de -maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), sulfo-MBS, succinimidil-yodoacetato, o *N*-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), sulfo-LC-SMCC, *N*-succinimidil éster del ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), sulfo-KMUA, *N*-succinimidil éster del ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), sulfo-GMBS, éster *N*-hidroxisuccinimida del ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), sulfo-EMCS, éster de *N*-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), sulfo-AMAS, succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), sulfo-SMPH, *N*-succinimidil-4-(*p*-maleimidofenil)-butirato (SMPB), sulfo-SMPH, *N*-(*p*-maleimidofenil)isocianato (PMPi), *N*-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), *N*-succinimidil yodoacetato (SIA), *N*-succinimidil bromoacetato (SBA) y *N*-succinimidil 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP), como se describe en la bibliografía. Véase, Yoshitake et al., 101 Eur. J. Biochem. 395-399 (1979); Hashida et al., J. Applied Biochem. 56-63 (1984); y Liu et al., 18 690-697 (1979); Uto et al., 138 J. Immunol. Meth. 87-94 (1991); Rich et al. 18 J. Med. Chem. 1004-1010 (1975); Kitagawa y Aikawa, 79 J. Biochem. (Tokio) 233-236 (1976); Tanimori et al., 62 J. Immunol. Meth. 123-128 (1983); Hashida et al., 6 J. Appl. Biochem. 56-63 (1984); Thorpe et al., 140 Eur. J. Biochem. 63-71 (1984), Chrisey et al. 24 Nucl. Acid Res. 3031-3039 (1996), Annunziato et al., 4 Bioconjugate Chem. 212-218 (1993), Rector et al., 24 J. Immunol. Meth. 321-336 (1978) e Inman et al. 2 Bioconjugate. Chem. 458-463 (1991).

El anticuerpo modificado se trata entonces con el maitansinoide que contiene tiol (1,25 equivalentes molares/grupo maleimido o yodoacetilo) para producir un conjugado. Las mezclas se incuban toda la noche a aproximadamente 4°C. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se purifica por filtración en gel a través de una columna Sephadex G-25. El número de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo puede determinarse midiendo espectrofotométricamente la proporción de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. Típicamente, se unen una media de 1-10 maitansinoides por anticuerpo.

Un método preferido es modificar los anticuerpos con succinimidil 4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) para introducir grupos maleimido seguido de reacción del anticuerpo modificado con un maitansinoide que contiene tiol para proporcionar un conjugado unido por tioéter. De nuevo, resultan conjugados con 1 a 10 moléculas de fármaco por molécula de anticuerpo. Los ejemplos de conjugados anticuerpo-maitansinoide se muestran en las Figs. 17-20.

De manera similar, por ejemplo, agentes de unión a células estrógenos y andrógenos tales como estradiol y androstenodiol pueden esterificarse en el grupo hidroxilo C-17 por reacción con un cloruro de ácido carboxílico que contiene un grupo tiol protegido apropiadamente tal como cloruro de 3-S-acetilpropanoilo. También pueden emplearse otros métodos de esterificación como se describe en la bibliografía (Haslam, 36 Tetrahedron 2400-2433 (1980)). El andrógeno o estrógeno que contiene tiol protegido o libre puede hacerse reaccionar con un maitansinoide que contiene tiol para producir conjugados. Los conjugados pueden purificarse por cromatografía en columna en gel de sílice o por HPLC.

Un método particularmente preferido es modificar maitansinol con un reactivo de entrecruzamiento lo que resulta en una unión que no contiene ningún átomo de azufre, seguido de reacción del maitansinoide modificado con un anticuerpo para producir conjugados.

Eficacia terapéutica de los conjugados citotóxicos

5 Los conjugados agente de unión a células maitansinoide pueden evaluarse para su capacidad de suprimir la proliferación de varias líneas celulares *in vitro*. Por ejemplo, pueden usarse líneas celulares tales como la línea de carcinoma de colon humano COLO205, la línea celular de melanoma humano A375, la línea celular de leucemia mieloide humana HL60, la línea de carcinoma de mama humano SKBR3 o la línea celular de carcinoma epidermoide humano KB para la evaluación de la citotoxicidad de estos conjugados. Las células que se van a evaluar pueden exponerse a los
10 compuestos durante 24 horas y medirse las fracciones supervivientes de células en ensayos directos por métodos conocidos. (Véase, por ejemplo, Goldmacher et al., 135 J. Immunol. 3648-3651 (1985) y Goldmacher et al., 102 J. Cell Biol. 1312-1319 (1986)). Los valores de CI_{50} pueden calcularse a partir de los resultados de los ensayos.

Alta citotoxicidad puede definirse como que presenta una toxicidad que tiene una CI_{50} (la concentración inhibidora de una sustancia tóxica que deja una fracción superviviente de 0,5) de aproximadamente 10^{-8} o menos cuando se mide *in vitro* con células SKBR3 después de un tiempo de exposición al fármaco de 24 horas.
15

La potencia y la especificidad de diana *in vitro* de conjugados anticuerpo-maitansinoide de la descripción se muestran en la Fig. 4. Los conjugados de huC242 con DM1 usando el reactivo de entrecruzamiento SMCC son altamente potentes en la destrucción de células SKBR3 positivas para el antígeno, con un valor de CI_{50} de $3,5 \times 10^{-12}$ M. Por el contrario, las células A375 negativas para el antígeno son aproximadamente 800 veces menos sensibles lo que demuestra que los
20 conjugados de maitansinoide de la presente descripción son altamente potentes y específicos.

El conjugado huC242-SMCC-DM1 tuvo una potencia igual o mayor cuando se compara con los conjugados preparados con conectores que contienen disulfuro en ensayos de citotoxicidad clonogénicos (Fig. 6A-C) e indirectos (Fig. 7). Estos resultados fueron inesperados, tomando como base datos publicados previamente que demuestran que un anticuerpo anti-Her2 conjugado con maitansinoides mediante SMCC no mostró actividad específica (Chari et al., 52 Cancer Res. 127-133 (1992)).
25

La actividad de los conjugados preparados con el conector no escindible SMCC no está restringida a los conjugados huC242. También se observó actividad específica *in vitro* con conjugados SMCC-DM1 de trastuzumab, un anticuerpo anti-Her2; My9-6, un anticuerpo anti-CD33; KS77, un anticuerpo anti-EGFR; y N901, un anticuerpo anti-CD56 (Figs. 8A-D y 25).

Además, los conjugados con conectores no escindibles que muestran actividad específica *in vitro* no están restringidos al conector SMCC. Un conjugado huC242 de DM1 sintetizado con el conector no escindible SIAB mostró una citotoxicidad potente y específica de antígeno en ensayos clonogénicos *in vitro* (Fig. 9). Además, un conjugado de trastuzumab de DM1 sintetizado con SIAB también fue citotóxico en ensayos clonogénicos (Fig. 28). Además, un conjugado huC242-conector no escindible que no contiene S-DM1 también demostró una citotoxicidad potente y específica de antígeno en
30 ensayos clonogénicos *in vitro* (Fig. 22).
35

Los conjugados de anticuerpo con DM1 usando el conector SMCC muestran eficacia anti-tumoral frente a xenoinjertos de tumor humano en ratones (Fig. 10A-C). En primer lugar, como se muestra en la Fig. 10A, se observó una inhibición importante del crecimiento tumoral después de tratamiento de xenoinjertos de tumor de colon COLO 205 con huC242-SMCC-DM1. En este experimento, un grupo de cinco animales que presentan tumores subcutáneos establecidos se trató con huC242-SMCC-DM1 a una dosis de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de DM1 conjugado. Los tamaños de los tumores se midieron periódicamente y se representaron frente al tiempo después de la inoculación del tumor. Todos los cinco animales tratados tuvieron una remisión completa, aunque tres animales recayeron posteriormente a diferentes puntos de tiempo, mientras que dos animales permanecieron sin tumor hasta la finalización del experimento (Fig. 10A). Esta actividad anti-tumoral se observa a dosis de conjugado que no tienen efecto en el peso corporal de los ratones, una medida de la toxicidad de los fármacos. En segundo lugar, como se muestra en la Fig. 10B, el tratamiento de ratones que presentan xenoinjertos de tumor de carcinoma de colon COLO 205 con el conjugado huC242-SMCC-DM1 resultó en la regresión completa de los tumores, permaneciendo algunos ratones sin tumores detectables durante más de 2 meses después del tratamiento. En este experimento, tres grupos de cinco animales que presentan cada uno tumores SNU subcutáneos establecidos se trataron con huC242-SMCC-DM1 a dosis de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de DM1 conjugado, respectivamente. Los tamaños de los tumores se midieron periódicamente y se representaron frente al tiempo después de la inoculación del tumor. HuC242-SMCC-DM1 mostró un efecto antitumoral dependiente de la dosis. De nuevo, esta actividad se obtuvo a una concentración de conjugado que no mostró ningún efecto en el peso corporal de los ratones. Un conjugado trastuzumab-SMCC-DM1 también mostró una regresión tumoral significativa, en un modelo de xenoinjerto de tumor de ratón con la línea celular de carcinoma de mama MCF-7 (Fig. 10C).
40
45
50

El aclaramiento plasmático del conjugado anticuerpo-maitansinoide sintetizado con el conector no escindible SMCC es muy lento y comparable con el aclaramiento del anticuerpo solo. Esto contrasta de forma marcada con el aclaramiento plasmático de conjugados preparados con enlaces disulfuro relativamente lábiles tales como huC242-SPP-DM1. Por ejemplo, la vida media para aclaramiento del conjugado SMCC es aproximadamente 320 horas, mientras que la vida media para el conjugado SPP está en el intervalo de 40-50 horas (Fig. 11). Sin embargo, el aclaramiento del componente anticuerpo para cada tipo de conjugado es idéntico, lo que sugiere que la diferencia en la velocidad de aclaramiento medida del conjugado se debe a la pérdida del maitansinoide del conjugado de anticuerpo en el caso del conjugado SPP-DM1. La unión con SMCC no escindible es por lo tanto mucho más resistente a las actividades de escisión del maitansinoide-conector presentes *in vivo* que el conjugado SPP-DM1. Además, la velocidad de aclaramiento disminuida para los conjugados unidos por SMCC, comparada con los conjugados SPP-DM1, da lugar a un incremento de cerca de 5 veces en la exposición global del animal al maitansinoide según se mide por el área bajo la curva (AUC). Esta exposición incrementada podría tener un impacto sustancial en la eficacia del fármaco en algunos casos.

Los conjugados de maitansinoide preparados con conectores no escindibles tales como SMCC muestran una tolerabilidad incrementada inesperada en ratones comparados con conjugados preparados con conectores disulfuro escindibles. Se realizó un ensayo de toxicidad aguda con una única dosis intravenosa en ratones hembra CD-1. Se realizó una comparación de la tolerabilidad de un conjugado huC242-SMCC-DM1 (no escindible) con conjugados huC242 preparados con conectores que contenían enlaces disulfuro escindibles monitorizando la muerte de los ratones (Fig. 12A y B) y signos de toxicidad (Fig. 12C y D) en una serie de cuatro dosis crecientes de cada conjugado. La dosis máxima tolerada (MTD) para el conjugado SMCC-DM1 fue mayor que la dosis más alta ensayada (150 mg/kg) mientras que la MTD para el conjugado unido por disulfuro SPP-DM1 estuvo en el intervalo de 45-90 mg/kg. A 150 mg/kg, todos los ratones en el grupo tratado con SMCC-DM1 sobrevivieron, mientras que se observó una toxicidad letal para todos los ratones en el grupo tratado con SPP-DM1 a las 96 horas después del tratamiento.

Se piensa que los conjugados de maitansinoide confieren su actividad destructora celular a través de la inhibición de la polimerización de los microtúbulos. Esta inhibición de la polimerización de los microtúbulos da lugar a una parada del ciclo celular principalmente en G2/M. La parada dependiente de antígeno de las células en G2/M por los conjugados anticuerpo-maitansinoide puede monitorizarse por análisis de citometría de flujo (Fig. 13). El tratamiento de células COLO205 con el conjugado huC242-SPP-DM1 o huC242-SMCC-DM1 resulta en una parada completa en G2/M a las 6-10 horas. A las 30 horas después del tratamiento, sin embargo, algunas de las células paradas por el tratamiento con el conjugado unido por disulfuro huC242-SPP-DM1 escapan de la parada del ciclo celular y reinician la división celular. Sorprendentemente, las células tratadas con el conjugado no escindible no escapan del bloqueo del ciclo celular en este punto de tiempo posterior. La diferencia en la durabilidad de la actividad de estos dos conjugados también se refleja en el porcentaje de células muertas en el punto de tiempo de 30 horas, según se juzga por un ensayo de exclusión de tinte usando azul de tripán. Estos resultados demuestran una durabilidad inesperada de los eventos moleculares inducidos por el tratamiento con los conjugados con conector no escindible SMCC.

Un aspecto adicional de los conjugados preparados con conectores no escindibles comparado con conjugados que tienen conectores disulfuro escindibles es la ausencia de actividad frente a células negativas para antígeno cuando se encuentran muy próximas a las células positivas para antígeno, denominado aquí el efecto presencial. Esto es, los conjugados preparados con conectores no escindibles tienen una actividad presencial mínima. Tanto los conjugados huC242-SPP-DM1 (escindible) como huC242-SMCC (no escindible) muestran una actividad destructora celular potente frente a la línea celular COLO205 positiva para antígeno y no tienen actividad frente a la línea celular negativa para antígeno, Namalwa, cuando se cultivan separadamente (Fig. 14A-C). Sin embargo, el tratamiento de co-cultivos de células COLO205 y Namalwa con huC242-SPP-DM1 revela una actividad destructora celular dramática del conjugado incluso frente a las células negativas para antígeno Namalwa. Por el contrario, el conjugado huC242-SMCC-DM1 no demuestra ninguna actividad presencial como ésta en estas condiciones. No se observa ninguna actividad destructora celular frente a las células Namalwa con el conjugado huC242-SMCC-DM1 incluso cuando se co-cultivan con las células positivas para antígeno COLO 205. Esta actividad presencial mínima del conjugado no escindible, según se mide en este ensayo *in vitro*, puede contribuir a la tolerabilidad incrementada del conjugado con conectores no escindibles observada en los estudios de toxicidad aguda.

Los resultados de los experimentos anteriores demuestran que los conjugados de maitansinoide con conectores no escindibles de la descripción poseen una actividad anti-tumoral enormemente mejorada comparados con conjugados de agente de unión a células maitansinoide descritos previamente.

Métodos de uso

Los conjugados descritos anteriormente pueden usarse en un método para dirigir maitansinoides a una población celular seleccionada, comprendiendo el método poner en contacto una población celular o tejido que se sospecha que contiene la población celular seleccionada con un conjugado agente de unión a células maitansinoide, en el que uno o más

maitansinoides están unidos covalentemente al agente de unión a células mediante un conector no escindible y el agente de unión a células se une a las células de la población celular seleccionada.

5 Los conjugados descritos anteriormente también pueden usarse en un método para destruir células, comprendiendo el método poner en contacto las células con un conjugado agente de unión a células maitansinoide, en el que uno o más maitansinoides están unidos covalentemente al agente de unión a células mediante un conector no escindible y el agente de unión a células se une a las células.

10 Los conjugados descritos anteriormente también pueden usarse en un método de tratamiento de afecciones que incluyen pero no están limitadas a tumores malignos, enfermedades autoinmunes, rechazos de injertos, enfermedad de injerto frente a huésped, infecciones virales, infecciones por microorganismos e infecciones por parásitos, comprendiendo el método administrar a un sujeto que necesita el tratamiento una cantidad eficaz de un conjugado agente de unión a células maitansinoide, en el que uno o más maitansinoides están unidos covalentemente al agente de unión a células mediante un conector no escindible y el agente de unión a células se une a las células enfermas o infectadas de la afección.

15 Los ejemplos de afecciones médicas que pueden tratarse según los métodos de la descripción incluyen malignidades de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario y órganos linfáticos; enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injertos, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante cardiaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto frente a huésped; infecciones virales, tales como infección por CMV, infección por VIH, SIDA, etc; e infecciones por parásitos, tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras según determina un experto en la técnica.

Los métodos pueden llevarse a la práctica *in vitro* o *in vivo*.

25 Los conjugados descritos anteriormente pueden usarse en un método de uso *in vitro* para tratar, por ejemplo, las células de médula ósea autólogas antes de su trasplante en el mismo paciente con el fin de destruir las células enfermas o malignas; las células de médula ósea o de otro tejido antes de su trasplante con el fin de destruir las células T y otras células linfoides y prevenir la enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD); cultivos celulares con el fin de destruir todas las células excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno diana; o cultivos celulares con el fin de destruir las células variantes que expresan el antígeno no deseado; comprendiendo el método tratar las células con una cantidad eficaz de un conjugado agente de unión a células maitansinoide, en el que uno o más maitansinoides están unidos covalentemente al agente de unión a células mediante un conector no escindible y el agente de unión a células se une a las células que se quieren destruir.

Las condiciones de uso clínico y no clínico *in vitro* las determina fácilmente un experto en la técnica.

35 Por ejemplo, el tratamiento puede realizarse como sigue. La médula ósea se puede recoger del paciente u otro individuo e incubarse en medio que contiene suero al que se añade el agente citotóxico, con concentraciones en el intervalo de aproximadamente 10 pM a 1 nM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, las puede determinar fácilmente un experto en la técnica. Después de la incubación, las células de médula ósea pueden lavarse con medio que contiene suero y devolverse al paciente intravenosamente según métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento tal como un curso de quimioterapia ablativa o irradiación de cuerpo completo entre el momento de la recogida de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de médula tratadas pueden almacenarse congeladas en nitrógeno líquido usando equipos médicos estándar.

40 Para el uso clínico *in vivo*, el agente citotóxico puede suministrarse como una disolución o un polvo liofilizado que se ensaya para esterilidad y para niveles de endotoxinas. Los ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugados son como sigue. Los conjugados pueden proporcionarse semanalmente durante 4 semanas como un bolo intravenoso cada semana. Las dosis de bolo pueden proporcionarse en 50 a 500 ml de disolución salina normal a la que se pueden añadir 5 a 10 ml de albúmina de suero humano. Las dosificaciones serán 10 mg a 2.000 mg por administración, intravenosamente (intervalo de 100 ng a 20 mg/kg por día). Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo tratamiento semanalmente.

Los protocolos clínicos *in vivo* específicos respecto a la ruta de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones, tiempos, etc., puede determinarlos un experto en la técnica según lo justifique la situación clínica.

50 Si se desea, pueden administrarse junto con el conjugado otros agentes activos, tales como otros agentes anti-tumorales.

Nuevos Conjugados, composiciones y métodos para preparar los conjugados

5 Aunque se conocen algunos conjugados de anticuerpos y maitansinoídes unidos por un conector no escindible, otros son nuevos. Por lo tanto, se describe un conjugado agente de unión a células maitansinoíde que tiene al menos un maitansinoíde unido a un agente de unión a células mediante un conector no escindible, siempre que el conector no comprenda un grupo derivado de un agente de entrecruzamiento seleccionado del grupo que consiste en: succinimidil 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), sulfo-SMCC, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), sulfo-MBS y succinimidil-yodoacetato cuando el agente de unión a células es un anticuerpo.

Los nuevos conjugados pueden prepararse y usarse como se ha descrito anteriormente.

La composición comprende el conjugado agente de unión a células maitansinoíde y un vehículo.

10 El vehículo puede ser un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son muy conocidos y pueden determinarlos los expertos en la técnica según lo justifique la situación clínica.

15 Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene o no contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) disolución salina al 0,9% (0,9% p/v NaCl) y (3) dextrosa al 5% (p/v); y también puede contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizador tal como Tween 20.

Para estos nuevos conjugados, también se proporcionan métodos de síntesis.

Uno de los procesos para preparar el conjugado agente de unión a células maitansinoíde comprende:

- (a) proporcionar el agente de unión a células
- 20 (b) modificar el agente de unión a células con un agente de entrecruzamiento, y
- (c) conjugar el agente de unión a células modificado con un maitansinoíde o un maitansinoíde que contiene tiol proporcionando de esta manera el conector no escindible entre el agente de unión a células y el maitansinoíde o maitansinoíde que contiene tiol para producir el conjugado.

Otro proceso para preparar el conjugado agente de unión a células maitansinoíde comprende:

- 25 (a) proporcionar el maitansinoíde o un maitansinoíde que contiene tiol,
- (b) modificar el maitansinoíde o maitansinoíde que contiene tiol con un agente de entrecruzamiento para formar de esta manera un conector no escindible, y
- (c) conjugar el maitansinoíde o maitansinoíde que contiene tiol modificado con el agente de unión a células, proporcionando de esta manera el conector no escindible entre el agente de unión a células y el maitansinoíde o maitansinoíde que contiene tiol para producir el conjugado.

30 Un proceso adicional para preparar el conjugado agente de unión a células maitansinoíde comprende:

- (a) proporcionar el maitansinoíde,
- (b) modificar el maitansinoíde para proporcionar un maitansinol que no contiene azufre que tiene un éster activo, y
- 35 (c) conjugar el maitansinoíde modificado con el agente de unión a células, proporcionando de esta manera un conector no escindible que no contiene S entre el agente de unión a células y el maitansinol para producir el conjugado. Estos métodos se han descrito con detalle anteriormente y en las patentes de los Estados Unidos citadas en la presente memoria.

Ejemplos

40 La invención se ilustrará ahora por referencia a los ejemplos. A no ser que se indique otra cosa, todos los porcentajes, proporciones, partes, etc. son en peso. El Ejemplo 2 se refiere a la invención; los demás ejemplos son ejemplos de referencia.

Los tampones usados en los experimentos siguientes fueron: 50 mM fosfato de potasio (KPi)/50 mM cloruro de sodio (NaCl)/2 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), pH 6,5 (Tampón A); 1x disolución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 6,5 (Tampón B); y 0,1 M tampón KPi/2 mM EDTA a pH 7,5 (Tampón de Ensayo).

5 SMCC (Producto No. 22360, P.M. 334,33 g/mol) y SIAB (Producto No. 22329, P.M. 402,15 g/mol) se adquirieron en Pierce. El anticuerpo huC242 es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal C242, descrito en la patente U.S. No. 5.552.293, para el que el hibridoma está depositado con el Número de Identificación ECACC 90012601). El anticuerpo trastuzumab se obtuvo de Genentech. DM1 (forma tiol libre; P.M. 737,5 g/mol) se preparó como se ha descrito previamente en las patentes U.S. Nos. 5.208.020 y 6.333.410 B1.

10 La cromatografía se realizó usando columnas de cromatografía adquiridas en Amersham Biosciences (columnas preempaquetadas Sephadex G25 NAP-25 (Amersham 17-0852-02); Columnas de Desalación HiPrep 26/10, resina fina Sephadex G25, 3 conectadas en serie (Amersham 17-5087-01)). También se usaron columnas de cromatografía TSK-GEL G3000SWXL (TOSOH Bioscience, 08541), con Pre-Columna TSK SWx1 (TOSOH Bioscience 08543).

Los disolventes usados en los experimentos siguientes fueron dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA), etanol (EtOH) y 100 mM Reactivo de Ellman (DTNB, disponible en Cayman Chemical) en DMSO.

15 Ejemplo 1A

Preparación del conjugado huC242-SMCC-DM1

a. Preparación y medida del anticuerpo huC242

La concentración de anticuerpo se midió usando un coeficiente de extinción de $1,48 \text{ (mg/mL)}^{-1}$ a 280 nm y un peso molecular de 147.000 g/mol.

20 b. Preparación y medida de la disolución madre de SMCC

Se preparó una disolución 20 mM de SMCC (6,69 mg/mL) en dimetilsulfóxido (DMSO). La disolución se diluyó 1/40 en Tampón de Ensayo y se midió la absorbancia de las muestras a 302 nm. La concentración de la disolución madre se calculó usando un coeficiente de extinción de $602 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

c. Preparación y medida de la disolución madre de DM1

25 Se preparó una disolución 10 mM de DM1 (forma tiol libre) en dimetilacetamida (DMA) (7,37 mg/mL) (Fig. 2). La absorbancia de las diluciones de la disolución madre en etanol (EtOH) se midió a 280 nm. La concentración de DM1 madre se calculó usando un coeficiente de extinción de 5.700 M^{-1} a 280 nm. La concentración de grupos sulfhidrilo o tiol libres (-SH) en la preparación madre de DM1 se midió usando el reactivo de Ellman (DTNB). Se prepararon diluciones de la disolución madre en Tampón de ensayo llevado a 3% (v/v) DMA y se añadió 100 mM DTNB en DMSO (1/100 de volumen). El incremento en la absorbancia a 412 nm se midió frente a un blanco de reactivo y la concentración se calculó usando un coeficiente de extinción de $14.150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La concentración de -SH que resulta del ensayo de Ellman se usó para representar la concentración madre de DM1 en los cálculos para las condiciones de la conjugación.

d. Modificación de huC242 con el agente de entrecruzamiento SMCC

35 El anticuerpo se dividió en dos muestras; una se modificó usando un exceso molar de 7,5 veces de agente de entrecruzamiento SMCC, la otra con un exceso molar de 8,5 veces de agente de entrecruzamiento SMCC. Las muestras se hicieron reaccionar a 8 mg/mL de anticuerpo. Las reacciones se realizaron en Tampón A (95% v/v) con DMSO (5% v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.

e. Cromatografía G25 para eliminar el exceso de SMCC

40 Las mezclas de reacción de huC242-SMCC se filtraron en gel a través de columnas preempaquetadas 1,5 x 4,9 cm de resina Sephadex G25 equilibradas en Tampón A. Los volúmenes de carga y elución fueron según las instrucciones del fabricante. Las eluciones de anticuerpo modificado se ensayaron para determinar la concentración del anticuerpo usando el coeficiente de extinción descrito anteriormente. El rendimiento del anticuerpo modificado fue 74,6% para la reacción con exceso molar de 7,5 veces de SMCC y 81,6% para la reacción con exceso molar de 8,5 veces de SMCC.

f. Conjugación de huC242-SMCC con DM1

45 Las muestras de anticuerpo modificado se hicieron reaccionar con un exceso de 1,7 veces de DM1 sobre el conector (asumiendo 5 conectores por anticuerpo). Las reacciones se realizaron a 2,5 mg/mL de concentración de anticuerpo en

Tampón A (97% v/v) con DMA (3% v/v). Después de la adición de DM1, las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 horas con agitación.

g. Purificación de la conjugación por cromatografía G25

- 5 Las mezclas de reacción de la conjugación se filtraron en gel a través de columnas preempaquetadas 1,5 x 4,9 cm de resina Sephadex G25 equilibradas en Tampón B. Los volúmenes de carga y elución fueron según las instrucciones del fabricante. El número de moléculas de DM1 unidas por mol de huC242 se determinó midiendo la absorbancia del material eluido tanto a 252 nm como a 280 nm. Se encontró que la proporción DM1/anticuerpo para la muestra con un exceso molar de 7,5 veces de SMCC era 3,54 y se encontró que la proporción para la muestra con un exceso molar de 8,5 veces de SMCC era 3,65. Los rendimientos de la etapa de conjugación fueron 83,7% y 75,4%, respectivamente.
- 10 Ambos conjugados se combinaron conjuntamente, se esterilizaron por filtración y se volvieron a ensayar para concentraciones de fármaco y de anticuerpo. A la muestra combinada se le asignó Lote # 1713-146C y se analizó para unión, citotoxicidad, especificidad, grado de agregación y contenido de fármaco libre.

Tabla I. Características de huC242-SMCC-DM1

Número de Referencia	Conc. Final de Proteína (mg/ml)	Conc. Final de DM1 (µg/ml)	DM1/Ab
1713-146C	1,77	26,96	3,05

Ejemplo 1B

15 Ensayo *in vitro* de huC242-SMCC-DM1

a. Unión

- Las afinidades de unión del anticuerpo huC242 y huC242-SMCC-DM1 se compararon usando un método indirecto en células COLO 205 en el que se usaron 5×10^3 células por pocillo, con una incubación primaria de tres horas en hielo. Los resultados se muestran en la Fig. 3. El anticuerpo desnudo se unió con una KD de $5,1 \times 10^{-10}$ M y la versión conjugada se unió con una KD de $5,52 \times 10^{-10}$ M. Así, la conjugación con DM1 no parece alterar la afinidad de unión de huC242.
- 20

b. Citotoxicidad y especificidad

- La citotoxicidad y especificidad *in vitro* del conjugado huC242-SMCC-DM1 se evaluaron usando un ensayo clonogénico de exposición continua. Los resultados se muestran en la Fig. 4. HuC242-SMCC-DM1 fue eficaz en la destrucción de células positivas para antígeno SKBR3 ($CI_{50} = 3,5 \times 10^{-12}$ M). La especificidad se mostró comparando el valor de CI_{50} de las células SKBR3 diana con el de la línea celular negativa para antígeno, A375, en la que la CI_{50} del conjugado fue mayor de $3,0 \times 10^{-9}$ M.
- 25

c. Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño

- El conjugado se analizó usando una columna de exclusión por tamaño TSK3000 (Fig. 5). El pico 4 representa la fracción de monómero del conjugado mientras que los picos más tempranos representan multímero y los picos más tardíos representan fragmento. El área bajo cada curva dividida por las áreas totales de los picos representa la contribución del pico a la muestra. Se encontró que la muestra de conjugado era 96,0% monómero.
- 30

d. Fármaco libre

El porcentaje de fármaco libre se midió por ELISA y se encontró que era 4,4%.

35 Ejemplo 2A

Preparación de conjugado trastuzumab-SMCC-DM1

- El anticuerpo trastuzumab se obtuvo de Genentech para conjugación a DM1 usando el reactivo de entrecruzamiento heterobifuncional no escindible SMCC. Se cambió el tampón del anticuerpo de 50 mM fosfato de potasio/2 mM EDTA, pH 6,0 a 50 mM fosfato de potasio/50 mM cloruro de sodio/2 mM EDTA, pH 6,5 (Tampón A). El anticuerpo se hizo reaccionar con un exceso molar de 7,5 veces de conector SMCC y se purificó con resina Sephadex G25 antes de conjugarlo con DM1.
- 40

Preparación y medida del anticuerpo trastuzumab

El anticuerpo trastuzumab en tampón 50 mM fosfato de potasio/2 mM EDTA, pH 6,0, se pasó sobre una columna Sephadex G25 equilibrada con Tampón A y se eluyó en Tampón A. Todos los tampones usados en este experimento se ensayaron para no contener endotoxinas usando un método cromogénico de lisado de amebocito de Limulus (LAL) (Cambrex). La concentración de anticuerpo se midió usando un coeficiente de extinción de $1,45 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm y un peso molecular de 145,423 g.

b. Preparación y medida de la disolución madre de SMCC

Se preparó una disolución 20 mM de SMCC (6,69 mg/mL) en DMSO. La disolución se diluyó 1/40 en Tampón de Ensayo y la absorbancia de las muestras se midió a 302 nm. La concentración de la disolución madre se calculó usando un coeficiente de extinción molar de $602 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

c. Preparación y medida de la disolución madre de DM1

Se preparó una disolución 10 mM de DM1 (forma tiol libre) en DMA (7,37 mg/mL) (Fig. 2). La absorbancia de las diluciones de la disolución madre en EtOH se midió a 280 nm. La concentración de DM1 madre se calculó usando un coeficiente de extinción molar de $5.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm. La concentración de -SH libre en la preparación madre de DM1 se midió usando el reactivo de Ellman (DTNB). Las diluciones de la disolución madre se prepararon en Tampón de ensayo llevado a 3% (v/v) DMA y se añadió 100 mM DTNB en DMSO (1/100 de volumen). El incremento en la absorbancia a 412 nm se midió frente a un blanco de reactivo y la concentración se calculó usando un coeficiente de extinción de $14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La concentración de -SH que resulta del ensayo de Ellman se usó para representar la concentración de DM1 madre en los cálculos para las condiciones de la conjugación.

d. Modificación de trastuzumab con el agente de entrecruzamiento SMCC

El anticuerpo se modificó usando un exceso molar de 7,5 veces de SMCC a 20 mg/mL de anticuerpo. La reacción se realizó en Tampón A (95% v/v) con DMSO (5% v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.

e. Cromatografía G25 para eliminar el exceso de SMCC

La mezcla de reacción trastuzumab-SMCC se filtró en gel a través de una columna preempaquetada 1,5 x 4,9 cm de resina Sephadex G25 equilibrada en Tampón A. Los volúmenes de carga y elución fueron según las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences). La concentración de la disolución de anticuerpo modificado se ensayó espectrofotométricamente usando el coeficiente de extinción descrito anteriormente. El rendimiento del anticuerpo modificado fue 88% tomando como base la concentración de proteínas.

f. Conjugación de trastuzumab-SMCC con DM1

El anticuerpo modificado se hizo reaccionar con un exceso de 1,7 veces de DM1 sobre el conector (asumiendo 5 conectores por anticuerpo). La reacción se realizó a 10 mg/mL de concentración de anticuerpo en Tampón A (94% v/v) con DMA (6% v/v). Después de la adición de DM1, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 16,5 horas con agitación.

g. Purificación de la conjugación por cromatografía G25

La mezcla de reacción de la conjugación se filtró en gel a través de una columna preempaquetada 1,5 x 4,9 cm de resina Sephadex G25 equilibrada en Tampón B. Los volúmenes de carga y elución fueron según las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences). El número de moléculas de DM1 unidas por mol de trastuzumab se determinó midiendo la absorbancia tanto a 252 nm como a 280 nm del material eluido. Se encontró que la proporción DM1/anticuerpo era 3,13 y el rendimiento de la etapa de conjugación fue 95,7%. El rendimiento global de trastuzumab conjugado fue 84% tomando como base el anticuerpo de partida. El conjugado resultante se analizó para unión, citotoxicidad, especificidad, grado de agregación y contenido de fármaco libre.

Tabla II. Características de trastuzumab-SMCC-DM1

Número de Referencia	Conc. Final de Proteína (mg/ml)	Conc. Final de DM1 ($\mu\text{g/ml}$)	DM1/Ab
1762-14	6,71	106.	3,13

Ejemplo 2B

Ensayo *in vitro* de trastuzumab-SMCC-DM1

Los estudios de unión mostraron que la conjugación del anticuerpo con DM1 no afectaba la K_D aparente; tanto el anticuerpo trastuzumab desnudo como el conjugado trastuzumab-SMCC-DM1 tenían la misma afinidad de unión a placas ECD ($5,5 \times 10^{-11}$ M). La evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de la muestra mostró que el conjugado trastuzumab-SMCC-DM1 es tanto altamente tóxico (CI_{50} $3,6 \times 10^{-12}$ M en la línea celular positiva para antígeno) como específico (CI_{50} mayor de $3,0 \times 10^{-9}$ M en la línea celular negativa para antígeno).

a. Unión

La afinidad de unión del anticuerpo trastuzumab y de trastuzumab-SMCC-DM1 se comparó usando el ensayo de unión en placa HER2 ECD proporcionado por Genentech. Los resultados se muestran en la Fig. 24. Tanto el anticuerpo desnudo como la versión conjugada se unen con una K_D aparente de $5,5 \times 10^{-11}$ M. Así, la conjugación con DM1 no altera la afinidad de unión de trastuzumab.

b. Citotoxicidad y especificidad

La citotoxicidad y especificidad *in vitro* del conjugado trastuzumab-SMCC-DM1 se evaluaron usando un ensayo clonogénico de exposición continua. Los resultados se muestran en la Fig. 25. Trastuzumab-SMCC-DM1 fue eficaz en la destrucción de células positivas para antígeno SKBR3 (CI_{50} $3,6 \times 10^{-12}$ M). La especificidad se mostró cuando se comparó la CI_{50} de las células SKBR3 diana con la de la línea celular negativa para antígeno, A375, en la que la CI_{50} del conjugado fue mayor de $3,0 \times 10^{-9}$ M.

c. Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño

El conjugado se analizó usando una columna de exclusión por tamaño TSK3000 (Fig. 26). El pico 1 representa multímero, el pico 2 representa dímero y el pico 3 representa monómero. El área bajo cada curva dividida por las áreas totales de los picos representa la contribución del pico a la muestra. Se encontró que la muestra de conjugado era 95,3% monómero.

d. Análisis del fármaco libre

El porcentaje de fármaco libre se midió por ELISA y se encontró que era 3,4%.

e. Nivel de endotoxinas

El conjugado se ensayó usando un ensayo cromatográfico LAL y se encontró que contenía 0,03 EU/mg.

Ejemplo 3A

Preparación del conjugado trastuzumab-SIAB-DM1

El anticuerpo trastuzumab se obtuvo de Genentech para conjugación con DM1 usando el agente de entrecruzamiento heterobifuncional no escindible SIAB. El anticuerpo se hizo reaccionar con un exceso molar de 7,0 veces de conector SIAB a pH 6,5 y se purificó con resina Sephadex G25F. Las fracciones que contenían anticuerpo se combinaron y se hicieron reaccionar con DM1 toda la noche en condiciones estándar de conjugación de pH 6,5 y temperatura ambiente pero en oscuridad. Se tomó una alícuota del recipiente de reacción y se analizó para determinar la incorporación de DM1. La alícuota se midió después de una filtración en NAP 5 y sólo tenía 1,4 fármacos/Ab. Se añadió un exceso de 8 veces de SIAB adicional a la reacción durante 2 horas y el pH se incrementó hasta 8 justo antes de la adición de un exceso de 1,5 veces DM1/SIAB adicional. Se dejó que la reacción procediera y se purificó usando resina Sephadex G25F. El conjugado resultante contenía 3,42 moles de DM1 por mol de anticuerpo.

a. Medida del anticuerpo trastuzumab

La concentración de anticuerpo se midió usando un coeficiente de extinción de $1,45 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm y un peso molecular de 145,423 g.

b. Preparación y medida de la disolución madre de SIAB

Se preparó una disolución 18 mM de SIAB (7,2 mg/mL) en DMSO. Se registró un escaneo de longitud de onda de la disolución diluida en tampón pH 4 sólo para propósitos informativos.

45

c. Preparación y medida de la disolución madre de DM1

Se preparó una disolución aproximadamente 30 mM de DM1 (forma tiol libre) en DMA. La concentración de -SH libre en la preparación madre de DM1 se midió usando reactivo de Ellman (DTNB). Las diluciones de la disolución madre se prepararon en Tampón de ensayo llevado a 3% (v/v) DMA, y se añadió 100 mM DTNB en DMSO (1/100 de volumen). El incremento en absorbancia a 412 nm se midió frente a un blanco de reactivo y la concentración se calculó usando un coeficiente de extinción molar de $14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La concentración de -SH que resulta del ensayo de Ellman se usó para representar la concentración de DM1 madre en los cálculos para las condiciones de la conjugación.

d. Modificación de trastuzumab con el agente de entrecruzamiento SIAB

El anticuerpo se modificó usando un exceso molar de 7,0 veces de SIAB a 20 mg/mL de anticuerpo. La reacción se realizó en Tampón A (95% v/v) con DMSO (5% v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación en oscuridad.

e. Cromatografía G25 para eliminar el exceso de SIAB

La mezcla de reacción trastuzumab-SIAB se filtró en gel a través de Columnas de Desalado HiPrep 26/10 equilibradas en Tampón A. Parecía haber interferencia a 280 nm por parte del reactivo SIAB, de manera que el rendimiento del anticuerpo modificado se asumió que era 100% y se asumió una modificación de 5 conectores/anticuerpo para la determinación de la cantidad de DM1 en la reacción de conjugación.

f. Conjugación de trastuzumab-SIAB con DM1

El anticuerpo modificado se hizo reaccionar con un exceso de 1,7 veces de DM1 sobre el conector asumiendo un rendimiento de 100% y 5 agentes de entrecruzamiento/anticuerpo como se ha indicado anteriormente. La concentración de anticuerpo en la reacción se estimó que era 12,5 mg/mL y la reacción se realizó en Tampón A (97% v/v) con DMA (3% v/v). Después de la adición de DM1, la reacción se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 16,5 horas con agitación.

g. Análisis de la reacción de conjugación

Se tomó una alícuota de 0,25 mL de la mezcla de reacción y se filtró en gel sobre una columna pre-empaquetada G25 Sephadex equilibrada en Tampón B. El número de moléculas de DM1 unidas por mol de trastuzumab se determinó midiendo la absorbancia tanto a 252 nm como a 280 nm del material eluido. La proporción DM1/anticuerpo fue sólo 1,4.

h. Reacción adicional de modificación/conjugación

Se añadió un exceso molar de 8 veces de SIAB adicional y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió un exceso molar de 1,5 veces de DM1 sobre SIAB y el pH de la reacción se incrementó hasta 8 con la adición de 1 N NaOH. La reacción se incubó a temperatura ambiente en oscuridad y se filtró en gel sobre una columna de resina G25F equilibrada en Tampón B.

i. Combinación y caracterización del conjugado

Las fracciones que contenían proteína se combinaron, se filtraron y se midieron por absorbancia a 252 y 280 nm. Las muestras del conjugado se ensayaron para nivel de endotoxinas, unión, citotoxicidad específica y no específica, % de monómero y nivel de fármaco libre.

Tabla III. Características de trastuzumab-SIAB-DM1

Número de Referencia	Conc. Final de Proteína (mg/ml)	Conc. Final de DM1 (µg/ml)	DM1/Ab
1806-32	5,62	97,3	3,42

Ejemplo 3B

Ensayo *in vitro* de trastuzumab-SIAB-DM1

Los estudios de unión mostraron que la conjugación del anticuerpo con DM1 no afectaba la K_D aparente; tanto trastuzumab desnudo como trastuzumab-SIAB-DM1 tenían afinidades de unión similares ($1,2 \times 10^{-10}$ M Ab y $1,9 \times 10^{-10}$ M K_D aparente conjugado). La evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de la muestra mostró que el conjugado trastuzumab-SIAB-DM1 es tanto altamente tóxico ($CI_{50} 5 \times 10^{-12}$ M en la línea celular positiva para antígeno SKBR3) como específico (CI_{50} mayor de $3,0 \times 10^{-9}$ M en la línea celular negativa para antígeno, A375).

a. Unión

La afinidad de unión del anticuerpo trastuzumab y de trastuzumab-SIAB-DM1 se comparó usando el ensayo de unión en placa HER2 ECD proporcionado por Genentech. Los resultados se muestran en la Fig. 27. Trastuzumab desnudo y trastuzumab-SIAB-DM1 tenían afinidades de unión similares ($1,2 \times 10^{-10}$ M para el anticuerpo y $1,9 \times 10^{-10}$ M K_D aparente para el conjugado).

b. Citotoxicidad y especificidad

La evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de la muestra mostró que el conjugado trastuzumab-SIAB-DM1 es tanto altamente tóxico ($CI_{50} = 5 \times 10^{-12}$ M en la línea celular positiva para antígeno, SKBR3) como específico (CI_{50} mayor de $3,0 \times 10^{-9}$ M en la línea celular negativa para antígeno, A375). Véase la Fig. 28.

c. Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño

El conjugado se analizó usando una columna de exclusión por tamaño TSK3000 (Fig. 29). El pico 1 representa dímero y el pico 2 representa monómero. El área bajo cada curva dividida por las áreas totales de los picos representa la contribución del pico a la muestra. Se encontró que la muestra de conjugado era 96,4% monómero.

d. Fármaco libre

El porcentaje de fármaco libre se midió por ELISA y se encontró que era 0,35%.

e. Nivel de endotoxinas

El conjugado se ensayó usando un ensayo cromatográfico LAL y se encontró que contenía <0,04 EU/mg.

Ejemplo 4

Conjugación de huC242 con un reactivo de entrecruzamiento que forma un conector no escindible que no contiene S

a. Síntesis

Se preparó una disolución madre del reactivo de entrecruzamiento (véase la Fig. 21 para la estructura) en DMA, el precipitado insoluble se eliminó por centrifugación y la concentración de la disolución restante se determinó usando un coeficiente de extinción de $\epsilon^{280} = 5.700 \text{ M}^{-1}$ que es la extinción para DM1 a esta longitud de onda. Como el coeficiente de extinción real para este material no se ha medido esto sólo es una estimación de la concentración. Debe indicarse que la proporción $\epsilon^{252}/\epsilon^{280}$ para DM1 es 4,7 (en ETOH) mientras que $\epsilon^{252}/\epsilon^{280}$ para esta disolución de reactivo de entrecruzamiento (en tampón pH 7,5) se midió como 1,42 lo que sugiere bien diferentes extinciones o impurezas.

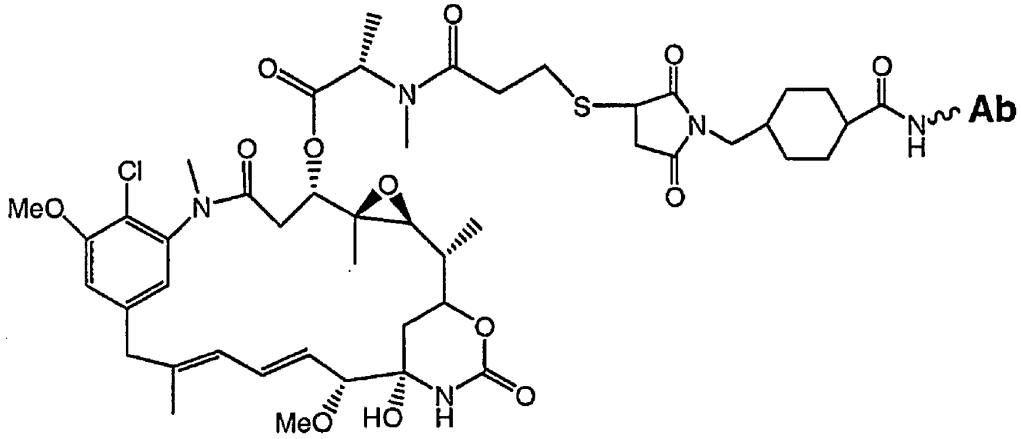
La reacción de conjugación se realizó en una escala de 2 mg usando 2,8 mg/ml de anticuerpo huC242 en 16% DMA en Tampón E, pH 7,5 (Tampón E= 50 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA). Tomando como base la concentración estimada del reactivo de entrecruzamiento de la disolución madre, se usaron 30 equivalentes de agente de entrecruzamiento/anticuerpo (un experimento anterior usando 10 eq. de agente de entrecruzamiento/anticuerpo produjo un conjugado con sólo 0,9 DM1/anticuerpo). Se dejó que la reacción continuara durante 3 horas y el conjugado se purificó pasándolo sobre una columna Nap 10 (G25). Después de filtrar (filtro Millex GV, tamaño de poro 0,2 μm), el conjugado tenía 2,56 DM1/anticuerpo (Lote # 1749-119A, recuperación de anticuerpo= 78%). Una alícuota del conjugado se examinó por HPLC (columna HiPrep) para DM1 libre y se observó un pico de DM1 considerable a 12,09'. La muestra se dializó por lo tanto en Tampón B para eliminar este pico y se volvió a ensayar. La muestra final del conjugado (Lote # 1749-124A) no tenía DM1 libre por HPLC y tenía 1,84 DM1/anticuerpo. Se realizó SEC HPLC en el conjugado para mostrar que era 97% anticuerpo monomérico.

b. Citotoxicidad y unión

Los inventores realizaron estudios de unión y de citotoxicidad en el conjugado huC242-conector no escindible que no contiene S-DM1. En primer lugar, se compararon las afinidades de unión del anticuerpo huC242, huC242-SMNP-DM3 y huC242-conector no escindible que no contiene S-DM1 a células COLO 205. Se usaron 5×10^3 células por pocillo, con una incubación primaria de tres horas en hielo. Los resultados se muestran en la Fig. 23. El conjugado huC242-conector no escindible que no contiene S-DM1 tuvo una constante de disociación aparente aproximadamente dos veces mayor que el anticuerpo libre (véase la Fig. 23). Además, el conjugado huC242-conector no escindible que no contiene S-DM1 tuvo una citotoxicidad *in vitro* comparable a huC242-SMNP-DM3 (CI_{50} del conjugado con conector no escindible que no contiene S= $7,0 \times 10^{-12}$ M) (véase la Fig. 22).

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado agente de unión a células maitansinoide que tiene la fórmula siguiente:



en la que Ab es trastuzumab.

- 5 2. Una composición que comprende el conjugado agente de unión a células maitansinoide de la reivindicación 1, y un
vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. El conjugado agente de unión a células maitansinoide de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de un tumor
maligno.
- 10 4. El conjugado agente de unión a células maitansinoide de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de un cáncer
que expresa el antígeno Her2.
5. El conjugado agente de unión a células maitansinoide de la reivindicación 4, en el que el cáncer es cáncer de mama,
cáncer de próstata o cáncer de ovario.
6. El conjugado agente de unión a células maitansinoide para uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que
el conjugado agente de unión a células maitansinoide es para administrarse con un agente anti-tumoral.

FIG. 1

SMCC (Succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato)

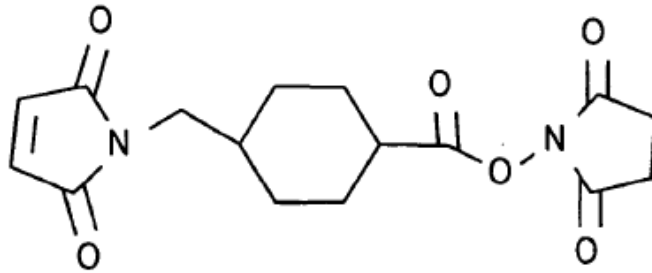


FIG. 2

DM1 (Maitansinoide tiolado)

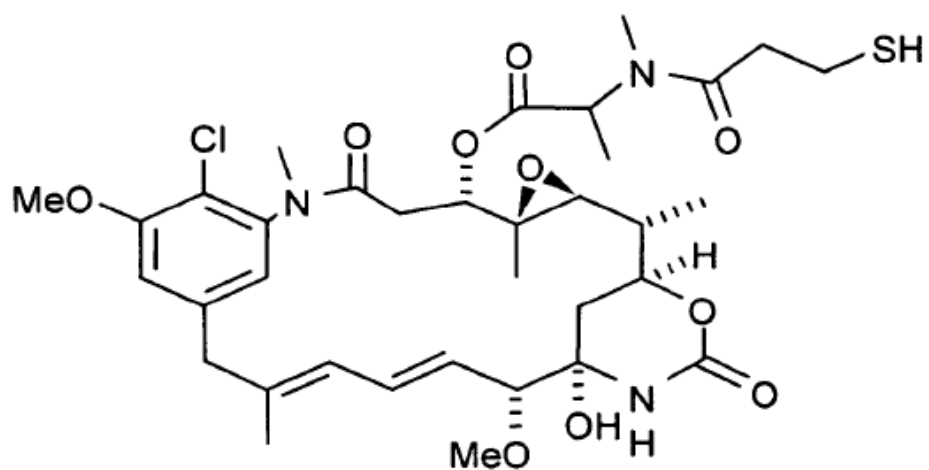
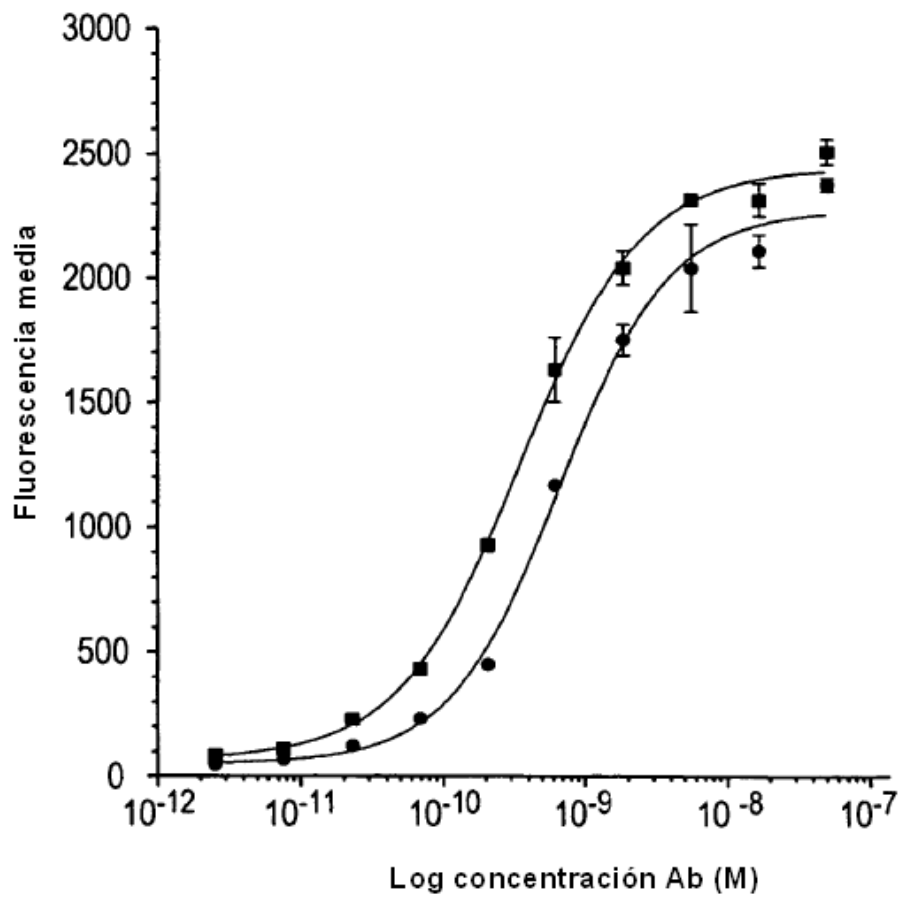


FIG. 3

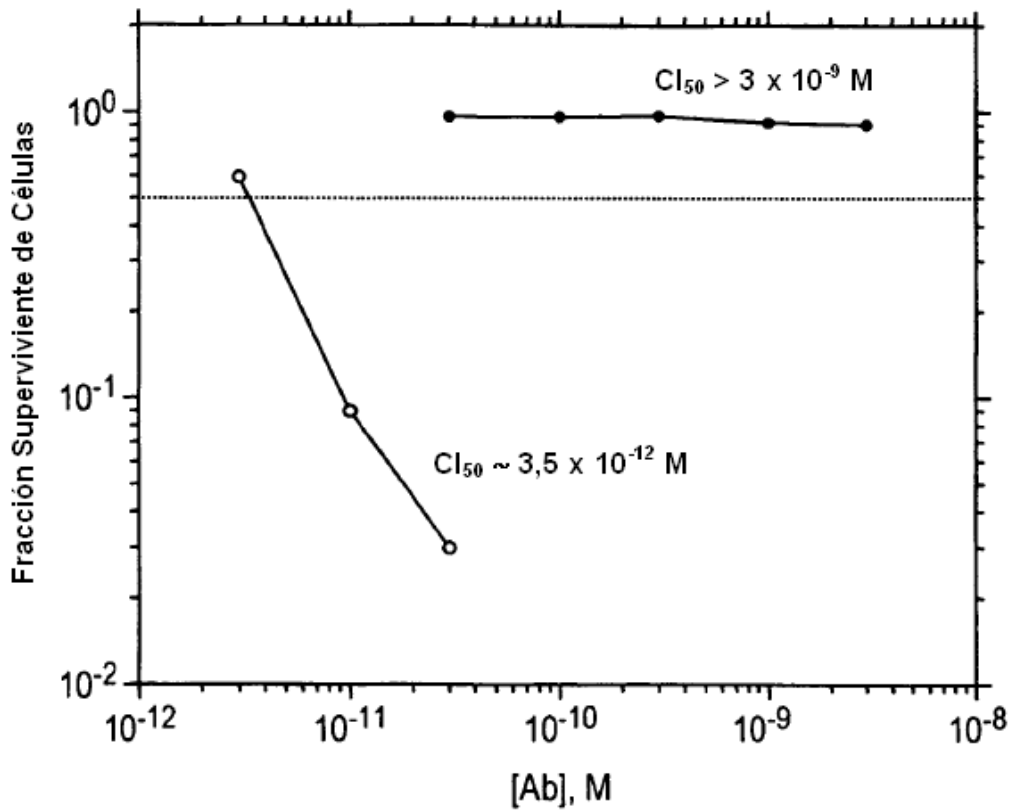
Ensayo de unión FACS del anticuerpo huC242 y el conjugado huC242 a células COLO 205



■ anticuerpo huC242, $CE_{50} = 5,1 \times 10^{-10}$ M
 ● huC242-SMCC-DM1, $CE_{50} = 5,52 \times 10^{-10}$ M

FIG. 4

Evaluación de la Potencia de huC242-SMCC-DM1,
 Ensayo Clonogénico de Exposición Continua



—○— células COLO 205
 —●— células A375

FIG. 5

Cromatografía de Exclusión por Tamaño para huC242-SMCC-DM1

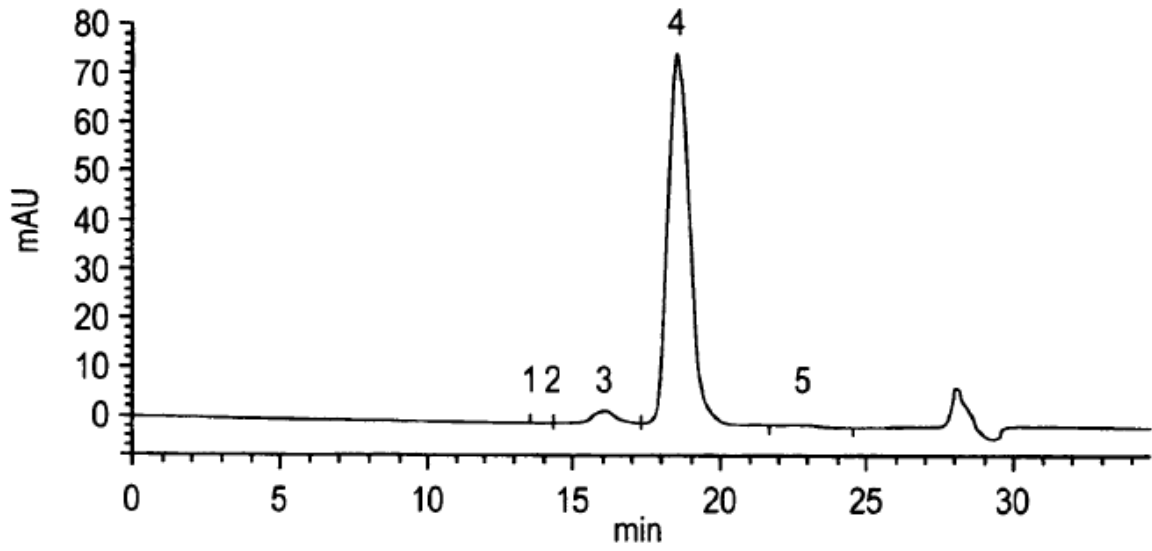
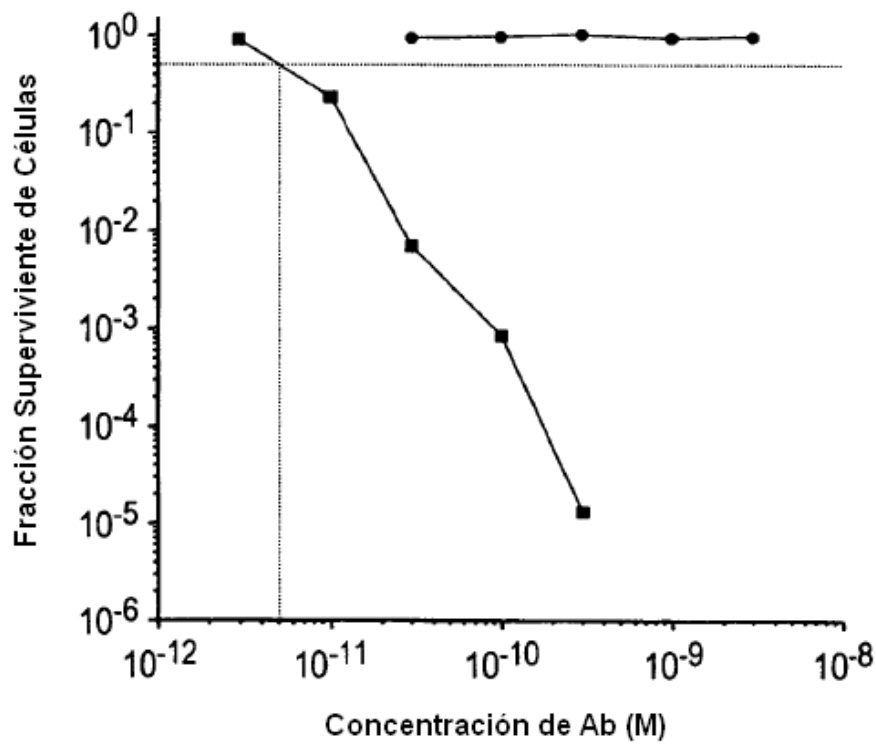


FIG. 6A

Citotoxicidad de huC242-SMCC-DM1
frente a COLO 205 (+) y A375 (-)
Ensayo Clonogénico de Exposición Continua

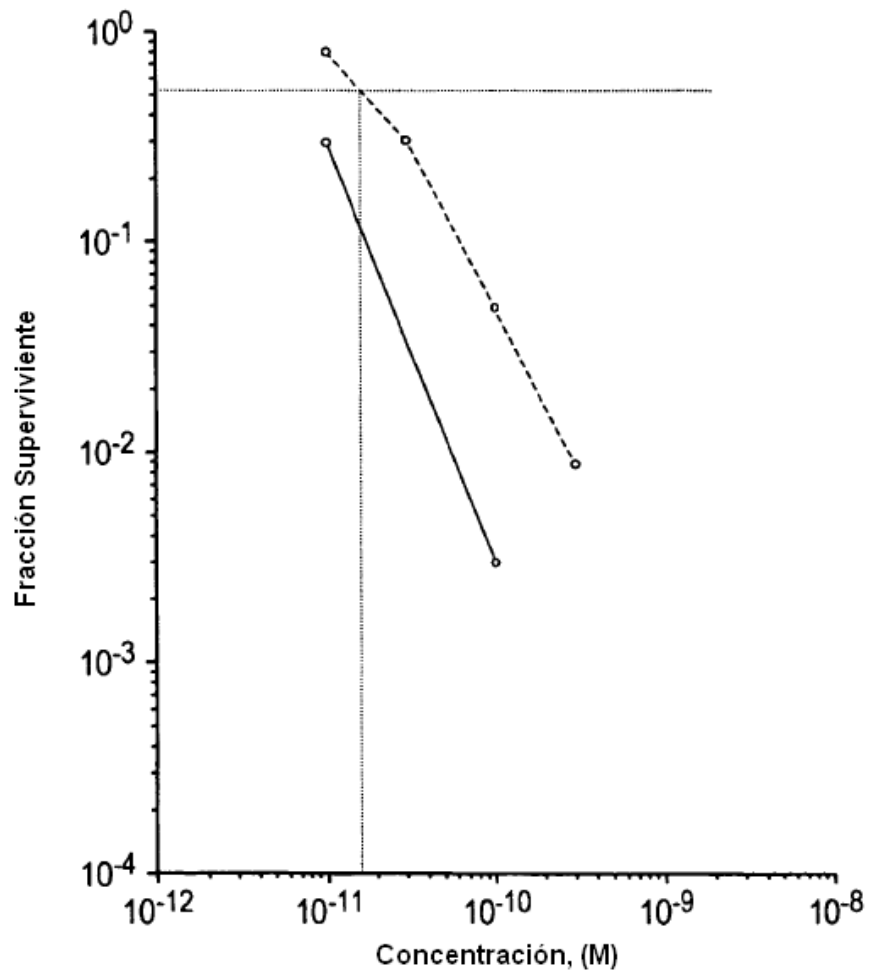


● A375

■ COLO 205
 $CI_{50} = 5 \times 10^{-12}$ M

FIG. 6B

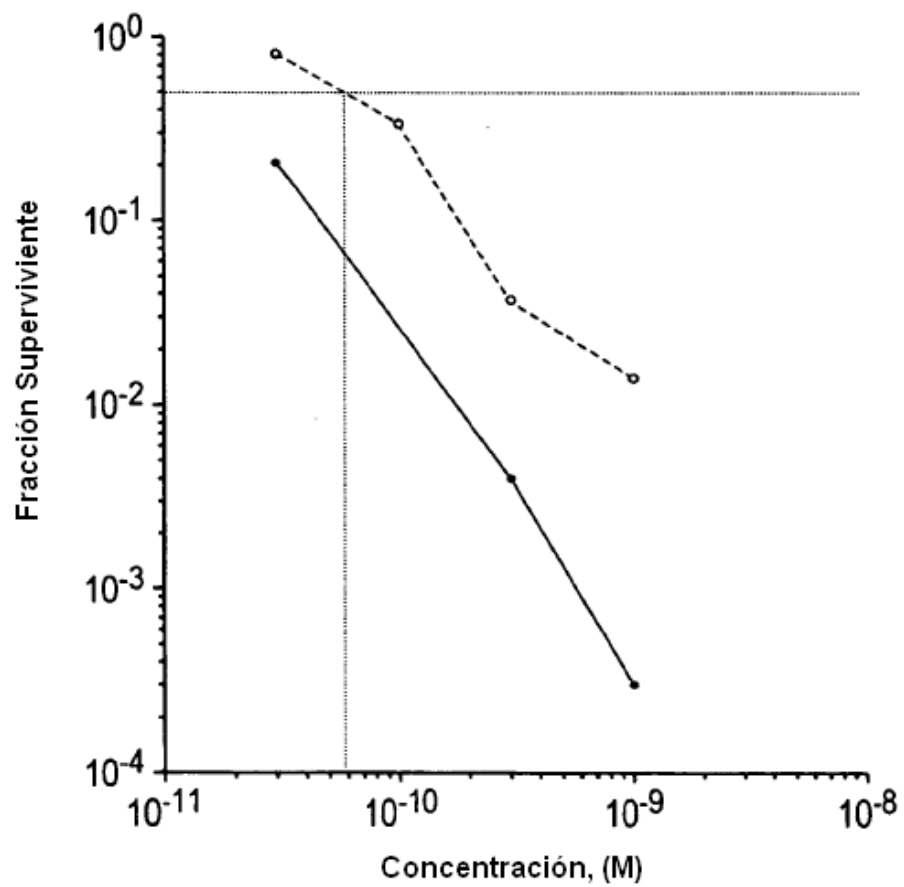
Citotoxicidad de los conjugados de huC242 frente a células COLO 205
 Ensayo Clonogénico de 24 Horas de Exposición



--○ huC242-SPP-DM1
 —● huC242-SMCC-DM1

FIG. 6C

Citotoxicidad de los conjugados de huC242 frente a células COLO 205
 Ensayo Clonogénico de 4 Horas de Exposición



--○-- huC242-SPP-DM1
 —●— huC242-SMCC-DM1

FIG. 7

Citotoxicidad In Vitro del conjugado
huC242-SMCC-DM1 frente a células COLO 205(+) y Namalwa(-)
5 días de incubación, ensayo MTT

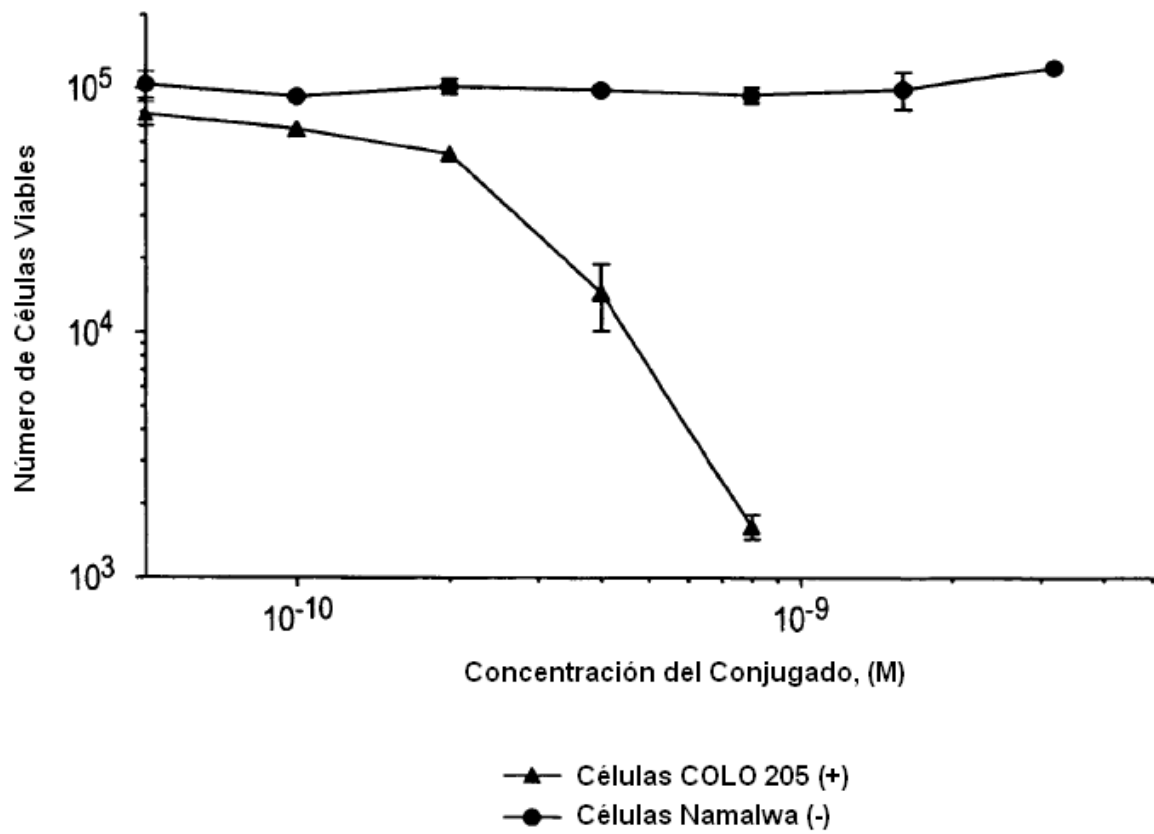
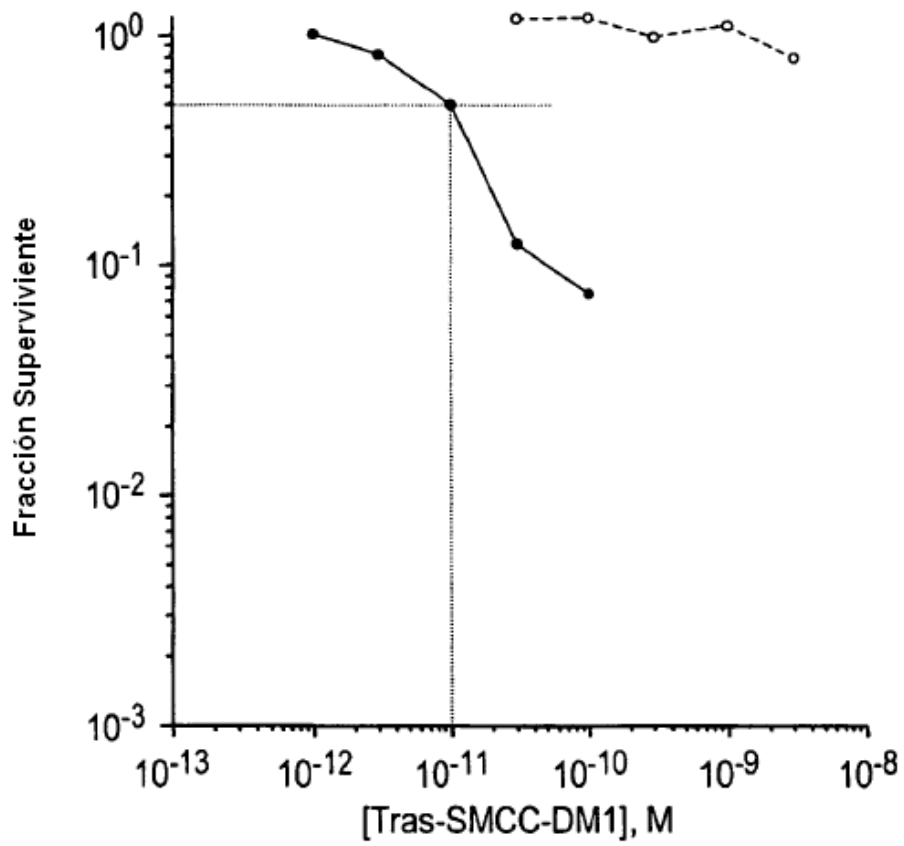


FIG. 8A

Citotoxicidad de
Trastuzumab-SMCC-DM1,
frente a células SKBR3 y A375



—●— células SKBR3, $CI_{50} = 1 \times 10^{-11}$ M
 - - - ○ - - - células A375

FIG. 8B

Evaluación de la potencia de My9-6-SMCC-DM1, frente a células THP-
 Ensayo Clonogénico de Exposición Continua

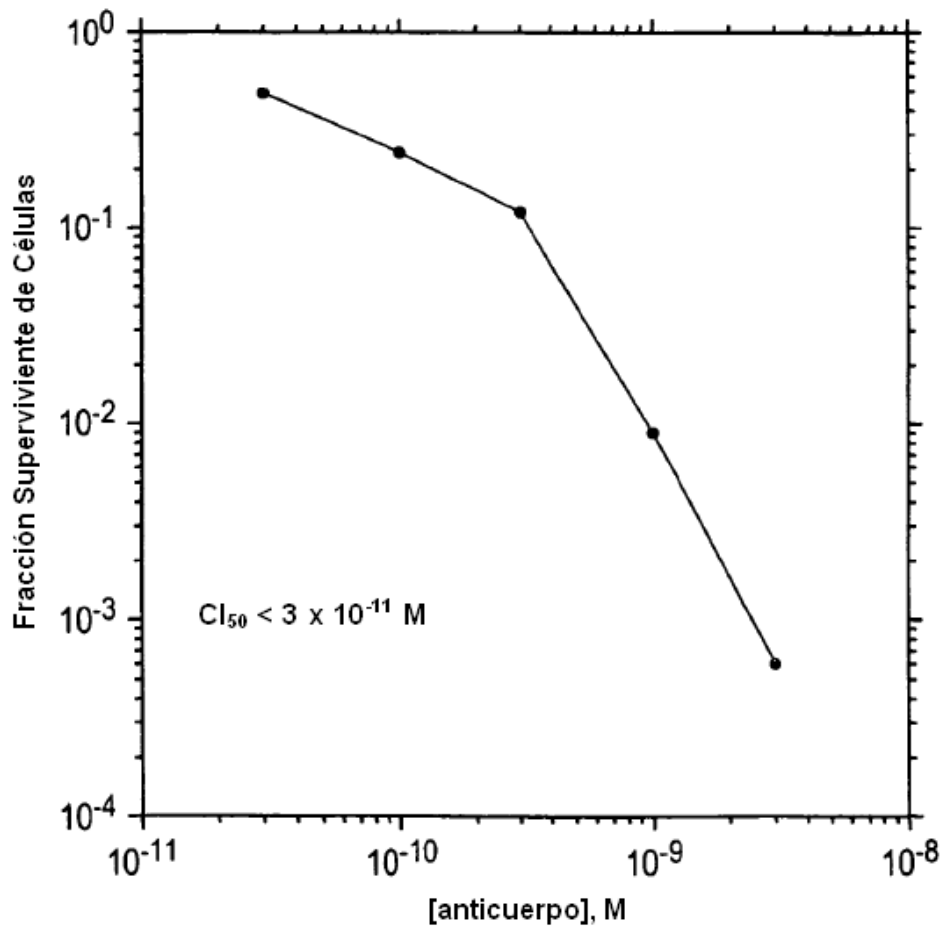


FIG. 8C

Citotoxicidad de KS77-SMCC-DM1 frente a
células A431 (+) y A375 (-)
Ensayo Clonogénico de Exposición Continua

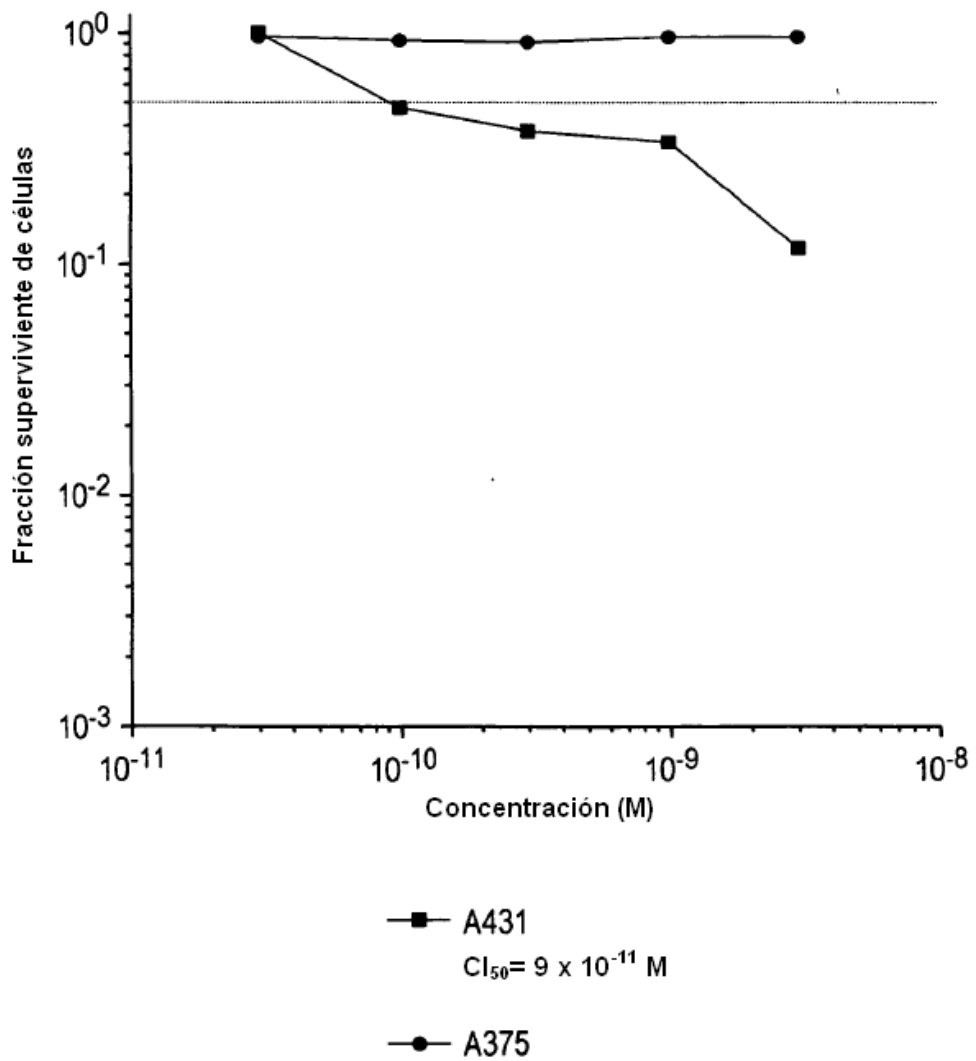
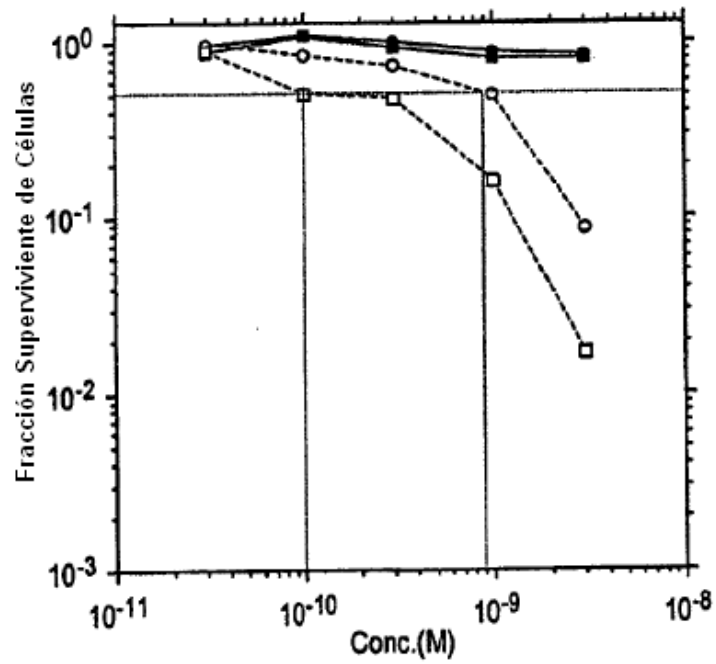


FIG. 8D

Citotoxicidad de conjugados
 N901-SMCC-DM1 frente a CHD-163 (+) y A431 (-)
 Ensayo Clonogénico de Exposición Continua



--□-- CHD-163 $Cl_{50} = 1,0 \times 10^{-10}$	—■— A431 $Cl_{50} > 3,0 \times 10^{-9}$
--○-- CHD-163 $Cl_{50} = 9,0 \times 10^{-10}$	—●— A431 $Cl_{50} > 3,0 \times 10^{-9}$

FIG. 9

Evaluación de la Potencia
de huC242-SIAB-DM1, frente a
células COLO 205 (+) y A375 (-)
Ensayo Clonogénico de Exposición Continua

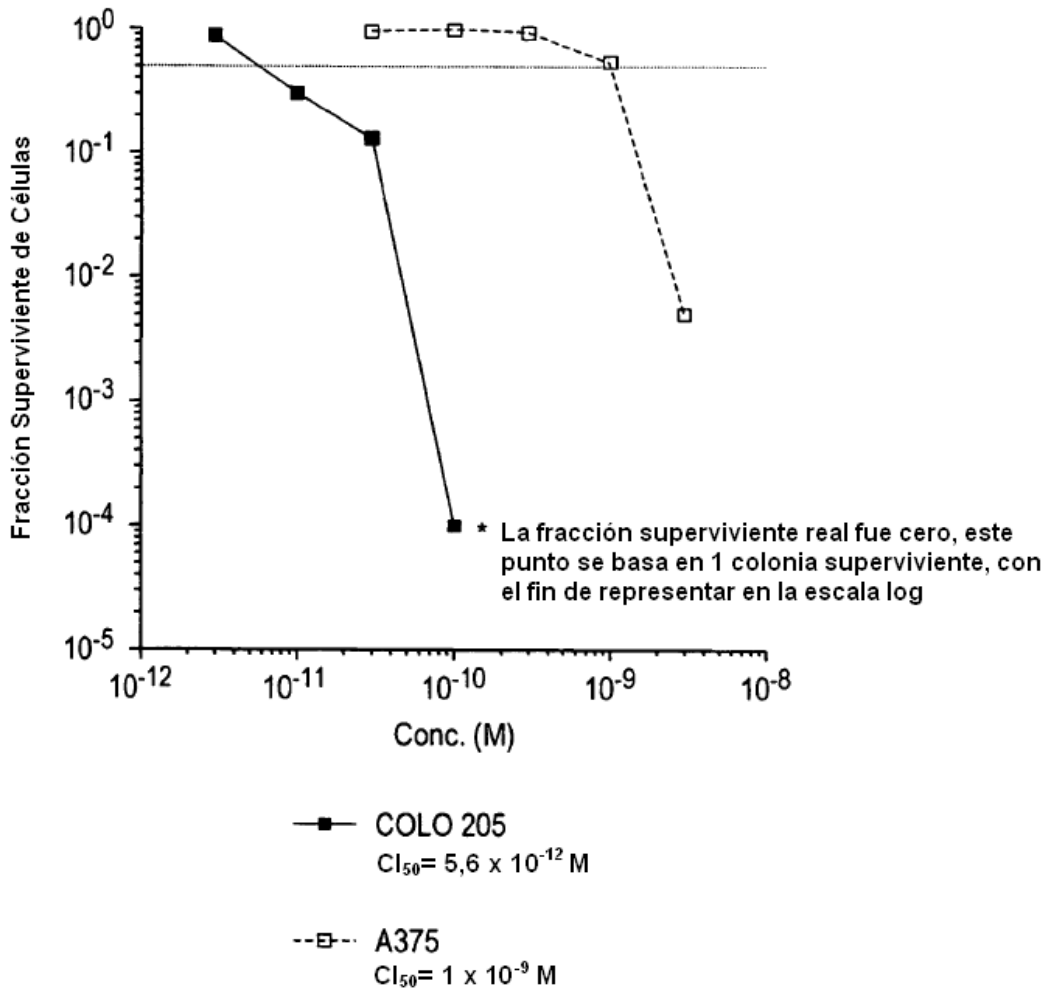


FIG. 10A

Actividad anti-tumoral de huC242-SMCC-DM1
frente a xenoinjertos de cáncer de colon
humano Colo 205 en ratones SCID

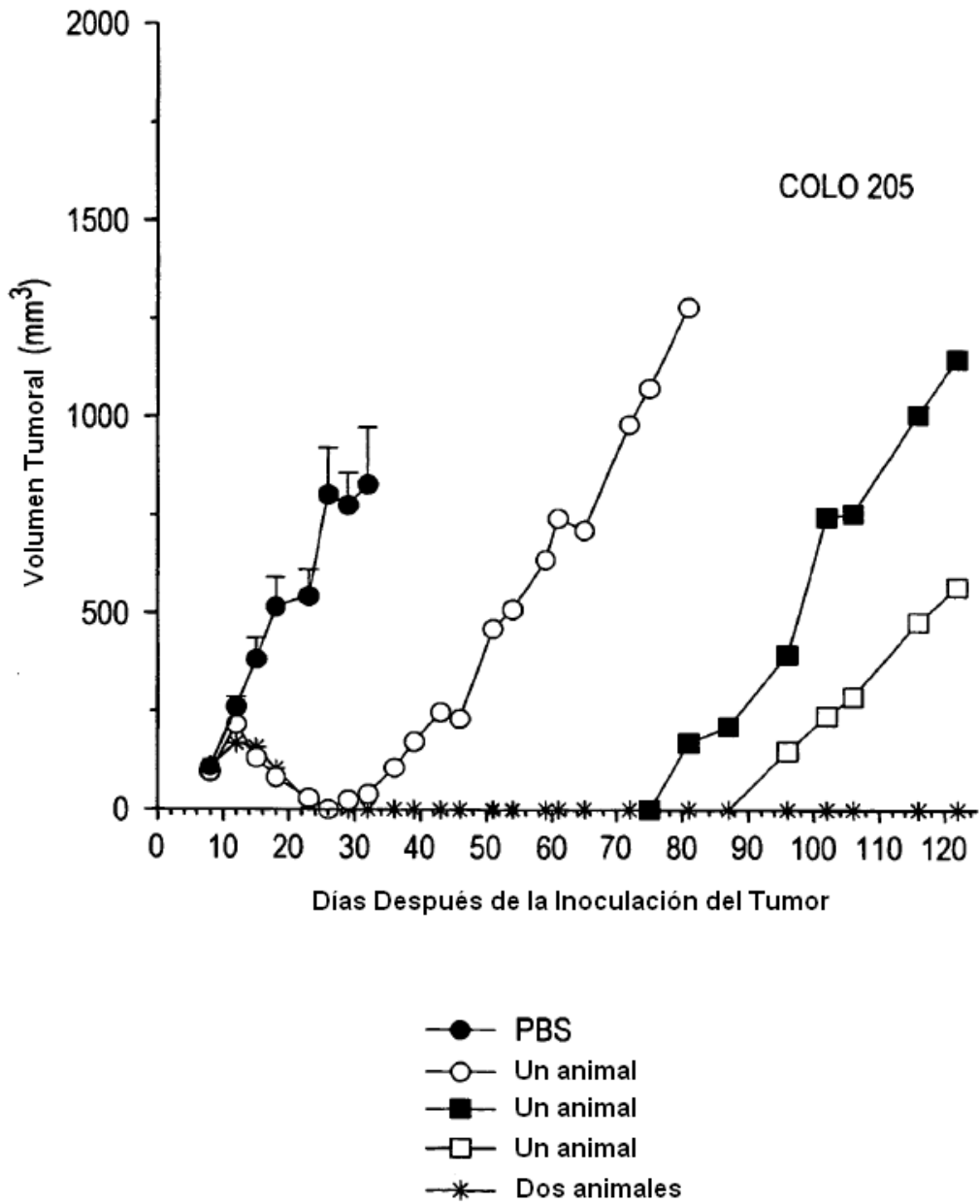


FIG. 10B

Actividad anti-tumoral de huC242-SMCC-DM1
frente a xenoinjertos de tumor gástrico
humano SNU 16 en ratones SCID

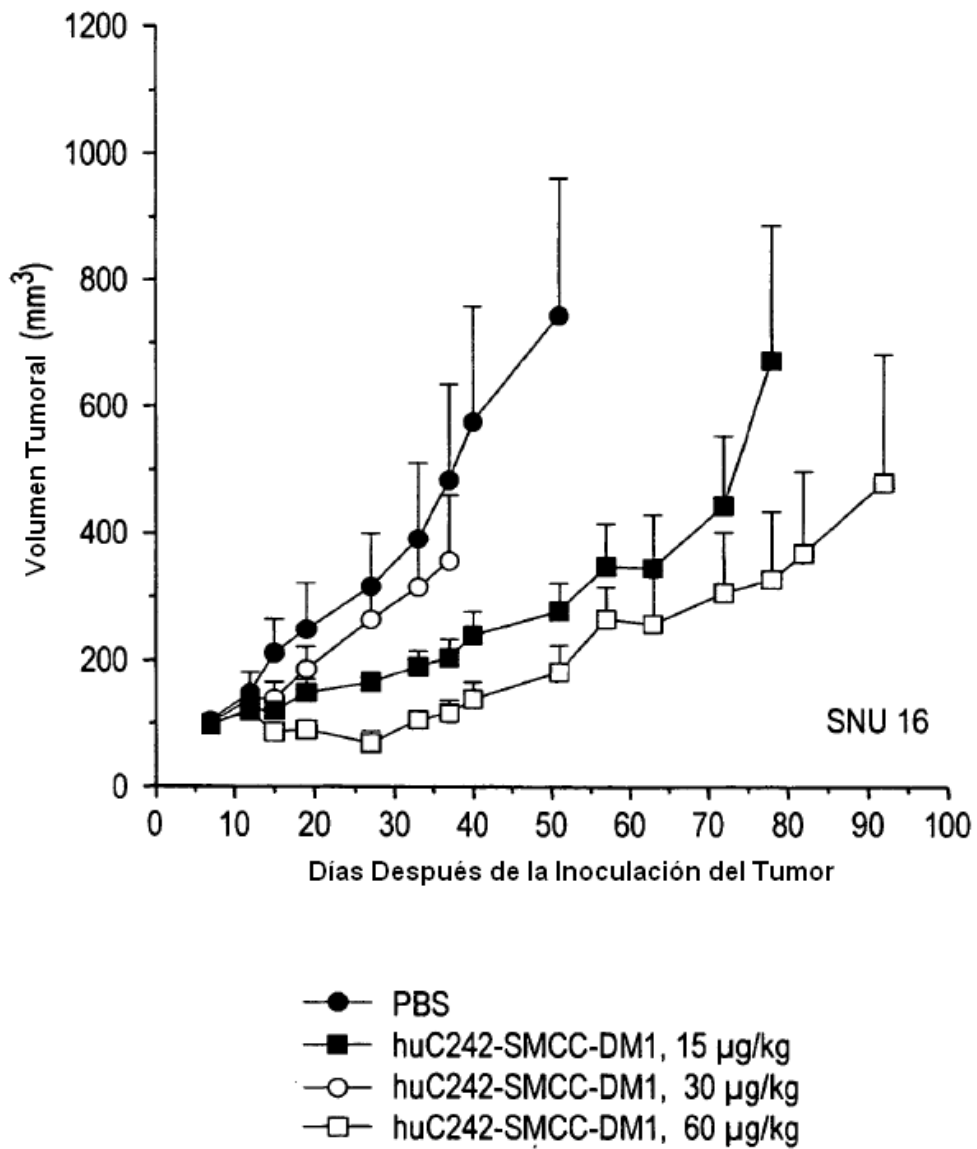


FIG. 10C

Actividad anti-tumoral de
Trastuzumab-SMCC-DM1 frente a xenoinjertos
MCF7 en ratones CB.17 SCID

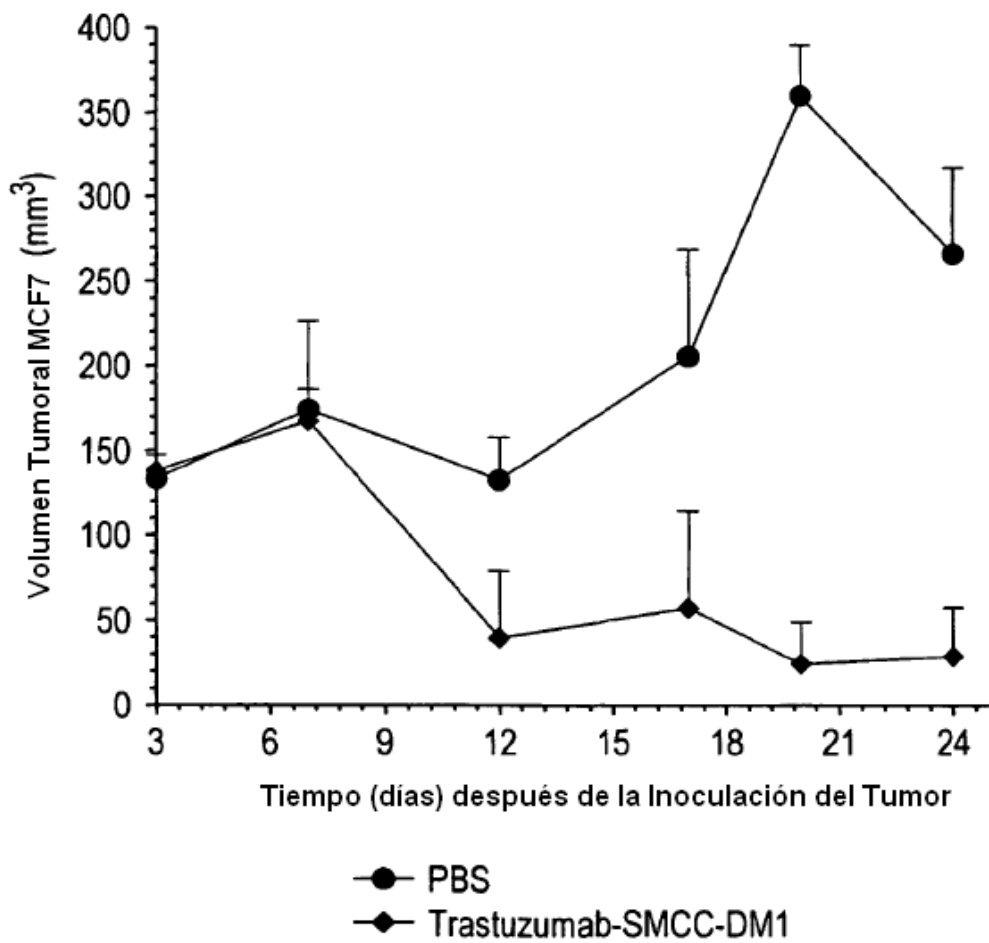
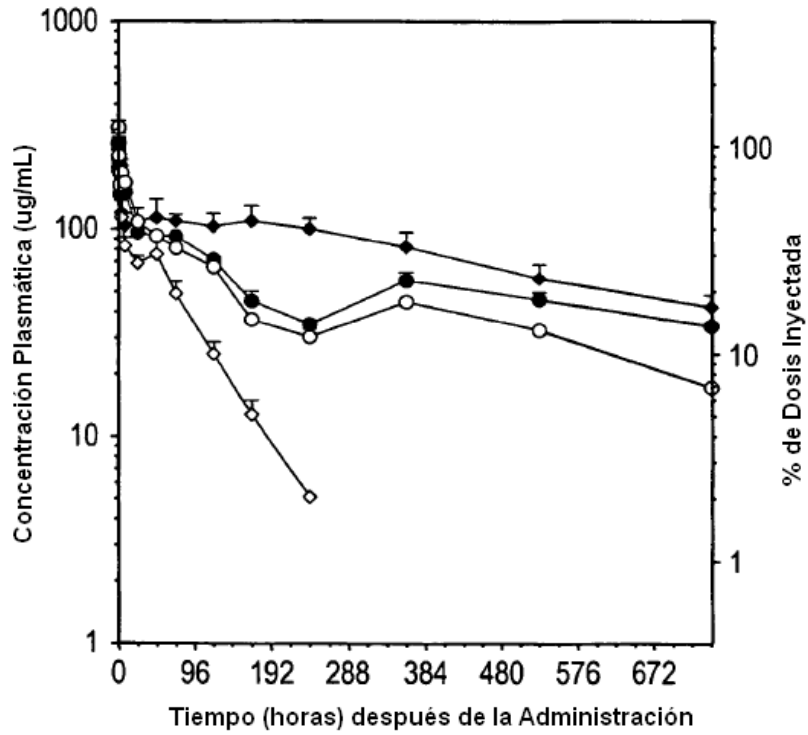


FIG. 11

Estudios Farmacocinéticos de conjugados
 huC242-SPP-DM1 y huC242-SCC-DM1 en Ratones CD-1
 Curvas de aclaramiento plasmático y Parámetros farmacocinéticos



- ◇ huC242-SPP-DM1 conjugado
- huC242-SMCC-DM1 conjugado
- ◆ huC242-SPP-DM1 anticuerpo
- huC242-SMCC-DM1 anticuerpo

Inmunoconjugado	DM1/AB	Cmax	t1/2	AUC	CL	Vss
		ug/mL	hora	Hora.ug/mL	mL/hora/kg	mL/kg
huC242-SMCC-DM1	3.17	312.2	318.3	40374.2	0.3	112.5
huC242-SMCC		262.9	533.7	65953.9	0.2	119.6
huC242-SPP-DM1	3.26	191.4	49.8	9205.7	1.1	92.6
huC242-SPP		212.5	499.2	89345.7	0.1	78.2

FIG. 12A

Supervivencia de Ratones CD-1 Tratados con huC242-SPP-DM1

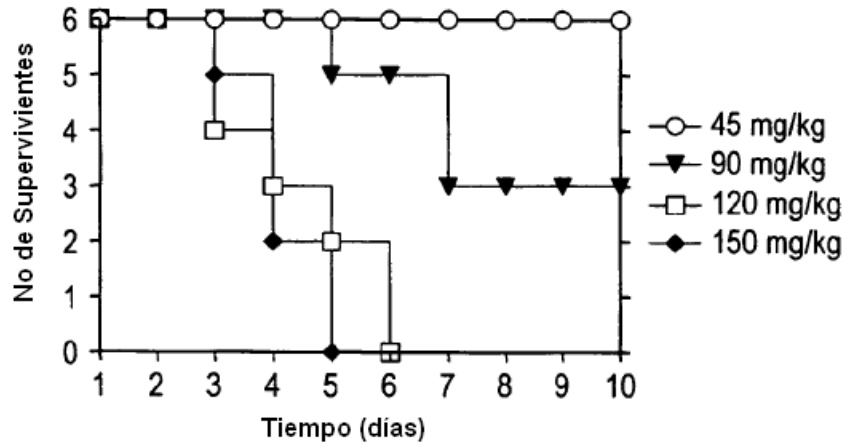


FIG. 12B

Supervivencia de Ratones CD-1 Tratados con huC242-SMCC-DM1

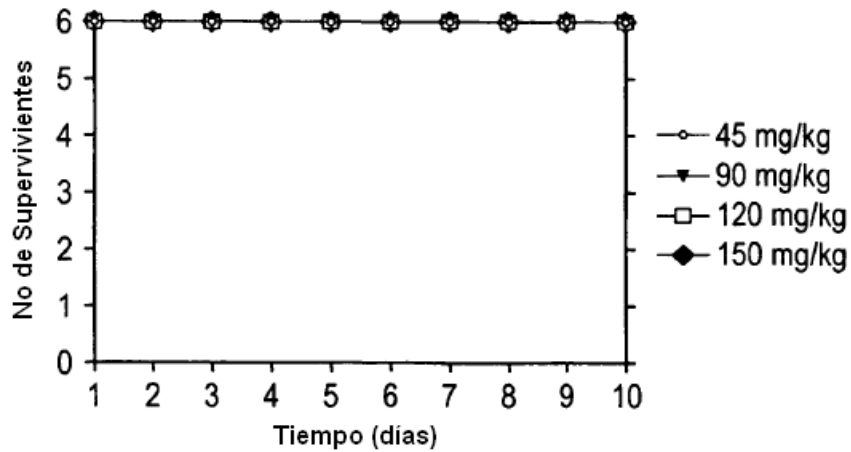


FIG. 12C

Peso Corporal de Ratones CD-1 Tratados con huC242-SPP-DM1

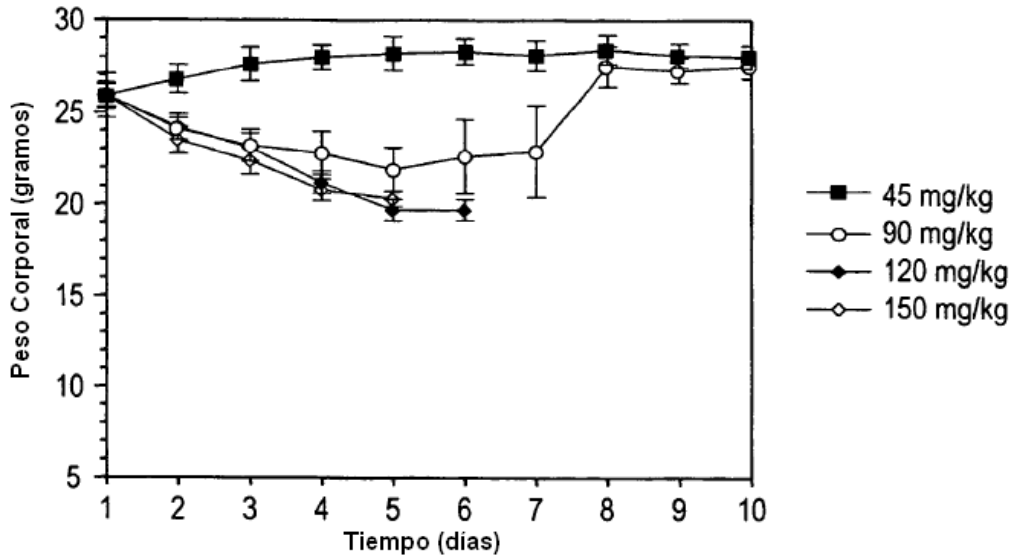


FIG. 12D

Peso Corporal de Ratones CD-1 Tratados con huC242-SMCC-DM1

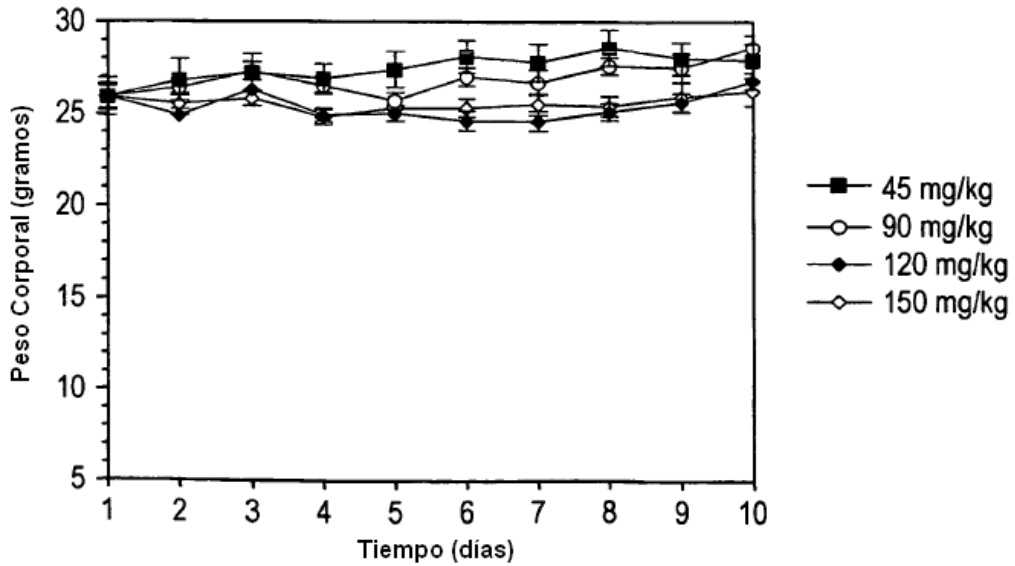
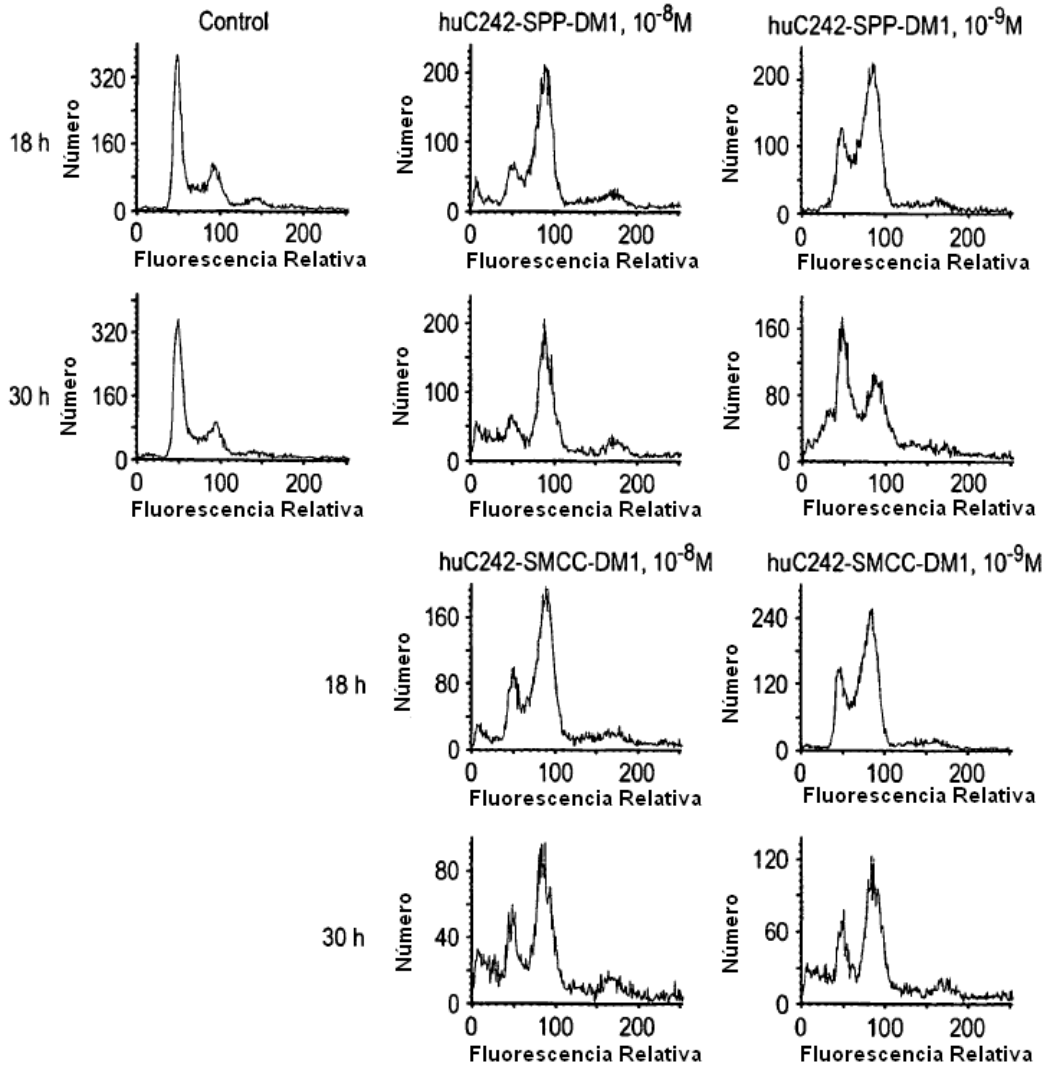


FIG. 13

Comparación de la actividad de parada del ciclo celular in vitro de los conjugados huC242-SPP-DM1 y huC242-SMCC-DM1



			Actividad de Parada Celular		Actividad de Muerte Celular
Conjugado	Concentración	Línea celular	18 horas	30 horas	30 horas
C242-SPP-DM1	1 x 10 ⁻⁸ M	Colo205	+++	+++	
	1 x 10 ⁻⁹ M	Colo205	+++	++	25%
C242-SMCC-DM1	1 x 10 ⁻⁸ M	Colo205	+++	+++	
	1 x 10 ⁻⁹ M	Colo205	+++	+++	33-37%

FIG. 14A

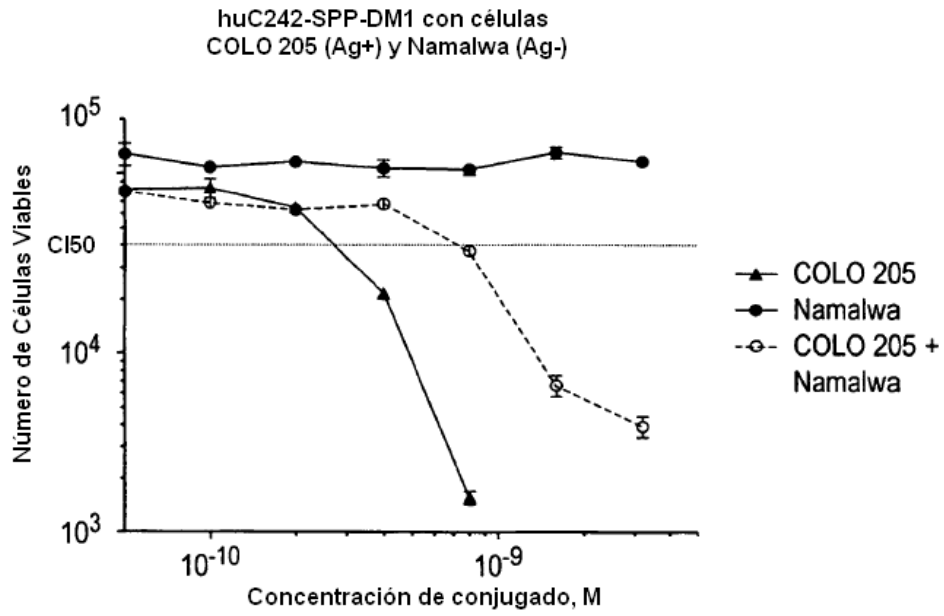


FIG. 14B

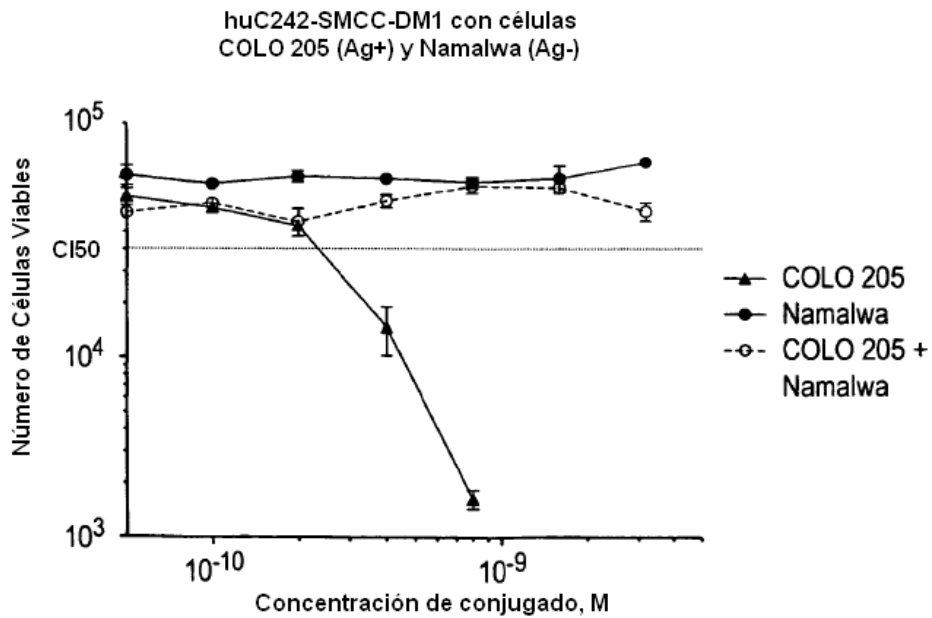


FIG. 14C

Concentración de conjugados huC242 : 8×10^{-10} M

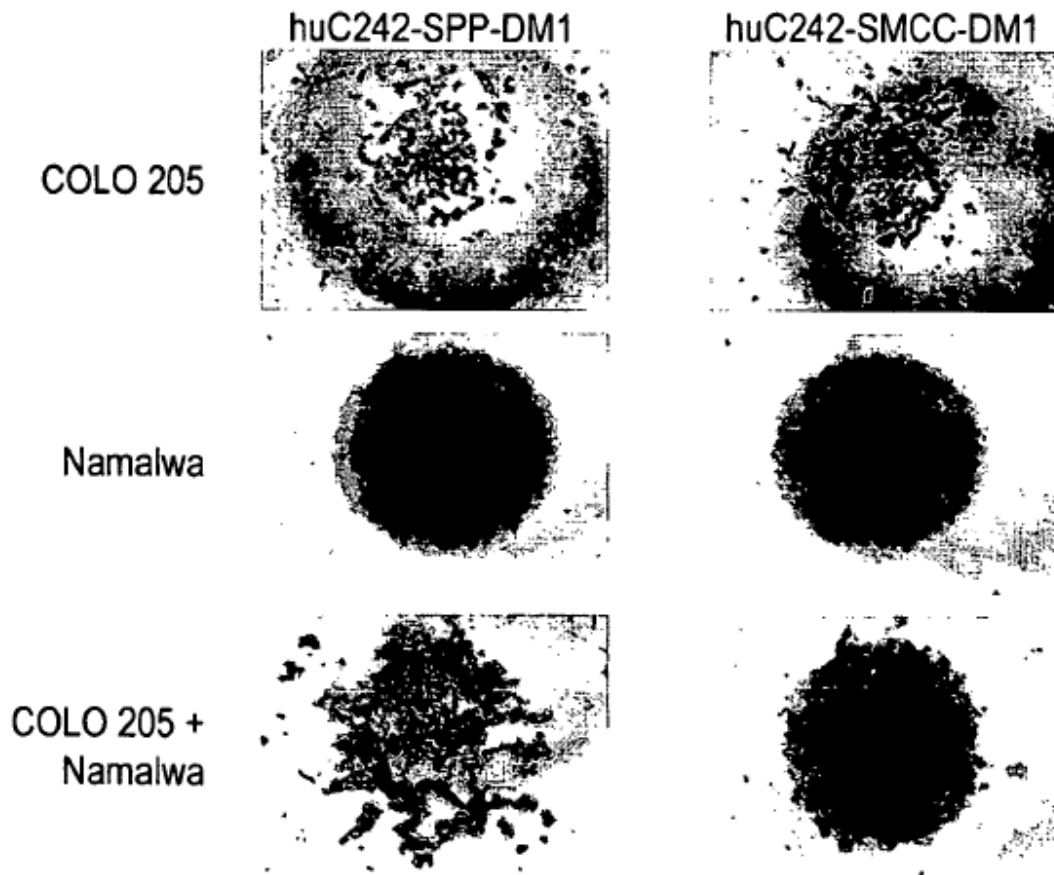
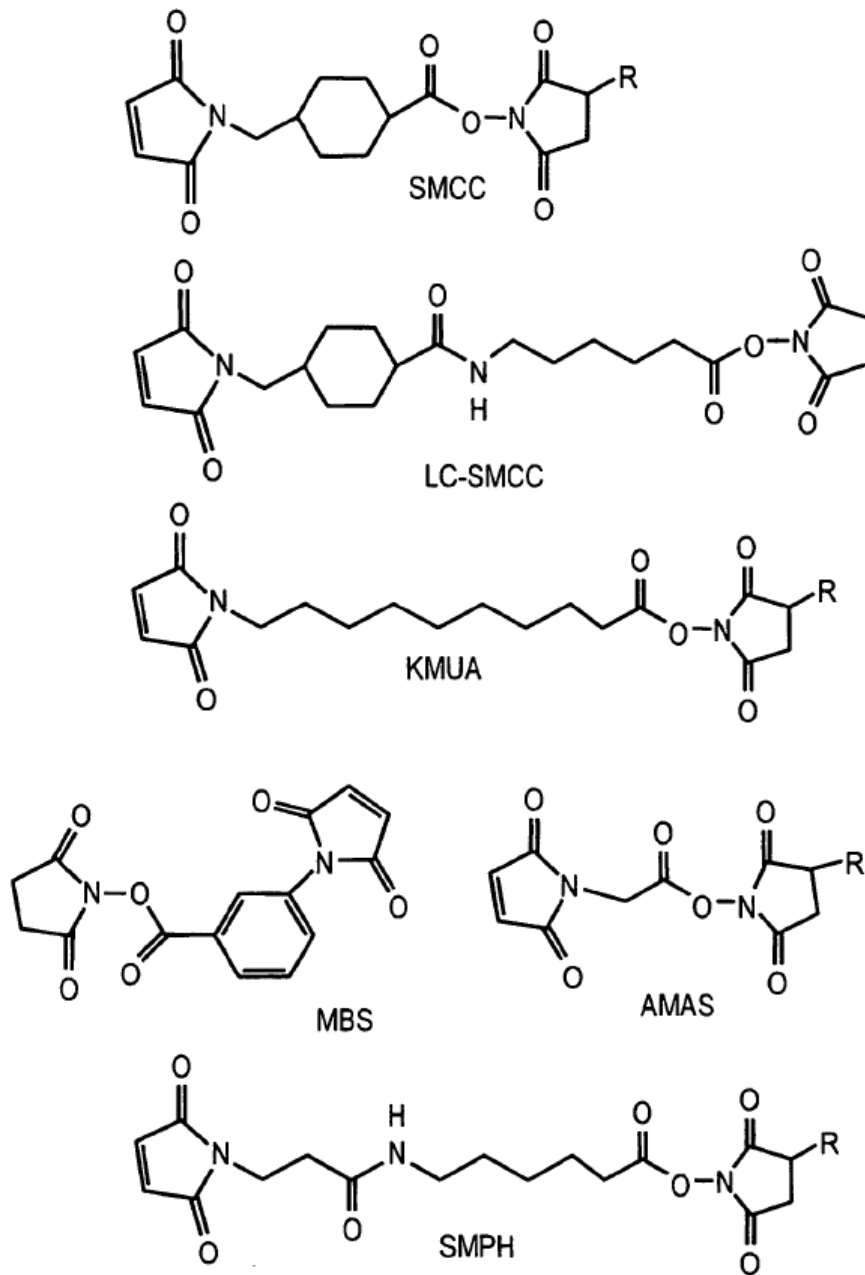


FIG. 15

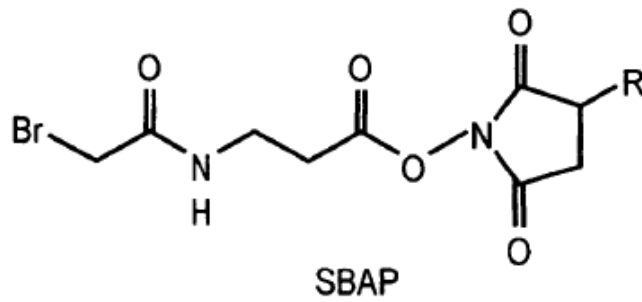
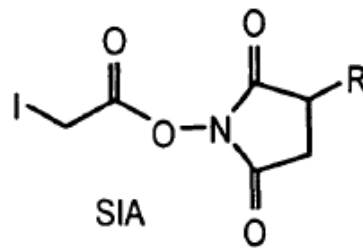
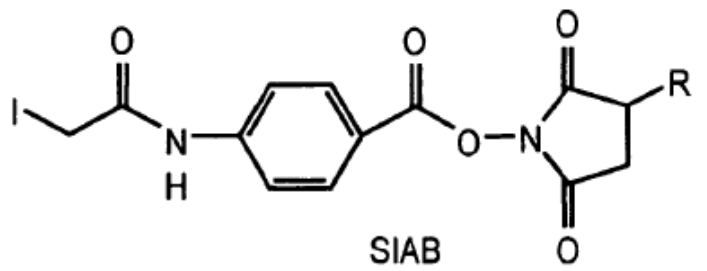
Estructuras representativas de agentes de entrecruzamiento basados en maleimido



En todos los casos R = H o SO₃⁻

FIG. 16

Estructuras representativas de agentes de entrecruzamiento basados en haloacetilo



En todos los casos R = H o SO₃⁻

FIG. 17

Estructura de DM1 y conjugados anticuerpo-DM1 de anticuerpos derivatizados con maleimido. Como un ejemplo se usó el reactivo de entrecruzamiento SMCC.

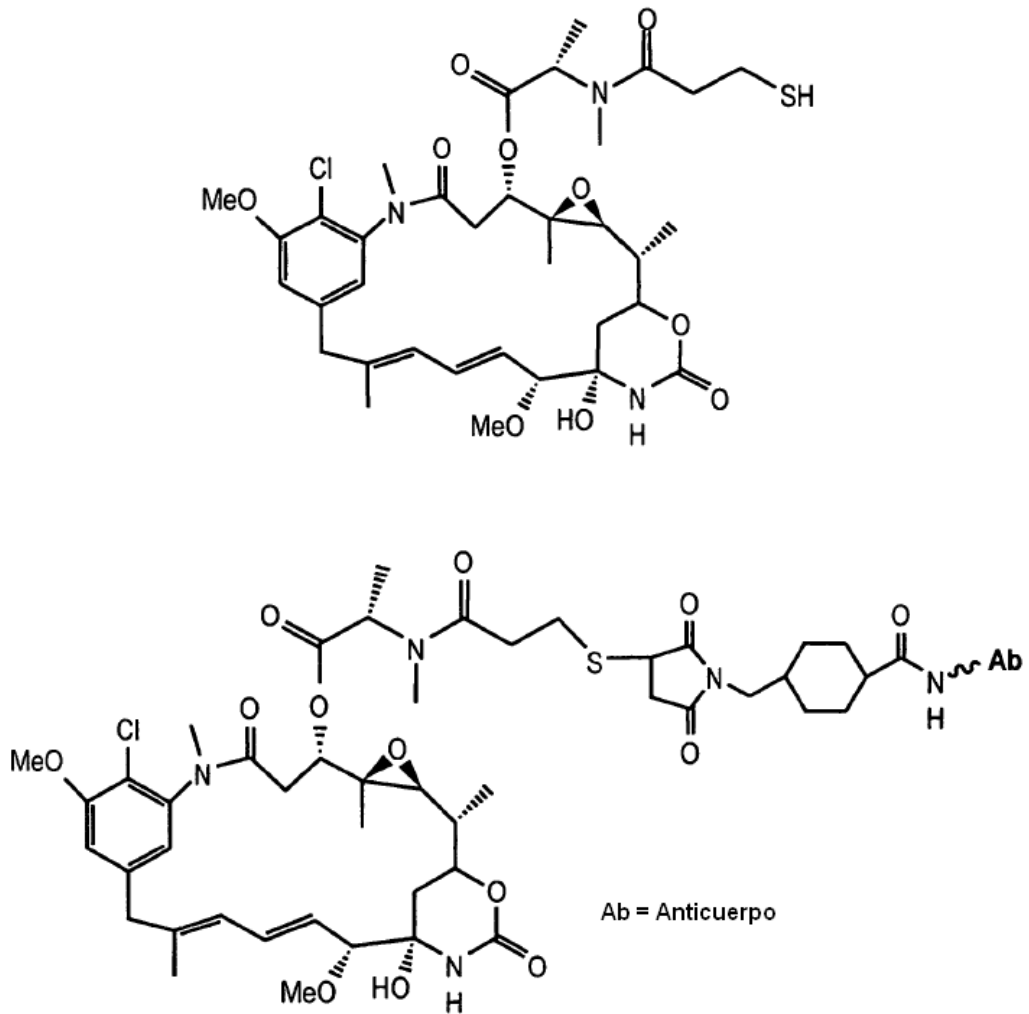
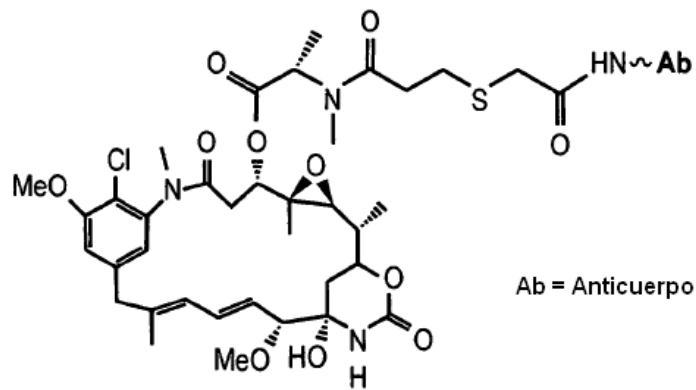
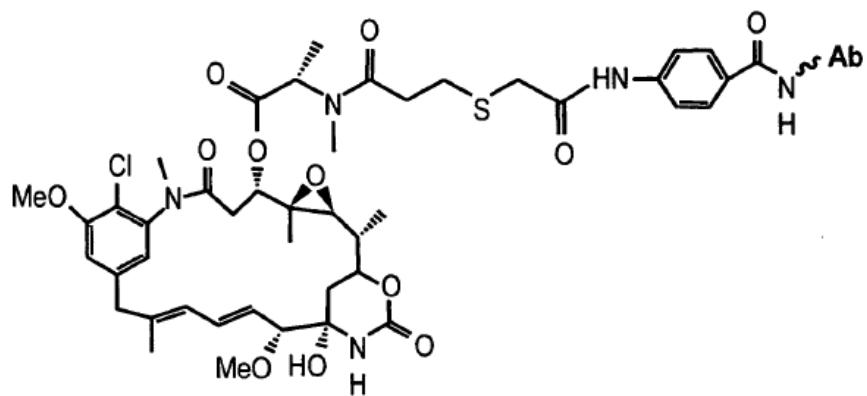


FIG. 18

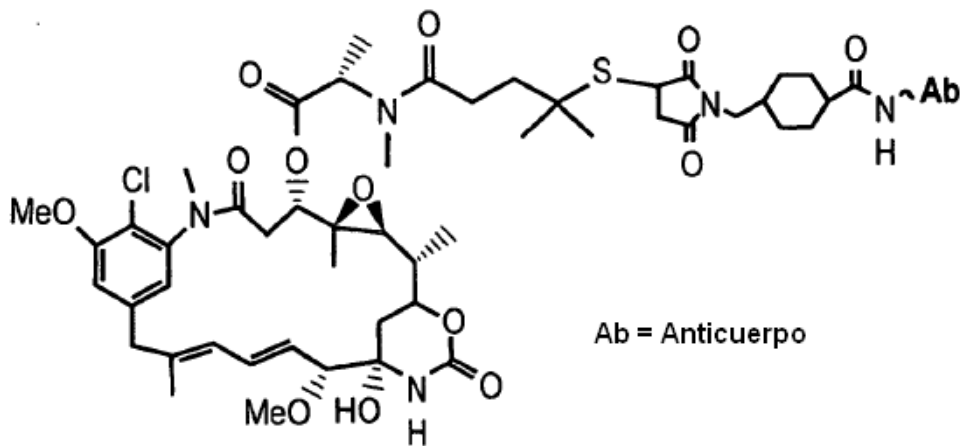
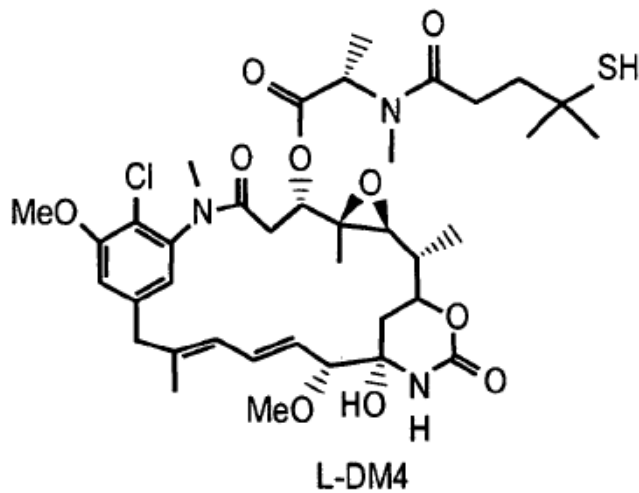
Estructuras de conjugados Anticuerpo-DM1 de anticuerpos derivatizados con haloacetilo. Como un ejemplo se usaron el reactivo de entrecruzamiento SIAB (estructura superior) y el reactivo SIA (estructura inferior).



Ab = Anticuerpo

FIG. 19

Estructuras de DM4 y conjugados anticuerpo-DM4 derivados de anticuerpos derivatizados con maleimido. Como un ejemplo se usó el reactivo de entrecruzamiento SMCC.



Conjugado Anticuerpo-DM4

FIG. 20

Estructuras de conjugados Anticuerpo-DM4 de anticuerpos derivatizados con haloacetilo. Como un ejemplo se usaron el reactivo de entrecruzamiento SIAB (estructura superior) y el reactivo SIA (estructura inferior).

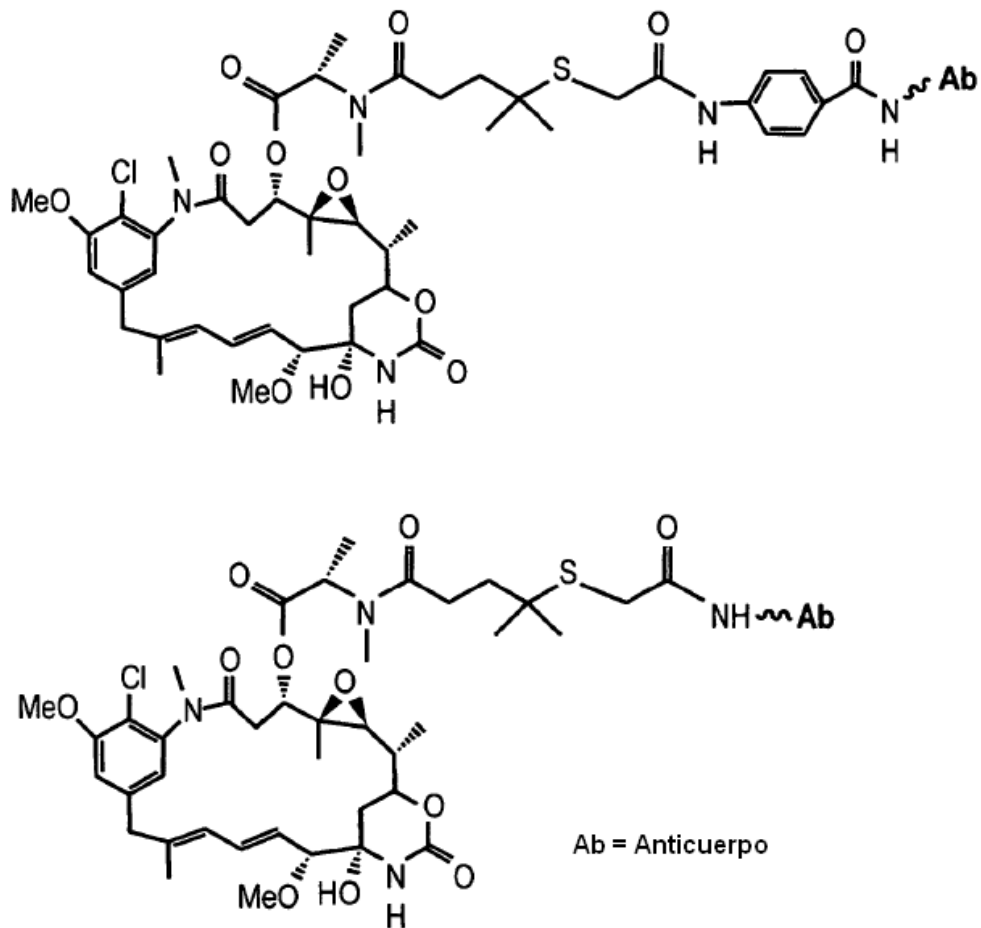


FIG. 21

Conector Sin Azufre

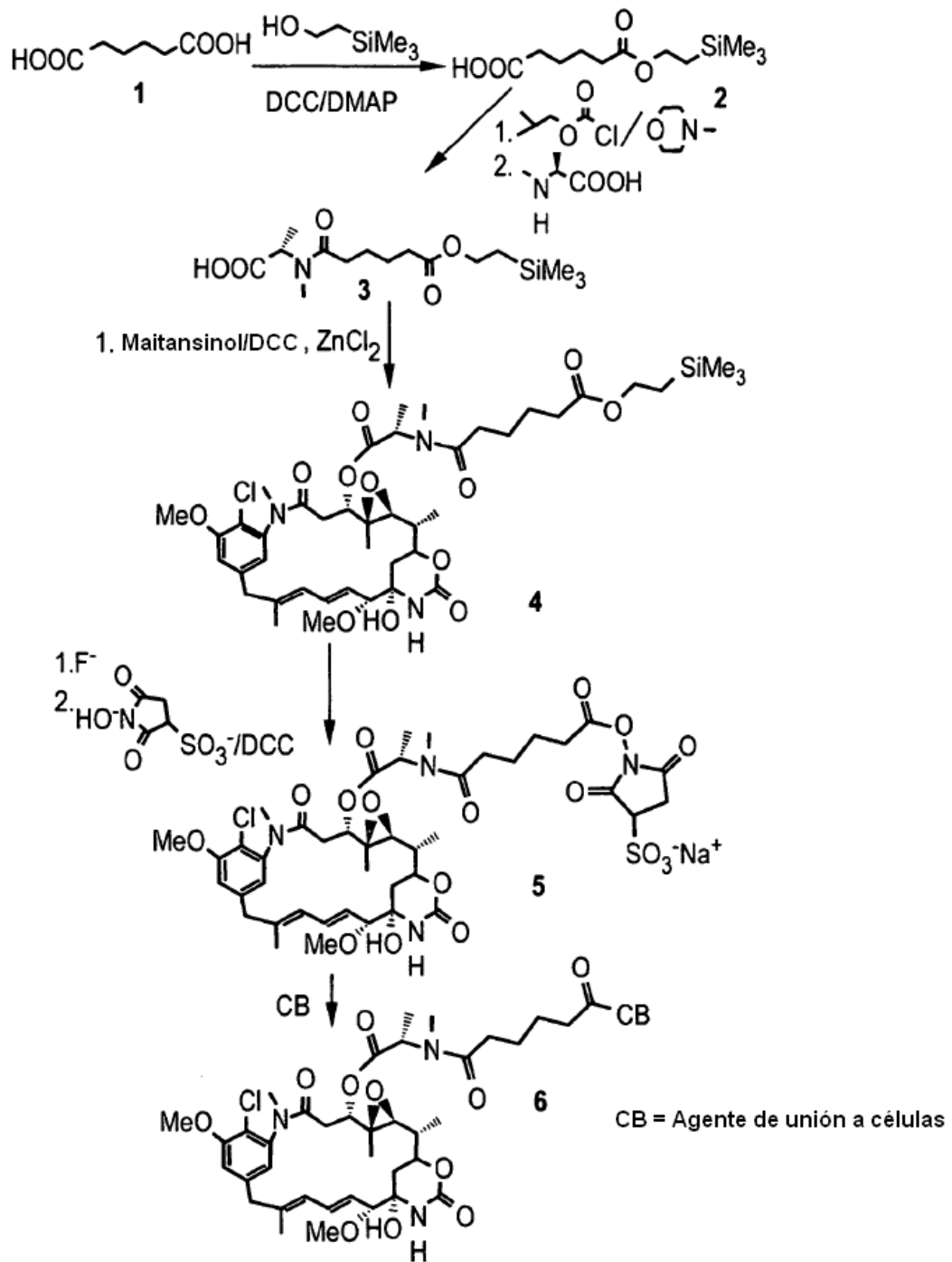
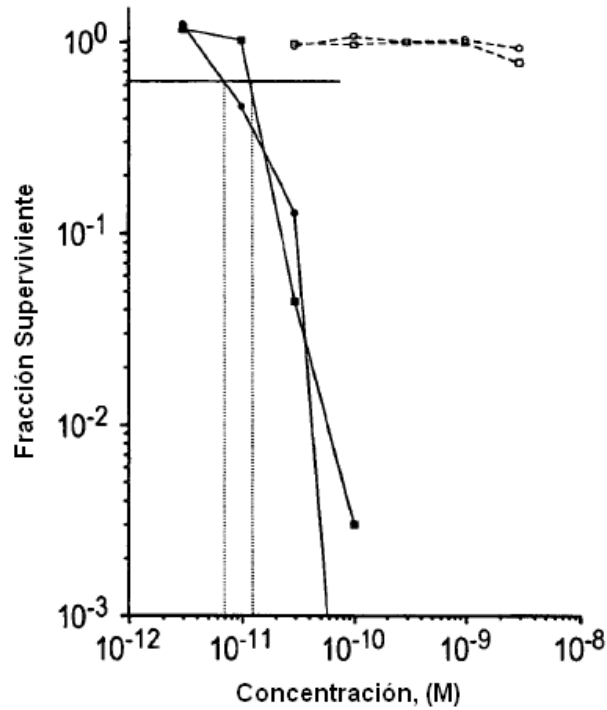


FIG. 22

Citotoxicidad de huC242-conector no escindible que no contiene S-DM1
y hC242-SMNP-DM3 frente a células COLO 205 y A375
Ensayo Clonogénico de Exposición Continua



—●— huC242-conector no escindible que no contiene S-DM1 /
COLO 205, $CI_{50} = 7,0 \times 10^{-12}$ M

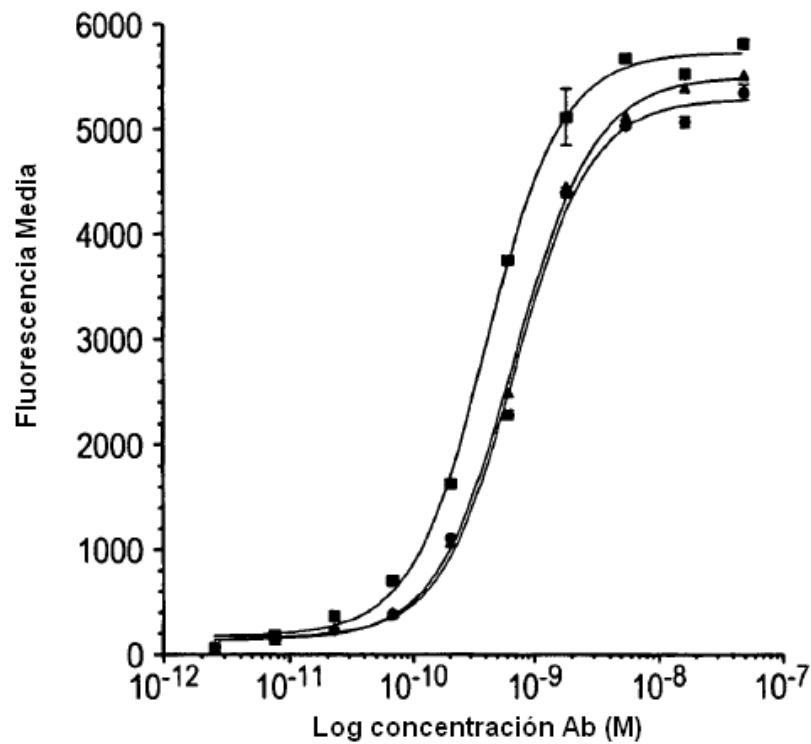
—■— huC24-SMNP-DM3 / COLO 205, $CI_{50} = 1,3 \times 10^{-11}$ M

-○- huC242-conector no escindible que no contiene S-DM1 /
A375, $CI_{50} > 3 \times 10^{-9}$ M

-◇- huC24-SMNP-DM3 / A375, $CI_{50} > 3 \times 10^{-9}$ M

FIG. 23

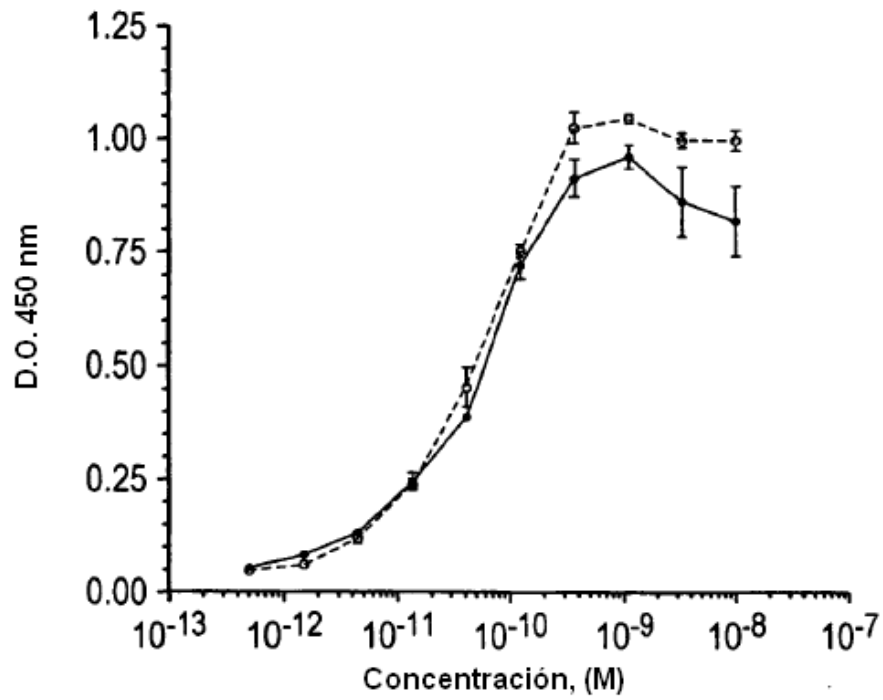
Ensayo de unión FACS de huC242-conector no escindible que no contiene S-DM1 y huC242-SMNP-DM3 a células COLO 205



- huC242
CE₅₀ = 4,12 x 10⁻¹⁰ M
- ▲ huC242 conector no escindible que no contiene S-DM1
CE₅₀ = 7,04 x 10⁻¹⁰ M
- huC242-SMNP-DM3
CE₅₀ = 7,08 x 10⁻¹⁰ M

FIG. 24

ELISA: Unión de
Trastuzumab-SMCC-DM1 y
anticuerpo Trastuzumab a placas
ECD recubiertas a 0,3 ng/pocillo



—●— Trastuzumab-DM1, $K_D = 5.5 \times 10^{-11}$ M
 - - ◻ - - Trastuzumab Ab, $K_D = 5.5 \times 10^{-11}$ M

FIG. 25

Citotoxicidad de Trastuzumab-SMCC-DM1 frente a células SK BR 3 y A 375
 Ensayo Clonogénico de Exposición Continua

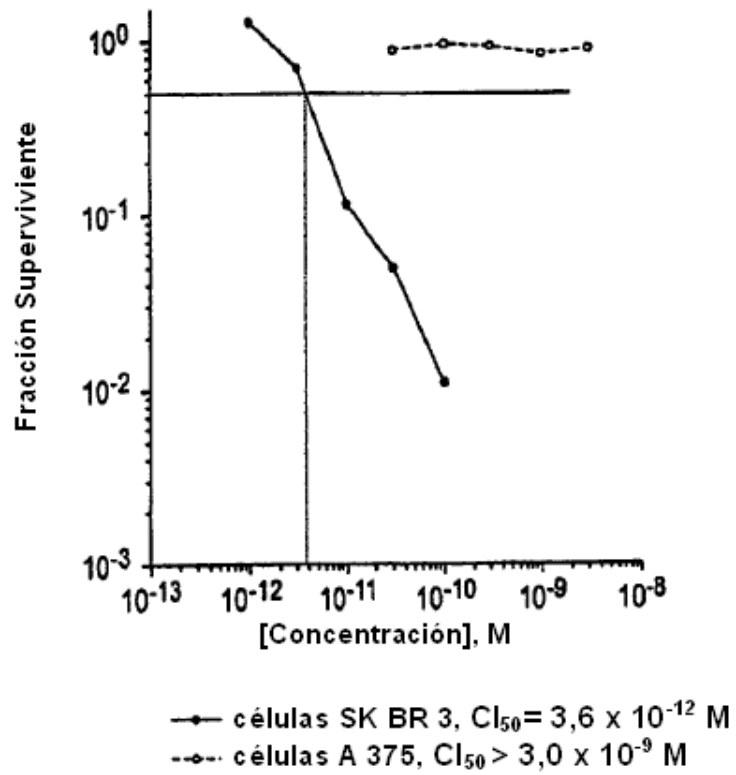


FIG. 26

Cromatografía de Exclusión por Tamaño para Trastuzumab-SMCC-DM1

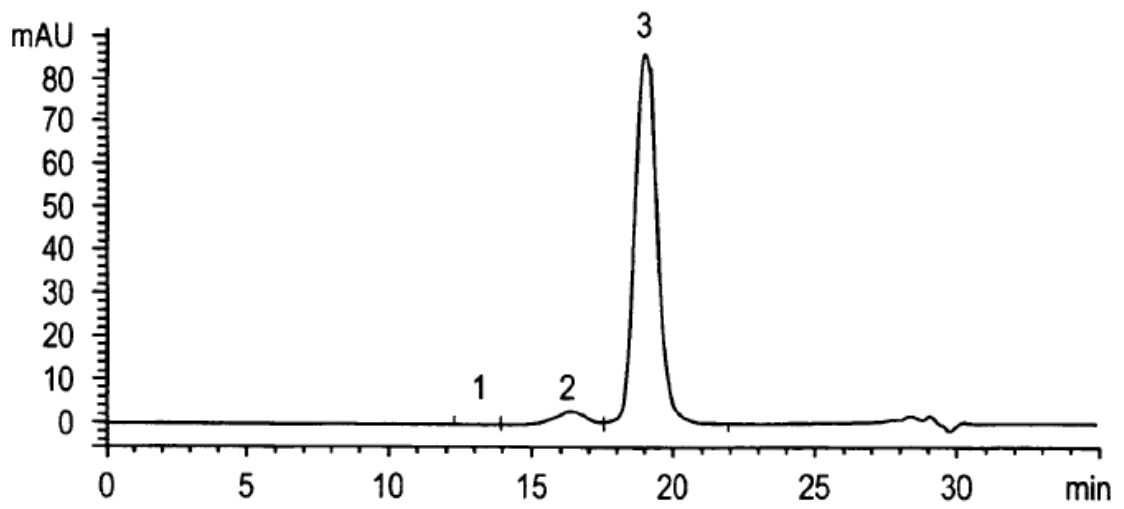
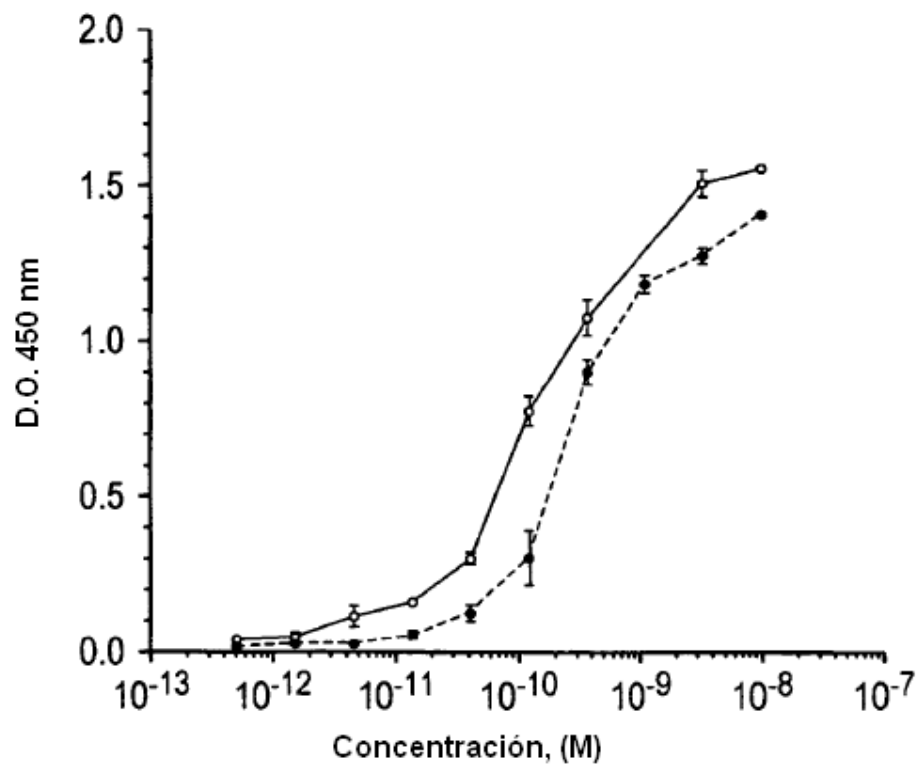


FIG. 27

ELISA: Unión de
Trastuzumab-SIAB-DM1 y
anticuerpo Trastuzumab a una placa
ECD recubierta a 0,3 ng/pocillo



- Trastuzumab-SIAB-DM1, $K_D = 1.9 \times 10^{-10}$ M
- Anticuerpo Trastuzumab, $K_D = 1.2 \times 10^{-10}$ M

FIG. 28

**Citotoxicidad de
Trastuzumab-SIAB-DM1
frente a células SKBR3 y A 375
Ensayo Clonogénico
de Exposición Continua**

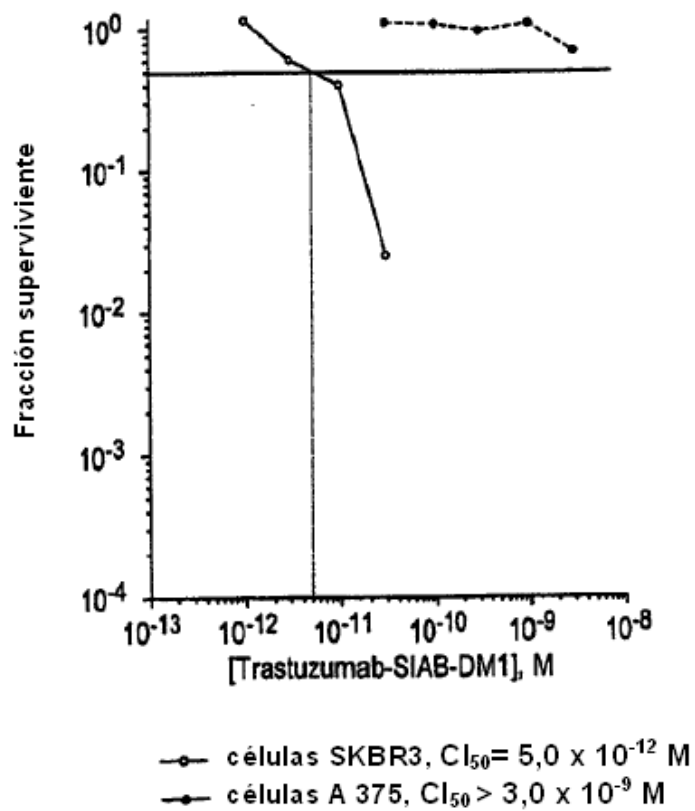


FIG. 29

Cromatografía de Exclusión por Tamaño para Trastuzumab-SIAB-DM1

