

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 992**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2006 E 11004940 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2399609**

54 Título: **Procedimiento para preparar conjugados de anticuerpo maitansinoide**

30 Prioridad:

**24.08.2005 US 710858 P**  
**04.05.2006 US 797713 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.04.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DAI, YONG;**  
**WANG, YONG;**  
**JIN, SHENGJIN;**  
**MESHULAM, DEBORAH H. y**  
**AMPHLETT, GODFREY W.**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 533 992 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 anticuerpo maitansinoide

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a un procedimiento para preparar conjugados de pureza y estabilidad sustancialmente altas, en donde los conjugados comprenden un agente de unión a células acoplado químicamente a un fármaco, como se define en las reivindicaciones.

**Antecedentes de la invención**

10 El tratamiento del cáncer ha progresado significativamente con el desarrollo de productos farmacéuticos que acceden y matan más eficazmente a las células cancerosas. Para este fin, los investigadores han aprovechado receptores superficiales celulares y antígenos expresados selectivamente por las células cancerosas para desarrollar fármacos basados en anticuerpos que se unen a los antígenos específicos de tumores o asociados a tumores. A este respecto, moléculas citotóxicas tales como toxinas de bacterias y plantas, radionúclidos y ciertos fármacos quimioterapéuticos han sido enlazados químicamente a anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos superficiales celulares específicos de tumores o asociados a tumores (véanse, p.ej., las solicitudes de patente internacionales WO 00/02587, WO 02/060955 y WO 02/092127, las patentes de EE.UU. 5.475.092, 6.340.701 y 6.171.586, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2003/004210 A1, y Ghetie et al., *J. Immunol. Methods*, 112: 267-277 (1988)). Tales compuestos se denominan típicamente "conjugados" de toxinas, de radionúclidos y de fármacos, respectivamente. A menudo, también se denominan inmunoconjugados, radioinmunoconjugados, e inmunotoxinas. La muerte de la célula tumoral se produce tras la unión del conjugado de fármaco a una célula tumoral y la liberación y/o activación de la actividad citotóxica del fármaco. La selectividad proporcionada por los conjugados de fármaco minimiza la toxicidad hacia las células normales, aumentando de este modo la tolerabilidad del fármaco en el paciente.

25 Se han descrito previamente procedimientos para conjugar anticuerpos a agentes citotóxicos que contienen sulfhidrido tales como maitansinoides (véanse, p.ej., 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 describen un procedimiento para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoide en los que el anticuerpo se modifica primero con un reactivo heterobifuncional tal como se describe en las patentes EE.UU. 4.149.003, 4.563.304 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2004/0241174 A1. Las patentes de EE.UU. 5.208.020 y 5.416.064 describen además la conjugación de un anticuerpo modificado con un exceso de un agente citotóxico que contiene sulfhidrido a pH 7, seguido de la purificación en columnas de cromatografía Sephadex™ G25. La purificación de conjugados anticuerpo-fármaco por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) también ha sido descrita (véase, p.ej., Liu et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93: 8618-8623 (1996) y Chari et al., *Cancer Research*, 52: 127-131 (1992)).

35 Los procedimientos que se han descrito previamente para la preparación de los conjugados anticuerpo-fármaco son complejos, porque son obstaculizados con etapas que son incómodas de realizar o producen inmunoconjugados que son menos puros o menos estables que lo óptimamente deseado. Por ejemplo, la conjugación a un pH de entre 6,0 y 6,5 no es óptima para producir conjugados puros y estables. Además, las reacciones de conjugación bajo estas condiciones son generalmente lentas e ineficaces, conduciendo a un requisito de excesivo tiempo y utilización de material.

40 Sería deseable modificar o eliminar una o más etapas de preparación sin comprometer la calidad del producto, tal como la pureza y/o la estabilidad. Sería deseable además tener opciones de purificación adicionales que las que se han descrito hasta ahora, en la medida que algunas opciones serán más eficaces con ciertas combinaciones de agentes de unión a células, enlazadores y fármacos, que con otros.

45 En vista de lo anterior, hay una necesidad en la técnica de desarrollar métodos mejorados de preparación de composiciones de conjugados agente de unión a células-fármaco que sean de pureza sustancialmente alta y al mismo tiempo tengan mayor estabilidad. Se describe tal método.

**Breve compendio de la invención**

50 Se describe un procedimiento para preparar un conjugado de pureza y estabilidad sustancialmente altas que comprende un agente de unión a células acoplado químicamente a un fármaco. El procedimiento comprende (a) poner en contacto un agente de unión a células con un reactivo de reticulación bifuncional para unir covalentemente un enlazador al agente de unión a células y preparar de este modo una primera mezcla que comprende agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos, (b) someter la primera mezcla a cromatografía adsorptiva, y preparar de este modo una primera mezcla purificada de agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos, (c) conjugar un fármaco con los agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos en la primera mezcla purificada haciendo reaccionar los agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos con un fármaco en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para preparar una segunda mezcla que comprende (i) agente de unión a células acoplado químicamente mediante el enlazador al fármaco, (ii) fármaco libre y (iii) subproductos de reacción,

y (d) someter la segunda mezcla a cromatografía adsorbtiva para purificar los agentes de unión a células acoplados químicamente mediante los enlazadores al fármaco de los otros componentes de la segunda mezcla y preparar de este modo una segunda mezcla purificada, como se describe en las reivindicaciones.

### Descripción detallada de la invención

5 Se describe un procedimiento para preparar conjugados agente de unión a células-fármaco de pureza y estabilidad sustancialmente altas. Tales composiciones se pueden usar para tratar enfermedades, debido a la alta pureza y estabilidad de los conjugados. Se describen composiciones que comprenden un agente de unión a células, tal como un anticuerpo, acoplado químicamente a un fármaco, tal como un maitansinoide, en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2004/0241174 A1. En este contexto, se considera que pureza sustancialmente  
10 alta es: (a) más que 90%, preferiblemente más que 95% de las especies conjugadas son monoméricas, y/o (b) el nivel de fármaco libre en la preparación del conjugado es menor que 2% (relativo al fármaco total).

A este respecto, el procedimiento descrito comprende (a) modificar el agente de unión a células con un reactivo de reticulación bifuncional para unir covalentemente un enlazador al agente de unión a células y preparar de este modo una primera mezcla que comprende agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos, (b)  
15 someter la primera mezcla a cromatografía adsorbtiva, para purificar los agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos de otros componentes de la primera mezcla y preparar de este modo una primera mezcla purificada de agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos, (c) conjugar un fármaco con los agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos en la primera mezcla purificada haciendo reaccionar los agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos con el  
20 fármaco en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para preparar una segunda mezcla que comprende (i) agente de unión a células acoplado químicamente mediante el enlazador al fármaco, (ii) fármaco libre y (iii) subproductos de reacción, y (d) someter la segunda mezcla a cromatografía adsorbtiva para retirar los fármacos no conjugados, los reaccionantes y los subproductos, así como para obtener conjugados agente de unión a células-fármaco sustancialmente purificados, según las reivindicaciones.

25 Preferiblemente, se utilizan resinas de cromatografía adsorbtiva en las etapas de purificación. En una descripción adicional, se utilizan resinas de cromatografía adsorbtiva en ambas etapas de purificación.

Se puede utilizar cualquier resina de cromatografía adsorbtiva adecuada. Las resinas de cromatografía adsorbtiva preferidas incluyen resinas para cromatografía con hidroxapatita, cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico de modo mixto, cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC), cromatografía de ligando colorante, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa, y combinaciones de las mismas. Los ejemplos de resinas de hidroxapatita adecuadas incluyen hidroxapatita cerámica (CHT Tipo I y Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), hidroxapatita HA Ultrogel (Pall Corp., East Hills, NY), y fluoroapatita cerámica (CFT Tipo I y Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Un ejemplo de una resina HCIC adecuada es la resina MEP Hypercel (Pall Corp., East Hills, NY). Los ejemplos de resinas HIC adecuadas incluyen resinas de Butil-Sefarosa, Hexil-Sefarosa, Fenil-Sefarosa y Octil-Sefarosa (todas de GE Healthcare, Piscataway, NJ), así como resinas Macro-prep Metilo y Macro-prep t-Butilo (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas de intercambio iónico adecuadas incluyen resinas SP-Sefarosa, CM-Sefarosa y Q-Sefarosa (todas de GE Healthcare, Piscataway, NJ), y resina Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de intercambiadores iónicos de modo mixto adecuados incluyen resina Bakerbond ABx (JT Baker, Phillipsburg, NJ). Los ejemplos de resinas IMAC adecuadas incluyen resina de Sefarosa Quelante (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resina Profinity IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas de ligando colorante adecuadas incluyen resina de Sefarosa Azul (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resina Affi-gel Azul (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas de afinidad adecuadas incluyen resina de Sefarosa de Proteína A (p.ej., MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ), en la que el agente de unión a células es un anticuerpo, y resinas de afinidad de lectina, p.ej. resina de Sefarosa de Lectina de Lenteja (GE Healthcare, Piscataway, NJ) en la que el agente de unión a células lleva sitios de unión a lectina apropiados. Alternativamente, se puede usar un anticuerpo específico para el agente de unión a células. Tal anticuerpo puede ser inmovilizado, por ejemplo, a resina Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los ejemplos de resinas de fase inversa adecuadas incluyen resinas C4, C8 y C18 (Grace Vydac, Hesperia, CA).  
50

De acuerdo con el método descrito, se produce una primera mezcla que comprende el agente de unión a células que tiene enlazadores unidos al mismo, así como reaccionantes y otros subproductos. La purificación del agente de unión a células modificado de los reaccionantes y subproductos se lleva a cabo sometiendo la primera mezcla a un procedimiento de purificación. A este respecto, la primera mezcla se purifica usando cromatografía adsorbtiva. Esta primera etapa de purificación proporciona una primera mezcla purificada, es decir, una concentración aumentada de los agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos, y una cantidad disminuida de reactivo de reticulación bifuncional no unido, en comparación con la primera mezcla antes de la purificación de acuerdo con la descripción.  
55

Después de la purificación de la primera mezcla para obtener una primera mezcla purificada de agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos, un fármaco es conjugado a los agentes de unión a células que  
60

tienen enlazadores unidos a los mismos en la primera mezcla purificada haciendo reaccionar los agentes de unión a células que tienen enlazadores unidos a los mismos con un fármaco en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9, después de lo cual se produce una segunda mezcla que comprende (i) el agente de unión a células acoplado químicamente mediante el enlazador al fármaco, (ii) fármaco libre, y (iii) subproductos de reacción. Aunque la reacción de conjugación se realiza a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente pH 9, la reacción se realiza preferiblemente a un pH de aproximadamente 6 o inferior o a un pH de aproximadamente 6,5 o mayor, lo más preferiblemente a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 o a un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9, y especialmente a un pH de 4 a menos que 6 o a un pH de más que 6,5 a 9. Cuando la etapa de conjugación se realiza a un pH de aproximadamente 6,5 o mayor, algunos fármacos que contienen sulfhidrilo pueden ser proclives a dimerizarse por formación de enlace disulfuro. La retirada de metales traza y/o oxígeno de la mezcla de reacción, así como la adición opcional de antioxidantes o el uso de enlazadores con grupos salientes más reactivos, o la adición de fármaco en más que una alícuota, puede ser requerido para permitir una reacción eficaz en tal situación.

El método descrito puede incluir opcionalmente la adición de sacarosa a la etapa de conjugación usada en el método inventivo para aumentar la solubilidad y recuperación de los conjugados agente de unión a células-fármaco. Deseablemente, la sacarosa se añade en una concentración de aproximadamente 0,1% (p/v) a aproximadamente 20% (p/v) (p.ej., aproximadamente 0,1% (p/v), 1% (p/v), 5% (p/v), 10% (p/v), 15% (p/v) o 20% (p/v)). Preferiblemente, la sacarosa se añade en una concentración de aproximadamente 1% (p/v) a 10% (p/v) (p.ej., aproximadamente 2% (p/v), aproximadamente 4% (p/v), aproximadamente 6% (p/v) o aproximadamente 8% (p/v)). Además, la reacción de conjugación también puede comprender la adición de un agente amortiguador. Se puede usar cualquier agente amortiguador adecuado conocido en la técnica. Los agentes amortiguadores adecuados incluyen, por ejemplo, un tampón citrato, un tampón acetato, un tampón succinato y un tampón fosfato.

Después de la etapa de conjugación, la segunda mezcla se somete a una etapa de purificación. A este respecto, la segunda mezcla se purifica usando cromatografía adsorbtiva. Esta segunda etapa de purificación proporciona una segunda mezcla purificada, es decir, una concentración aumentada de los agentes de unión a células acoplados químicamente mediante los enlazadores al fármaco y una cantidad disminuida de uno o más otros componentes de la segunda mezcla, en comparación con la segunda mezcla antes de la purificación de acuerdo con la descripción.

El agente de unión a células es un anticuerpo (p.ej., anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos).

El término "anticuerpo", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier inmunoglobulina, cualquier fragmento de inmunoglobulina, tal como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos, o quimeras de inmunoglobulina, que pueden unirse a un antígeno en la superficie de una célula (p.ej., que contiene una región determinante de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés)). Se puede usar cualquier anticuerpo adecuado. Un experto habitual en la técnica apreciará que la selección de un anticuerpo apropiado dependerá de la población de células que se tiene como diana. A este respecto, el tipo y número de moléculas de la superficie celular (es decir, antígenos) que están expresadas selectivamente en una población de células particular (típicamente y preferiblemente una población de células enfermas) gobernará la selección de un anticuerpo apropiado para uso en la composición. Se conocen perfiles de expresión en la superficie celular para una amplia variedad de tipos de células, incluyendo tipos de células tumorales, o, si se desconocen, pueden ser determinados usando técnicas de biología molecular y de histoquímica rutinarias.

El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, pero lo más preferiblemente es un anticuerpo monoclonal. Tal como se emplea en la presente memoria, anticuerpos "policlonales" se refiere a poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos, contenidas típicamente 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 producidos típicamente por un único clon de linfocitos B ("células B"). Se pueden obtener anticuerpos monoclonales usando diversas técnicas conocidas por los expertos en la técnica, que incluyen tecnología de hibridoma estándar (véase, p.ej., 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, Nueva York, NY (2001)). Brevemente, el método del hibridoma para producir anticuerpos monoclonales implica típicamente inyectar cualquier animal adecuado, típica y preferiblemente un ratón, con un antígeno (es decir, un "inmunogen"). El animal es posteriormente sacrificado, y se condensan células B aisladas de su bazo con células de mieloma humano. Se produce una célula híbrida (es decir, un "hibridoma"), que prolifera indefinidamente y secreta de manera continua 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. Tales métodos incluyen, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), análisis Western blot y radioinmunoensayo. La población de hibridomas es cribada para aislar clones individuales, cada uno de los cuales secreta una única especie de anticuerpo para el antígeno. Como cada hibridoma es un clon derivado de la fusión con una única célula B, todas las moléculas de anticuerpo que produce son idénticas en estructura, incluyendo su sitio de unión a antígenos e isotipo. También se pueden generar anticuerpos monoclonales usando otras técnicas adecuadas, que incluyen tecnología de EBV-hibridoma (véase, p.ej., Haskard y Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2): 361-67 (1984), y Roder et al., *Methods Enzymol.*, 121: 140-67 (1986)), sistemas de expresión de vectores de bacteriófagos (véase, p.ej., Huse et al., *Science*, 246: 1275-81 (1989)), o librerías de presentación a fagos que comprenden fragmentos de

anticuerpos, tales como Fab y scFv (región variable de cadena única) (véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. 5.885.793 y 5.969.108, y las solicitudes 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 producido preferiblemente en un mamífero, más preferiblemente un ratón o un ser humano, y lo más preferiblemente un ser humano. Los métodos para producir un anticuerpo en ratones son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen en la presente memoria. Con respecto a los anticuerpos humanos, un experto en la técnica apreciará que se pueden aislar anticuerpos policlonales a partir de los sueros de sujetos humanos vacunados o inmunizados con un antígeno apropiado. Alternativamente, se pueden generar anticuerpos humanos adaptando técnicas conocidas para producir anticuerpos humanos en animales no humanos tales como ratones (véanse, p.ej., 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).

Aunque son la elección ideal para aplicaciones terapéuticas en seres humanos, los anticuerpos humanos, particularmente anticuerpos monoclonales humanos, son típicamente más difíciles de generar que los anticuerpos monoclonales de ratón. Los anticuerpos monoclonales de ratón, sin embargo, inducen una rápida respuesta de anticuerpos del huésped cuando se administran a seres humanos, lo que puede reducir el potencial terapéutico o diagnóstico del conjugado anticuerpo-fármaco. Para sortear estas complicaciones, un anticuerpo monoclonal preferiblemente no es reconocido como "extraño" por el sistema inmunitario humano.

Para este fin, se puede usar presentación a fagos para generar el anticuerpo. A este respecto, se pueden generar librerías de fagos que codifican dominios variables (V) de unión a antígenos de anticuerpos, usando técnicas de biología molecular estándar y de ADN recombinante (véase, p.ej., Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001)). Los fagos que codifican una región variable con la especificidad deseada se seleccionan para la unión específica al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo humano completo que comprende el dominio variable seleccionado. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo reconstituido se introducen en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma usada para la producción de hibridomas, de tal modo que anticuerpos humanos que tienen las características de anticuerpos monoclonales son secretados por la célula (véase, p.ej., Janeway et al., citado anteriormente, Huse et al., citado anteriormente, y patente de EE.UU. 6.265.150). Alternativamente, se pueden generar anticuerpos monoclonales a partir de ratones que son transgénicos para genes de inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera humanos específicos. Tales 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 Janeway et al., citado anteriormente.

Lo más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Tal como se emplea en la presente memoria, un anticuerpo "humanizado" es uno en el que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal de ratón, que forman los bucles de unión al antígeno del anticuerpo, son injertados en el armazón de una molécula de anticuerpo humano. Debido a la similitud de los armazones de los anticuerpos de ratón y humano, se acepta generalmente en la técnica que este método 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 las secuencias CDR fueron derivadas. Los métodos para generar anticuerpos humanizados son bien conocidos en la técnica, y se describen en detalle en, por ejemplo, Janeway et al., citado anteriormente, las patentes de EE.UU. 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, la patente europea N° 0239400 B1, y la patente del Reino Unido N° 2188638. También se pueden generar anticuerpos humanizados usando la tecnología de reconstrucción superficial de anticuerpos descrita en la patente de EE.UU. 5.639.641 y Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235: 959-973 (1994). Aunque el anticuerpo empleado en el conjugado de la composición descrita es, lo más preferiblemente, un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal humano y un anticuerpo monoclonal de ratón, descritos anteriormente, también se describen.

Los fragmentos de anticuerpo que tienen al menos un sitio de unión a antígenos, y por tanto reconocen y se unen al menos a un antígeno o receptor presente en la superficie de una célula diana, también se describen. A este respecto, la escisión proteolítica de una molécula de anticuerpo intacta puede producir diversos fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de reconocer y unirse a antígenos. Por ejemplo, la digestión limitada de una molécula de anticuerpo con la proteasa papaína produce típicamente tres fragmentos, dos de los cuales son idénticos y se denominan fragmentos Fab, ya que conservan la actividad de unión a antígenos de la molécula de anticuerpo parental. La escisión de una molécula de anticuerpo con la enzima pepsina produce normalmente dos fragmentos de anticuerpo, uno de los cuales conserva ambos brazos de unión a antígenos de la molécula de anticuerpo, y se denomina por tanto fragmento F(ab')<sub>2</sub>. La reducción de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> con ditiotreitól o mercaptoetilamina produce un fragmento denominado fragmento Fab'. Un fragmento de anticuerpo de región variable (sFv) de cadena única, que consiste en un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo enlazada a un dominio V de una cadena ligera de anticuerpo por medio de un péptido sintético, se puede generar usando técnicas de tecnología de ADN recombinante (véase, p.ej., Janeway et al., citado anteriormente). De manera similar, se pueden preparar fragmentos de región variable estabilizada con disulfuro (dsFv) por tecnología de ADN recombinante (véase, p.ej., Reiter et al., *Protein Engineering*, 7: 697-704 (1994)). Se puede emplear cualquier fragmento de anticuerpo que reconozca y se una a un receptor o antígeno superficial celular deseado. Se describen adicionalmente 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)). La unión anticuerpo-antígeno puede ser ensayada usando cualquier método

adecuado conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, Western blot, inmunoprecipitación, y ensayos de inhibición competitiva (véase, p.ej., Janeway et al., citado anteriormente, y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2002/0197266 A1).

5 Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión a antígenos del mismo. Por "quimérico" se quiere decir que el anticuerpo comprende al menos dos inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, obtenidos o derivados de al menos dos especies diferentes (p.ej., dos inmunoglobulinas diferentes, tal como una región constante de inmunoglobulina humana combinada con una región variable de inmunoglobulina murina). El anticuerpo también puede ser un anticuerpo de dominio (dAb) o un fragmento de unión a antígenos del mismo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo camélido (véase, p.ej., Desmyter et al., *Nature Struct. Biol.*, 3: 752, (1996)), o un anticuerpo de tiburón, tal como, por ejemplo, un nuevo receptor de antígeno (IgNAR) (véase, p.ej., Greenberg et al., *Nature*, 374: 168 (1995), y Stanfield et al., *Science*, 305: 1770-1773 (2004)).

10 Se puede usar cualquier anticuerpo adecuado en el contexto de la descripción. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal J5 es un anticuerpo IgG2a murino que es específico para el Antígeno de la Leucemia Linfoblástica Aguda Común (CALLA, por sus siglas en inglés) (Ritz et al., *Nature*, 283: 583-585 (1980)), y se puede usar para acceder a células que expresan CALLA (p.ej., 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 se puede usar para acceder a células que expresan CD33 (p.ej., células de leucemia mielógena aguda (AML)).

15 De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 (también denominado B4) es un anticuerpo IgG1 murino que se une al antígeno CD19 en células B (Nadler et al., *J. Immunol.*, 131: 244-250 (1983)), y se puede usar para acceder a células B o células enfermas que expresan CD19 (p.ej., células de linfoma no de Hodgkin y células de leucemia linfoblástica crónica). El N901 es un anticuerpo monoclonal murino que se une al antígeno CD56 (molécula de adhesión de células neurales) encontrado en células de origen neuroendocrino, que incluyen tumores de pulmón de células pequeñas, que se puede usar en el conjugado para dirigir fármacos a células de origen neuroendocrino. Los anticuerpos J5, MY9 y B4 son preferiblemente reconstruidos en superficie o humanizados antes de su uso como parte del conjugado. La reconstrucción superficial o la humanización de anticuerpos se describe en, por ejemplo, Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 969-73 (1994).

20 Además, el anticuerpo monoclonal C242 se une al antígeno CanAg (véase, p.ej., la patente de EE.UU. 5.552.293), y se puede usar para dirigir el conjugado a tumores que expresan CanAg, tales como tumores colorrectales, pancreáticos, de pulmón de células no pequeñas, y cánceres gástricos. El HuC242 es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal C242 (véase, p.ej., la patente de EE.UU. 5.552.293). El híbrido a partir del cual se produce el HuC242 está depositado con el número de identificación ECACC 90012601. El HuC242 se puede preparar usando metodología de injerto CDR (véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762) o tecnología de reconstrucción superficial (véase, p.ej., la patente de EE.UU. 5.639.641). El HuC242 se puede usar para dirigir el conjugado a células tumorales que expresan el antígeno CanAg, por ejemplo, células de cáncer colorrectal, pancreático, de pulmón de células no pequeñas y gástrico.

25 Para acceder a células de cáncer ovárico y 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, p.ej., Taylor-Papadimitriou et al., *Int. J. Cancer*, 28: 17-21 (1981)), hCTM01 (véase, p.ej., van Hof et al., *Cancer Res.*, 56: 5179-5185 (1996)), y DS6. También se puede acceder a las células de cáncer de próstata con el conjugado usando un antígeno de membrana anti-próstata específico (PSMA) como agente de unión a células, tal como J591 (véase, p.ej., Liu et al., *Cancer Res.*, 57: 3629-3634 (1997)). Además, se puede acceder a células cancerosas que expresan el antígeno Her2, tales como cánceres de mama, próstata y ovario, usando el anticuerpo trastuzumab. También se pueden usar en el conjugado anticuerpos anti-IGF-IR que se unen al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina.

30 Son anticuerpos particularmente preferidos los anticuerpos monoclonales humanizados, los ejemplos de los cuales incluyen huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatumumab, sivotuzumab y rituximab (véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. 5.639.641 y 5.665.357, la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 60/424.332 (que está relacionada con la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2005/0118183 A1), la solicitud de patente internacional WO 02/16401, Pedersen et al., citado anteriormente, Roguska et al., citado anteriormente, Liu et al., citado anteriormente, Nadler et al., citado anteriormente, 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)). Lo más preferiblemente, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal humanizado huN901 o el anticuerpo monoclonal humanizado huMy9-6. Otros anticuerpos preferidos incluyen CNT095, huDS6, huB4 y huC242. Se conocen en la técnica otros anticuerpos monoclonales humanizados, y se pueden usar en relación con la descripción.

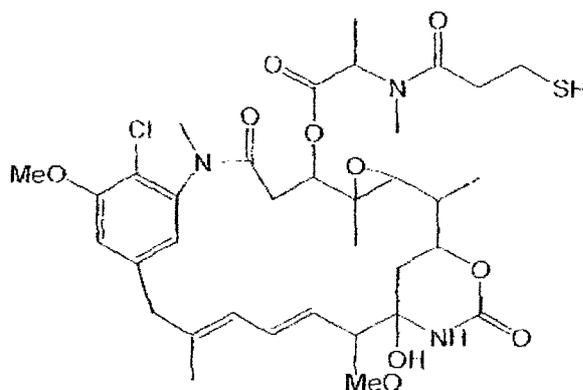
35 El conjugado comprende un maitansinoide. Un maitansinoide, que incluye maitansinol, es un compuesto que inhibe la formación de los microtúbulos y es altamente tóxico para las células de los mamíferos. Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen los que tienen un anillo aromático modificado y los que tienen modificaciones en otras posiciones. Tales maitansinoides se describen en, por ejemplo, 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.

5 Los ejemplos de análogos de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen: (1) C-19-decloro (patente de EE.UU. 4.256.746) (preparado por reducción con LAH de ansamitocina P2), (2) C-20-hidroxi (p C-20-demetil) +/- C-19-decloro (patentes de EE.UU. 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o de cloración usando LAH), y (3) C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/- decloro (patente de EE.UU. 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo).

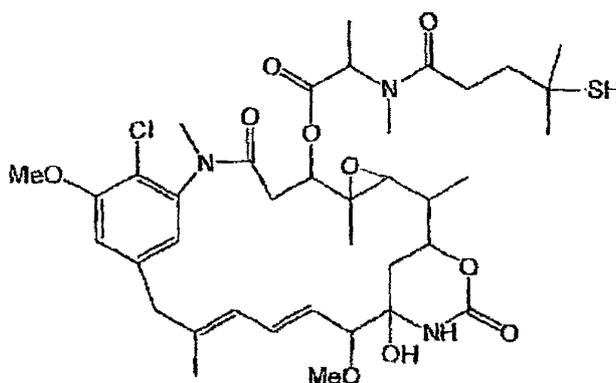
10 Los ejemplos de análogos de maitansinol que tienen modificaciones de posiciones distintas a un anillo aromático incluyen: (1) C-9-SH (patente de EE.UU. 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H<sub>2</sub>S o P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>), (2) C-14-alcóximetilo (demetoxi/CH<sub>2</sub>OR) (patente de EE.UU. 4.331.598), (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH<sub>2</sub>OH o CH<sub>2</sub>OAc) (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 la conversión de 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-demetoxi (patentes de EE.UU. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*), y (7) 4,5-desoxi (patente de EE.UU. 4.371.533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

En una realización preferida de la invención, el conjugado utiliza el maitansinoide que contiene tiol DM1, también conocido como N<sup>2</sup>-desacetil-N<sup>2</sup>-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como agente citotóxico. La estructura del DM1 está representada por la fórmula (I):



(I)

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



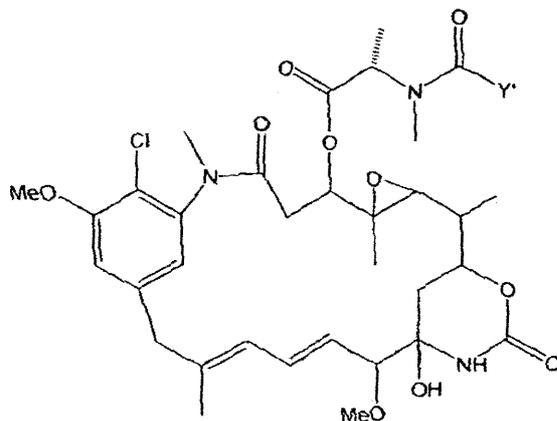
(II)

25 Se pueden usar otras maitansinas en el contexto de la invención, que incluyen, por ejemplo, maitansinas que contienen tiol y disulfuro que llevan una sustitución mono- o dialquílica en el átomo de carbono que lleva el átomo de azufre. Se prefiere particularmente un maitansinoide que tiene en la posición C-3 (a) funcionalidad C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo, y (b) una cadena lateral de aminoácido acilado con un grupo acilo que lleva un grupo sulfhidrido impedido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que lleva la funcionalidad tiol tiene

uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alquenido lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además en donde uno de los sustituyentes puede ser H, y en 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.

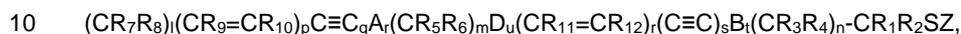
5

Maitansinas adicionales para el uso en el contexto de la invención incluyen compuestos representados por la fórmula (III):



(III),

en la que Y' representa



en donde cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alquenido lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R<sub>2</sub> también puede ser H,

15

en donde A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenido que tienen 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático, o heterocicloalquilo,

en donde cada uno de R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> son independientemente H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alquenido lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenido ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

20

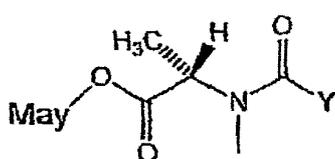
en donde cada uno de l, m, n, o, p, q, r, s y t son independientemente cero o un número entero de 1 a 5, a condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento, y

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

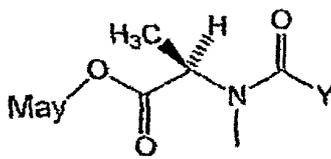
25

Las realizaciones preferidas de la fórmula (III) incluyen compuestos de fórmula (III) en los que (a) R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es metilo y Z es H, (b) R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son metilo y Z es H, (c) R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es metilo, y Z es -SCH<sub>3</sub>, y (d) R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son metilo, y Z es -SCH<sub>3</sub>.

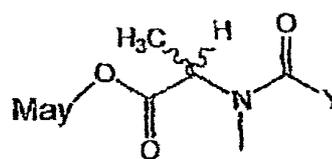
Tales maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (IV-L), (IV-D) o (IV-D,L):



(IV-L)



(IV-D)



(IV-D,L)

en las que Y representa  $(CR_7R_8)(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ,$

en donde cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R<sub>2</sub> también puede ser H,

5 en donde cada uno de R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son independientemente H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

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

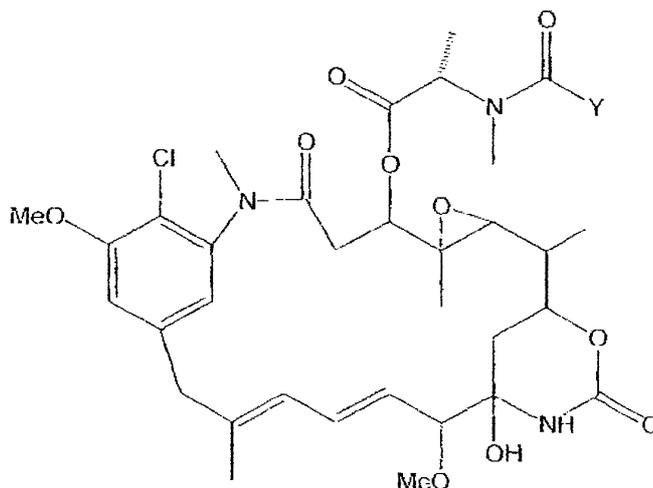
10 en donde Z es H, SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y

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

15 Las realizaciones preferidas de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) incluyen compuestos de fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) en las que (a) R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es metilo, cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son H, cada uno de l y m son 1, n es 0, y Z es H, (b) R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son metilo, cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son H, cada uno de l y m son 1, n es 0, y Z es H, (c) R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es metilo, cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son H, cada uno de l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH<sub>3</sub>, o (d) R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son metilo, cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son H, cada uno de l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH<sub>3</sub>.

Preferiblemente, el maitansinoide es representado por la fórmula (IV-L).

Maitansinas preferidas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (V):



(V)

20 en la que Y representa (CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>)(CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>n</sub>CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>SZ,

en donde cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R<sub>2</sub> también puede ser H,

25 en donde cada uno de R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son independientemente H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

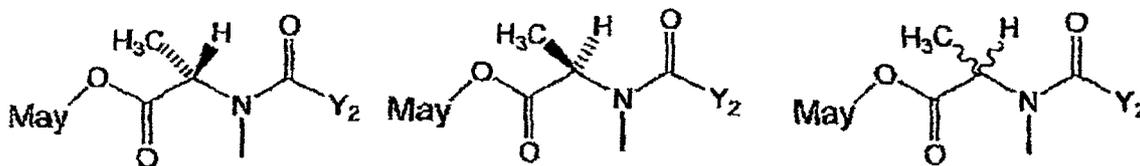
en donde cada uno de l, m y n son independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser cero,

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

Las realizaciones preferidas de la fórmula (V) incluyen compuestos de fórmula (V) en los que (a) R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es metilo, cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son H; cada uno de l y m son 1; n es 0, y Z es H, (b) R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son metilo; cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son H; l y m son 1; n es 0; y Z es H, (c) R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es metilo, cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son

H, cada uno de l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH<sub>3</sub>, o (d) R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son metilo, cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH<sub>3</sub>.

Otras maitansinas preferidas adicionalmente incluyen compuestos representados por la fórmula (VI-L), (VI-D) o (VI-D, L):



(VI-L)

(VI-D)

(VI-D, L),

5

en las que Y<sub>2</sub> representa (CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>)<sub>l</sub>(CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>n</sub>CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>SZ<sub>2</sub>,

en donde cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R<sub>2</sub> también puede ser H,

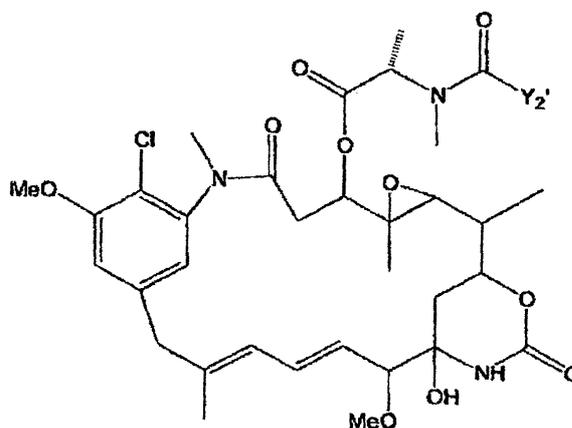
10 en donde cada uno de R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son independientemente H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alquenilo lineal o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

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

15 en donde Z<sub>2</sub> es SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y

en donde May es un maitansinoide.

Maitansinas preferidas adicionales incluyen compuestos representados por la fórmula (VII):



(VII),

20 en la que Y<sub>2</sub>' representa

(CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>)<sub>l</sub>(CR<sub>9</sub>=CR<sub>10</sub>)<sub>p</sub>(C≡C)<sub>q</sub>Ar(CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>)<sub>m</sub>D<sub>u</sub>(CR<sub>11</sub>=CR<sub>12</sub>)<sub>r</sub>(C≡C)<sub>s</sub>B<sub>t</sub>(CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>n</sub>CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>SZ<sub>2</sub>,

en donde cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R<sub>2</sub> también puede ser H,

25 en donde cada uno de A, B y D es independientemente cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

en donde cada uno de R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> son independientemente H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10

átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

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

5 en donde Z<sub>2</sub> es SR o -COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

Las realizaciones preferidas de la fórmula (VII) incluyen compuestos de fórmula (VII) en los que R<sub>1</sub> es H y R<sub>2</sub> es metilo.

10 Los conjugados de fármaco se pueden preparar por métodos *in vitro*. Para enlazar un fármaco o un profármaco al anticuerpo, se usa un grupo enlazante. Los grupos enlazantes adecuados son bien conocidos en la técnica, e incluyen grupos disulfuro, grupos lábiles con ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles con peptidasa, y grupos lábiles con esterasa. Los grupos enlazantes preferidos son los grupos disulfuro. Por ejemplo, se pueden construir conjugados usando una reacción de intercambio de disulfuro entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco.

15 De acuerdo con la descripción, el anticuerpo se modifica haciendo reaccionar un reactivo de reticulación bifuncional con el anticuerpo, dando como resultado de este modo la unión covalente de una molécula enlazadora al anticuerpo. Tal como se emplea en la presente memoria, un "reactivo de reticulación bifuncional" es cualquier resto químico que enlaza covalentemente un agente de unión a células a un fármaco, tal como los fármacos descritos en la presente memoria. En una realización preferida de la invención, una parte del resto enlazante es proporcionada por el fármaco. A este respecto, el fármaco comprende un resto enlazante que es parte de una molécula enlazadora más grande que se usa para unir el agente de unión a células al fármaco. Por ejemplo, para formar el maitansinoide DM1, la cadena lateral en el grupo hidroxilo C-3 de la maitansina se modifica para que tenga un grupo sulfhidrilo libre (SH). Esta forma tiolada de maitansina puede reaccionar con un agente de unión a células modificado para formar un conjugado. Por lo tanto, el enlazador final está ensamblado a partir de dos componentes, uno de los cuales es proporcionado por el reactivo de reticulación, mientras que el otro es proporcionado por la cadena lateral del DM1.

20

25

Se puede usar cualquier reactivo de reticulación bifuncional adecuado en relación con el presente procedimiento, siempre y cuando el reactivo enlazador proporcione la conservación de las características terapéuticas, p.ej., citotoxicidad, y de accesibilidad del fármaco y el agente de unión a células, respectivamente. Preferiblemente, la molécula enlazadora une el fármaco al agente de unión a células mediante enlaces químicos (como se describió anteriormente), de tal modo que el fármaco y el agente de unión a células se acoplan químicamente (p.ej., se unen covalentemente) uno al otro. Preferiblemente, el reactivo enlazante es un enlazador escindible. Más preferiblemente, el enlazador es escindido bajo condiciones suaves, es decir, condiciones dentro de una célula bajo las que la actividad del fármaco no es afectada. Los ejemplos de enlazadores escindibles adecuados incluyen enlazadores de disulfuro, enlazadores lábiles con ácidos, enlazadores fotolábiles, enlazadores lábiles con peptidasa y enlazadores lábiles con esterasa. Los enlazadores que contienen disulfuro son enlazadores escindibles mediante intercambio de disulfuro, que puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas. Los enlazadores lábiles con ácidos son enlazadores escindibles a pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimentos intracelulares, tales como los endosomas y lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5), y proporcionan condiciones adecuadas para escindir enlazadores lábiles con ácidos. Los enlazadores fotolábiles son útiles en la superficie del cuerpo y en muchas cavidades del cuerpo que son accesibles a la luz. Además, la luz infrarroja puede penetrar los tejidos. Los enlazadores lábiles con peptidasa se pueden usar para escindir ciertos péptidos dentro o fuera de las células (véase p.ej., Trouet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 626-629 (1982), y Umemoto et al., *Int. J. Cancer*, 43: 677-684 (1989)).

30

35

40

Preferiblemente, el fármaco se enlaza a un agente de unión a células mediante un enlace disulfuro. La molécula enlazadora comprende un grupo químico reactivo que puede reaccionar con el agente de unión a células. Los grupos químicos reactivos preferidos para la reacción con el agente de unión a células son ésteres de N-succinimidilo y ésteres de N-sulfosuccinimidilo. Adicionalmente, la molécula enlazadora comprende un grupo químico reactivo, preferiblemente un grupo ditiopiridilo, que puede reaccionar con el fármaco para formar un enlace disulfuro. Las moléculas enlazadoras particularmente preferidas incluyen, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (véase, p.ej., Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)), 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB) (véase, p.ej., la patente de EE.UU. 4.563.304), 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) (véase, p.ej., número de registro CAS 341498-08-6), y otros reticuladores reactivos que se describen en la patente de EE.UU. 6.913.748.

45

50

Aunque se usan preferiblemente enlazadores escindibles en el método inventivo, también se puede usar un enlazador no escindible para generar el conjugado descrito anteriormente. Un enlazador no escindible es cualquier resto químico que es capaz de enlazar un maitansinoide a un agente de unión a células de una manera covalente, estable. Por tanto, los enlazadores no escindibles son sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácidos, la escisión producida por la luz, la escisión inducida por peptidasa, la escisión inducida por esterasa y la escisión del enlace disulfuro, en condiciones bajo las que el fármaco o el agente de unión a células permanece activo.

55

Los reactivos de reticulación adecuados que forman enlazadores no escindibles entre un fármaco y el agente de unión a células son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de enlazadores no escindibles incluyen enlazadores que tienen un resto éster de N-succinimidilo o éster de N-sulfosuccinimidilo para la reacción con el agente que se une a la célula, así como un resto basado en maleimido o haloacetilo para la reacción con el fármaco. Los reactivos de reticulación que comprenden un resto basado en maleimido incluyen 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), 4-(maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) de N-succinimidilo, que es un análogo de "cadena larga" del SMCC (LC-SMCC), éster de N-succinimidilo del ácido κ-maleimidoundecanoico (KMUA), éster de N-succinimidilo del ácido γ-maleimidobutírico (GMBS), éster de hidroxisuccinimidilo del ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α-maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), 6-(β-maleimidopropionamido)hexanoato de N-succinimidilo (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), e isocianato de N-(p-maleimidofenilo) (PMPPI). Los reactivos de reticulación que comprenden un resto basado en haloacetilo 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 en el método inventivo otros reactivos de reticulación que carecen de un átomo de azufre y que forman enlazadores no escindibles. Tales enlazadores pueden derivar de restos basados en ácidos dicarboxílicos. Los restos basados en ácidos dicarboxílicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácidos α,ω-dicarboxílicos de la fórmula general (IX):



(IX),

en la que X es un grupo alquilo, alqueno o alquino lineal o ramificado que tiene 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalqueno que lleva 3 a 10 átomos de carbono, Z es un grupo aromático sustituido o no sustituido que lleva 6 a 10 átomos de carbono, o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en el que el heteroátomo se selecciona de N, O o S, y en donde cada uno de l, m y n son cero o 1, a condición de que l, m y n no son todos cero al mismo tiempo.

Muchos de los enlazadores no escindibles descritos en la presente memoria se describen en detalle en la solicitud de patente de EE.UU. N° 10/960.602, que corresponde a la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2005/0169933 A1.

Se describe información adicional relativa a maitansinoides, agentes citotóxicos que comprenden los mismos, conjugados de fármacos y métodos de preparación relacionados en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/352.121 y la solicitud de patente de EE.UU. N° 10/849.136, que corresponde a la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2004/0235840 A1.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

#### Ejemplo comparativo 1

Este ejemplo demuestra la purificación de un anticuerpo modificado con un reactivo de modificación heterobifuncional usando TFF.

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 etanol al 5%. En un primer grupo, la mezcla de reacción se purificó 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. En un segundo grupo, la mezcla de reacción se purificó usando un sistema Pellicon XL TFF (Millipore, Billerica, MA), y el anticuerpo fue diafiltrado (5 volúmenes) en fosfato de potasio 50 mM, NaCl 50 mM (pH 6,5) y EDTA 2 mM usando una membrana de corte de peso molecular de 10.000 (membrana de celulosa regenerada Ultracel™, Millipore, Billerica, MA). Ambas muestras fueron conjugadas con DM1 (exceso molar de 1,7 veces sobre el enlazador no unido) durante 18 horas a pH 6,5 en tampón fosfato de potasio que contenía NaCl 50 mM y una concentración final de 3% de DMA.

En ambos grupos, los rendimientos se determinaron espectrofotométricamente (longitud de onda 280 nm) para la etapa de modificación y purificación combinada. Las relaciones enlazador/anticuerpo también se determinaron por tratamiento con ditiotreitól para liberar piridina-2-tiona, que tiene un coeficiente de extinción de 8.080 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> a 343 nm. Las relaciones fármaco/anticuerpo se determinaron espectrofotométricamente (longitudes de onda de 280 nm y 252 nm) para la etapa de conjugación. Además, la retirada de especies moleculares pequeñas relacionadas con el SPP se midió por HPLC Hisep.

Los datos resultantes se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1: Métodos de purificación para huN901 modificado usando G-25F frente a TFF

		Resina Sephadex™ G25F	TFF
Etapa de modificación	Rendimiento de etapa	94 %	98 %
	Relación enlazador/anticuerpo	4,9	4,9
	Moléculas pequeñas relacionadas con el SPP	0,2 %	0,2 %
Etapa de conjugación	Relación fármaco/anticuerpo	3,7	3,7

Como se muestra en la Tabla 1, el uso de TFF proporciona un producto conjugado de fármaco de calidad al menos equivalente al procedimiento de cromatografía no adsorptiva (G25), mientras que es más conveniente y escalable.

## 5 Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la purificación de un anticuerpo modificado con un reactivo de modificación heterobifuncional usando cromatografía adsorptiva.

Se modificó el anticuerpo huB4 con 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB, exceso molar de 5,4 veces) 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 etanol al 5%. En un primer grupo, la mezcla de reacción se purificó usando la columna de resina Sephadex™ G25F descrita en el Ejemplo 1. En un segundo grupo, la mezcla de reacción se cargó en una columna de hidroxapatita cerámica (CHT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), que se equilibró en tampón fosfato de potasio 12,5 mM (pH 6,5) y se eluyó con tampón fosfato de potasio 80 mM (pH 6,5).

En ambos grupos, los rendimientos y relaciones enlazador/anticuerpo se determinaron como se describe en el Ejemplo 1. El primer grupo tuvo un 91% de rendimiento y una relación enlazador/anticuerpo de 4,2. El segundo grupo tuvo un 89% de rendimiento y una relación enlazador/anticuerpo de 4,2.

Se modificó el anticuerpo CNTO95 (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 sacarosa al 2,7% y etanol al 5%. En un primer grupo, la mezcla de reacción se purificó usando una columna de resina Sephadex™ G25F en tampón fosfato de potasio 12,5 mM (pH 6,6) que contenía NaCl 12,5 mM y EDTA 0,5 mM. En un segundo grupo, la mezcla de reacción se cargó en una columna de SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ), que fue equilibrada en tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,5) y eluida con tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 7,5), que contenía NaCl 50 mM.

En ambos grupos, los rendimientos y relaciones enlazador/anticuerpo se determinaron como se describe en el Ejemplo 1. El primer grupo tuvo un 96% de rendimiento y una relación enlazador/anticuerpo de 4,0. El segundo grupo tuvo un 97% de rendimiento y una relación enlazador/anticuerpo de 4,1.

Los datos obtenidos en este ejemplo demuestran que se puede usar cromatografía adsorptiva para purificar un anticuerpo modificado con un reactivo de modificación heterobifuncional.

## Ejemplo comparativo 3

Este ejemplo demuestra los efectos beneficiosos de conjugar un anticuerpo modificado con un fármaco a un pH por encima de 6,5.

En un primer experimento, se modificó y purificó el anticuerpo CNTO95 como se describe en el Ejemplo 2. Después, el anticuerpo modificado se dividió 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, DMA al 3% y un exceso molar de 1,7 veces de fármaco por enlazador a 20° C. En el segundo grupo, la reacción de conjugación fue a pH 7,5. El anticuerpo conjugado fue purificado sobre columnas NAP-10.

La relación fármaco/anticuerpo se midió para ambos grupos. Los datos resultantes se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2: Relación fármaco/anticuerpo en una reacción de conjugación de pH 6,5 frente a 7,5

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

Como muestran los datos expuestos en la Tabla 2, la conjugación tiene lugar más rápido a pH 7,5 que a pH 6,5.

5 En un segundo experimento, se modificó el anticuerpo monoclonal humanizado huB4 bien con (a) un exceso molar de 4,9 veces de SPDB en relación al anticuerpo, o bien (b) un exceso molar de 4,8 veces de SPDB en relación al anticuerpo. En ambas situaciones, la reacción fue en fosfato de potasio 50 mM, cloruro de potasio 50 mM, y EDTA 2 mM (pH 6,5) en etanol al 5% para un total de 120 minutos a temperatura ambiente. La muestra (a) fue purificada 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. La muestra (b) fue purificada de manera equivalente, excepto que el tampón de cromatografía se ajustó a pH 7,5. Ambas muestras fueron conjugadas con DM4 (exceso molar de 1,7 veces sobre el enlazador unido) durante 18 horas a temperatura ambiente en una concentración final de dimetilacetamida (DMA) de 3%.

10 Así, la muestra (a) fue conjugada a pH 6,5, y la muestra (b) fue conjugada a pH 7,5. Después, las muestras se purificaron 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. Ambas muestras se incubaron a 4° C durante hasta 7 meses y se sometieron a análisis de fármaco libre liberado a intervalos. Los datos resultantes se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3: Liberación de fármaco libre con el tiempo desde 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 muestran los datos expuestos en la Tabla 3, la liberación de fármaco libre es sustancialmente más lenta desde 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. Por consiguiente, se muestra que el producto de fármaco conjugado preparado a pH 7,5 es más estable con respecto a la liberación de fármaco libre con el tiempo en comparación con el producto de fármaco conjugado preparado a pH 6,5. La conjugación a pH 7,5 también muestra una mejor incorporación del fármaco que a pH 6,5, requiriendo de este modo usar menos fármaco.

#### Ejemplo comparativo 4

25 Este ejemplo demuestra los efectos beneficiosos de conjugar un anticuerpo modificado con un fármaco a un pH por debajo de 6,0.

30 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 etanol al 5%. En un primer grupo, la mezcla de reacción se purificó 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, la mezcla de reacción se purificó 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. Ambas muestras fueron conjugadas con DM4 (exceso molar de 1,7 veces sobre el enlazador unido) durante 3, 19, 25, 48 y 120 horas a temperatura ambiente en una concentración final de dimetilacetamida (DMA) de 3%.

5 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 potasio 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl 50 mM y EDTA 2 mM. Después, las muestras fueron purificadas 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.

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

El primer grupo tuvo una relación enlazador/anticuerpo de 4,3. El segundo grupo tuvo una relación enlazador/anticuerpo de 4,2.

Las relaciones fármaco/anticuerpo con el tiempo para los dos grupos se exponen en la Tabla 4.

Tabla 4: Velocidad de incorporación de DM1 en huN901 modificado con SPP en función del pH de conjugación

Tiempo de reacción (horas)	Relación 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	NT
48	3,46	3,17
120	3,44	2,85

15 Como es evidente a partir de los datos expuestos en la Tabla 4, el conjugado que se prepara conjugando el anticuerpo modificado con el fármaco a un pH de 5,0 alcanza un nivel más alto 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 la estabilidad aumentada, los resultados indican que se alcanza un nivel de fármaco/anticuerpo más alto tras la conjugación a pH 5,0 que cuando se usa la misma cantidad de fármaco a un pH de conjugación de 6,5, indicando de este modo una utilización más eficaz del fármaco a pH 5,0.

20 En ambos grupos, se determinaron las cantidades de monómero conjugado con el tiempo. Los datos resultantes se exponen en la Tabla 5.

25 Tabla 5: Efecto del pH de conjugación sobre el nivel de monómero conjugado durante la conjugación de huN901 modificado por SPP con DM1

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

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

**Ejemplo comparativo 5**

Este ejemplo demuestra adicionalmente los beneficios de conjugar un fármaco con un anticuerpo modificado a un pH menor que 6.

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

10 Se conjugó el anticuerpo modificado a cada pH con DM1 (exceso molar de 1,7 veces sobre el enlazador) en dimetilacetamida (DMA, concentración final de 3%). Después de una incubación durante 17-18 horas a temperatura ambiente, las muestras de anticuerpo conjugado se purificaron por cromatografía en columnas NAP 25 equilibradas en PBS (pH 6,5). Las relaciones enlazador/anticuerpo (E/A en la Tabla 6) se determinaron por tratamiento con ditiotreitól para liberar piridina-2-tiona, que tiene un coeficiente de extinción de  $8.080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 343 nm. Las relaciones fármaco/anticuerpo se determinaron espectrofotométricamente (longitudes de onda de 280 nm y 252 nm)

15 para la etapa de conjugación. El monómero conjugado, las especies de alto peso molecular y las especies de bajo peso molecular se determinaron 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 e isopropanol al 20%.

Los resultados de este análisis se exponen en la Tabla 6.

Tabla 6: Características del producto conjugado con fármaco en relación al pH

Tampón	Exceso molar de SPP	E/A	F/A	Monómero (%)	PM alto (%)	PM bajo (%)	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

20 Los datos expuestos en la Tabla 6 demuestran que la conjugación de BIWA 4 modificado por SPP con DMI fue eficaz a un pH por debajo de 6,0, comparado con la conjugación a pH 6,5. Las cantidades de enlazador y fármaco, específicamente enlazador SPP y DM1, requeridas para alcanzar una relación fármaco/anticuerpo final particular, se redujo a pH más bajo. Además, los niveles de monómero conjugado, las especies de alto peso molecular y las especies de bajo peso molecular fueron más óptimos, y los rendimientos fueron mejorados, a pH más bajo.

25

**Ejemplo comparativo 6**

Este ejemplo demuestra que la etapa para purificar el anticuerpo modificado puede ser eliminada opcionalmente. El fármaco puede ser añadido simultáneamente con el reactivo modificador bifuncional o en algún momento después.

30 En un ejemplo de adición de fármaco después del reactivo modificador, el anticuerpo monoclonal humanizado CNT095 fue modificado a una concentración de 20 mg/ml con el reactivo modificador bifuncional SPDB a un exceso molar de SPDB sobre el anticuerpo de 4,6 durante 120 min a 20° C. El tampón de modificación fue tampón fosfato 44 mM (pH 7,5) que contenía sacarosa al 5,3% y etanol al 5%. Una alícuota del anticuerpo modificado fue purificada sobre resina Sephadex™ G25F (procedimiento de cuatro etapas estándar), equilibrada y eluida en tampón fosfato de potasio 12,5 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 12,5 mM, y fue conjugada posteriormente con DM4 (exceso molar de 1,7 veces de fármaco sobre enlazador unido) a una concentración final de anticuerpo modificado de 10 mg/ml en

35 tampón fosfato de potasio 12,5 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 12,5 mM y DMA al 10% durante 20 horas a temperatura ambiente. Una segunda alícuota del anticuerpo modificado se conjugó inmediatamente al final de la reacción de modificación de 120 minutos (procedimiento de tres etapas), sin ser purificada adicionalmente.

40 Las concentraciones de proteína y tampón de la mezcla de reacción de modificación fueron ajustadas para dar una concentración de proteína modificada de 10 mg/ml y una composición de tampón fosfato de potasio 28 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 5,9 mM y sacarosa al 2,7%. Después se añadió DM4 (exceso molar de 1,7 veces sobre el SPDB de partida) y la DMA se ajustó a una concentración final de 10%. Después de 20 horas de incubación a temperatura ambiente, ambas alícuotas de anticuerpo conjugado fueron purificadas en resina Sephadex™ G25F equilibrada en histidina 10 mM y sacarosa al 10% a pH 5,5.

Las relaciones enlazador/anticuerpo (E/A) se determinaron por tratamiento con ditiotreitól para liberar piridina-2-tiona, que tiene un coeficiente de extinción de  $8.080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 343 nm. Las relaciones fármaco/anticuerpo (D/A) y el rendimiento se determinaron espectrofotométricamente (longitudes de onda de 280 nm y 252 nm) para la etapa de conjugación. Los porcentajes de monómero fueron ensayados por SEC-HPLC. Los porcentajes de fármaco libre fueron ensayados por HPLC en una columna Hisep. Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 7.

Tabla 7: Eliminación opcional de la etapa de purificación para el anticuerpo modificado

Parámetros	Procedimiento de 4 etapas	Procedimiento de 3 etapas
SPDB de partida	4,6 x	4,6 x
E/A	4,1	No determinado
D/A	3,9	4,0
Rendimiento	79%	91%
% de Monómero	95,8%	96,1%
% de Fármaco libre	2,4%	1,1%

Como demuestran los resultados expuestos en la Tabla 7, la etapa para purificar el anticuerpo modificado puede ser eliminada en el contexto de la invención.

#### 10 Ejemplo comparativo 7

Este ejemplo demuestra un medio mejorado para purificar un anticuerpo que ha sido modificado con un reactivo de modificación heterobifuncional y conjugado después con un maitansinoide.

15 El anticuerpo huN901 modificado con SPP (exceso molar de 7 veces) y purificado en resina Sephadex™ G25F, como se describe en el Ejemplo 1, fue conjugado con el maitansinoide DM1 (exceso molar de 1,7 veces sobre el enlazador, disuelto en dimetilacetamida (DMA), concentración final 3%).

Una primera muestra de conjugado se purificó por cromatografía estándar en resina Sephadex™ G25F en suero salino tamponado con fosfato (PBS, pH 6,5).

Una segunda muestra de conjugado se purificó por un sistema Pellicon XL TFF (Millipore, Billerica, MA), como se describe en el Ejemplo 1.

20 Una tercera muestra de conjugado se purificó usando una columna de resina MEP Hypercell equilibrada en Tris 50 mM (pH 8,0), y eluida con acetato de sodio 50 mM (pH 4,0).

Una cuarta muestra de conjugado se purificó usando una columna de resina UNOsphere S equilibrada en fosfato de sodio 50 mM (pH 6,5) y eluida con NaCl 0,2 M y fosfato de sodio 50 mM (pH 6,5).

25 Una quinta muestra de conjugado se purificó usando una columna de resina CHT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) equilibrada en fosfato de sodio 50 mM (pH 6,5) y eluida con NaCl 0,3 M y fosfato de sodio 50 mM (pH 6,5).

Una sexta muestra de conjugado se purificó usando una columna de resina SP Sefarosa equilibrada en citrato de sodio 35 mM, cloruro de sodio 10 mM (pH 5,0), y eluida con NaCl 0,25 M, citrato de sodio 35 mM (pH 5,0).

30 El monómero conjugado se determinó por SEC-HPLC usando una columna de resina TSKG3000SW<sub>XL</sub> equilibrada y desarrollada en tampón fosfato de potasio 0,2 M a pH 7,0, que contenía cloruro de potasio 0,2 M e isopropanol al 20%. El rendimiento de la etapa de conjugación se determinó dividiendo el rendimiento de anticuerpo conjugado por la cantidad de anticuerpo modificado que fue conjugado (determinado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 nm).

Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 8.

Tabla 8: Comparación de las etapas de conjugación y purificación

Muestra de conjugado	Etapas de conjugación y purificación	Monómero conjugado %	Rendimiento de etapa %
1 (control)	Resina G25F	93,2	86
2 (invención)	TFF	92,8	85
3 (invención)	Resina MEP Hypercell	94,5	74
4 (invención)	Resina UNOsphere	96,3	81
5 (invención)	Resina CHT	97,9	72
6 (invención)	Resina SP Sefarosa	95,1	81

5 Los resultados en la Tabla 8 muestran que todos los métodos de purificación inventivos (grupos 2-6) dieron rendimientos similares a los obtenidos con el procedimiento de control (grupo 1). Cada método cromatográfico inventivo proporcionó una mejora en el nivel de monómero conjugado y puede ser aumentado a escala fácilmente.

Además de CHT (hidroxiapatita cerámica), también se puede usar CFT (fluoroapatita cerámica) bajo condiciones cromatográficas similares. Alternativamente, se puede usar tanto la CHT como la CFT en modo no adsorptivo, de tal modo que el producto deseado (sustancialmente conjugado monomérico) no es retenido por las resinas, mientras que las especies de alto peso molecular son retenidas y de este modo separadas del producto deseado.

10 Aunque una composición tampón/disolvente estándar para la conjugación comprende DMA al 3%, fosfato de potasio 50 mM, NaCl 50 mM y EDTA 2 mM a pH 6,5 (como se utiliza en el Ejemplo 1), otras composiciones son más compatibles con algunas de las etapas cromatográficas descritas en la presente memoria y proporcionan otros beneficios en relación con el procedimiento estándar. Por ejemplo, la conjugación se puede realizar en DMA al 3%, fosfato de potasio 12,5 mM, NaCl 12,5 mM y EDTA 0,5 mM a pH 6,5. Bajo estas condiciones, la cantidad de DM4  
15 incorporada en relación a la cantidad del enlazador incorporada en el anticuerpo huB4 fue aproximadamente 10% más alta que para las condiciones estándar. Además, estas condiciones son más compatibles con la carga sobre resinas tales como resinas de intercambio catiónico y resinas de CHT.

20 Todas las referencias, incluyendo publicaciones, solicitudes de patente y patentes citadas en la presente memoria se incorporan por la presente memoria por referencia en la misma medida que si cada referencia fuera individualmente y específicamente indicada para ser incorporada por referencia y fuera expuesta en su totalidad en la presente memoria.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un conjugado anticuerpo-maitansinoide, que comprende las etapas de:
  - (a) poner en contacto un anticuerpo con un reactivo de reticulación bifuncional para unir covalentemente un enlazador al anticuerpo y preparar de este modo una primera mezcla que comprende anticuerpos que tienen enlazadores unidos a los mismos,
  - (b) someter la primera mezcla a cromatografía adsorbtiva y preparar de este modo una primera mezcla purificada de anticuerpos que tienen enlazadores unidos a los mismos,
  - (c) conjugar un maitansinoide con los anticuerpos que tienen enlazadores unidos a los mismos en la primera mezcla purificada haciendo reaccionar los anticuerpos que tienen enlazadores unidos a los mismos con un maitansinoide en una solución que tiene un pH de 4 a 9 para preparar una segunda mezcla que comprende (i) anticuerpo acoplado químicamente mediante el enlazador al maitansinoide, (ii) maitansinoides libres y (iii) subproductos de reacción, y
  - (d) someter la segunda mezcla a cromatografía adsorbtiva para purificar los anticuerpos acoplados químicamente mediante los enlazadores al maitansinoide de los otros componentes de la segunda mezcla y preparar de este modo una segunda mezcla purificada de anticuerpos acoplados químicamente mediante los enlazadores al maitansinoide.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la cromatografía adsorbtiva se selecciona del grupo que consiste en cromatografía con hidroxapatita, cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico de modo mixto, cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC), cromatografía de ligando colorante, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa, y combinaciones de las mismas.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la solución en la etapa (c) tiene un pH de 4 a 6.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la solución en la etapa (c) tiene un pH de 6,5 a 9.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la solución en la etapa (c) comprende sacarosa.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la solución en la etapa (c) comprende un agente amortiguador seleccionado del grupo que consiste en un tampón citrato, un tampón acetato, un tampón succinato y un tampón fosfato.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, CNTO95, huDS6 y rituximab.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo es trastuzumab.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el maitansinoide es N<sup>2'</sup>-desacetil-N<sup>2'</sup>-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1).
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el maitansinoide es N<sup>2'</sup>-desacetil-N<sup>2'</sup>-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM4).
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el anticuerpo se acopla químicamente al maitansinoide por medio de enlaces químicos seleccionados del grupo que consiste en enlaces disulfuro, enlaces lábiles con ácidos, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles con peptidasa, enlaces tioéter y enlaces lábiles con esterasa.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el reactivo de reticulación bifuncional se selecciona del grupo que consiste en 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB), 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), 4-(maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) de N-succinimidilo (LC-SMCC), éster de N-succinimidilo del ácido κ-maleimidoundecanoico (KMUA), éster de N-succinimidilo del ácido γ-maleimidobutírico (GMBS), éster de hidroxisuccinimida del ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α-maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), 6-(β-maleimidopropionamido)hexanoato de N-succinimidilo (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), isocianato de N-(p-maleimidofenilo) (PMPI), 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).