

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 503 719**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2006 E 06720665 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 1853322**

54 Título: **Procedimiento para preparar conjugados de anticuerpos y de maitansinoides**

30 Prioridad:

11.02.2005 US 652434 P

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

07.10.2014

73 Titular/es:

**IMMUNOGEN, INC. (100.0%)
830 Winter Street
Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**CHARI, RAVI;
ZHANG, WEI;
MESHULAM, DEBORAH H.;
DAI, YONG;
WANG, YONG y
AMPHLETT, GODFREY W.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 503 719 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

Procedimiento para preparar conjugados de anticuerpos y de maitansinoides

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a un método para preparar un conjugado que comprende un agente de unión a células químicamente acoplado a un fármaco.

Antecedentes de la invención

10 El tratamiento del cáncer ha progresado significativamente con el desarrollo de productos farmacéuticos que se dirigen y matan a las células cancerosas más eficazmente. Con este fin, los investigadores han aprovechado los receptores y antígenos de la superficie celular expresados de manera selectiva por las células cancerosas para desarrollar fármacos basados en anticuerpos que se unen a los antígenos específicos de tumores o asociados a tumores. En este sentido, se han unido químicamente moléculas citotóxicas, tales como bacterias y toxinas de plantas, radionúclidos y ciertos fármacos quimioterapéuticos a anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos de la superficie celular específicos de tumores o asociados a tumores (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente (PCT) Internacional WO 00/02587, WO 02/060955 y WO 02/092127, las Patentes de EE. UU. 15 5.475.092, 6.340.701 y 6.171.586, la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2003/0004210 A1 y Ghetie et al., J. Immunol. Methods, 112, 267-277 (1988)). Se hace típicamente referencia a dichos compuestos como "conjugados" de toxina, radionúclido y fármaco, respectivamente. Con frecuencia, también se hace referencia a ellos como inmunoconjugados, radioinmunoconjugados e inmunotoxinas. La muerte de las células tumorales se produce al unirse el conjugado de fármaco a una célula tumoral y activarse la actividad citotóxica del maitansinoide. La selectividad aportada por los conjugados de fármaco minimiza la toxicidad para las células normales, aumentando así la tolerabilidad del fármaco en el paciente.

20 Se han descrito previamente procedimientos para conjugar anticuerpos con agentes citotóxicos que contienen sulfhidrilo, tales como maitansinoides (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. 5.208.020, 5.416.064 y 6.441.163. Por ejemplo, las Patentes de EE. UU. 5.208.020 y 5.416.064 divulgan un procedimiento para fabricar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, donde el anticuerpo es primeramente modificado con un reactivo heterobifuncional, tal como se describe en las Patentes de EE. UU. 4.149.003 y 4.563.304. Las Patentes de EE. UU. 25 5.208.020 y 5.416.064 describen además la conjugación de un anticuerpo modificado con un exceso de un agente citotóxico que contiene sulfhidrilo a pH 7, seguida de purificación en columnas de cromatografía SEPHADEX™ G25. También se ha descrito la purificación de conjugados anticuerpo-fármaco por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) (véanse, por ejemplo, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 93, 8618-8623 (1996), y Chari et al., Cancer Research, 52, 127-131 (1992)).

30 La Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 03/057163 describe la modificación de un anticuerpo a un pH de 5,0 a 8,0, la eliminación del conector no reaccionado por filtración de flujo tangencial (TFF), la conjugación del anticuerpo a un pH de 6,0 a 6,5 en dimetilacetamida (DMA) y/o acetonitrilo y la purificación del conjugado por cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, hidroxipatito cerámico (CHT)). Se eluye el anticuerpo con una mayor concentración de cloruro de sodio. Como alternativa, la Patente de EE. UU. 6.441.163 describe la realización de la conjugación anticuerpo-fármaco en una sola etapa usando un compuesto conector-fármaco preformado.

35 A pesar de los avances en la preparación de conjugados anticuerpo-fármaco, los métodos actuales están limitados por varios factores. Por ejemplo, la unión de un agente entrecruzante bifuncional a un anticuerpo es heterogénea en las condiciones actualmente empleadas en la técnica, lo que da lugar a la lenta liberación del fármaco por el conjugado y a inestabilidad del conjugado. Más aún, algunos derivados de conjugados de proteína-disulfuro de 2-piridilo generados con ésteres de hidroxisuccimida son inestables y se descomponen lentamente. Otra limitación es que el propio proceso de conjugación da lugar a la formación de productos de degradación no deseables, tales como especies de alto y bajo peso molecular de conjugado y precipitados, lo que puede dar como resultado menores rendimientos del procedimiento.

40 Así, en vista de lo anterior, siguen necesitándose métodos mejorados de preparación de composiciones de conjugados de fármacos que sean más estables y de mayor pureza que las composiciones de conjugados de fármacos actualmente disponibles. La invención proporciona dicho método. Éstas y otras ventajas de la invención, así como características inventivas adicionales, resultarán evidentes gracias a la descripción de la invención proporcionada en este documento.

Breve compendio de la invención

45 La invención proporciona un nuevo procedimiento para preparar un conjugado que comprende un anticuerpo como agente de unión a células químicamente acoplado a un maitansinoide como fármaco. El procedimiento comprende: (a) poner en contacto el agente de unión a células con un reactivo entrecruzante bifuncional para unir covalentemente un conector al agente de unión a células y así preparar una primera mezcla que comprende agentes de unión a células que tienen conectores unidos de manera estable e inestable a estos; (b) someter la primera mezcla a cromatografía no adsorbtiva para purificar los agentes de unión a células que tienen conectores unidos a sí

mismos de otros componentes de la primera mezcla y así preparar una primera mezcla purificada; (c) conjugar un fármaco con los agentes de unión a células que tienen conectores unidos a sí mismos por reacción de los agentes de unión a células que tienen conectores unidos a sí mismos con el fármaco en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8, para preparar una segunda mezcla que comprende (i) un agente de unión a células químicamente acoplado a través del conector con el fármaco, (ii) fármaco libre y (iii) solventes y subproductos de reacción; (d) someter la segunda mezcla a cromatografía no adsorptiva para purificar los agentes de unión a células químicamente acoplados a través de los conectores con el fármaco de los otros componentes de la segunda mezcla y así preparar una segunda mezcla purificada; (e) opcionalmente someter la segunda mezcla purificada a filtración de flujo tangencial (TFF) o cromatografía adsorptiva para aislar un conjugado que comprende el agente de unión a células químicamente acoplado a el fármaco y (f) mantener la mezcla entre al menos una de las etapas b-c y las etapas d-e para liberar los conectores inestablemente unidos del agente de unión a células.

Breve descripción de las diversas vistas del/de los dibujo(s)

La Figura es un gráfico de la liberación del conector ácido 4-(2-piridilditio)pentanoico (PPA) (% del conector total originalmente unido) con respecto a huN901 modificado con 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) después de mantener a varios niveles de pH.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la preparación de composiciones de conjugados estables que comprenden un anticuerpo como agente de unión a células químicamente acoplado a un maitansinoide como fármaco, donde las composiciones están sustancialmente libres de conjugados inestables. Dichas composiciones pueden ser usadas para tratar enfermedades gracias a la estabilidad y a la gran pureza de los conjugados. Se describen composiciones que comprenden un agente de unión a células, tal como un anticuerpo, químicamente acoplado a un fármaco, tal como un maitansinoide, en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2004/0241174 A1.

Alguien con conocimientos ordinarios en la técnica apreciará que típicamente se preparan conjugados que comprenden un anticuerpo químicamente acoplado a un fármaco ("conjugados anticuerpo-fármaco") purificando un anticuerpo y modificando el anticuerpo purificado, seguido de purificación en una sola etapa, conjugación y una etapa de purificación final. Esta invención mejora dichos métodos incluyendo una etapa de mantenimiento, así como deseablemente diafiltración, conseguida mediante un procedimiento de Filtración de Flujo Tangencial (TFF) basado en membrana, después de la etapa de purificación final. Además, la invención mejora los métodos previos modificando el pH durante la reacción de conjugación, de tal forma que se optimizan la utilización del fármaco, los rendimientos del procedimiento, la reducción de las reacciones colaterales y la pureza del conjugado agente de unión a células-fármaco. Opcionalmente, la adición de sacarosa durante el proceso ha mostrado aumentar los rendimientos del procedimiento.

A este respecto, el procedimiento de la invención comprende: (a) modificar el agente de unión a células con un reactivo entrecruzante bifuncional para unir covalentemente un conector al agente de unión a células y así preparar una primera mezcla que comprende agentes de unión a células que tienen conectores estable e inestablemente unidos a los mismos; (b) someter la primera mezcla a cromatografía no adsorptiva para purificar los agentes de unión a células que tienen conectores unidos a sí mismos de otros componentes de la primera mezcla y así preparar una primera mezcla purificada; (c) conjugar un fármaco a los agentes de unión a células que tienen conectores unidos a sí mismos por reacción de los agentes de unión a células que tienen conectores unidos a sí mismos con el fármaco en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8, para preparar una segunda mezcla que comprende (i) agente de unión a células químicamente acoplado a través del conector con el fármaco, (ii) fármaco libre y (iii) solventes y subproductos de reacción; (d) someter la segunda mezcla a cromatografía no adsorptiva para purificar los agentes de unión a células químicamente acoplados a través de los conectores con el fármaco de los otros componentes de la segunda mezcla y así preparar una segunda mezcla purificada; (e) opcionalmente, someter la segunda mezcla purificada a filtración de flujo tangencial (TFF) o cromatografía adsorptiva para aislar un conjugado que comprende el agente de unión a células químicamente acoplado al fármaco, y (f) mantener la mezcla entre al menos una de las etapas b-c, de las etapas c-d y de las etapas d-e para liberar los conectores inestablemente unidos del agente de unión a células.

El agente de unión a células es un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y fragmentos de éstos).

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier inmunoglobulina, cualquier fragmento de inmunoglobulina, tal como Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos, o quimera de inmunoglobulina que pueda unirse a un antígeno sobre la superficie de una célula (por ejemplo, que contiene una región determinante de complementariedad (CDR)). Se puede usar cualquier anticuerpo adecuado como agente de unión a células. Alguien con conocimientos ordinarios en la técnica apreciará que la selección de un anticuerpo apropiado dependerá de la población celular a la que se haya de dirigir. En este sentido, el tipo y el número de moléculas de la superficie celular (es decir, antígenos) que se expresan selectivamente en una población celular particular (típica y preferentemente una población de células enfermas) regirá la selección de un anticuerpo apropiado para uso en la composición de la invención. Se conocen perfiles de expresión en la superficie celular para

una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo tipos de células tumorales, o, si se desconocen, se pueden determinar usando técnicas rutinarias de biología molecular e histoquímica.

El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, pero es más preferentemente un anticuerpo monoclonal. Tal como se utiliza en este documento, anticuerpos "policlonales" se refiere a poblaciones heterogéneas de anticuerpo, típicamente contenidas en los sueros de animales inmunizados. Anticuerpos "monoclonales" se refiere a poblaciones homogéneas de moléculas de anticuerpo que son específicas para un antígeno particular. Los anticuerpos monoclonales son típicamente producidos por un solo clon de linfocitos B ("células B"). Se pueden obtener anticuerpos monoclonales usando una variedad de técnicas conocidas para los expertos en la técnica, incluyendo la tecnología de hibridomas estándar (véanse, por ejemplo, Köhler y Milstein, Eur. J. Immunol., 5, 511-519 (1976); Harlow y Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988) y C.A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5ª Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). Resumiendo, el método de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales típicamente conlleva inyectar a cualquier animal adecuado, típica y preferentemente un ratón, un antígeno (es decir, un "inmunógeno"). El animal es posteriormente sacrificado y se fusionan las células B aisladas de su bazo con células de mieloma humanas. Se produce una célula híbrida (es decir, un "hibridoma"), que prolifera indefinidamente y segrega continuamente altos títulos de un anticuerpo con la especificidad deseada *in vitro*. Se puede usar cualquier método apropiado conocido en la técnica para identificar células de hibridoma que producen un anticuerpo con la especificidad deseada. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, el ensayo inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA), el análisis de Western blot y el radioinmunoensayo. Se hace un cribado de la población de hibridomas para aislar clones individuales, cada uno de los cuales segrega una sola especie de anticuerpo para el antígeno. Dado que cada hibridoma es un clon derivado de la fusión con una sola célula B, todas las moléculas de anticuerpo que produce son idénticas en cuanto a estructura, incluyendo su sitio de unión a antígeno y su isotipo. Los anticuerpos monoclonales pueden ser también generados usando otras técnicas adecuadas, incluyendo la tecnología de EBV-hibridomas (véanse, por ejemplo, Haskard y Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984), y Roder et al., *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), los sistemas de expresión en vectores bacteriófagos (véase, por ejemplo, Huse et al., *Science*, 246, 1275-81 (1989)), o las bibliotecas de presentación de fagos que comprenden fragmentos de anticuerpos, tales como Fab y scFv (región variable de cadena única) (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. 5.885.793 y 5.969.108 y las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional WO 92/01047 y WO 99/06587).

El anticuerpo monoclonal puede ser aislado de, o producido en, cualquier animal adecuado, pero es preferentemente producido en un mamífero, más preferentemente un ratón y más preferentemente un humano. Los métodos para producir un anticuerpo en ratones son bien conocidos para los expertos en la técnica y se describen en este documento. Con respecto a los anticuerpos humanos, alguien con conocimientos ordinarios en la técnica apreciará que se pueden aislar anticuerpos policlonales de los sueros de sujetos humanos vacunados o inmunizados con un antígeno apropiado. Como alternativa, se pueden generar anticuerpos humanos adaptando técnicas conocidas para la producción de anticuerpos humanos en animales no humanos, tales como ratones (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352 y la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2002/0197266 A1).

Aun siendo la elección ideal para aplicaciones terapéuticas en humanos, los anticuerpos humanos, particularmente anticuerpos monoclonales humanos, típicamente son más difíciles de generar que los anticuerpos monoclonales de ratón. Los anticuerpos monoclonales de ratón, sin embargo, inducen una rápida respuesta de anticuerpos por el huésped cuando se administran a humanos, lo que puede reducir el potencial terapéutico o diagnóstico del conjugado anticuerpo-fármaco. Para eludir estas complicaciones, un anticuerpo monoclonal preferentemente no es reconocido como "extraño" por el sistema inmunitario humano. Con este fin, se puede usar la presentación de fagos para generar el anticuerpo. En este sentido, se pueden generar bibliotecas de fagos codificantes de los dominios variables (V) de unión a antígeno de anticuerpos usando técnicas estándar de biología molecular y ADN recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Se seleccionan los fagos codificantes de una región variable con la especificidad deseada para la unión específica al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo humano completo que comprende el dominio variable seleccionado. Se introducen secuencias de ácidos nucleicos codificantes del anticuerpo reconstituido en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma usada para la producción de hibridomas, de tal forma que la célula segrega anticuerpos humanos que tienen las características de anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo, Janeway et al., *supra*, Huse et al., *supra*, y Patente de EE. UU. 6.265.150). Como alternativa, se pueden generar anticuerpos monoclonales a partir de ratones que son transgénicos para genes de inmunoglobulinas de cadenas pesadas y ligeras humanas específicos. Dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. 5.545.806 y 5.569.825, y en Janeway et al., *supra*. Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Tal como se usa en este documento, un anticuerpo "humanizado" es aquel en el que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal de ratón, que forman los bucles de unión a antígeno del anticuerpo, están injertadas en el marco de una molécula de anticuerpo humano. Debido a la similitud de los marcos de los anticuerpos murinos y humanos, en general se acepta en la técnica que este enfoque produce un anticuerpo monoclonal que es antigénicamente idéntico a un anticuerpo humano, pero que se une al mismo antígeno que el anticuerpo monoclonal de ratón del que derivaron las secuencias CDR. Los métodos para generar anticuerpos humanizados son bien conocidos en la técnica y se describen con detalle en, por ejemplo, Janeway et al., *supra*,

Patentes de EE. UU. 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, la Patente Europea 0239400 B1 y la Patente del Reino Unido 2188638. También se pueden generar anticuerpos humanizados usando la tecnología de revestimiento de anticuerpos descrita en la Patente de EE. UU. 5.639.641 y en Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235, 959-973 (1994). Aunque el anticuerpo empleado en el conjugado de la composición de la invención es más preferentemente un anticuerpo monoclonal humanizado, también quedan dentro del alcance de la invención un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal de ratón, como se ha descrito anteriormente.

Los fragmentos de anticuerpo que tienen al menos un sitio de unión a antígeno, y por lo tanto reconocen y se unen a al menos un antígeno o receptor presente sobre la superficie de una célula diana, quedan también dentro del alcance de la invención. A este respecto, la escisión proteolítica de una molécula de anticuerpo intacta puede producir una variedad de fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad de reconocer y unirse a antígenos. Por ejemplo, la digestión limitada de una molécula de anticuerpo con la proteasa papaína típicamente produce tres fragmentos, dos de los cuales son idénticos y se hace referencia a ellos como los fragmentos Fab, ya que conservan la actividad de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo parental. La escisión de una molécula de anticuerpo con la enzima pepsina normalmente produce dos fragmentos de anticuerpo, uno de los cuales conserva ambos brazos de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo, y se hace por lo tanto referencia a él como el fragmento F(ab')₂. La reducción de un fragmento F(ab')₂ con ditioneitol o mercaptoetilamina produce un fragmento al que se hace referencia como un fragmento Fab'. Se puede generar un fragmento de anticuerpo de región variable de una sola cadena (sFv), que consiste en un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo unido a un dominio V de una cadena ligera de anticuerpo por medio de un péptido sintético, usando técnicas rutinarias de tecnología del ADN recombinante (véase, por ejemplo, Janeway et al., *supra*). De forma similar, se pueden preparar fragmentos de regiones variables estabilizados con disulfuro (dsFv) por tecnología del ADN recombinante (véase, por ejemplo, Reiter et al., Protein Engineering, 7, 697-704 (1994)). Los fragmentos de anticuerpos de esta invención, sin embargo, no se limitan a estos tipos ejemplares de fragmentos de anticuerpos. Se puede emplear cualquier fragmento de anticuerpo adecuado que reconozca y se una a un receptor o antígeno de la superficie celular deseado. Se describen además fragmentos de anticuerpo en, por ejemplo, Parham, J. Immunol., 131, 2895-2902 (1983); Spring et al., J. Immunol., 113, 470-478 (1974), y Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys., 89, 230-244 (1960). Se puede estudiar la unión anticuerpo-antígeno usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, Western blot, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición competitiva (véanse, por ejemplo, Janeway et al., *supra*, y la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2002/0197266 A1).

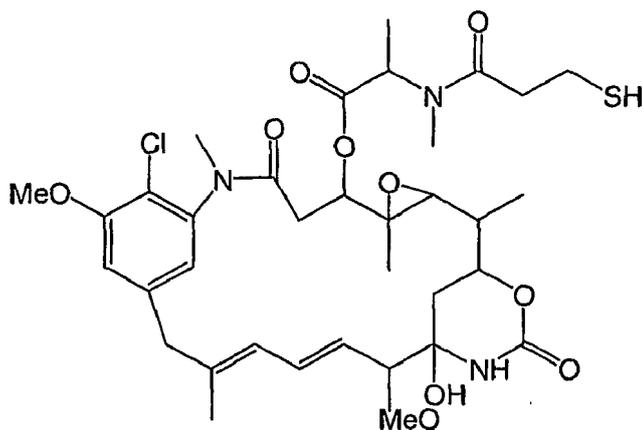
Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o fragmentos de unión a antígeno de éste. Por "quimérico", se entiende que el anticuerpo comprende al menos dos inmunoglobulinas, o fragmentos de éstas, obtenidas o derivadas de al menos dos especies diferentes (por ejemplo, dos inmunoglobulinas diferentes, tales como una región constante de inmunoglobulina humana combinada con una región variable de inmunoglobulina murina). El anticuerpo puede ser también un anticuerpo de dominio (dAb) o un fragmento de unión a antígeno de éste, tal como, por ejemplo, un anticuerpo de camélido (véase, por ejemplo, Desmyter et al., Nature Struct. Biol., 3, 752, (1996)), o un anticuerpo de tiburón, tal como, por ejemplo, un nuevo receptor de antígeno (IgNAR) (véanse, por ejemplo, Greenberg et al., Nature, 374, 168 (1995), y Stanfield et al., Science, 305, 1770-1773 (2004)).

Se puede usar cualquier anticuerpo adecuado en el contexto de la invención. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal J5 es un anticuerpo IgG2a murino específico para el Antígeno de la Leucemia Linfoblástica Aguda Común (CALLA) (Ritz et al., Nature, 283, 583-585 (1980)), y puede ser usado para abordar células que expresan CALLA (por ejemplo, células de leucemia linfoblástica aguda). El anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG1 murino que se une específicamente al antígeno CD33 (Griffin et al., Leukemia Res., 8, 521 (1984)), y puede ser usado para abordar células que expresan CD33 (por ejemplo, células de leucemia mielógena aguda (AML)).

De forma similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 (al que también se hace referencia como B4) es un anticuerpo IgG1 murino que se une al antígeno CD19 sobre las células B (Nadler et al., J. Immunol., 131, 244-250 (1983)), y puede ser usado para abordar células B o células enfermas que expresan CD19 (por ejemplo, células de linfoma no Hodgkin y células de leucemia linfoblástica crónica). N901 es un anticuerpo monoclonal murino que se une al antígeno CD56 (molécula de adhesión de las células neurales) que se encuentra en células de origen neuroendocrino, incluyendo el tumor pulmonar de células pequeñas, el cual puede ser usado en el conjugado para dirigir fármacos a células de origen neuroendocrino. Los anticuerpos J5, MY9 y B4 son preferentemente revestidos o humanizados antes de su uso como parte del conjugado. Se describe el revestimiento o humanización de anticuerpos en, por ejemplo, Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 969-73 (1994).

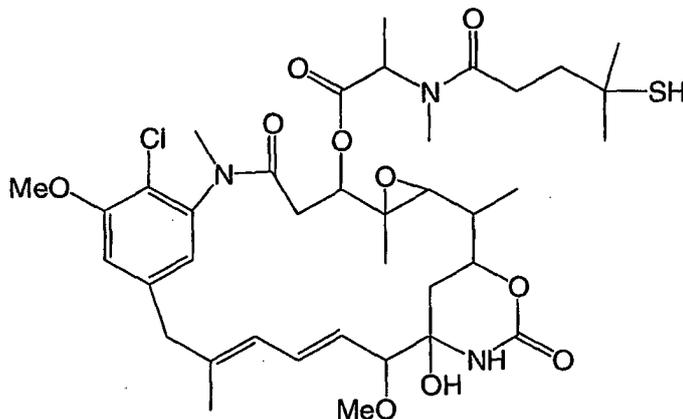
Además, el anticuerpo monoclonal C242 se une al antígeno CanAg (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 5.552.293) y puede ser usado para dirigir el conjugado a tumores que expresan CanAg, tales como los cánceres colorrectal, pancreático, pulmonar de células no pequeñas y gástrico. HuC242 es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal C242 (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 5.552.293). El hibridoma a partir del cual se produce HuC242 está depositado con el Número de identificación ECACC 90012601. HuC242 puede ser preparado usando metodología de injertación de CDR (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762) o tecnología de revestimiento (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 5.639.641). HuC242 puede ser usado para dirigir el conjugado a células tumorales que expresan el antígeno CanAg, tales como, por ejemplo, células de cáncer colorrectal, pancreático, pulmonar de células no pequeñas y gástrico.

- Para abordar las células de cáncer de ovario y de cáncer de próstata, se puede usar un anticuerpo anti-MUC1 como agente de unión a células en el conjugado. Los anticuerpos anti-MUC1 incluyen, por ejemplo, anti-HMFG-2 (véase, por ejemplo, Taylor-Papadimitriou et al., *Int. J. Cancer*, 28, 17-21 (1981)), hCTM01 (véase, por ejemplo, van Hof et al., *Cancer Res.*, 56, 5179-5185 (1996)) o DS6. Las células del cáncer de próstata pueden ser también abordadas con el conjugado utilizando un anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) como agente de unión a células, tal como J591 (véase, por ejemplo, Liu et al., *Cancer Res.*, 57, 3629-3634 (1997)). Más aún, las células cancerosas que expresan el antígeno Her2, tales como los cánceres de mama, de próstata y de ovario, pueden ser abordadas usando el anticuerpo trastuzumab. También se pueden usar en el conjugado anticuerpos anti-IGF-IR que se unen al receptor del factor de crecimiento de tipo insulina.
- 5
- 10 Son anticuerpos particularmente preferidos los anticuerpos monoclonales humanizados, como ejemplos de los cuales se incluyen huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, CNTO95, huDS6 y rituximab (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. 5.639.641 y 5.665.357, la Publicación de Solicitud de Patente de Patente de EE. UU. 2005/0118183 A1, la Publicación de Solicitud de Patente (PCT) Internacional WO 02/16401, Pedersen et al., *supra*, Roguska et al., *supra*, Liu et al., *supra*, Nadler et al., *supra*, Colomer et al., *Cancer Invest.*, 19, 49-56 (2001), Heider et al., *Eur. J. Cancer*, 31A, 2385-2391 (1995), Welt et al., *J. Clin. Oncol.*, 12, 1193-1203 (1994), y Maloney et al., *Blood*, 90, 2188-2195 (1997)). Más preferentemente, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal humanizado huN901 o el anticuerpo monoclonal humanizado huMy9-6. Se conocen en la técnica otros anticuerpos monoclonales humanizados, y éstos pueden ser utilizados en relación a la invención.
- 15
- 20 Las moléculas no anticuerpo adecuadas de la técnica anterior incluyen, por ejemplo, interferones (por ejemplo, alfa, beta o gamma interferón), linfoquinas (por ejemplo, interleuquina 2 (IL-2), IL-3, IL-4 o IL-6), hormonas (por ejemplo, insulina), factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, TGF-alfa, FGF y VEGF), factores estimulantes de colonias (por ejemplo, G-CSF, M-CSF y GM-CSF (véase, por ejemplo, Burgess, *Immunology Today*, 5, 155-158 (1984)), somatostatina y transferrina (véase, por ejemplo, O'Keefe et al., *J. Biol. Chem.*, 260, 932-937 (1985)). Por ejemplo, se puede usar GM-CSF, que se une a las células mieloides, como agente de unión a células para abordar las células de leucemia mielógena aguda. Además, se puede usar IL-2, que se une a células T activadas, para la prevención del rechazo de injertos trasplantados, para la terapia y la prevención de la enfermedad del injerto contra el huésped y para el tratamiento de la leucemia de células T aguda. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) puede ser usado para abordar cánceres escamosos, tales como el cáncer de pulmón y el cáncer de la cabeza y del cuello. La somatostatina puede ser usada para abordar células de neuroblastoma y otros tipos de células tumorales.
- 25
- 30 El conjugado comprende un maitansinoide como agente citotóxico. Un "agente citotóxico", tal como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier compuesto que dé lugar a la muerte de una célula, que induzca la muerte celular o que disminuya la viabilidad celular. Como agentes citotóxicos adecuados, se incluyen, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoides. Según esta invención, el agente citotóxico es un maitansinoide, incluyendo el maitansinol y análogos del maitansinol. Los maitansinoides son compuestos que inhiben la formación de los microtúbulos y son altamente tóxicos para las células de mamíferos. Como ejemplos de análogos de maitansinol adecuados se incluyen los que tienen un anillo aromático modificado y los que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. 4.256.746, 4.294.757, 4.307.016, 4.313.946, 4.315.929, 4.322.348, 4.331.598, 4.361.650, 4.362.663, 4.364.866, 4.424.219, 4.371.533, 4.450.254, 5.475.092, 5.585.499, 5.846.545 y 6.333.410.
- 35
- 40 Como ejemplos de análogos de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado, se incluyen: (1) C-19-descloro (Patente de EE. UU. 4.256.746) (preparado por reducción LAH de ansamitocina P2), (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/- C-19-descloro (Patentes de EE. UU. 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 (Patente de EE. UU. 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo).
- 45
- 50 Como ejemplos de análogos de maitansinol que tienen modificaciones en posiciones distintas a un anillo aromático, se incluyen: (1) C-9-SH (Patente de EE. UU. 4.424.219) (preparado por reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅), (2) C-14-alcoximetil (desmetoxi/CH₂OR) (Patente de EE. UU. 4.331.598), (3) C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH₂OH o CH₂OAc) (Patente de EE. UU. 4.450.254) (preparado a partir de *Nocardia*), (4) C-15-hidroxi/aciloxi (Patente de EE. UU. 4.364.866) (preparado por conversión del maitansinol por *Streptomyces*), (5) C-15-metoxi (Patentes de EE. UU. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*), (6) C-18-N-desmetil (Patentes de EE. UU. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por desmetilación del maitansinol por *Streptomyces*) y (7) 4,5-desoxi (Patente de EE. UU. 4.371.533) (preparado por reducción con tricloruro de titanio/LAH del maitansinol).
- 55 En una realización preferida de la invención, los conjugados utilizan el maitansinoide que contiene tiol DM1, también conocido como N^{2'}-desacetil-N^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropil)maitansina, como agente citotóxico. La estructura de DM1 está representada por la fórmula (I):



(I)

En otra realización preferida de la invención, el conjugado utiliza el maitansinoide que contiene tiol DM4, también conocido como N-2'-desacetil-N-2'-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)maitansina, como agente citotóxico. La estructura de DM4 está representada por la fórmula (II):



(II)

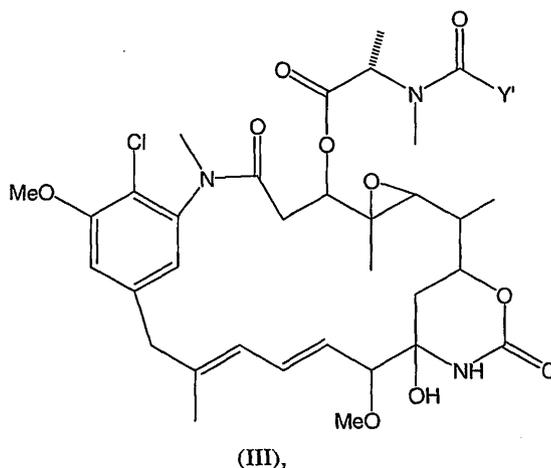
5

Se pueden usar otras maitansinas en relación al procedimiento de la invención, incluyendo, por ejemplo, maitansinoides que contienen tiol y disulfuro portadores de una sustitución con mono o di-alquilo sobre el átomo de carbono que lleva el átomo de azufre. Es particularmente preferido un maitansinoide que tiene en la posición C₃ (a) funcionalidad C₁₄ hidroximetilo, C₁₅ hidroxilo o C₂₀ desmetilo, y (b) una cadena lateral de aminoácidos acilados con un grupo acilo portador de un grupo sulfhidrilo bloqueado, donde el átomo de carbono del grupo acilo portador de la funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además donde uno de los sustituyentes puede ser H, y donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

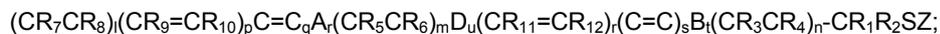
10

15

Como maitansinas adicionales para uso en la invención, se incluyen compuestos representados por la fórmula (III):



donde Y' representa



5 donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenido lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y donde R₂ también puede ser H;

donde A, B y D son cicloalquilo o cicloalquenido de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

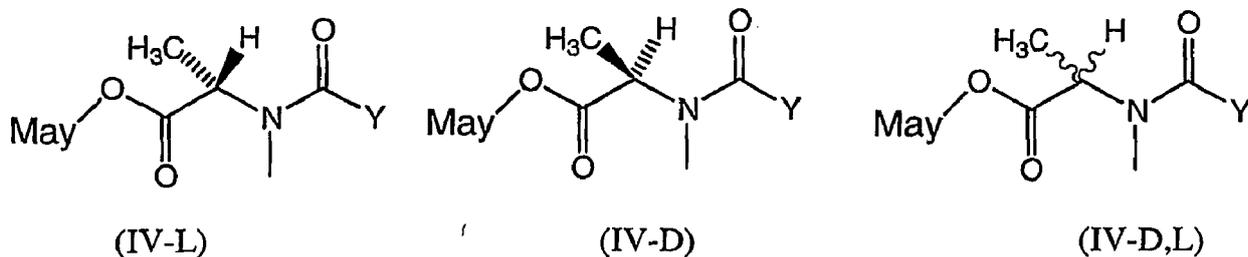
10 donde R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁ y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenido lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

donde l, m, n, o, p, q, r, s y t son cada uno independientemente cero o un número entero de 1 a 5, siempre que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento, y

15 donde Z es H, SR o COR, donde R es alquilo o alquenido lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

Como realizaciones preferidas de fórmula (III), se incluyen compuestos de fórmula (III) donde (a) R₁ es H, R₂ es metilo y Z es H; (b) R₁ y R₂ son metilo y Z es H; (c) R₁ es H, R₂ es metilo y Z es -SCH₃, y (d) R₁ y R₂ son metilo y Z es -SCH₃.

20 Dichas maitansinas adicionales incluyen también compuestos representados por la fórmula (IV-L), (IV-D) o (IV-D, L):



donde Y representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$;

25 donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenido lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y donde R₂ también puede ser H;

donde R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenido lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

donde l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5 y además n puede ser cero;

30 donde Z es H, SR o COR, donde R es alquilo o alquenido lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o

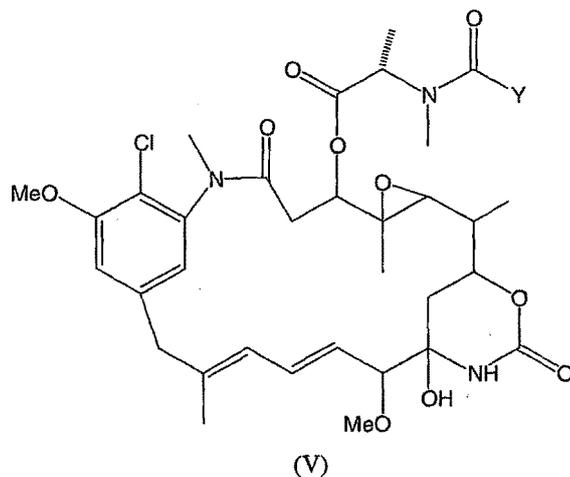
alqueno cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y

donde May representa un maitansinoide que lleva la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo.

- 5 Como realizaciones preferidas de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L), se incluyen compuestos de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) donde (a) R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, 1 y m son cada uno 1, n es 0 y Z es H; (b) R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, 1 y m son 1, n es 0 y Z es H; (c) R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, 1 y m son cada uno 1, n es 0 y Z es -SCH₃; o (d) R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, 1 y m son 1, n es 0 y Z es -SCH₃.

- 10 Preferentemente, el agente citotóxico está representado por la fórmula (IV-L).

Como maitansinas preferidas adicionales, también se incluyen compuestos representados por la fórmula (V):



donde Y representa (CR₇CR₈)₁(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ;

- 15 donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y donde R₂ también puede ser H;

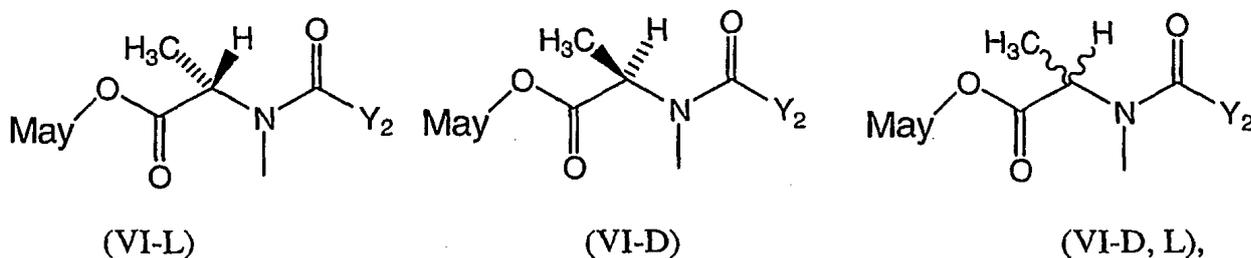
donde R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

- 20 donde 1, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5 y además n puede ser cero, y

donde Z es H, SR o COR, donde R es alquilo o alqueno lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

- 25 Como realizaciones preferidas de fórmula (V), se incluyen compuestos de fórmula (V) donde (a) R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, 1 y m son cada uno 1, n es 0 y Z es H, (b) R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, 1 y m son 1, n es 0 y Z es H, (c) R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, 1 y m son cada uno 1, n es 0 y Z es -SCH₃; o (d) R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, 1 y m son 1, n es 0 y Z es -SCH₃.

- 30 Como otras maitansinas aún más preferidas, se incluyen compuestos representados por la fórmula (VI-L), (VI-D) o (VI-D, L):



donde Y_2 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$;

donde R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y donde R_2 también puede ser H;

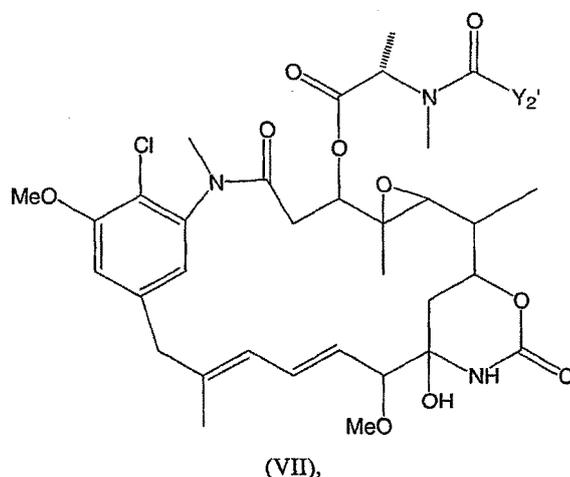
- 5 donde R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo,

donde 1, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5 y además n puede ser cero;

- 10 donde Z_2 es SR o COR, donde R es alquilo o alquenilo lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y

donde May es un maitansinoide.

Como maitansinas preferidas adicionales, se incluyen compuestos representados por la fórmula (VII):



- 15 donde Y_2 representa

$(CR_7CR_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qAr(CR_5CR_6)_mDu(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sBt(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$;

donde R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

- 20 donde A, B y D son cada uno independientemente cicloalquilo o cicloalquenilo de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

donde R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo,

- 25 donde l, m, n, o, p, q, r, s y t son cada uno independientemente cero o un número entero de 1 a 5, siempre que al menos dos de 1, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento, y

donde Z_2 es SR o -COR, donde R es alquilo o alquenilo lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

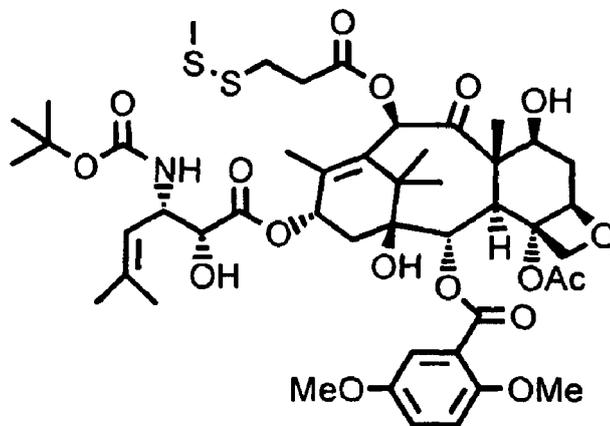
- 30 Como realizaciones preferidas de fórmula (VII), se incluyen compuestos de fórmula (VII) donde R_1 es H y R_2 es metilo.

Otro agente citotóxico conocido en la técnica es un taxano o un derivado de este. Los taxanos son una familia de compuestos que incluye el paclitaxel (TAXOL®), un producto natural citotóxico, y el docetaxel (TAXOTERE™), un derivado semisintético, los cuales son ambos ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer. Los taxanos son venenos del huso mitótico que inhiben la despolimerización de la tubulina, dando como resultado la muerte celular.

- 35 Aunque el docetaxel y el paclitaxel son agentes útiles en el tratamiento del cáncer, su actividad antitumoral es limitada debido a su toxicidad no específica hacia las células normales. Además, compuestos como el paclitaxel y el

docetaxel no son suficientemente potentes como para ser usados en conjugados de agentes de unión a células.

Un taxano preferido para uso en la preparación de conjugados citotóxicos es el taxano de fórmula (VIII):



(VIII)

5 Se describen con detalle métodos para sintetizar taxanos, junto con métodos para conjugar taxanos con agentes de unión a células, tales como anticuerpos, en las Patentes de EE. UU. 5.416.064, 5.475.092, 6.340.701, 6.372.738, 6.436.931, 6.596.757, 6.706.708 y 6.716.821, y en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2004/0024049 A1.

10 Otro agente citotóxico conocido en la técnica es CC-1065 o un derivado de éste. CC-1065 es un potente antibiótico antitumoral aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1.000 veces más potente *in vitro* que los fármacos anticancerosos comúnmente utilizados, tales como doxorubicina, metotrexato y vincristina (Bhuyan et al., Cancer Res., 42, 3532-3537 (1982)). Se divulgan el CC-1065 y sus análogos en las Patentes de EE. UU. 5.585.499, 5.846.545, 6.340.701 y 6.372.738. Se ha correlacionado la potencia citotóxica de CC-1065 con su actividad alquilante y su actividad de unión al ADN o de intercalación en el ADN. Estas dos actividades residen en partes separadas de la molécula. A este respecto, la actividad alquilante está contenida en la subunidad de ciclopropapirroloindol (CPI) y la actividad de unión al ADN reside en las dos subunidades de pirroloindol de CC-1065.

20 Se conocen en la técnica varios análogos de CC-1065 (véase, por ejemplo, Warpehoski et al., J. Med. Chem., 31, 590-603 (1988)). Se han desarrollado una serie de análogos de CC-1065 en los que el resto de CPI está reemplazado por un resto de ciclopropabenzindol (CBI) (Boger et al., J. Org. Chem., 55, 5823-5833 (1990), y Boger et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1, 11S- 120 (1991)). Estos análogos de CC-1065 mantienen la elevada potencia *in vitro* del fármaco parental, sin causar toxicidad retardada en ratones. Al igual que CC-1065, estos compuestos son agentes alquilantes que se unen covalentemente al surco menor del ADN para causar muerte celular.

25 La eficacia terapéutica de los análogos de CC-1065 puede verse muy mejorada cambiando la distribución *in vivo* a través de la administración dirigida a un sitio tumoral, lo que da como resultado una menor toxicidad para los tejidos no abordados y, por lo tanto, una menor toxicidad sistémica. Con este fin, se han generado conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con agentes de unión a células que se dirigen específicamente a células tumorales (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. 5.475.092, 5.585.499 y 5.846.545). Estos conjugados típicamente exhiben una gran citotoxicidad específica de diana *in vitro* y actividad antitumoral en modelos de xenoinjertos tumorales humanos en ratones (véase, por ejemplo, Chari et al., Cancer Res., 55, 4079-4084 (1995)).

30 Se describen métodos para sintetizar análogos de CC-1065 con detalle en las Patentes de EE. UU. 5.475.092, 5.585.499, 5.846.545, 6.534.660, 6.586.618 y 6.756.397 y en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2003/0195365 A1.

35 Fármacos tales como el metotrexato, la daunorrubicina, la doxorubicina, la vincristina, la vinblastina, el melfalán, la mitomicina C, el clorambucilo, la calicheamicina, la tubulisina y análogos de la tubulisina, la duocarmicina y análogos de la duocarmicina y la dolastatina y análogos de la dolastatina, así como compuestos de oxarrubicina y daunorrubicina (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 6.630.579) son conocidos en la técnica.

40 Los conjugados de fármaco pueden ser preparados por métodos *in vitro*. Con objeto de unir un fármaco o profármaco al anticuerpo, se usa un grupo de unión. Los grupos de unión adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas y grupos lábiles a esterases. Son grupos de unión preferidos los grupos disulfuro. Por ejemplo, se pueden construir conjugados usando una reacción de intercambio de disulfuro entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco.

Según el método de la invención, el agente de unión a células es modificado por reacción de un reactivo entrecruzante bifuncional con el agente de unión a células, para obtener así como resultado la unión covalente de una molécula de conector al agente de unión a células. Tal como se utiliza en este documento, un "reactivo entrecruzante bifuncional" es cualquier resto químico que una covalentemente un agente de unión a células a un fármaco, tal como los fármacos descritos en este documento. En una realización preferida de la invención, una porción del resto de unión es aportada por el fármaco. A este respecto, el fármaco comprende un resto de unión que es parte de una molécula conectora mayor que se usa para unir el agente de unión a células al fármaco. Por ejemplo, para formar el maitansinoide DM1, se modifica la cadena lateral en el grupo hidroxilo C-3 de la maitansina para tener un grupo sulfhidrilo libre (SH). Esta forma tiolada de la maitansina puede reaccionar con un agente de unión a células modificado para formar un conjugado. Por lo tanto, el conector final se forma a partir de dos componentes, uno de los cuales es aportado por el reactivo entrecruzante, mientras que el otro es aportado por la cadena lateral de DM1.

Se puede usar cualquier reactivo entrecruzante bifuncional adecuado en relación a la invención, en la medida en que el reactivo conector permita conservar las características terapéuticas, por ejemplo, citotoxicidad, y de abordaje del fármaco y del agente de unión a células, respectivamente. Preferentemente, la molécula conectora une el fármaco al agente de unión a células a través de enlaces químicos (como se ha descrito anteriormente), de tal forma que el fármaco y el agente de unión a células se acoplan químicamente (por ejemplo, se unen covalentemente) entre sí. Preferentemente, el reactivo de unión es un conector escindible. Más preferentemente, el conector se escinde en condiciones suaves, es decir, condiciones en el interior de una célula bajo las cuales no resulta afectada la actividad del fármaco. Como ejemplos de conectores escindibles adecuados, se incluyen conectores disulfuro, conectores lábiles a ácidos, conectores fotolábiles, conectores lábiles a peptidasas y conectores lábiles a esterasas. Los conectores que contienen disulfuro son conectores escindibles por intercambio de disulfuro, que puede producirse en condiciones fisiológicas. Los conectores lábiles a ácidos son conectores escindibles a pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimentos intracelulares, tales como los endosomas y los lisosomas, tienen un pH ácido (pH de 4 a 5) y proporcionan condiciones adecuadas para escindir conectores lábiles a ácidos. Los conectores fotolábiles son útiles en la superficie del cuerpo y en muchas cavidades corporales que son accesibles a la luz. Además, la luz infrarroja puede penetrar en el tejido. Los conectores lábiles a peptidasas pueden ser usados para escindir ciertos péptidos dentro o fuera de las células (véanse por ejemplo, Trouet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 626-629 (1982), y Umemoto et al., Int. J. Cancer, 43, 677-684 (1989)).

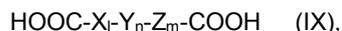
Preferentemente, el fármaco se une a un agente de unión a células a través de un enlace disulfuro. La molécula conectora comprende un grupo químico reactivo que puede reaccionar con el agente de unión a células. Son grupos químicos reactivos preferidos para la reacción con el agente de unión a células los ésteres de N-succinimidilo y los ésteres de N-sulfosuccinimidilo. Además, la molécula conectora comprende un grupo químico reactivo, preferentemente un grupo ditiopiridilo, que puede reaccionar con el fármaco para formar un enlace disulfuro. Como moléculas conectoras particularmente preferidas, se incluyen, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (véase, por ejemplo, Carlsson et al., Biochem. J., 173, 723-737 (1978)), 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB) (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 4.563.304) y 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) (véase, por ejemplo, número de Registro CAS 341498-08-6).

Aunque preferentemente se usan conectores escindibles en el procedimiento de la invención, también se puede usar un conector no escindible para generar el conjugado antes descrito. Un conector no escindible es cualquier resto químico que sea capaz de unir un fármaco, tal como un maitansinoide, un taxano o un análogo de CC-1065, a un agente de unión a células de una manera covalente estable. Así, los conectores no escindibles son sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, a la escisión inducida por la luz, a la escisión inducida por peptidasas, a la escisión inducida por esterasas y a la escisión de enlaces disulfuro, en condiciones en las cuales el fármaco o el agente de unión a células permanece activo.

Los reactivos entrecruzantes adecuados que forman conectores no escindibles entre un fármaco y el agente de unión a células son bien conocidos en la técnica. Como ejemplos de conectores no escindibles, se incluyen conectores que tienen un resto de éster de N-succinimidilo o de éster de N-sulfosuccinimidilo para la reacción con el agente de unión a células, así como un resto basado en maleimido- o haloacetilo para la reacción con el fármaco. Como reactivos entrecruzantes que comprenden un resto basado en maleimido, se incluyen 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), éster N-succinimidilo del ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), éster N-succinimidilo del ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido ε -maleimidocaproico (EMCS), éster m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster N-(α -maleimidoacetoxi)succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)butirato de N-succinimidilo (SMPB) y N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI). Como reactivos entrecruzantes que comprenden un resto basado en haloacetilo, se incluyen 4-(yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA) y 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidilo (SBAP).

También se pueden usar otros reactivos entrecruzantes que carecen de átomo de azufre y que forman conectores no escindibles en el método de la invención. Dichos conectores pueden derivar de restos basados en ácido

dicarboxílico. Como restos basados en ácido dicarboxílico adecuados, se incluyen ácidos α,ω -dicarboxílicos de fórmula general (IX):



5 donde X es un grupo alquilo, alqueno o alquino lineal o ramificado de 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalqueno de 3 a 10 átomos de carbono, Z es un grupo aromático sustituido o no sustituido de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido donde el heteroátomo es seleccionado entre N, O o S, y donde l, m y n son cada uno 0 ó 1, siempre que l, m y n no sean todos cero al mismo tiempo.

Muchos de los conectores no escindibles divulgados en este documento están descritos con detalle en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2005/0169933 A1.

10 Según el procedimiento de la invención, se produce una mezcla que comprende el agente de unión a células que tiene conectores unidos estable e inestablemente al mismo, así como reactivos y otros subproductos. Un conector está "establemente" unido al agente de unión a células cuando el enlace covalente entre el conector y el agente de unión a células no resulta sustancialmente debilitado o cortado en condiciones normales de almacenamiento a lo largo de un período de tiempo, que podría ir de varios meses a varios años. Por el contrario, un conector está "inestablemente" unido al agente de unión a células cuando el enlace covalente entre el conector y el agente de unión a células resulta sustancialmente debilitado o cortado en condiciones normales de almacenamiento a lo largo de un período de tiempo, que podría ir de varios meses a varios años. La purificación del agente de unión a células modificado con respecto a los reactivos y subproductos es preferentemente llevada a cabo sometiendo la mezcla a cromatografía en resina SEPHADEX™ o a una etapa cromatográfica no absorbente similar. Como ejemplos de resinas para cromatografía adecuadas, se incluyen SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, resinas SEPHACRYL™ (por ejemplo, S-200 y S-300), resinas SUPERDEX™ (por ejemplo, SUPERDEX™ 75 y SUPERDEX™ 200), resinas BIO-GEL® (por ejemplo, P-6, P-10, P-30, P-60 y P-100) y otras conocidas para quienes tienen conocimientos ordinarios en la técnica.

25 El agente de unión a células modificado es conjugado con un fármaco (por ejemplo, un maitansinoide) por reacción del agente de unión a células modificado con el fármaco en una solución que tiene un pH que va de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8, donde la etapa de conjugación da lugar a la formación de una mezcla de conjugados agente de unión a células-fármaco estables, conjugados agente de unión a células-fármaco no estables, fármaco no conjugado (es decir, fármaco "libre"), reactivos y subproductos. Se puede realizar una mayor purificación repitiendo la etapa de purificación, por ejemplo, en SEPHADEX™ G-25 o una resina cromatográfica no absorbente similar, antes descrita para eliminar el fármaco no conjugado, los reactivos y los subproductos y retener sustancialmente los conjugados agente de unión a células-fármaco.

35 El procedimiento de la invención comprende además una etapa de mantenimiento tras la modificación del agente de unión a células con un reactivo entrecruzante bifuncional. La etapa de mantenimiento comprende el mantenimiento de la solución a una temperatura adecuada durante un período de tiempo adecuado para liberar los conectores inestablemente unidos del agente de unión a células sin liberar sustancialmente los conectores establemente unidos del agente de unión a células. Deseablemente, la etapa de mantenimiento comprende el mantenimiento de la solución a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C durante un período de al menos aproximadamente 12 horas a 30 días o más. Como alternativa, la duración de la etapa de mantenimiento puede ser sustancialmente reducida realizando la etapa de mantenimiento a una temperatura elevada, estando limitada la temperatura máxima por la estabilidad del conjugado agente de unión a células-fármaco. Por ejemplo, para un conjugado anticuerpo-fármaco, la etapa de mantenimiento puede ser realizada a hasta aproximadamente 37°C durante hasta aproximadamente cuatro semanas, preferentemente entre dos y cuatro semanas, incluso más preferentemente entre una y dos semanas, y más preferentemente durante aproximadamente una semana o menos (por ejemplo, de 2 horas a aproximadamente seis días). Los valores preferidos del pH para la etapa de mantenimiento varían de aproximadamente 6 a 10. Los valores más preferidos del pH son de entre aproximadamente 6,5 y 8,5. Preferentemente, la etapa de mantenimiento comprende la incubación de la mezcla que contiene el agente de unión a células modificado a 4°C y a pH 6,5 durante al menos aproximadamente 12 horas a 4 semanas. Más preferentemente, la etapa de mantenimiento comprende la incubación de la mezcla que contiene el agente de unión a células modificado a entre 20 y 30°C y a pH 6,5 durante aproximadamente 12 horas a 50 aproximadamente 1 semana. Se puede realizar la etapa de mantenimiento antes o después de conjugar el agente de unión a células con el fármaco. Preferentemente, la etapa de mantenimiento es realizada directamente tras la modificación del agente de unión a células con el reactivo entrecruzante bifuncional.

55 En una realización preferida, el procedimiento de la invención comprende una etapa de mantenimiento tras la modificación del agente de unión a células con un reactivo entrecruzante bifuncional y antes de la conjugación. La etapa de mantenimiento comprende el mantenimiento de la solución a una temperatura adecuada durante un período de tiempo adecuado para liberar los conectores inestablemente unidos del agente de unión a células sin liberar sustancialmente los conectores establemente unidos del agente de unión a células. Deseablemente, la etapa de mantenimiento comprende el mantenimiento de la solución a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C durante un período de al menos aproximadamente 5 horas a 5 días o más, por ejemplo 30 60 días. Como alternativa, la duración de la etapa de mantenimiento puede ser sustancialmente reducida realizando la

etapa de mantenimiento a elevada temperatura, estando limitada la temperatura máxima por la estabilidad del conjugado agente de unión a células-fármaco. Por ejemplo, para un conjugado anticuerpo-fármaco, la etapa de mantenimiento puede ser realizada a hasta aproximadamente 37°C durante hasta aproximadamente cuatro semanas, preferentemente entre dos y cuatro semanas, incluso más preferentemente entre una y dos semanas, y más preferentemente durante aproximadamente una semana o menos (por ejemplo, de 2 horas a aproximadamente seis días). El valor del pH para la etapa de mantenimiento es preferentemente de aproximadamente 4 o más, pero inferior a aproximadamente 6 (por ejemplo, de 4 a 5,9). El valor del pH para la etapa de mantenimiento es más preferentemente de aproximadamente 5 o más, pero inferior a aproximadamente 6 (por ejemplo, de 5 a 5,9). Preferentemente, la etapa de mantenimiento comprende la incubación de la mezcla que contiene el agente de unión a células modificado a 4°C y a pH 5 durante al menos aproximadamente 5 horas a 5 días o más, por ejemplo 10 días. Más preferentemente, la etapa de mantenimiento comprende la incubación de la mezcla que contiene el agente de unión a células modificado a entre 20 y 30°C y a un pH de aproximadamente 5 durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 1 a 3 días, preferentemente 1 día. Tras la modificación del agente de unión a células, se puede realizar una etapa de purificación antes de la etapa de mantenimiento y/o después de la etapa de mantenimiento, pero antes de la etapa de conjugación. Dichas etapas de purificación, tales como cromatografía no adsorbtiva o adsorbtiva, son bien conocidas para alguien con conocimientos ordinarios en la técnica.

En una realización, la duración de la etapa de mantenimiento puede ser sustancialmente reducida por adición de nucleófilos. Se pueden añadir los nucleófilos durante la etapa de conjugación y se puede realizar la etapa de mantenimiento simultáneamente a la conjugación. En el contexto de la invención, los nucleófilos son restos químicos que pueden reaccionar con grupos éster y amidas de imidazol sobre agentes de unión a células modificados en soluciones acuosas. Se conocen en la técnica nucleófilos adecuados, y se incluyen, por ejemplo, aminas primarias, es decir, RNH₂, donde R es un grupo alquilo o aromático, o aminas secundarias, es decir, RR'NH, donde R y R' son grupos alquilo o aromáticos. Las aminas pueden ser también aminoácidos, péptidos que contienen aminoácidos de lisina, péptidos que contienen grupos alfa-amino o amino secundario no natural o aminas hidrosolubles. Los nucleófilos pueden estar en solución, en estado polimérico o en forma inmovilizada como reactivo de fase sólida. Como ejemplos de nucleófilos adecuados en solución, se incluyen glicilglicina, glicina, taurina (2-aminoetanosulfonato de sodio), etanolamina, dietanolamina, lisina, hidroxilamina, hidrazina, imidazol, histidina, etilamina, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol y 4-amino-1-butanol. Las concentraciones apropiadas de nucleófilos solubles varían de aproximadamente 0,1 mM al límite de solubilidad para el nucleófilo particular. Como ejemplos de nucleófilos en estado polimérico, se incluyen poli(etilenimina), polilisina y péptidos con aminoácidos de lisina y péptidos que contienen grupos alfa-amino o amino secundario no natural. Como ejemplos de nucleófilos en forma inmovilizada como reactivos de fase sólida, se incluyen aminas ligadas a fase sólida, tales como EAH Sepharose 4B y perlas de aminometilpoliestireno. Para un nucleófilo en fase sólida, la cantidad molar de amina en fase sólida debe estar en exceso con respecto a la cantidad de entrecruzante unido al agente de unión a células.

El método de la invención comprende además la conjugación del agente de unión a células modificado con un fármaco por reacción del agente de unión a células modificado con un fármaco en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8, mediante lo cual se produce una segunda mezcla que comprende (i) el agente de unión a células químicamente acoplado a el fármaco, (ii) fármaco libre y (iii) solventes y subproductos de la reacción. Aunque la reacción de conjugación es llevada a cabo a un pH de entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 8,0, la reacción es preferentemente llevada a cabo a un pH inferior a 6 o superior a 7.

El procedimiento de la invención puede opcionalmente incluir la adición de sacarosa a la etapa de conjugación utilizada en el procedimiento de la invención para aumentar la solubilidad y la recuperación de los conjugados agente de unión a células-fármaco. Deseablemente, la sacarosa es añadida a una concentración de aproximadamente un 0,1% (p/v) a aproximadamente un 20% (p/v) (por ejemplo, de aproximadamente un 0,1% (p/v), un 1% (p/v), un 5% (p/v), un 10% (p/v), un 15% (p/v) o un 20% (p/v)). Preferentemente, la sacarosa es añadida a una concentración de aproximadamente un 1% (p/v) a un 10% (p/v) (por ejemplo, de aproximadamente un 2% (p/v), aproximadamente un 4% (p/v), aproximadamente un 6% (p/v) o aproximadamente un 8% (p/v)). Además, la reacción de conjugación puede también comprender la adición de un agente tamponante. Se puede usar cualquier agente tamponante adecuado conocido en la técnica. Como agentes tamponantes adecuados, se incluyen, por ejemplo, un tampón citrato, un tampón acetato, un tampón succinato y un tampón fosfato.

Después de la etapa de conjugación, el conjugado es preferentemente sometido a una etapa de purificación final. En este sentido, se puede purificar la mezcla de conjugación usando un procedimiento de filtración de flujo tangencial (TFF) basado en membrana. Alguien con conocimientos ordinarios en la técnica apreciará que la etapa de purificación final permite el aislamiento de un conjugado estable que comprende el agente de unión a células químicamente acoplado al fármaco.

Como alternativa, como se divulga en la Patente de EE. UU. 6.441.163 B1, el fármaco puede ser primeramente modificado para introducir un éster reactivo adecuado para reaccionar con un agente de unión a células. La reacción de estos maitansinoides que contienen un resto conector activado con un agente de unión a células proporciona otro método de producción de un conjugado agente de unión a células-maitansinoide escindible o no escindible.

Así, se proporciona otro procedimiento para preparar un conjugado que comprende un agente de unión a células químicamente acoplado a un fármaco, cuyo procedimiento comprende: (a) poner en contacto un agente de unión a

5 células con un fármaco portador de un éster activo y preparar así una mezcla que comprende agentes de unión a células que tienen fármacos estable e inestablemente unidos a los mismos; (b) someter la mezcla a cromatografía no adsorptiva para purificar el agente de unión a células que tiene fármaco unido al mismo de otros componentes de la mezcla y preparar así una mezcla purificada; (c) opcionalmente, someter la mezcla purificada a filtración de flujo tangencial (TFF) para aislar un conjugado que comprende el agente de unión a células químicamente acoplado a el fármaco, y (d) mantener la mezcla entre al menos una de las etapas a-b y b-c para liberar los fármacos inestablemente unidos del agente de unión a células.

10 Los conjugados pueden ser purificados como se describe en la Patente de EE. UU. 6.441.163 B1. Después de formarse el conjugado y antes de una etapa de purificación final, se puede incluir una etapa de mantenimiento con objeto de permitir el aislamiento de un conjugado estable que comprende el agente de unión a células químicamente acoplado a el fármaco. Se puede reducir la etapa de mantenimiento realizándola a elevada temperatura, a elevado pH y/o en presencia de nucleófilos, como se ha descrito anteriormente. Además, se puede llevar a cabo la reacción del agente de unión a células con el fármaco portador de un éster reactivo a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,0, opcionalmente en presencia de sacarosa (de un 0,1% (p/v) a aproximadamente un 20% (p/v)), también como se ha descrito anteriormente.

15 Los siguientes ejemplos dan una mayor ilustración de la invención.

Ejemplo 1A

20 Este ejemplo demuestra un procedimiento de preparación de un conjugado que comprende un anticuerpo químicamente acoplado a un fármaco, que incluye una etapa de mantenimiento realizada tras la modificación del anticuerpo con un reactivo entrecruzante bifuncional y antes de la conjugación del anticuerpo con el fármaco.

25 Se incubó el anticuerpo monoclonal huN901 (concentración final 8 mg/ml) con 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) (exceso molar de 7 veces de SPP) durante aproximadamente 100 minutos a temperatura ambiente en tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y un 5% de etanol. Se purificó la mezcla de reacción usando una columna de SEPHADEX™ G25F equilibrada y eluida en el tampón fosfato de potasio antes mencionado sin etanol.

30 Se mantuvieron muestras de anticuerpo modificado durante hasta dos semanas a 4°C y se conjugaron luego con el maitansinoide DM1 (exceso molar de 1,7 veces con respecto al conector) disuelto en dimetilacetamida (DMA, la concentración final es del 3%). Después de incubar durante la noche a temperatura ambiente, se purificaron las muestras de anticuerpo conjugado por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en solución salina tamponada con fosfatos (PBS), pH 6,5. Se guardaron las muestras a 4°C durante una semana. Se determinó el número de moléculas de DM1 unidas por molécula de anticuerpo usando los coeficientes de extinción previamente reportados para anticuerpo y fármaco (Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 8618-8623 (1996)). Se determinó la cantidad de fármaco libre presente tras la reacción de conjugación inyectando de 20 a 50 µg de conjugado en una columna HiSep equilibrada en acetonitrilo al 25% en tampón acetato de amonio 100 mM, pH 7,0, y eluyendo en acetonitrilo. Se comparó el área pico de la especie del fármaco libre total (eluida en el gradiente e identificada por comparación del tiempo de elución con patrones conocidos), que se midió usando un detector de absorbancia fijado a una longitud de onda de 252 nm, con el área pico relacionada con el fármaco unido (eluido en el pico del conjugado en las fracciones de flujo a través de la columna) para calcular la proporción de la especie del fármaco total que estaba libre. Los resultados de este análisis son mostrados en la Tabla 1.

40 Tabla 1: Efecto del tiempo de mantenimiento sobre las características del conjugado

Tiempo de mantenimiento	Proporción fármaco/anticuerpo	% Fármaco libre
0	3,7	6,4
2 semanas	3,6	0,5

45 Como se ve por los datos mostrados en la Tabla 1, el mantenimiento del anticuerpo modificado a 4°C tras la modificación, pero antes de la conjugación, reducía significativamente la cantidad de fármaco libre en la muestra de conjugado tras almacenamiento durante una semana, sin afectar significativamente a la cantidad de fármaco unido (como se refleja en la proporción fármaco/anticuerpo).

Ejemplo 1B

Este ejemplo demuestra el impacto beneficioso de una etapa de mantenimiento a pH 5,0 en relación a pH 6,5 y 7,5 tras la modificación de un anticuerpo con un reactivo entrecruzante bifuncional y antes de la conjugación del anticuerpo modificado con el fármaco.

50 Se incubó el anticuerpo monoclonal huN901 (concentración final 8 mg/ml) con 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-

succinimidilo (SPP) (exceso molar de 5,6 veces de SPP) durante aproximadamente 180 minutos a 20°C en tampón fosfato de potasio 50 mM que contenía NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y un 5% de etanol, a pH 7,5. Se dividió la mezcla de reacción en tres partes y se purificó cada parte usando columnas de filtración por gel empaquetadas con SEPHADEX™ G25 (columna NAP 10 obtenida de Amersham Biosciences) y equilibradas y eluidas con tres tampones diferentes. La primera columna fue equilibrada y eluida con un tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 50 mM y EDTA 2 mM. La segunda columna fue equilibrada y eluida con un tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl 50 mM y EDTA 2 mM. La tercera columna fue equilibrada y eluida con un tampón citrato de sodio 50 mM (pH 5,0) que contenía NaCl 50 mM y EDTA 50 mM.

Se estudió el número de grupos piridilditio (-SSPy) unidos al anticuerpo por tratamiento con ditiotreitolo para liberar piridino-2-tiona, que tiene un coeficiente de extinción de $8.080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 343 nm. Las tres muestras tenían todas 4,7 -SSPy unidos por molécula de anticuerpo.

Se mantuvieron muestras de anticuerpo modificado durante hasta 121 horas a temperatura ambiente. La cantidad de ácido 4-(2-piridilditio)pentanoico (PPA) liberado en el transcurso de este tiempo es una medida de la liberación de conector débilmente unido. Se determinó la liberación de PPA inyectando de 45 a 55 μg de los anticuerpos modificados cada 1,5 horas en una columna HiSep equilibrada en acetonitrilo al 25% en tampón acetato de amonio 100 mM, pH 7,0, y eluyendo en acetonitrilo. Se usó el área pico de la especie PPA (eluida en el gradiente e identificada por comparación del tiempo de elución con patrones conocidos), que se midió usando un detector de absorbancia fijado a una longitud de onda de 252 nm, para calcular el porcentaje de conector liberado en cada muestra. Los resultados de este análisis son mostrados en la Figura.

Tal como se muestra en la Figura, la liberación de PPA, que representa conector débilmente unido, es significativamente más rápida a pH 5,0, en comparación con pH 6,5 y 7,5. Además, la liberación de PPA es sustancialmente más completa a pH 5,0 a lo largo de un período de tiempo apropiado para la fabricación (por ejemplo, entre aproximadamente 5 y 24 horas).

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra un procedimiento de preparación de un conjugado que comprende un anticuerpo químicamente acoplado a un fármaco, que incluye una etapa de mantenimiento realizada tras la modificación del anticuerpo con un reactivo entrecruzante bifuncional y antes de la conjugación del anticuerpo con el fármaco.

Se trató una solución de anticuerpo huC242 (16 mg a 8 mg/ml) en un tampón a pH 6,5, consistente en fosfato de potasio 50 mM, cloruro de sodio 50 mM y ácido etilendiaminotetraacético 2 mM (EDTA), sal disódica, a temperatura ambiente con una solución de SPP (stock 10 mM en etanol, exceso molar de 6,5; la concentración final de etanol era del 5% v/v). Se incubó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se pasó entonces una porción (0,4 ml) de la mezcla a través de una columna de filtración por gel empaquetada con SEPHADEX™ G25 (columna NAP 10 obtenida de Amersham Biosciences) para eliminar cualquier SPP no reaccionado y otro material de bajo peso molecular. La elución con el tampón anterior dio el anticuerpo modificado ("muestra A"). Se trató una segunda porción de la mezcla de reacción (0,2 ml) con una solución de lisina (0,05 ml de una solución stock de lisina 250 mM en tampón fosfato de potasio 500 mM, pH 7,5, que contenía EDTA 10 mM), para dar una concentración final de lisina de 50 mM. Se incubó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante dos horas y se purificó después por paso a través de una columna de filtración por gel como se ha descrito anteriormente, para obtener la "muestra B".

Se estudió el número de grupos piridilditio (-SSPy) unidos al anticuerpo por tratamiento con ditiotreitolo, para liberar piridino-2-tiona, que tiene un coeficiente de extinción de $8.080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 343 nm. La muestra parental A que no había sido tratada con lisina tenía 4,9 -SSPy unidos por molécula de anticuerpo. La muestra B tenía 3,5 -SSPy unidos por molécula de anticuerpo, lo que indica que el tratamiento con lisina elimina el conector inestablemente unido, que en esta muestra era de hasta el 40% del conector inicialmente unido total.

Se diluyó cada una de las muestras de anticuerpo modificado A y B (2,3 mg de anticuerpo) a una concentración final de 2,5 mg/ml en tampón a pH 6,5, consistente en fosfato de potasio 50 mM, cloruro de sodio 50 mM y EDTA 2 mM. Ambas muestras fueron tratadas con DM1 en dimetilacetamida (concentración final de dimetilacetamida 3% v/v) usando un exceso molar de 1,7 veces de DM1 con respecto a los -SSPy que estaban unidos. Así, se trató la muestra A con 0,13 micromoles de DM1, mientras que la muestra B tratada con lisina requería sólo 0,086 micromoles de DM1. Se incubaron las mezclas de reacción durante 24 h a temperatura ambiente.

Se separaron los conjugados anticuerpo monomérico-DM1 por paso a través de columnas de filtración por gel (20 ml) empaquetadas con SEPHACRYL™ S300, eluyendo con solución salina tamponada con fosfatos (PBS) a pH 6,5. Se determinó el número de moléculas de DM1 unidas por molécula de anticuerpo como se describe en el Ejemplo 1. La muestra A, que originalmente contenía 4,9 grupos -SSPy, dio 3,5 DM1 por anticuerpo, mientras que la muestra B, que tenía 3,5 -SSPy, dio como resultado 3,2 DM1 por anticuerpo. Se dializaron ambos conjugados anticuerpo-DM1 en PBS durante 48 horas y se volvieron a estudiar en cuanto al contenido en DM1. En la muestra A, el número de moléculas de DM1 unidas se redujo de 3,5 a 3,4, mientras que el número de moléculas de DM1 unidas en la muestra B permanecía inalterado en 3,2. Esto confirma la conclusión de que el tratamiento con lisina elimina los

conectores inestablemente unidos sin efecto sobre el nivel del fármaco DM1 establemente unido que se puede alcanzar.

Ejemplo 3

5 Este ejemplo demuestra un procedimiento de preparación de un conjugado que comprende un anticuerpo químicamente acoplado a un fármaco, que incluye una etapa de mantenimiento tras la purificación de la mezcla de reacción del conjugado y diafiltración (utilizando TFF basada en membrana) del conjugado tras la etapa de mantenimiento.

10 Se modificó el anticuerpo BIWA 4 con SPP (exceso molar de 6,6 veces de SPP con respecto al anticuerpo) durante 105 minutos a temperatura ambiente en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, que contenía NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y un 5% de etanol. Se purificó entonces el anticuerpo modificado por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, que contenía NaCl 50 mM y EDTA 2 mM. Se conjugó después el anticuerpo modificado purificado con DM1 (exceso molar de 1,7 veces con respecto al conector) en dimetilacetamida (DMA) (concentración final 3%). Después de incubar durante la noche a temperatura ambiente, se purificó el conjugado por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en PBS, pH 6,5.

15 Se puso una porción del conjugado (Muestra A) a 4°C sin mayor tratamiento. Se mantuvo una segunda porción (Muestra B) durante cuatro días a 4°C y se diafiltró después frente a PBS, pH 6,5, y se puso también a 4°C. Se midió el fármaco libre a intervalos como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados son mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2: Efecto del mantenimiento sobre el fármaco libre liberado

Meses a 4°C	Fármaco libre (%)							
	Muestra A - Sin diafiltración				Muestra B - Mantenimiento de 4 días y luego diafiltración			
	DM1	DM1-TPA	Dímero de DM1	Fármaco libre total	DM1	DM1-TPA	Dímero de DM1	Fármaco libre total
0	1,5	1,1	0,5	3,1	0,5	0,2	0,3	0,9
1	1,3	1,7	3,1	6,0	0,2	0,7	0,4	1,3
2	1,7	3,0	6,5	11,2	0,3	1,3	0,9	2,5
3	1,1	3,2	8,2	12,5	0,1	1,8	0,9	2,8

20 Tal como muestran los datos presentados en la Tabla 2, la liberación de fármaco libre de la muestra diafiltrada estaba significativamente reducida en relación a la liberación de la muestra no tratada.

Ejemplo 4A

25 Este ejemplo demuestra un procedimiento para preparar un conjugado que comprende un anticuerpo químicamente acoplado a un fármaco, cuyo procedimiento incluye una etapa de mantenimiento prolongado antes de la diafiltración por TFF basada en membrana.

30 Se hizo reaccionar al anticuerpo monoclonal BIWA 4 (concentración final de 20 mg/ml) con SPP (exceso molar de 6,6 veces de SPP) durante aproximadamente 130 minutos a temperatura ambiente en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, que contenía NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y un 5% de etanol. Se purificó el anticuerpo modificado usando una columna SEPHADEX™ G25F equilibrada y eluida en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, que contenía NaCl 50 mM y EDTA 2 mM. Se conjugó el anticuerpo modificado con DM1 (exceso molar de 1,7 veces con respecto al conector) disuelto en dimetilacetamida (DMA, concentración final 3%). Después de incubar durante la noche a temperatura ambiente, se purificaron las muestras de anticuerpo conjugado por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en solución salina tamponada con fosfatos (PBS), pH 6,5.

35 Se mantuvo una porción del conjugado durante un día a 4°C, se diafiltró por TFF basada en membrana frente a succinato de sodio 10 mM, pH 5,5, y se puso a 4°C. Se mantuvo una segunda porción del conjugado durante treinta días, se diafiltró por TFF basada en membrana frente a succinato de sodio 10 mM, pH 5,5, y se puso a 4°C. Se midió el fármaco libre como se describe en el Ejemplo 1. Después de ocho semanas de almacenamiento a 4°C, la muestra que había sido diafiltrada después de un mantenimiento de un día tenía un 1,7% de fármaco libre, mientras que la muestra diafiltrada después de un mantenimiento de treinta días tenía un 0,8% de fármaco libre. Este resultado demuestra que una etapa de mantenimiento prolongado disminuye el nivel de fármaco libre en el

40

conjugado.

Ejemplo 4B

Este ejemplo demuestra un procedimiento para preparar un conjugado que comprende un anticuerpo químicamente acoplado a un fármaco, cuyo procedimiento incluye una etapa de mantenimiento prolongado antes de la diafiltración por TFF basada en membrana, y muestra que es más beneficioso el mantenimiento a un pH superior (6,5).

Se hizo reaccionar al anticuerpo monoclonal BIWA 4 (concentración final de 20 mg/ml) con SPP (exceso molar de 4,4 a 4,6 veces de SPP) durante aproximadamente 120 minutos a temperatura ambiente en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, que contenía NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y un 5% de etanol. Se purificó el anticuerpo modificado usando una columna de SEPHADEX™ G25F equilibrada y eluida en tampón citrato de sodio 35 mM, que contenía NaCl 150 mM y EDTA 2 mM, a un pH de 5,0. Se conjugó el anticuerpo modificado con DM1 (exceso molar de 1,7 veces con respecto al conector) disuelto en dimetilacetamida (DMA, concentración final 3%). Después de incubar durante la noche a temperatura ambiente, se purificaron las muestras de anticuerpo conjugado por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en solución salina tamponada con fosfatos (PBS), pH 6,5, (Muestra A) o en succinato de sodio 10 mM, pH 5,5, (Muestra B). Se mantuvieron ambas muestras a una concentración de conjugado de 2 mg/ml a una temperatura de 2 a 8°C durante 29 días. Se diafiltró entonces la Muestra A frente a PBS, pH 6,5. Se diafiltró la Muestra B frente a succinato de sodio 10 mM, pH 5,5. Se guardaron ambas muestras a una temperatura de 2 a 8°C y se analizaron en cuanto a fármaco libre a intervalos como se describe en el Ejemplo 1A. Los resultados de este análisis son mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3: Efecto del pH de mantenimiento sobre el fármaco libre liberado

	pH de mantenimiento	pH de la formulación	Fármaco libre (%) liberado en almacenamiento a 4°C			
			T = 0	2 semanas	4 semanas	6 semanas
Muestra A	6,5	6,5	0,4	0,8	1,0	1,4
Muestra B	5,5	5,5	0,4	1,9	2,6	3,6

Como se ve por los datos mostrados en la Tabla 3, la estabilidad (con respecto a la liberación de fármaco libre) del conjugado que había sido mantenido a un pH de 6,5 (Muestra A) era significativamente mayor que la de la muestra de conjugado (Muestra B) que había sido mantenida a un pH de 5,5. Habría que observar que la formulación final de la Muestra A era a pH 6,5, en comparación con el pH 5,5 para la Muestra B. Sin embargo, como se divulga en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2004/0241174 A1, la formulación de un conjugado a pH 5,5 confiere una significativa estabilidad (con respecto a la liberación de fármaco libre) en comparación con la formulación a pH 6,5. Estos resultados confirman el efecto estabilizador del mantenimiento del conjugado a pH 6,5, en comparación con pH 5,5.

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra un procedimiento para preparar un conjugado que comprende un anticuerpo químicamente acoplado a un fármaco a un pH inferior a 6.

Se modificó el anticuerpo huN901 con SPP (exceso molar de SPP como se muestra en la Tabla 3) durante 90 a 120 minutos a temperatura ambiente en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, que contenía NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y un 5% de etanol. Se purificaron entonces alícuotas de anticuerpo modificado en columnas independientes de G25F equilibradas en tampón citrato de sodio 35 mM, pH 5,0, que contenía NaCl 150 mM, o en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, que contenía NaCl 50 mM y EDTA 2 mM. Se conjugó el anticuerpo modificado de cada solución con DM1 y se purificó en SEPHADEX™ G25 como se describe en el Ejemplo 1. También se determinaron las proporciones fármaco/anticuerpo como se describe en el Ejemplo 1. Se determinaron las proporciones conector/anticuerpo midiendo los grupos piridilditíio liberables como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados del análisis de las muestras conjugadas en las soluciones con diferentes valores de pH son mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4: Efecto del pH sobre la preparación de conjugados

Tampón de conjugación	Exceso molar de SPP	Proporción conector/anticuerpo	Proporción fármaco/anticuerpo
Citrato de sodio 35 mM, NaCl 150 mM, pH 5,0	5,7	4,2	3,6
Fosfato de potasio 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5	7,0	4,8	3,6

Como se ve por los datos mostrados en la Tabla 4, cuando se realiza la conjugación a un pH inferior, se requiere un menor exceso de SPP para alcanzar el mismo nivel final de fármaco/anticuerpo observado a un pH más alto. Como resultado, se requiere menos DM1 para alcanzar el mismo nivel de fármaco/anticuerpo, ya que la cantidad de fármaco añadida se basa en la proporción conector/anticuerpo medida. El uso más eficiente de conector y fármaco a menor pH no sólo reduce los costes de los materiales, sino que también es indicativo de reacciones colaterales reducidas durante la reacción de conjugación.

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra además los efectos beneficiosos de la conjugación de un anticuerpo modificado con un fármaco a un pH inferior a 6,0.

Se incubó el anticuerpo monoclonal huN901 (concentración final de 8 mg/ml) con 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP, exceso molar de 5,6 veces) durante aproximadamente 180 minutos a 20°C en tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y un 5% de etanol. En un primer grupo, se purificó la mezcla de reacción usando una columna de resina SEPHADEX™ G25F equilibrada y eluida en tampón citrato de sodio 50 mM (pH 5,0) que contenía NaCl 50 mM y EDTA 2 mM. En un segundo grupo, se purificó la mezcla de reacción usando una columna de resina SEPHADEX™ G25F equilibrada y eluida en tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl 50 mM y EDTA 2 mM. Se conjugaron ambas muestras con DM1 (exceso molar de 1,7 veces con respecto al conector unido) durante 3, 19, 25, 48 y 120 horas a temperatura ambiente en una concentración final de dimetilacetamida (DMA) del 3%.

Así, el primer grupo de muestras fue conjugado en tampón citrato de sodio 50 mM (pH 5,0) que contenía NaCl 50 mM y EDTA 2 mM, y el segundo grupo de muestras fue conjugado en tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl 50 mM y EDTA 2 mM. Se purificaron entonces las muestras usando una columna de resina SEPHADEX™ G25F equilibrada y eluida en tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl 50 mM.

En ambos grupos, se determinaron las proporciones conector/anticuerpo por tratamiento con ditiotreitolo para liberar piridino-2-tiona, que tiene un coeficiente de extinción de $8.080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 343 nM. Se determinaron las proporciones fármaco/anticuerpo espectrofotométricamente (longitudes de onda 280 nm y 252 nm) para la etapa de conjugación.

El primer grupo tenía una proporción conector/anticuerpo de 4,3. El segundo grupo tenía una proporción conector/anticuerpo de 4,2.

Las proporciones fármaco/anticuerpo a lo largo del tiempo para los dos grupos son mostradas en la Tabla 5.

Tabla 5: Velocidad de incorporación de DM1 en huN901 modificado con SPP en función del pH de conjugación

Tiempo de reacción (horas)	Proporción fármaco/anticuerpo (mol/mol)	
	Conjugación a pH 5,0	Conjugación a pH 6,5
3	2,43	2,97
19	3,38	3,28
25	3,41	No estudiado (N/E)
48	3,46	3,17
120	3,44	2,85

Como es evidente por los datos presentados en la Tabla 5, el conjugado que se prepara conjugando el anticuerpo modificado con el fármaco a un pH de 5,0 alcanza un nivel mayor y más estable de fármaco unido durante el curso de la reacción de conjugación que el conjugado preparado a un pH de conjugación de 6,5. Además de una mayor estabilidad, los resultados indican que se alcanza un nivel superior de fármaco/anticuerpo al realizar la conjugación a un pH de 5,0 que cuando se usa la misma cantidad de fármaco a un pH de conjugación de 6,5, indicando así un uso más eficiente de fármaco a pH 5,0.

En ambos grupos, se determinaron las cantidades de monómero de conjugado a lo largo del tiempo. Los datos resultantes son mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6: Efecto del pH de conjugación sobre el nivel de monómero de conjugado durante la conjugación de huN901 modificado con SPP con DM1

Tiempo de reacción (horas)	Monómero de conjugado (%)	
	Conjugación a pH 5,0	Conjugación a pH 6,5
3	98,5	98,0
19	98,8	98,2
25	99,1	N/E
48	99,2	98,3
120	99,2	97,8

Como es evidente por los datos mostrados en la Tabla 6, el conjugado que se prepara conjugando el anticuerpo modificado con el fármaco a un pH de 5,0 tiene un mayor nivel de monómero de conjugado que el conjugado preparado a un pH de conjugación de 6,5.

5 Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra además un procedimiento de preparación de un conjugado que comprende un anticuerpo químicamente acoplado a un fármaco a un pH inferior a 6.

Se modificó el anticuerpo BIWA 4 con SPP (exceso molar de SPP como se muestra en la Tabla 6) durante 120 a 140 minutos a temperatura ambiente en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y un 5% de etanol. Se purificaron alícuotas de anticuerpo modificado en columnas NAP 25 independientes equilibradas en tampones que tenían varios valores de pH (pH de 4,6 a 6,5). Los tampones de pH 4,6 a 5,9 estaban compuestos por citrato de sodio 35 mM, cloruro de sodio 150 mM y EDTA 2 mM. El tampón de pH 6,5 era PBS con EDTA 2 mM.

Se conjugó el anticuerpo modificado a cada pH con DM1 (exceso molar de 1,7 veces con respecto al conector) en dimetilacetamida (DMA, concentración final 3%). Después de incubar durante 17 a 18 horas a temperatura ambiente, se purificaron las muestras de anticuerpo conjugado por cromatografía en columnas NAP 25 equilibradas en PBS, pH 6,5. Los resultados de este análisis son mostrados en la Tabla 7. Se determinaron las proporciones conector/anticuerpo (C/A en la Tabla 7) por medición de los grupos piridilditíio liberables como se describe en el Ejemplo 2. Se determinaron las proporciones fármaco/anticuerpo (F/A en la Tabla 7) como se describe en el Ejemplo 1A. Se determinaron el monómero de conjugado, las especies de alto peso molecular y las especies de bajo peso molecular por SEC-HPLC usando una columna TSKG3000SWXL equilibrada y desarrollada en tampón fosfato de potasio 0,2 M, pH 7,0, que contenía cloruro de potasio 0,2 M y un 20% de isopropanol. Se determinó el rendimiento de la etapa de conjugación dividiendo el rendimiento de anticuerpo conjugado (calculado como se describe en el Ejemplo 1A) por la cantidad de anticuerpo modificado que se usó en la etapa de conjugación (determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 nm).

25 Tabla 7: Efecto del pH sobre la preparación de conjugados

Tampón	Exceso molar de SPP	C/A	F/A	Monómero (%)	Alto PM (%)	Bajo PM (%)	Rendimiento de la etapa de conjugación (%)
pH 4,6	4,7	3,8	3,6	97,5	2,2	0,4	74
pH 5,1	4,4	4,7	3,6	97,6	1,9	0,6	75
pH 5,6	5,0	4,9	3,6	97,7	1,5	0,8	85
pH 5,9	5,5	5,3	3,7	96,4	2,3	1,4	76
pH 6,5	6,6	6,4	3,7	95,1	2,8	1,9	71

Los datos mostrados en la Tabla 7 demuestran que la conjugación de BIWA 4 modificado con SPP con DM1 era más eficaz a un pH inferior a 6,0, en comparación con la conjugación a un pH de 6,5. Las cantidades de conector SPP y DM1 requeridas para alcanzar una proporción fármaco/anticuerpo final particular se redujeron a un pH inferior. Además, los niveles de monómero de conjugado, especies de alto peso molecular y especies de bajo peso molecular eran más óptimas, y los rendimientos mejoran a un pH inferior.

30 Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra un procedimiento para preparar un conjugado que comprende un anticuerpo químicamente acoplado a un fármaco, donde el pH de la reacción de conjugación es mayor de 7.

Se hizo reaccionar al anticuerpo huB4 con 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB) (exceso molar de 6,0 veces) durante 120 minutos a temperatura ambiente en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y un 5% de etanol. Se purificaron entonces diversas alícuotas de anticuerpo modificado en columnas NAP 25 independientes equilibradas en tampones con diversos valores de pH (de 6,1 a 8,0). Se conjugó el anticuerpo modificado de soluciones con estos diferentes valores de pH con DM4 (exceso molar de 1,7 veces con respecto al conector) en dimetilacetamida (DMA, concentración final 3%). Después de incubar durante 16 a 18 horas a temperatura ambiente, se purificaron las muestras de anticuerpo conjugado por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en PBS, pH 6,5. Los resultados de este análisis son mostrados en la Tabla 8. Se determinaron las proporciones conector/anticuerpo (C/A en la Tabla 8) midiendo los grupos piridilditio liberables como se describe en el Ejemplo 2. Se determinaron las proporciones fármaco/anticuerpo (F/A en la Tabla 8) como se describe en el Ejemplo 1A. Se determinaron el monómero de conjugado y el rendimiento de la etapa de conjugación como se describe en el Ejemplo 8.

Tabla 8: Efecto del pH sobre la preparación de conjugados

Tampón	C/A	F/A	Monómero (%)	Rendimiento de la etapa de conjugación (%)
PBS, pH 6,1	4,7	4,1	92,3	74
PBS, pH 6,5	4,9	4,2	93,6	73
PBS, pH 7,0	4,8	4,3	93,0	80
PBS, pH 7,5	4,7	4,3	94,2	82
PBS, pH 8,0	4,7	4,4	94,8	83

Los datos presentados en la Tabla 8 demuestran que, a un pH de 7,0 y superior, los rendimientos de conjugado y los niveles de monómero de conjugado eran más óptimos que a un pH de 6,1 a 6,5. Además, se consiguió una mayor proporción fármaco/anticuerpo para la misma cantidad de DM4 utilizada, lo que indica una incorporación más eficaz de DM4 a mayor pH.

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra los efectos beneficiosos de la conjugación de un anticuerpo modificado con un fármaco a un pH superior a 6,5.

En un primer experimento, se modificó el anticuerpo CNT095 (concentración final de 10 mg/ml) con 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB, exceso molar de 4,5 veces) durante 120 minutos a 20°C en tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,5) que contenía un 2,7% de sacarosa y un 5% de etanol. Se purificó la mezcla de reacción usando una columna de resina SEPHADEX™ G25F equilibrada y eluida en tampón fosfato de potasio 12,5 mM, pH 6,5, NaCl 12,5 mM y EDTA 0,5 mM. Se dividió entonces el anticuerpo modificado purificado en dos grupos. En el primer grupo, se realizó la conjugación en fosfato de potasio 12,5 mM a pH 6,5 que contenía NaCl 12,5 mM, EDTA 0,5 mM, un 3% de DMA y un exceso molar de 1,7 veces de fármaco por conector a 20°C. En el segundo grupo, se realizó la conjugación en el tampón con un pH ajustado de 7,5. Se purificó el anticuerpo conjugado sobre columnas NAP-10 equilibradas en tampón citrato de sodio 10 mM, pH 5,5, que contenía NaCl 135 mM.

Se midió la proporción fármaco/anticuerpo para ambos grupos. Los datos resultantes son mostrados en la Tabla 9.

Tabla 9: Proporción fármaco/anticuerpo en la reacción de conjugación a un pH de 6,5 frente a 7,5

Tiempo de reacción (horas)	Proporción fármaco/anticuerpo en la reacción de conjugación a pH 6,5	Proporción fármaco/anticuerpo en la reacción de conjugación a pH 7,5
0,5	N/E	3,0
1	2,3	3,4
1,5	N/E	3,5
2	2,8	3,5
2,75	N/E	3,6

Tiempo de reacción (horas)	Proporción fármaco/anticuerpo en la reacción de conjugación a pH 6,5	Proporción fármaco/anticuerpo en la reacción de conjugación a pH 7,5
3,5	3,2	3,6
5	3,4	3,7

Como se ve por los datos presentados en la Tabla 9, la conjugación procede más rápidamente a pH 7,5 que a pH 6,5.

5 En un segundo experimento, se modificó el anticuerpo monoclonal humanizado huB4 con (a) un exceso molar de 4,9 veces de SPDB en relación al anticuerpo, o (b) un exceso molar de 4,8 veces de SPDB en relación al anticuerpo. En ambas situaciones, la reacción se produjo en fosfato de potasio 50 mM, cloruro de potasio 50 mM y EDTA 2 mM (pH 6,5) en un 5% de etanol durante un total de 120 minutos a temperatura ambiente. Se purificó la muestra (a) sobre una columna de resina SEPHADEX™ G25F equilibrada en fosfato de potasio 50 mM, cloruro de sodio 50 mM y EDTA 2 mM a pH 6,5. Se purificó la muestra (b) de un modo equivalente, excepto por el hecho de que se ajustó el tampón de la cromatografía a pH 7,5. Se conjugaron ambas muestras con DM4 (exceso molar de 1,7 veces con respecto al conector unido) durante 18 horas a temperatura ambiente en una concentración final de dimetilacetamida (DMA) del 3%.

10 Así, se conjugó la muestra (a) a pH 6,5 y se conjugó la muestra (b) a pH 7,5. Se purificaron entonces las muestras sobre una columna de resina SEPHADEX™ G25F equilibrada en fosfato de potasio 9,6 mM y cloruro de sodio 4,2 mM a pH 6,5. Se incubaron ambas muestras a 4°C durante hasta 7 meses y se las sometió a análisis de fármaco libre liberado a intervalos. Los datos resultantes son mostrados en la Tabla 10.

Tabla 10: Liberación de fármaco libre a lo largo del tiempo a partir de muestras conjugadas a pH 6,5 y 7,5

Tiempo (meses)	Conjugación a pH 6,5	Conjugación a pH 7,5
0	1,0	0,8
1,5	1,8	1,0
2,5	3,2	1,9
7	4,0	2,8

20 Como se ve por los datos presentados en la Tabla 10, la liberación de fármaco libre es sustancialmente más lenta a partir de la muestra (b) que había sido conjugada a pH 7,5 en relación a la muestra (a) que había sido conjugada a pH 6,5. En consecuencia, se ve que el producto de conjugado de fármaco preparado a pH 7,5 es más estable con respecto a la liberación de fármaco libre a lo largo del tiempo en comparación con el producto de conjugado de fármaco preparado a pH 6,5. La conjugación a pH 7,5 también muestra una mejor incorporación del fármaco que a pH 6,5, requiriendo así el uso de menos fármaco.

25 Ejemplo 10

Este ejemplo demuestra un procedimiento de preparación de un conjugado que comprende un anticuerpo químicamente acoplado a un fármaco, donde la mezcla de reacción de la conjugación contiene sacarosa.

30 Se modificó el anticuerpo J591 con SPP (exceso molar de 7,0 veces de SPP con respecto al anticuerpo) durante 130 minutos a temperatura ambiente en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,0, que contenía EDTA 2 mM y un 5% de etanol. Se purificó entonces el anticuerpo modificado por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,0, que contenía EDTA 2 mM. Se conjugó el anticuerpo modificado con DM1 (exceso molar de 1,7 veces con respecto al conector) en dimetilacetamida (DMA, concentración final 3%), en presencia o en ausencia de un 10% (p/v) de sacarosa. Después de incubar durante la noche a temperatura ambiente, se purificaron las muestras conjugadas sin sacarosa por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en tampón succinato de sodio 20 mM, pH 5,5. Se purificaron las muestras conjugadas en presencia de sacarosa por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada con tampón succinato de sodio 20 mM, pH 5,5, que contenía un 5% (p/v) de sacarosa. El rendimiento de la etapa de conjugación (determinado como se describe en el Ejemplo 7) para el procedimiento realizado con adición de sacarosa era del 62% (media de dos operaciones), mientras que el rendimiento para el procedimiento sin sacarosa era del 49% (media de dos operaciones). Así, los resultados de este ejemplo demuestran que la sacarosa mejora el rendimiento de la reacción de conjugación.

40 Ejemplo 11

Este ejemplo demuestra un procedimiento para preparar un conjugado que comprende un anticuerpo químicamente acoplado a un fármaco, donde la mezcla de reacción de la conjugación contiene sacarosa.

5 Se modificó el anticuerpo BIWA 4 con SPP (exceso molar de 6,6 veces de SPP con respecto al anticuerpo) durante 120 minutos a temperatura ambiente en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, que contenía NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y un 5% de etanol. Se purificó el anticuerpo modificado por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, que contenía NaCl 50 mM y EDTA 2 mM. Se conjugó entonces el anticuerpo modificado purificado con DM1 (exceso molar de 1,7 veces con respecto al conector) en dimetilacetamida (DMA, concentración final 3%), en presencia o en ausencia de un 10% (p/v) de sacarosa. Después de incubar durante la noche a temperatura ambiente, se purificó la muestra conjugada sin sacarosa por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en PBS, pH 6,5. Se dividió la muestra conjugada en presencia de sacarosa en dos porciones. Se purificó una porción por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en PBS, pH 6,5. Se purificó la segunda porción por cromatografía en SEPHADEX™ G25F equilibrada en PBS, pH 6,5, que contenía un 10% (p/v) de sacarosa. El rendimiento de la etapa de conjugación (determinado como se describe en el Ejemplo 7) para el procedimiento llevado a cabo con sacarosa tanto en la reacción de conjugación como en la posterior columna G25 era del 80%, mientras que el rendimiento para el procedimiento con sacarosa sólo en la reacción de conjugación era del 68% y el rendimiento para el procedimiento llevado a cabo sin sacarosa era del 62%. Así, los resultados de este ejemplo demuestran que la sacarosa aumenta el rendimiento de la reacción de conjugación y de la posterior etapa de purificación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un conjugado que comprende un anticuerpo químicamente acoplado a un maitansinoide, comprendiendo dicho procedimiento:
 - 5 (a) poner en contacto un anticuerpo con un reactivo entrecruzante bifuncional para unir covalentemente un conector al anticuerpo y así preparar una primera mezcla que comprende anticuerpos que tienen conectores estable e inestablemente unidos a los mismos;
 - (b) someter la primera mezcla a cromatografía no adsorbtiva para purificar el anticuerpo que tiene conectores unidos al mismo de otros componentes de la primera mezcla y así preparar una primera mezcla purificada;
 - 10 (c) conjugar un maitansinoide con los anticuerpos que tienen conectores unidos a los mismos por reacción de los anticuerpos que tienen conectores unidos a los mismos con un maitansinoide en una solución que tiene un pH de 4,5 a 8, para preparar una segunda mezcla que comprende (i) anticuerpo químicamente acoplado a través del conector con el maitansinoide, (ii) maitansinoide libre y (iii) solventes y subproductos de la reacción;
 - 15 (d) someter la segunda mezcla a cromatografía no adsorbtiva para purificar los anticuerpos químicamente acoplados a través de los conectores con el maitansinoide de los otros componentes de la segunda mezcla y así preparar una segunda mezcla purificada;
 - (e) opcionalmente, someter la segunda mezcla purificada a filtración de flujo tangencial (TFF) para aislar un conjugado que comprende el anticuerpo químicamente acoplado a el maitansinoide, y
 - (f) mantener la mezcla entre al menos una de las etapas b-c y de las etapas d-e para liberar los conectores inestablemente unidos del anticuerpo,
- 20 donde la etapa de mantenimiento comprende
 - (i) incubar la mezcla a una temperatura de 2°C a 8°C durante un tiempo de 5 horas a 30 días,
 - (ii) incubar la mezcla a 25°C a un pH de 6 a 7,5 durante un tiempo de 12 horas a 1 semana,
 - (iii) incubar la mezcla a entre 20 y 30°C a un pH de 6,5 durante un tiempo de 12 horas a 1 semana,
 - (iv) incubar la mezcla a 25°C a un pH de 4,5 a 5,9 durante un tiempo de 5 horas a 1 día, o
 - 25 (v) incubar la mezcla a entre 20 y 30°C a un pH de 5 durante un tiempo de 5 horas a 3 días.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde se mantiene la mezcla entre las etapas b-c.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde se mantiene la mezcla entre las etapas d-e.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 5, donde el anticuerpo es seleccionado entre el grupo consistente en huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, CNT095, huDS6 y rituximab.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el maitansinoide comprende un grupo tiol.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, donde el maitansinoide es N2'-desacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)maitansina (DM1).
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 7, donde el maitansinoide es N2'-desacetil-N2'-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)maitansina (DM4).
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el anticuerpo está químicamente acoplado a el maitansinoide por enlaces químicos seleccionados entre el grupo consistente en enlaces disulfuro, enlaces lábiles a ácidos, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles a peptidasas, enlaces tioéter y enlaces lábiles a esterasas.
- 40 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la solución en la etapa (c) y/o (d) comprende además sacarosa.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la solución en la etapa (c) y/o (d) comprende además un agente tamponante seleccionado entre el grupo consistente en un tampón citrato, un tampón acetato, un tampón succinato y un tampón fosfato.
- 45 13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde se liberan los conectores inestablemente

unidos del anticuerpo ajustando el pH de la mezcla de la etapa (f).

14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la etapa de mantenimiento comprende la incubación de la mezcla a 4°C y a un pH de 6 a 7,5 durante 12 horas a 4 semanas.
- 5 15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la etapa de mantenimiento comprende la incubación de la mezcla a 25°C y a un pH de 6 a 7,5 durante 12 horas a 1 semana.
16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la etapa de mantenimiento comprende la incubación de la mezcla a 4°C y a un pH de 4,5 a 5,9 durante 5 horas a 5 días.
17. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la etapa de mantenimiento comprende la incubación de la mezcla a 25°C y a un pH de 4,5 a 5,9 durante 5 horas a 1 día.
- 10 18. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde la etapa de mantenimiento comprende además la adición de un nucleófilo a la mezcla.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, donde el nucleófilo es una amina nucleofílica primaria, una amina nucleofílica secundaria o una combinación de éstas.
- 15 20. El procedimiento de la reivindicación 19, donde el nucleófilo es seleccionado entre el grupo consistente en glicilglicina, taurina, dietanolamina, lisina, hidroxilamina, imidazol, etilamina, 4-amino-1-butanol, polilisina, péptidos portadores de lisina, poli(etilenimina), hidrazina, glicina, etanolamina, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol y combinaciones de éstos.
- 20 21. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, donde la cromatografía no adsorbtiva es seleccionada entre el grupo consistente en resinas SEPHADEX™, resinas SEPHACRYL™, resinas SUPERDEX™ y resinas BIO-GEL®.

Figura

