

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 420**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2014 PCT/GB2014/051304**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14174316**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2014 E 14726715 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2988785**

54 Título: **Método de síntesis de ADC utilizando resinas de afinidad**

30 Prioridad:

26.04.2013 GB 201307574

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

09.03.2018

73 Titular/es:

**ADC BIOTECHNOLOGY LTD (100.0%)
Optic Technium Ffordd William Morgan St. Asaph
Business Park
St. Asaph, Denbighshire LL17 0JD, GB**

72 Inventor/es:

**EVANS, DAVID JOHN y
MCKEE, COLIN MARTIN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

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

ES 2 658 420 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

Método de síntesis de ADC utilizando resinas de afinidad

5 Esta invención se refiere a un método en fase sólida para sintetizar conjugados de biomolécula-fármaco. En particular, esta invención se refiere a un método en fase sólida para sintetizar conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). Esta invención también se refiere a métodos intermedios para producir biomoléculas químicamente modificadas inmovilizadas, por ejemplo, anticuerpos.

10 Además de los métodos anteriores, la invención se refiere a diversos usos de resinas de captura, conjugados de biomolécula-fármaco, productos intermedios y composiciones de los métodos de la invención.

Antecedentes

15 Las inmunotoxinas y los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) son fármacos proteínicos que combinan un dominio de unión específico al objetivo con una molécula de fármaco de toxicidad potente suficiente que puede clasificarse como citotóxica. Los anticuerpos son la biomolécula ideal para este fin, creando un sistema de direccionamiento que combina alta especificidad con alta afinidad antigénica, permitiendo el transporte del fármaco citotóxico directo al sitio de administración deseado. Estas construcciones de fármacos son potencialmente terapéuticas contra enfermedades, encontrando una
20 prevalencia particular dentro de la oncología.

Los principales criterios de un Conjugado de Anticuerpo y Fármaco (ADC) son que la "ojiva" de la toxina (fármaco) tiene actividad a niveles extremadamente bajos (picoM). Además, es ventajoso tener eficacia frente a células tumorales independientemente del punto en el ciclo. Con este fin, los agentes activos de ADN han encontrado el favor como
25 candidatos a toxinas, ya que el daño en el ADN, a menos que sea reparable, impulsará la apoptosis independientemente del punto en el ciclo.

En principio, una toxina adecuada para un ADC puede ser cualquier fracción definida como una molécula L01 ATC ('Sistema de Clasificación Química Terapéutica Anatómica' (por sus siglas en inglés) en el que L01 es un subgrupo que define los
30 agentes antineoplásicos e inmunomoduladores, definidos por el Centro Colaborador de Metodología de Estadísticas de Medicamentos de la OMS). Alternativamente, otras fracciones que pueden categorizarse como cargas útiles adecuadas para ADC se pueden definir simplemente como cualquier cosa que sea tóxica para las células una vez internalizada. La mayoría de las fracciones que caen en la última categoría carecerían de la potencia suficiente para ser efectivas. Por lo tanto, existe una tendencia de la industria para identificar y explotar materiales de "ultrapotencia".

35 Se puede encontrar una revisión de expertos sobre la justificación, el diseño y la efectividad de la investigación de inmunotoxinas y ADC en: J. Adair et al, Expert Opin. Biol. Ther., 2012, 12 (9): P1 191-206, G. Casi et al., Journal of Controlled Release, 2012, 161, 2, PA22-428 y F. Dosio et al, Toxins, 2011, 3, P848- 883.

40 Se pueden utilizar varios métodos de fase de solución para fabricar conjugados de biomolécula-fármaco, por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). Sin embargo, los métodos de fase de solución son en sí mismos un desperdicio en términos de generación de grandes volúmenes de residuos y son problemáticos en términos de agregación de conjugados de biomolécula-fármaco durante la síntesis.

45 La primera etapa en un método de fase de solución para fabricar conjugados de biomolécula-fármaco generalmente implica la modificación química o la activación de la biomolécula. Por ejemplo, cuando la biomolécula es un anticuerpo, el anticuerpo puede 'modificarse químicamente' o 'activarse' reduciendo o reduciendo parcialmente el anticuerpo. Un proceso adecuado para la reducción parcial de anticuerpos se da en "Bioconjugate Techniques", página 96/97, Greg T. Hermanson, Academic Press; 2ª edición, 2008, ISBN-13: 978-0123705013. Un agente reductor como TCEP generalmente se emplea en
50 el proceso de reducción.

Después de la modificación química o la activación del anticuerpo, por ejemplo, reducción, la siguiente etapa es eliminar cualquier exceso de agente de activación/modificación química, por ejemplo, exceso de agente reductor. Esta etapa lleva mucho tiempo, ya que a veces es necesario ejecutar la muestra a través de una columna de separación varias veces. Esto
55 también puede ser problemático en términos de degradación si la estabilidad de la biomolécula es un problema. La cuestión de la purificación de la biomolécula modificada/activada químicamente es particularmente problemática si el proceso implica la reducción total de un ThiomAb con un gran exceso de un agente reductor.

Después de la etapa de purificación anterior, el anticuerpo químicamente modificado/activado, por ejemplo, reducido, se
60 conjuga luego con una fracción de fármaco. El principal problema con esta etapa es la alta probabilidad de agregación del conjugado biomolécula-fármaco. Esto es particularmente problemático cuando se emplean fármacos altamente hidrófobos

5 en el proceso. La agregación es un problema importante ya que puede conducir a conjugados de biomolécula-fármaco inservibles. En el mejor de los casos, los conjugados de biomolécula-fármaco contaminados con agregados conjugados de biomolécula-fármaco deben purificarse aún más para eliminar los agregados, lo que consume mucho tiempo y es muy derrochador. Una gran proporción del fármaco se perderá durante la purificación, ya que forma parte del conjugado biomolécula-fármaco agregado. En el peor de los casos, todo el lote de conjugado de biomolécula-fármaco contaminado con el agregado conjugado de biomolécula-fármaco en un grado tan alto es completamente inutilizable y debe desecharse.

10 Los oncólogos han estado trabajando en el aprovechamiento de anticuerpos monoclonales específicos del objetivo para administrar fármacos citotóxicos al sitio de los tumores, siempre que existan anticuerpos monoclonales; casi tres décadas. Hasta ahora, tres clases de toxinas han dominado el campo. A saber, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas. Estas clases de fármacos citotóxicos son típicamente de naturaleza hidrófoba. Cuando se conjugan con un anticuerpo, su presencia aumenta la hidrofobicidad global del anticuerpo de manera significativa y, en algunos casos, en la medida en que las interacciones hidrófobas entre conjugados conducen a la agregación conjugada. El orden de importancia de este problema es la caliqueamicina > Maitansina > Auristatina en base al conocimiento de que los procesos de Mylotarg y CMC-15 544 contienen etapas de extracción de agregados cromatográficos. Aproximadamente el 50% de los procesos de maitansina contienen etapas de eliminación de agregados y muy pocos procesos de Auristatina contienen etapas de eliminación de agregados.

20 Más recientemente, toxinas basadas en duocarmicinas (www.syntarga.com) y los dímeros de pirollebenzodiazepeno (PBD) (www.spirogen.com) han sido conjugados con anticuerpos y se están evaluando preclínicamente. Estas nuevas clases de toxinas son incluso más hidrófobas que sus clases de fármacos citotóxicos predecesoras y son más propensas a la agregación cuando se conjugan con anticuerpos.

25 Se han centrado esfuerzos significativos en la modulación de la hidrofobicidad del fármaco incorporando enlazadores hidrófilos (Zhao et al., J. Med. Chem., 2011, 54, 10, 3606-3623). Cuando la formación de agregados no se puede controlar, los desarrolladores se han basado en técnicas bien conocidas para la eliminación de agregados a partir de terapias basadas en proteínas. Estos incluyen un intervalo de diferentes separaciones cromatográficas que incluyen intercambio iónico, interacción hidrófoba, hidroxipatita y otros bien conocidos por los expertos en la técnica. La realización de tales técnicas de purificación cromatográfica tiene el resultado de lograr una calidad de producto adecuada, pero a expensas del rendimiento del proceso. Cuando se trabaja con anticuerpos y productos terapéuticos basados en anticuerpos en el contexto de la fabricación, la pérdida física de material a través de reacciones secundarias ambiguas e incidentales o interacciones fisicoquímicas no deseadas, tiene un impacto financiero enormemente significativo.

35 De acuerdo con lo anterior, los procesos de fase de solución convencionales para fabricar conjugado biomolécula-fármaco están plagados de dificultades y sería deseable proporcionar un procedimiento mejorado para fabricar conjugados de biomolécula-fármaco.

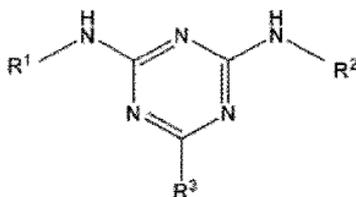
La presente invención aborda uno o más de los problemas anteriores con los métodos convencionales en fase de solución.

40 Breve resumen de la divulgación

Método de síntesis de un conjugado biomolécula-fármaco:

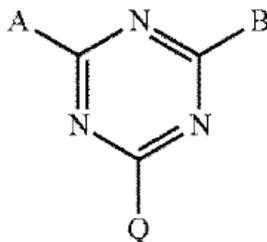
45 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para sintetizar un conjugado de biomolécula-fármaco, el método comprende:

(i) poner en contacto una biomolécula con resina F1P HF FAbsorbent, resina A1P MAbsorbent o resina A2P MAbsorbent o una resina de captura que comprende una fracción de captura para la biomolécula, en el que la fracción de captura es: un andamio de ligando ramificado de fórmula:



55 en el que R¹ y R² son iguales o diferentes y son cada uno de los ligandos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos, y R³ es un soporte sólido opcionalmente unido por un motivo separador; o

un andamio de triacilo ramificado de fórmula:



5 en el que Q representa el punto de unión a una matriz de soporte sólido, opcionalmente con un motivo separador y los Grupos A y B son grupos fenilo o naftilo sustituidos con uno o más sustituyentes capaces de formar puentes de hidrógeno, preferiblemente uno o más de -OH, -SH o -CO₂H; en condiciones adecuadas para inmovilizar la biomolécula y, por lo tanto, proporcionar una biomolécula inmovilizada; en donde la biomolécula es un anticuerpo, anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo;

10 (ii) opcionalmente poner en contacto la biomolécula inmovilizada con un agente de modificación química o un agente activador para proporcionar una biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente;

15 (iii) poner en contacto la biomolécula inmovilizada o la biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente con un componente de fármaco para formar un conjugado de biomolécula-fármaco inmovilizado;

(iv) liberar el conjugado biomolécula-fármaco de la resina de captura.

20 Una característica clave del método anterior de la invención es que la resina de captura empleada en el proceso puede inmovilizar la biomolécula de una manera consistente y reproducible. La inmovilización constante de la biomolécula a la resina de captura debería dar como resultado una variación reducida en el conjugado de biomolécula-fármaco resultante producido por el método anterior. Por ejemplo, la variación en el punto en el que el componente del fármaco está unido a la biomolécula inmovilizada se puede reducir, lo que conduce a un punto de unión más consistente entre el componente del fármaco y la biomolécula inmovilizada. Tal mejora en regio-especificidad sería deseable en términos de mejorar la consistencia del producto conjugado de biomolécula-fármaco resultante.

25 El empleo de una resina como se define en el primer aspecto como la fracción de captura de la biomolécula, en oposición al empleo de la Proteína A, Proteína G o Proteína L original como la fracción de captura de la biomolécula, puede conducir a una mejora relativa en la consistencia en la inmovilización de la biomolécula debido al aumento de la regioespecificidad de los imitadores contra los sistemas convencionales basados en Proteína A, Proteína G o Proteína L. En casos en los que la regioespecificidad de la inmovilización de biomoléculas a proteínas es baja, el empleo de la Proteína A, Proteína G o Proteína L como la fracción de captura de la biomolécula provocaría inherentemente una inmovilización variable de la biomolécula a la resina de captura. Por ejemplo, la proteína A, la proteína G o la proteína L original pueden presentar unión no específica a través de otros sitios en la proteína que pueden complicar la interacción global. Como se explicó anteriormente, la inmovilización consistente de la biomolécula a la resina de captura como se prevé en la presente invención puede dar como resultado una variación reducida en el conjugado de fármaco biomolecular resultante producido por el método anterior. Esto sería ventajoso. Otra ventaja de los sistemas de resinas de la presente invención reside en el hecho de que una gama más amplia de fármacos puede en principio conjugarse con la resina que en el caso de los sistemas convencionales basados en Proteína A, Proteína G o Proteína L. Por ejemplo, en el caso de moléculas hidrófobas, otras uniones no específicas que pueden ocurrir en los sistemas de Proteína A, Proteína G o Proteína L original pueden alterar o evitar la conjugación efectiva de dichos fármacos.

30 Otro beneficio de emplear una resina como se define en el primer aspecto en oposición al empleo de la proteína A, proteína G o proteína L original como fracción de captura de biomoléculas es que la compatibilidad con una amplia gama de químicas de conjugación de anticuerpos comunes y escala hasta niveles industriales. Esto está en contraste con las fracciones de captura de biomoléculas basadas en Proteína A, Proteína G o Proteína L.

35 Por ejemplo, a menudo es deseable dirigir el grupo funcional de la cadena lateral de lisilo sobre el anticuerpo inmovilizado. De los 28 conjugados de fármacos con anticuerpos actualmente en desarrollo clínico, casi la mitad (los grises sombreados en la tabla a continuación) emplean química de conjugación dirigida a lisina. La naturaleza proteínica de un ligando inmovilizante en la superficie de la Proteína A, G o L dará como resultado el direccionamiento involuntario de los grupos funcionales de la cadena lateral de lisilo en la resina de captura de proteína. La proteína A (swiss-prot P02976) tiene 59

residuos de lisina, la proteína G (swiss-prot P919909) tiene 59 residuos de lisina y la proteína L (swiss-prot Q51918) tiene 132 residuos de lisina.

Nombre	Objetivo	Fármaco+Ligador	Desarrollador	Fase	Indicación
ADCetris	CD30	vcE	Seattle Genetics	MA 2011	HL y ALCL
CR011-vcE	GPNMB	vcE	Celldex	Ph II	Mama, Melanoma
PSMA ADC	PSMA	vcE	Progenics	Ph II	Próstata
RG7593	CD22	vcE	GNE/Roche	Ph II	Hematológico
RG7596	CD79b	vcE	GNE/Roche	Ph II	Hematológico
SGN-75	CD70	mcMMAF	Seattle genetics	Ph 1b	NHL, RCC
AGS-5ME	SLC44A4	vcE	Agensys	Ph I	Próstata, Pancreático
AGS-22ME	Nectin 4	vcE	Agensys	Ph I	Tumores Sólidos
AGS-16M8F	ENPP3	mcMMAF	Agnsys	Ph I	Carcinoma de Célula renal
BAY 79-4620	MN/CA-9	vcE	Bayer	Ph I	Tumores Sólidos
MLN064	GCC	vcE	Takeda/Millennium	Ph I	Gastrointestinal
RG7450	STEAP 1	vcE	GNE/Roche	Ph I	Próstata
RG7458	MUC16	vcE	GNE/Roche	Ph I	Ovario
RG7598	?	Auristatina	GNE/Roche	Ph I	Mieloma Múltiple
RG7599	?	Auristatina	GNE/Roche	Ph I	NSCLC, Ovario
RG7600	?	Auristatina	GNE/Roche	Ph I	Pancreático, Ovario
RG7636	?	Auristatina	GNE/Roche	Ph I	Melanoma
Kadcyla	Her2	SMCC DM1	GNE/Roche	MA 2013	Cáncer de mama
Lorvotuzumab	CD56	SPP-DM1	Immunogen	Ph II	MM, Célula de Merkel
SAR3419	CD19	SPDB-DM4	Sanofi Aventis	Ph II	NHL, B-ALL
SAR566658	CA6	SPDB-DM4	Sanofi Aventis	Ph I	Mama, Ovario
BT-062	CD138	SPDB-DM4	Biotest	Ph I	Mieloma Múltiple
IMGN-529	CD37	SPDB-DM4	Immunogen	Ph I	NHL
IMG-853	FoIR1	SPDB-DM4	Immunogen	Ph I	Ovario NSCLC
BAY-94-9343	Mesotelina	SPDB-DM4	Bayer	Ph I	Meso tumores
AMG-595	EGFRvIII	DM1	Amgen	Ph I	Glioma Recurrente
AMG-172	?	DM1	Amgen	Ph I	Cáncer Renal
CMC-544	CD22	Caliqueamicina	Pfizer	Ph III	Células B ALL

5 Además de la competición entre los residuos de lisilo de ligando y anticuerpo como se describió anteriormente, también existen otros problemas con las resinas de captura basadas en Proteína A, G y L. Estos incluyen la lixiviación de la proteína y la inmunogenicidad de los aductos lixiviados. Esto significa que estos soportes de afinidad no pueden emplearse (para purificación o conjugación) hacia el final de un proceso de fabricación. Cualquier material conjugado suministrado a partir de un proceso de este tipo que emplee resinas de captura basadas en Proteína A, G y L no cumplirá con las directrices reguladoras actuales para la purificación de anticuerpos y la calidad del producto.

Método para sintetizar una biomolécula inmovilizada, activada y modificada químicamente.

15 De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un método para sintetizar una biomolécula inmovilizada químicamente modificada o activada, el método comprende:

20 (i) poner en contacto una biomolécula con una resina de captura en condiciones adecuadas para inmovilizar la biomolécula y, por lo tanto, proporcionar una biomolécula inmovilizada; en donde la biomolécula es un anticuerpo, anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo; y en el que la resina de captura comprende una fracción de captura de biomoléculas seleccionado del grupo que consiste en: (1) una base no peptídica, que incluye aminoácidos, Proteína A, Proteína G o proteína L miméticas, (2) un péptido basado en Proteína A, proteína G o proteína L miméticas, (3) una fracción de captura del sitio de unión a nucleótidos y (4) una fracción de captura de glicoproteína; y

25 (ii) poner en contacto la biomolécula inmovilizada con un agente de modificación química o un agente activador para proporcionar una biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente.

30 La conjugación de proteínas y más específicamente anticuerpos se usa a menudo en investigación, diagnóstico y terapéutica. Bioconjugate Techniques, segunda edición (Greg T Hermanson) proporciona información muy detallada sobre la química, los sistemas de reactivos y las aplicaciones prácticas para crear moléculas etiquetadas o conjugadas. También describe docenas de reacciones con detalles sobre cientos de reactivos disponibles comercialmente y el uso de estos reactivos para modificar o reticular péptidos y proteínas, azúcares y polisacáridos, ácidos nucleicos y oligonucleótidos,

lípidos y polímeros sintéticos. A continuación, se proporciona un breve resumen de las químicas de conjugación clave aplicadas a los anticuerpos.

5 La conjugación con tioles libres después de la reducción de los disulfuros intercatenarios naturales es un enfoque común para la conjugación de anticuerpos y la química empleada para ADC comercial ADCetris®. Un proceso comprende poner en contacto el anticuerpo con un reductor tal como TCEP, DTT, merceptoetilamina u otro reductor adecuado bien conocido en el campo, seguido de conjugación con un fármaco, ligando, etiqueta de la fórmula D-X, donde D es el fármaco, ligando o etiqueta y X es un grupo reactivo seleccionado entre maleimidias, haloalcanos, disulfuros de piridilo y otras químicas reactivas con tiol conocidas en la técnica.

10 Un enfoque alternativo a la conjugación de tiol con anticuerpos es diseñar residuos de cisteína reactivos en sitios específicos en anticuerpos para permitir que los fármacos se conjuguen con estequiometría definida sin interrupción de los enlaces disulfuro intercatenarios. Las cisteínas diseñadas a menudo están presentes como disulfuros mixtos de cisteína o glutatión. Los aductos se eliminan mediante reducción completa seguida de diafiltración. Esto rompe los disulfuros intercatenarios que deben ser reformados por oxidación con aire, CuSO₄ o ácido dehidroascórbico.

15 Otro sitio común para la conjugación son los grupos amino presentes en la cadena lateral de residuos de lisina. El enfoque más simple comprende poner en contacto el anticuerpo con un fármaco, ligando, marcador o enlazador de la fórmula D-Y. D tiene la misma definición que anteriormente e Y es un grupo reactivo seleccionado de isocianatos, ésteres de NHS, cloruros de sulfonilo, epóxidos y otros reactivos conocidos por los expertos en la técnica.

20 La conjugación indirecta a lisinas a menudo también se emplea. El grupo amino de la cadena lateral de lisina se activa primero con un enlazador heterobifuncional antes de que este se conjuge con un fármaco que contiene una química reactiva complementaria. Los ejemplos de dichos pareados incluyen la modificación de la lisina con 2-iminotiolano para crear un nuevo tiol seguido de conjugación con cualquiera de los enlazadores de fármaco reactivos con tiol (D-X) descritos anteriormente. Otro pareado es la modificación de lisina con SMCC para crear una maleimida unida a lisina seguida de conjugación con un fármaco que contiene un tiol libre. Para una revisión completa de pareados potenciales útiles para la conjugación indirecta de lisina, ver Hermanson y el catálogo de agentes de entrecruzamiento de Perbio.

25 Varios grupos han desarrollado formas de incorporar aminoácidos no naturales con cadenas laterales que son químicamente ortogonales a las 20 cadenas laterales de aminoácidos proteogénicos en las proteínas.

30 Redwood Bioscience (www.redwoodbioscience.com) ha desarrollado una tecnología que denominan etiquetado de aldehídos. En esto explotan una enzima natural llamada enzima formilglucina (FGE) que normalmente convierte un residuo Cys dentro de una secuencia de 13 aminoácidos altamente conservada en una formilglucina (aldehído) en las sulfatasas Tipo I (Wu et al, PNAS, 2009, 106, 9, 3001). Los fármacos, ligandos o marcadores que se van a conjugar con dichos anticuerpos modificados deben contener químicas reactivas a aldehídos tales como oxiaminas o hidrazinas. Se puede encontrar una descripción completa de las funcionalidades reactivas de aldehído en los catálogos de Hermanson y Perbio.

35 Ambryx ha desarrollado una tecnología que ellos llaman EuCode (Liu et al, Anu. Rdo. Biochem., 2010, 79, 413). EuCode es una plataforma mediante la cual las células se diseñan para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas heterólogas mediante la inclusión de tres componentes no naturales en el sistema de expresión:

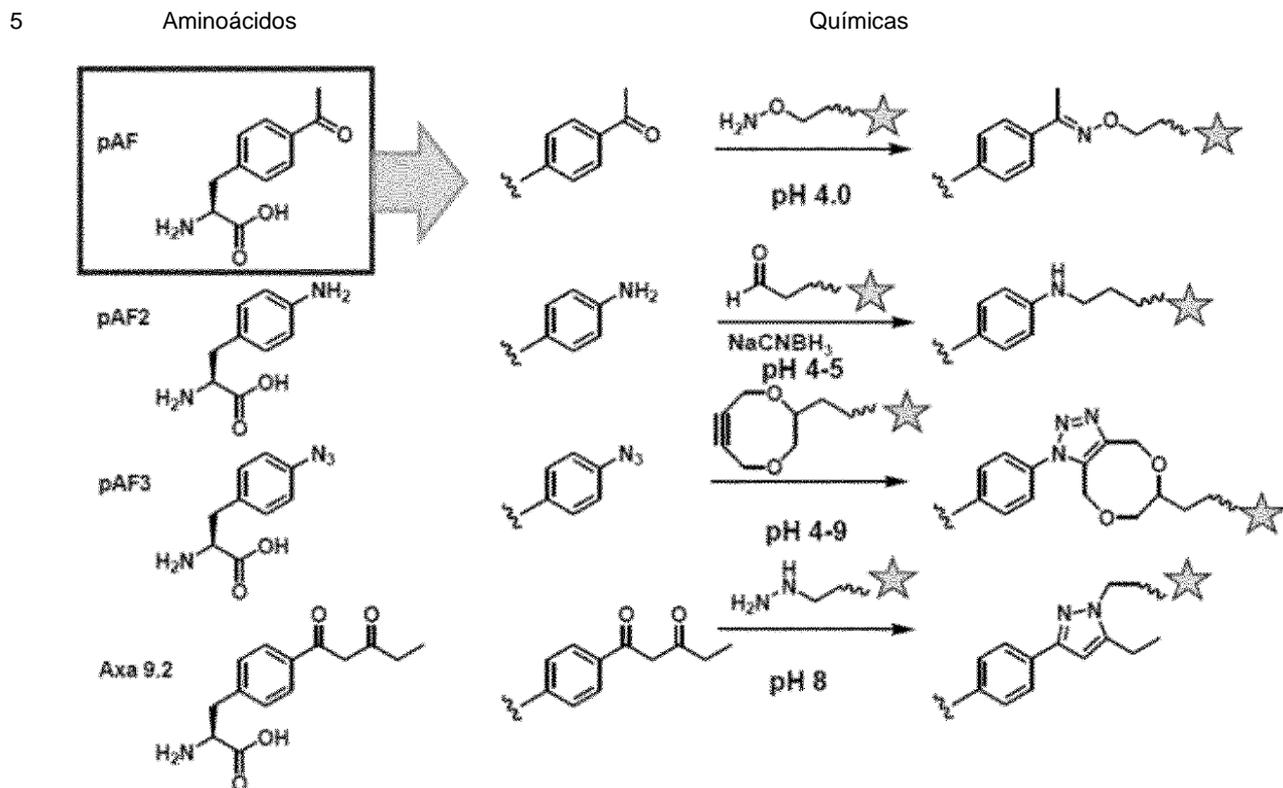
- 40 1. Un aminoácido no natural complementado en el medio
- 45 2. Unas sintetasas aminoacil-tARN ortogonales (aaRS)
3. Un tARN ortogonal

50 El par ortogonal de aaRS/tARN se ha diseñado/seleccionado para promover la lectura en el codón de parada ámbar y para incorporar el aminoácido no natural en esa posición. Hasta 70 nnAAs se han incorporado a la proteína utilizando este enfoque. La figura a continuación se amplía con la posible combinación de la cadena lateral de aminoácidos ortogonales y la química reactiva (adaptada de la presentación de Ambryx en la reunión cumbre de Hanson Wade ADC en febrero de 2012).

55 Sutro ha descrito la producción de anticuerpos y citocinas utilizando una tecnología de síntesis libre de células (OCFS). Una característica de OCFS es la capacidad de incorporar aminoácidos no naturales en la proteína con tARN cargados que pueden dirigirse a un codón específico para administrar el aminoácido no natural a una ubicación específica de la proteína, lo que hace que la proteína sea susceptible de respuesta específica. modificación o impartición de una nueva propiedad deseada (Goerke et al, Biotechnol. Bioeng., 2008, 99: 351-367).

60

La conjugación de anticuerpos inmovilizados es compatible con todas las cadenas laterales de aminoácidos no naturales y las químicas reactivas complementarias con una condición. El ligando de captura de anticuerpo no debe contener la nueva química incorporada como parte de la cadena lateral de aminoácido no natural.



10 La oxidación de residuos de polisacáridos en glicoproteínas con peryodato de sodio proporciona una forma suave y eficiente de generar grupos aldehídos reactivos para su posterior conjugación con moléculas que contienen amina o hidrazida; fármacos, ligandos o etiquetas. El proceso implica primero poner en contacto el anticuerpo con peryodato de sodio y luego conjugarse con grupos reactivos seleccionados entre aminas, hidrazidas, aminos u otras químicas reactivas con aldehído conocidas en la técnica.

15 Etapa (i):

En una realización, la etapa de poner en contacto la biomolécula con la resina de captura comprende incubar la biomolécula con la resina de captura.

20 La incubación puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 100°C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 5 a aproximadamente 50°C y opcionalmente a una temperatura de aproximadamente 10 a aproximadamente 40°C. Idealmente, la incubación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 15 a aproximadamente 37°C, por ejemplo, la incubación se lleva a cabo a temperatura ambiente, tal como a aproximadamente 21°C. Alternativamente, la incubación se lleva a cabo a aproximadamente 37°C.

25 La incubación puede llevarse a cabo durante un período de tiempo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 3 días, por ejemplo, durante un período de tiempo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 18 horas. Preferiblemente, la incubación se lleva a cabo durante un período de tiempo de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 1 hora.

30 En una realización, la incubación se lleva a cabo en un medio acuoso. En una realización alternativa, la incubación se lleva a cabo en una solución tampón tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o cualquier sal tampón compatible con el pH y química de unión deseados, opcionalmente la incubación se lleva a cabo en una solución tampón tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) En una realización, la incubación se lleva a cabo utilizando un codisolvente

que incluye un disolvente tal como DMSO o DMF. El codisolvente puede estar presente dentro de un rango de 0.5-80% v/v, tal como 0.5-50% v/v.

5 En una realización, la incubación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, más preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. En una realización preferida, la incubación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 7.5, idealmente a un pH de aproximadamente 6.5. En otra realización preferida, la incubación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, idealmente a un pH de aproximadamente 7.4. Esto da como resultado una unión mejorada del anticuerpo al soporte derivado.

10 En una realización, la biomolécula inmovilizada (es decir, la biomolécula que se inmoviliza en la resina de captura) se lava para eliminar cualquier biomolécula que no se haya inmovilizado en la resina de captura. El lavado de la biomolécula inmovilizada puede verse afectado por el enjuague con disolvente fresco. Por ejemplo, el lavado de la biomolécula inmovilizada puede verse afectado por el enjuague con una solución tampón tal como PBS. Opcionalmente, el enjuague de la biomolécula inmovilizada se lleva a cabo en presencia de un agente quelante, tal como EDTA. Alternativamente, el lavado de la biomolécula inmovilizada puede verse afectado por un enjuague con un "tampón de modificación" que incluye un tampón de fosfato de sodio, NaCl y un agente quelante, tal como EDTA.

Etapa (ii):

20 En una realización, la etapa de poner en contacto la biomolécula inmovilizada con un agente de modificación química o un agente activador para proporcionar una biomolécula inmovilizada modificada o activada implica reducir la biomolécula. En una realización, la reducción de la biomolécula implica una reducción completa. En una realización, la reducción de la biomolécula implica una reducción parcial. En una realización, la reducción de la biomolécula implica una reducción completa seguida de una reoxidación.

25 En una realización, la biomolécula se reduce al ponerla en contacto con un agente reductor tal como tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditioneitol (DTT), merceptoetilamina u otro reductor adecuado. Preferiblemente, el agente reductor es tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP).

30 En una realización, la biomolécula reducida se reoxida poniéndola en contacto con un agente oxidante tal como aire, CuSO_4 o ácido dehidroascórbico (DHAA). Preferiblemente, el agente oxidante es ácido deshidroascórbico (DHAA).

35 En una realización, el proceso de reducción de la biomolécula se lleva a cabo en una solución tampón tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una realización, el proceso de reducción de la biomolécula se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente 7.4.

40 En una realización, el proceso de reducción de la biomolécula se lleva a cabo en presencia de un agente quelante, tal como EDTA.

45 En una realización, el proceso de reducción de la biomolécula implica incubar la biomolécula con el agente reductor durante un período de tiempo de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 3 días, opcionalmente, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 días y además opcionalmente de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 18 horas.

50 En una realización, la etapa de poner en contacto la biomolécula inmovilizada con un agente de modificación química o un agente activador para proporcionar una biomolécula inmovilizada modificada o activada implica hacer reaccionar la biomolécula con una fracción de entrecruzador. Por ejemplo, la fracción de entrecruzamiento podría ser un entrecruzador de amina a sulfhidrilo, por ejemplo, un entrecruzador que tiene un éster de NHS y un grupo reactivo de maleimida en los extremos opuestos. Este procedimiento de modificación o activación de la biomolécula da como resultado un conjugado biomolécula-enlazador-fármaco. Los entrecruzadores adecuados generalmente son capaces de reaccionar con un grupo amino primario en el fármaco (a través del extremo del éster NHS reactivo) y también reaccionan con un residuo de cisteína en la biomolécula (a través del extremo reactivo de maleimida). En este ejemplo particular, el extremo de maleimida reaccionará con una cisteína en la biomolécula inmovilizada. Un ejemplo de tal entrecruzador es succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC).

60 En una realización, el proceso de reacción con un entrecruzador se lleva a cabo en una solución tampón tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS). Alternativamente, el proceso de reacción con un entrecruzador se lleva a cabo en un "tampón de modificación" que incluye un tampón de fosfato de sodio, NaCl y un agente quelante, tal como EDTA.

En una realización, el proceso de reacción con un entrecruzador se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente 8.0.

5 En una realización, el proceso de reacción con un entrecruzador se lleva a cabo en presencia de un agente quelante, tal como EDTA.

10 En una realización, el proceso de reacción con un entrecruzador implica incubar la biomolécula con el entrecruzador durante un período de tiempo de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 3 días, opcionalmente, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 días y adicionalmente de aproximadamente 6 horas. a alrededor de 18 horas.

En una realización, la etapa de poner en contacto la biomolécula inmovilizada con un agente de modificación química o un agente activador para proporcionar una biomolécula inmovilizada modificada o activada implica hacer reaccionar la biomolécula con el reactivo de Traut.

15 En una realización, el proceso de reacción con el reactivo de Traut se lleva a cabo en una solución tampón tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una realización, el proceso de reacción con el reactivo de Traut se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente 8.0.

20 En una realización, el proceso de reacción con el reactivo de Traut se lleva a cabo en presencia de un agente quelante, tal como EDTA.

25 En una realización, el proceso de reacción con el reactivo de Traut implica incubar la biomolécula con el agente reductor durante un período de tiempo de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 3 días, opcionalmente, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 días y además opcionalmente de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 18 horas.

En una realización, la biomolécula inmovilizada, activada, se lava para eliminar cualquier agente de modificación/activación.

30 En una realización, el lavado implica enjuagar con un tampón, opcionalmente en el que el tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS). Otros tampones adecuados incluyen: tampón de fosfato de potasio; Tampón de fosfato de sodio; Tampón de citrato de sodio; Tampón de propano Bis-Tris; Tampón HEPES; Tampón de acetato de sodio; Tampón de citrato de sodio; Tampón de ácido cacodílico; Tampón de acetato de amonio; Tampón de imidazol; Tampón Bicine; y tampón de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES). Por ejemplo, la biomolécula inmovilizada puede lavarse con una solución tampón tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente 7.4. Opcionalmente, el enjuague de la biomolécula inmovilizada activada se lleva a cabo en presencia de un agente quelante, tal como EDTA. Otro ejemplo de enjuague de la biomolécula inmovilizada activada implica enjuagar la resina con un tampón tal como PBS seguido de un "tampón de conjugación" que incluye citrato de sodio, NaCl y un agente quelante tal como EDTA.

40 Etapa (iii):

En una realización, la etapa de poner en contacto la biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente con un componente de fármaco para formar un conjugado de biomolécula-fármaco inmovilizado implica poner en contacto la biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente con un componente de fármaco en una solución tampón como se describió anteriormente con relación a la etapa (ii).

50 En una realización, la etapa de poner en contacto la biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente con un componente de fármaco para formar un conjugado de biomolécula-fármaco inmovilizado implica poner en contacto la biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente con un componente de fármaco a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente 7 a aproximadamente 8 y más preferiblemente aproximadamente 7.4.

55 En una realización, la etapa de poner en contacto la biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente con un componente de fármaco para formar un conjugado de biomolécula-fármaco inmovilizado se lleva a cabo en presencia de un agente quelante, tal como EDTA.

60 En una realización, la etapa de poner en contacto la biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente con un componente de fármaco para formar un conjugado de biomolécula-fármaco inmovilizado implica incubar la biomolécula inmovilizada, activada o modificada químicamente, con el componente de fármaco durante un período de aproximadamente

20 minutos a aproximadamente 3 días, opcionalmente, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 días y opcionalmente de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 18 horas.

5 En una realización, el conjugado de biomolécula - fármaco inmovilizado se lava antes de la etapa de liberación del conjugado de biomolécula - fármaco de la resina de captura. El lavado elimina cualquier componente de fármaco que no haya reaccionado. En una realización, el lavado implica enjuagar con un tampón, opcionalmente en el que el tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS) y otro disolvente. Otros tampones adecuados incluyen: tampón de fosfato de potasio; Tampón de fosfato de sodio; Tampón de citrato de sodio; Tampón de propano Bis-Tris; Tampón HEPES; Tampón de acetato de sodio; Tampón de citrato de sodio; Tampón de ácido cacodílico; Tampón de acetato de amonio; Tampón de imidazol; Tampón Bicine; y tampón de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES). Por ejemplo, el conjugado de biomolécula-fármaco inmovilizado puede lavarse con una solución tampón tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) y dimetilacetamida (DMA) a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7. Opcionalmente, el enjuague del conjugado de biomolécula-fármaco inmovilizado se lleva a cabo en presencia de un agente quelante, tal como EDTA.

15 Etapa (iv):

En una realización, la etapa de liberar el conjugado biomolécula-fármaco de la resina de captura implica:

- 20 a) exponer el compuesto de soporte-biomolécula a un agente de liberación; y/o
b) alterar el pH para romper el enlace soporte-biomolécula.

25 En una realización, el agente de liberación es un disruptor de enlace de hidrógeno tal como codisolventes de hexafluoroisopropanol, 2,2,2-trifluoroetanol o dimetilsulfóxido (DMSO).

En una realización, el agente de liberación se incuba con la biomolécula de soporte.

30 La incubación puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 100°C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 5 a aproximadamente 50°C y opcionalmente a una temperatura de aproximadamente 10 a aproximadamente 40°C. Idealmente, la incubación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 15 a aproximadamente 37°C, por ejemplo, la incubación se lleva a cabo a temperatura ambiente, tal como a aproximadamente 21°C. Alternativamente, la incubación se lleva a cabo a aproximadamente 37°C.

35 La incubación puede llevarse a cabo durante un período de tiempo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 3 días. Preferiblemente, la incubación se lleva a cabo durante un período de tiempo de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas.

40 La incubación puede llevarse a cabo en un medio acuoso. Alternativamente, la incubación puede llevarse a cabo en un disolvente tal como DMF, DMSO, MeOH o MeCN. Alternativamente, la incubación se puede llevar a cabo en una mezcla de disolvente acuoso con hasta 80% de disolvente, preferiblemente de 0.5 a 50% y más preferiblemente de 0.5% a 10% v/v. En ciertos casos, las mezclas de uno o más de los solventes anteriores, incluido el agua, pueden ser apropiadas. Cuando sea necesario, también se puede incluir un estabilizador para garantizar que el conjugado permanezca intacto.

45 En una realización, la etapa de liberar el conjugado biomolécula-fármaco de la resina de captura implica alterar el pH. El pH puede alterarse en cualquier cantidad que sea suficiente para romper el enlace soporte-biomolécula, pero que no afectará la actividad, integridad o estructura tridimensional de la biomolécula.

50 Por ejemplo, el pH puede ajustarse para que sea ácido. En una realización, el pH disminuye de aproximadamente pH 2 a aproximadamente pH 6. Opcionalmente, el pH se ajusta para que sea inferior a aproximadamente pH 5, por ejemplo, aproximadamente pH 3 a aproximadamente 5, por ejemplo, menos de aproximadamente pH 4. En una realización, el pH se reduce a aproximadamente pH 3.

55 Alternativamente, el pH puede ajustarse para que sea básico. En una realización, el pH se aumenta a aproximadamente pH 8 a aproximadamente pH 10. Opcionalmente, el pH se ajusta a más de pH 8. Por ejemplo, el pH puede aumentarse a aproximadamente pH 9. El pH puede aumentar hasta ser mayor que pH 9. Por ejemplo, el pH puede aumentarse hasta aproximadamente pH 10. El pH puede aumentar hasta ser mayor que pH 10, pero generalmente será menor que pH 14.

60 El conjugado de biomolécula-fármaco puede someterse a uno o más tratamientos con agente de liberación. Ventajosamente, el uso de un segundo tratamiento o posterior con agente de liberación reciente puede dar como resultado el aumento de la cantidad de conjugado biomolécula-fármaco liberado de la resina de captura. El agente de liberación

reciente es un agente de liberación que no se ha incubado previamente con el conjugado de biomolécula-fármaco inmovilizado.

5 En una realización, la etapa de liberar el conjugado biomolécula-fármaco de la resina de captura implica poner en contacto el conjugado biomolécula-fármaco con una sal. Por ejemplo, el conjugado biomolécula-fármaco podría ponerse en contacto con NaCl. La concentración de sal puede variar de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 M, preferiblemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1 M.

10 En una realización, los conjugados de biomolécula-fármaco eluidos se neutralizan después de la etapa de liberar el conjugado de la resina de captura. Por ejemplo, el conjugado se puede capturar en 2% v/v de 1M Tris(hidroximetil)aminoetano (TRIS).

Etapas de lavado:

15 En una realización, la etapa de lavar un intermedio en el procedimiento de la invención comprende eliminar sustancias que no están unidas a la resina de captura tales como contaminantes. Los contaminantes típicos incluyen el exceso de reactivo utilizado para activar la biomolécula inmovilizada, la biomolécula que no se ha inmovilizado en la resina de captura y el componente del fármaco que no ha reaccionado con la biomolécula inmovilizada activada. Cualquier medio que no afecte a la actividad, integridad o estructura tridimensional de la biomolécula o la integridad de la unión entre la biomolécula inmovilizada y la resina de captura se puede utilizar para lavar el intermediario.

20 Preferiblemente, el tampón es isotónico e induce un entorno estable a biomoléculas tales como anticuerpos imitando el pH fisiológico y la fuerza iónica. En una realización, la biomolécula inmovilizada, activada, se lava por filtración. Opcionalmente, el filtrado resultante se intercambia con tampón, por ejemplo, por centrifugación utilizando cartuchos de membrana.

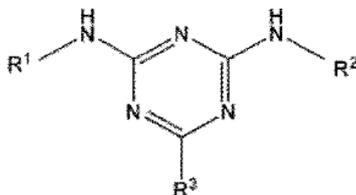
25 Normalmente, los aditivos se introducen en los medios de almacenamiento intermedio. Estos aditivos inducen un nivel de control del sistema tampón y la biomolécula contenida en él. Por ejemplo, se introducen aditivos tales como Tris o histidina en una corriente de proceso tamponada para mantener el pH y minimizar la acidificación incidental. Típicamente, el pH de una corriente de proceso de biomoléculas debe mantenerse entre pH 5 y 9.5, con los extremos de los límites de pH evitados durante periodos prolongados. Se pueden agregar sales inorgánicas tales como NaCl 0.1 M (ac) para mantener la fuerza iónica de la corriente de proceso. Se pueden añadir detergentes iónicos y no iónicos tales como Tween (polisorbato) al tampón para aumentar favorablemente la solubilidad de biomoléculas poco solubles en el medio tampón y minimizar la agregación.

35 Una mezcla que comprende una resina de captura y un agente activador:

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una mezcla que comprende:

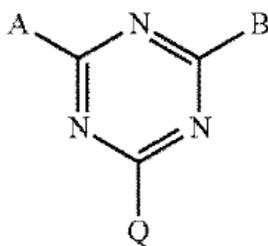
40 (i) una resina de captura sobre la que se inmoviliza un anticuerpo, anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo en el que la resina de captura es la resina F1P HF FAbsorbent, resina A1P MAbsorbent o resina A2P MAbsorbent o una resina de captura que comprende una fracción de captura para la biomolécula, en el que la fracción de captura es:

Un andamio de ligando ramificado de la fórmula:



45 en el que R¹ y R² son iguales o diferentes y son cada uno los ligandos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos, y R³ es un soporte sólido opcionalmente unido por un motivo separador; o

50 un andamio de triacilo ramificado de fórmula:



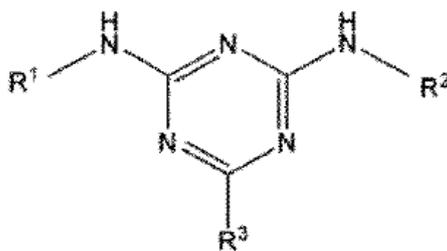
5 en el que Q representa el punto de unión a una matriz de soporte sólido, opcionalmente con un motivo separador y los Grupos A y B son grupos fenilo o naftilo sustituidos con uno o más sustituyentes capaces de formar puentes de hidrógeno, preferiblemente uno o más de -OH, -SH o -CO₂H; y

(ii) un agente de reducción o una fracción de entrecruzamiento.

10 Un uso de una resina de captura en la síntesis de un conjugado biomolécula-fármaco:

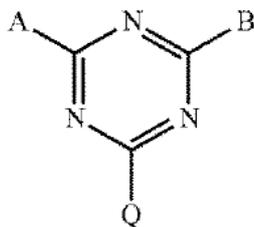
De acuerdo con la presente invención, se proporciona un uso de una resina de captura en la que la resina de captura es resina F1P HF FAbsorbent, resina A1P MAbsorbent o resina MAbsorbent A2P o una resina de captura que comprende una fracción de captura para la biomolécula, en el que la fracción de captura es:

15 un andamio de ligando ramificado de fórmula:



20 en el que R¹ y R² son iguales o diferentes y son cada uno de los ligandos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos, y R³ es un soporte sólido opcionalmente unido por un motivo separador; o

un andamio de triacilo ramificado de fórmula:



25 En el que Q representa el punto de unión a una matriz de soporte sólido, opcionalmente con un motivo separador y los Grupos A y B son grupos fenilo o naftilo sustituidos con uno o más sustituyentes capaces de formar puentes de hidrógeno, preferiblemente uno o más de -OH, -SH o -CO₂H en la síntesis de un conjugado de biomolécula-fármaco, en el que la biomolécula es un anticuerpo, un anticuerpo modificado o un fragmento de anticuerpo.

30 Resina de captura:

35 Durante años, los investigadores han tratado de desarrollar ligandos que tengan afinidad por una gama de anticuerpos de longitud completa, fragmentos o fusiones como reemplazos de los soportes tradicionales de purificación de afinidad de proteína A, G o L. El principal criterio para el éxito del ligando descubrimiento/ desarrollo ha sido:

1. Alta selectividad para anticuerpos para permitir una alta purificación inicial
2. Capacidad de enlace dinámico útil
- 5 3. Condiciones de elución compatibles con la retención de la integridad del anticuerpo
4. Estabilidad del soporte durante múltiples ciclos de elución/limpieza
- 10 5. Coste reducido con respecto a los soportes de Proteína A, G o L

En el contexto del uso de estos ligandos para la conjugación de anticuerpos en fase sólida, el criterio 1 anterior no es crítico ya que el proceso de conjugación comienza con el anticuerpo purificado. Sin embargo, el ligando debe cumplir con los 4 criterios restantes en su totalidad. Además, el ligando debe tener idealmente un sitio definido de interacción con el anticuerpo que proporcione una fuerza de unión de afinidad adecuada para la conjugación. Este atributo es necesario para que el anticuerpo se pueda unir al soporte y no eluir inadvertidamente durante el reabastecimiento del tampón a lo largo del tiempo. Además, es deseable un sitio definido de interacción para inferir una presentación conformacional consistente del complejo de anticuerpo unido a la fase de solución circundante con el efecto de proporcionar un medio para la química de conjugación consistente y reproducible. Los anticuerpos son biomoléculas bien caracterizadas con varios dominios de unión bien definidos que se explotan para la purificación por afinidad.

20 Las primeras regiones definidas son las bolsas de unión a Proteína A y Proteína G que se explotan en cromatografía de afinidad utilizando Proteína A/G y miméticos de soportes de Proteína A/G. La proteína A interactúa con el dominio intercatenario CH2 CH3 en la región Fc mediante el número de interacciones no covalentes con residuos de aminoácidos: Thr 250, Leu 251, Met 252, Ile 253, His 310, Gln 311, Leu 314, Asn 315, Lys 338, Glu 345, Ala 431, Leu 432, His 433, Asn 25 434 y His 435. Los soportes miméticos de proteína A se han diseñado racionalmente para interactuar con este dominio a través de uno o más de los aminoácidos definidos anteriormente. Estos soportes miméticos proporcionan ligandos de afinidad adecuados para la unión y conjugación de IgG. Los soportes miméticos de proteína A se pueden definir en subclases como ligandos que no contienen péptidos, péptidos o aminoácidos. De forma similar, la proteína G interactúa con el dominio intercatenario CH2 CH3 en la región Fc mediante el número de interacciones no covalentes con residuos de aminoácidos Ile 253, Ser 254, Gln 311, Glu 380, Glu 382, His 433, Asn 434 y His 435. Los soportes miméticos de proteína G se han diseñado racionalmente para interactuar con este dominio a través de uno o más de los aminoácidos descritos anteriormente. Una vez más, estos soportes miméticos proporcionan ligandos de afinidad adecuados para la unión y conjugación de IgG. Los soportes miméticos de proteína G pueden definirse en subclases como ligandos no peptídicos, peptídicos o basados en aminoácidos. En una realización, la resina de captura puede unirse a una proteína A o una bolsa 35 de unión a proteína G en una biomolécula.

Una segunda región definida es la cadena ligera del anticuerpo como objetivo por una matriz de afinidad de Proteína L. La proteína L se une específicamente a las cadenas ligeras Kappa I, II y IV, pero no a las cadenas ligeras Kappa III ni Gamma. La interacción entre la proteína L con anticuerpos se ha mapeado y se observó que los enlaces de hidrógeno y los puentes de sal son importantes en la unión. Un total de 11 residuos de aminoácidos hidrófilos, a saber; Ala, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, 40 Leu, Lys, Phe, Thr, Tyr - del dominio de Proteína L son importantes para formar estos enlaces. Los soportes de afinidad miméticos de proteína L se han desarrollado creando colecciones combinatorias de andamio de triazina utilizando compuestos químicos estructuralmente similares a los 11 aminoácidos descritos anteriormente (documento WO 2004/035199A). Divulgado dentro del documento WO2004/035199A, un mimético de Proteína L se define como un ligando que tiene un 50% de la afinidad de la Proteína L por un anticuerpo o fragmento y especificidad por la cadena ligera como se evidencia mediante la unión de fragmentos Fab. Cualquier andamio adecuado divulgado en la presente memoria o conocido por los expertos en la técnica puede sustituir al andamio de triazina siempre que se retengan las características de afinidad y especificidad para la cadena ligera. Tales resinas son útiles para la inmovilización de anticuerpos y fragmentos que 45 contienen cadenas ligeras Kappa I, II y IV. Una realización comercial de miméticos de Proteína L es F1P HF Fabsorbent™ (ProMetic Biosciences). Este soporte de afinidad cumple el criterio para un mimético de Proteína L pero también se une a la cadena ligera gamma que contiene anticuerpos y fragmentos. Por lo tanto, este soporte de afinidad es universalmente aplicable a la unión y conjugación de afinidad de anticuerpos. En una realización, la resina de captura puede unirse a una cadena ligera de anticuerpo como objetivo por una matriz de afinidad de Proteína L.

55 Una tercera región definida es el dominio de nucleótidos conservado en el brazo Fab de todos los isotipos de anticuerpos en una amplia gama de especies. El sitio de unión comprende 4 residuos de aminoácidos, el primero de los cuales es un Tyr o Phe y los tres restantes Tyr, Tyr y Trp. Mientras que la ubicación de la bolsa de unión y la orientación de la cadena lateral de aminoácidos se conservan en la superposición de la estructura cristalina, existen ligeras diferencias en la variación global de la secuencia principal de anticuerpo a anticuerpo y en los esquemas de numeración. Esto se demuestra a continuación comparando los sitios de unión de nucleótidos conservados para los anticuerpos comerciales Herceptina y Rituximab. Los miméticos de nucleótidos (no peptídicos, peptídicos, análogos de nucleótidos y aminoácidos) que se han diseñado 60

racionalmente para interactuar con este dominio mediante uno o más de los aminoácidos descritos anteriormente son ligandos de afinidad adecuados para la unión y conjugación de IgG.

Anticuerpo	Aminoácido 1	Aminoácido 2	Aminoácido 3	Aminoácido 4
Herceptina	Cadena Ligera Tyr 36	Cadena Ligera Tyr 87	Cadena Pesada Tyr 95	Cadena Pesada Trp 110
Rituximab	Cadena Ligera Phe 35	Cadena Ligera Tyr 86	Cadena Pesada Tyr 95	Cadena Pesada Trp 111

5 En una realización, la resina de captura puede unirse a un dominio de nucleótidos conservado en el brazo Fab de un anticuerpo.

Una cuarta región definida son las estructuras de glucano presentes en Asn 297 en el dominio CH2 de la región Fc de anticuerpos intactos. El ácido m-aminofenilborónico que actúa como un ligando de afinidad se une a grupos cis diol en residuos de azúcar tales como manosa, galactosa o glucosa de manera que están presentes con la fracción sacárido de las moléculas de glicoproteína. De esta interacción se proporciona un complejo anular reversible de cinco miembros. A continuación, se muestra una estructura de glucano de anticuerpo típica para resaltar la presencia de manosa y galactosa en anticuerpos glucanos (Adaptado de Arnold et al., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2005, 564, 27-43). En una realización, la resina de captura puede unirse a una estructura de glucano presente en Asn 297 en el dominio CH2 de la región Fc de anticuerpos intactos.

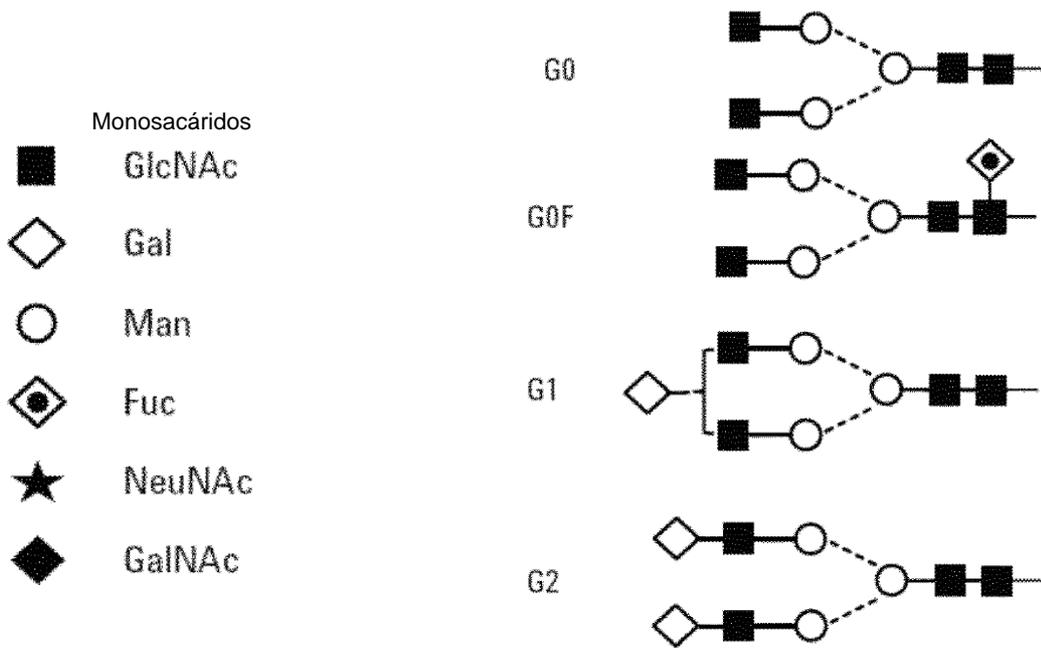


Figura 2 a b

20 Estructura de glucano e isoformas. a) nomenclatura general para glucanos. b) estructura de glucano predominantes de IgG. G = Unidades de galactosa, F= unidades de Fucosa. Modificado después de Arnold et al⁴.

Los ligandos se pueden unir a una gama de matrices de soporte sólidas bien conocidas en el campo de la cromatografía de afinidad. Estos incluyen, por ejemplo, polímeros sintéticos tales como poliacrilamida, poli(alcohol vinílico) o poliestireno, especialmente polímeros sintéticos reticulados, soportes inorgánicos tales como soportes basados en sílice y en particular soportes de polisacáridos tales como almidón, celulosa y agarosa.

Los soportes de ligandos específicos adecuados para la unión de anticuerpos se describen a continuación:

Soportes de afinidad miméticos de Proteína A, G y L no peptídicos

30 La modelación molecular de la interacción Proteína A, G o L combinada con el rastreo de colecciones químicas sintéticas ha permitido el diseño semi-racional de miméticos de moléculas pequeñas de estas proteínas (Li et al., *Nature Biotechnology*,

1998, 16, 190-195). Los ejemplos de dichas resinas incluyen los soportes comerciales F1P HF FAbsorbent y A1P mAbsorbent (ProMetic Biosciences).

Los soportes F1P HF FAbsorbent y A1P Absorbent se forman en un andamio de triazina utilizando una reacción multicomponente Ugi (www.prometicbioscience.com).

El documento US20010045384 divulga un complejo de ligando mimético de Proteína A ensamblado sobre un andamio del tipo de imino diacetato (IDA). El andamio de IDA se deriva con ligandos de triacilo para proporcionar un complejo de ligando de triacilo multivalente.

El documento WO9808603 describe el aislamiento de inmunoglobulinas de sobrenadantes de cultivos celulares, sueros, plasma o calostro utilizando resinas de afinidad. Estas resinas de afinidad comprenden ligandos sintéticos mono o bicíclico-aromáticos o heteroaromáticos para facilitar la purificación de inmunoglobulinas.

Otro ligando prometedor como resina de afinidad de anticuerpos es la sulfametazina. Las micropartículas de dextrano acopladas con sulfametazina se unen específicamente a los anticuerpos (Yi et al, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2012, 42, 6, 598-610).

En la selección de los ligandos candidatos líder divulgados anteriormente, se excluyeron muchos ligandos basándose en la falta de especificidad del anticuerpo. En la presente se describe que la especificidad es menos importante que la eficacia de unión, la capacidad y la estabilidad para una resina de conjugación de anticuerpos en fase sólida y, como tales, no se descuentan.

Soportes de afinidad mimética de Proteína 'Peptídica' A, G o L

Se han descrito varios péptidos miméticos de Proteína A. Menegatti identificó un hexapéptido con la secuencia HWRGWV que se une a la región del anticuerpo Fc (Menegatti y col., *Journal of Separation Science*, 2012, 35, 22, 3139-3148). Fassina et al. Han identificado un péptido mimético de proteína A TG191318 a través de la síntesis y selección de colecciones de péptidos multiméricos sintéticos compuestos de moléculas sintéticas aleatorizadas con un núcleo de lisina de tetradendato (Fassina et al., *J. Mol. Recognit.*, 1996, 9, 564). El documento EP1997826 describe un péptido que comprende X₁- Arg-Thr-Tyr. Lund et al. describen dos ligandos peptídicos adecuados para la cromatografía de afinidad de anticuerpos (Lund et al, *J Chromatogr. A*, 2012, 1225, 158-167). DAAG y D₂AAG contienen L-arginina, L-glicina y un ácido aromático sintético 2,6-di-tert-butil-4-hidroxibencil acrilato (DBHBA)

Apoyos de afinidad mimética de Proteína A, G o L de aminoácidos

Además de los ligandos macromoleculares complejos descritos anteriormente, se han propuesto aminoácidos simples como miméticos de Proteína A que se unen a anticuerpos de la misma manera (Naik et al., *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 1756-1766). Un ejemplo de esto es AbSep, una resina de polimetacrilato que contiene triptófano con una alta afinidad por el sitio de unión de la Proteína A en la región Fc de los anticuerpos. Las resinas que contienen los aminoácidos Tirosina, Histidina y Fenilalanina también son adecuadas para la inmovilización y conjugación de anticuerpos (Bueno et al., *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, 1995; 667, 1, 57-67).

Soporte de afinidad del sitio de unión de nucleótidos

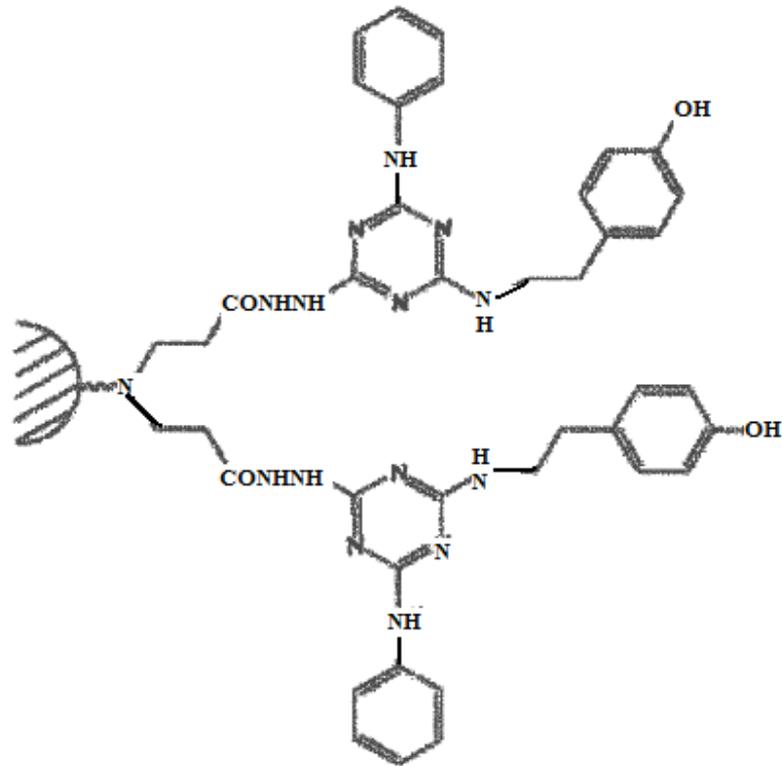
Otra estrategia para desarrollar ligandos de purificación de anticuerpos ha explotado el sitio de unión a nucleótidos (NBS) conservado menos conocido en las regiones variables de Fab de anticuerpos (Alves et al, *Anal. Chem.*, 2012, 84, 7721-7728). El análogo de nucleótido del ácido indolbutírico se ha acoplado a una resina ToyoPearl AF-650-amino M para preparar un soporte que cumple el criterio 1-5 anterior. En el documento WO/2012/099949 se describe un amplio intervalo de otros análogos de nucleótidos útiles para la cromatografía de afinidad de anticuerpos.

Resinas de enlace de carbohidratos

El ácido ligando m-aminofenilborónico inmovilizado en una variedad de soportes se ha utilizado para purificar glicoproteínas. El ligando se une a grupos cis-diol en residuos de azúcar tales como manosa, galactosa o glucosa que están presentes en la fracción sacárida de moléculas de glucoproteína que incluyen anticuerpos, formando un complejo anular reversible de cinco miembros. Este complejo se puede disociar bajando el pH, o utilizando un tampón de elución que contiene Tris o sorbitol.

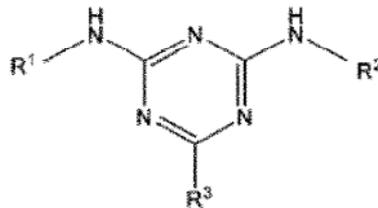
Un ligando de la resina de captura puede interactuar con una biomolécula mediante interacciones de enlace específicas, reversibles y no covalentes entre el ligando y la biomolécula, por ejemplo, una proteína, anticuerpo, anticuerpo modificado o

- 5 fragmento de anticuerpo. Las interacciones no covalentes se pueden clasificar como iónicas, van der Waals, enlaces de hidrógeno o hidrófobas. Estas interacciones funcionan de forma tridimensional para ayudar a la flexibilidad y la conformación de la biomolécula objetivo al ligando de la resina de captura. Cuando está muy cerca del ligando, la biomolécula puede inferir una, varias o todas estas interacciones para proporcionar un complejo ligando-biomolécula. La distancia entre el ligando y la biomolécula y la polaridad y electronegatividad del ligando determinarán la intensidad de estas interacciones. Además, la intensidad de estas interacciones se puede definir como la fuerza de afinidad. Una fuerza de alta afinidad entre un ligando y una biomolécula constituye un complejo ligando-biomolécula de estabilidad mejorada (documento US2009/0240033).
- 10 La resina de captura puede unir un anticuerpo, un anticuerpo modificado o un fragmento de anticuerpo.
- 15 Proteína A, proteína G o proteína L miméticas no basadas en péptidos se han utilizado en cromatografía de ligandos de colorante, que es un modo de cromatografía de afinidad que utiliza colorantes textiles unidos covalentemente inmovilizados a un soporte sólido tal como agarosa para purificar proteínas. Estos colorantes se parecen a sustratos naturales/ligandos proteicos a los que las proteínas tienen afinidad. Este modo de purificación y separación a menudo se denomina cromatografía de pseudoafinidad. La cromatografía de afinidad con el ligando colorante no es específica, pero la técnica es ventajosa para un amplio intervalo de unión para una variedad de proteínas. Los avances en la técnica de purificación emplearon tintes modificados para actuar como inhibidores competitivos para un sustrato/ligando normal de proteínas (P. Dean et al., J. Chromatography, 1979, 165, 3, 301-319). Los ligandos basados en triazinilo tales como Cibacron Blue 3GA, Procion Red H-3B, Procion Blue MX 3G, Procion Yellow HA, etc. son comúnmente empleados y abordan las preocupaciones de pureza, fuga y toxicidad de los colorantes comerciales originales tales como Blue Dextran (Lowe et al., Trends Biotechnology, 1992, 10, 442-448). Los ligandos de triazinilo se han utilizado con éxito para la purificación de albúmina, oxidoreductasas, descarboxilasas, enzimas glicolíticas, nucleasas, hidrolasas, liasas, sintetetasas y transferasas (N. Labrou, Methods Mol. Biol. 2002, 147, 129-139). Una limitación de la cromatografía de afinidad de ligando de colorante biomimético es que la fuerza de afinidad de biomolécula a biomolécula es considerablemente variable y en muchos casos un ligando que proporciona una fuerte afinidad por una proteína puede no ser aplicable a otra proteína. Por lo tanto, a menudo es necesario llevar a cabo un proceso de selección extensivo y empírico para identificar ligandos sintéticos adecuados con la afinidad deseada por una biomolécula de interés.
- 25
- 30 En consecuencia, para ayudar a la elucidación estructurada de ligandos adecuados que efectúan la unión de afinidad a una biomolécula, se ha incorporado un motivo de andamio multivalente a la estructura del ligando para proporcionar una construcción a la que se puede introducir y seleccionar una colección de ligandos en combinación con separación espacial rígida del ligando del soporte.
- 35 En una realización, el ligando de la resina de captura tiene una estructura de acuerdo con las estructuras enumeradas en la descripción del documento US20010045384. Las resinas de captura del documento US20010045384 son complejos de ligando miméticos de Proteína A ensamblados sobre un andamio tipo imino diacetato (IDA). El andamio IDA se deriva con ligandos triazilo para producir un complejo de ligando triazilo. Un complejo de ligando triazilo de ilustración definido dentro del documento US20010045384 se muestra adelante:
- 40



5 Este mimético de Proteína A ha demostrado su utilidad como medio de purificación por afinidad para inmunoglobulinas tales como IgG. Se postula que la geometría molecular de los ligandos de triazina adyacentes en el complejo ligando es una ventaja usando el andamio IDA.

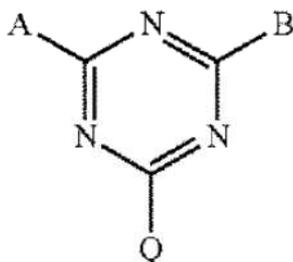
10 En una realización, el ligando de la resina de captura tiene una estructura de acuerdo con las estructuras enumeradas en la descripción de WO2004/035199. El documento WO2004/035199 divulga el uso de un mimético de Proteína L que comprende un almacén de ligando ramificado de fórmula general,



15 en donde R^1 y R^2 son iguales o diferentes y son cada uno de los ligandos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos, y R^3 es un soporte sólido opcionalmente unido por un motivo separador. El almacén de triacil-ligando se ha divulgado como ligandos miméticos de Proteína L adecuados para la unión por afinidad de inmunoglobulina o fragmentos de anticuerpos (fAb) de los mismos. Además, se divulga que estos almacenes de triacil-ligando tienen una afinidad de unión preferencial por las cadenas ligeras de inmunoglobulina K y λ .

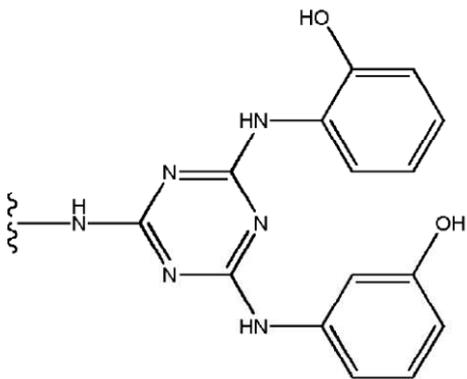
20 En una realización, el ligando de la resina de captura tiene una estructura de acuerdo con las estructuras enumeradas en la descripción del documento US20110046353. El documento US20110046353 divulga la purificación de un fragmento de anticuerpo (fAb) de un medio de producción. Los anticuerpos de fragmento no se pueden purificar en medio de Proteína A. El fAb se caracteriza por tener un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno y en muchas realizaciones descritas en él consiste en tener una cadena pesada (Vh) o un fragmento funcional de la misma y una cadena ligera (Vl) o un fragmento

funcional de la misma, junto con al menos otra cadena. Se definen dentro de los ligandos de afinidad para fAb, que consiste en un andamio de triacilo ramificado de la fórmula,



5 en el que Q representa el punto de unión a una matriz de soporte sólido, opcionalmente con un motivo espaciador y los Grupos A y B son grupos fenilo o naftilo sustituidos con uno o más sustituyentes capaces de formar puentes de hidrógeno, preferiblemente uno o más de -OH, -SH o -CO₂H. Se han informado excelentes resultados utilizando ligandos de afinidad soportados comercialmente disponibles de Prometic Biosciences con los nombres comerciales A1P MAbsorbent y A2P MAbsorbent.

En una realización, el ligando de la resina de captura tiene una estructura:



15 En una realización, la resina de captura tiene la forma de un cordón. En una realización, el tamaño del cordón en términos del diámetro del cordón es de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 2000 µm, preferiblemente de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 1000 µm, y lo más preferiblemente de aproximadamente 75 µm a aproximadamente 500 µm.

20 En una realización, la resina de captura incluye un soporte móvil hecho de un material seleccionado del grupo que consiste en: poliestireno, poliestireno (PS-DVB) - ligeramente reticulado con divinilbenceno (0.1-5.0% DVB, denominado microporoso), poliestireno (PS-DVB) - muy reticulado con divinilbenceno (5-60% DVB, denominado macroporoso), polietilenglicol, poliestireno injertado con polietilenglicol (copolímero PS-PEG), poliacrilamida, perlas de vidrio poroso controlado (CPG), sílice, Kieselguhr, Polipropileno, Poli(tetrafluoroetileno), Polietileno, Celulosa, Poli metacrilato, Monolitos funcionalizados, Fibras funcionalizadas, Columnas monolíticas (como Nikzad et al, OPRD, 2007, 11, 458-462), Agarosa, Sefarosa y cuentas de polímero recuperable magnéticas.

En una realización preferida, la resina de captura es un soporte móvil hecho de un material seleccionado del grupo que consiste en: agarosa, sefarosa y celulosa.

30 En una realización, la resina de captura es una resina de captura comercialmente disponible tal como la resina F1P HF FAbsorbent™. En una realización, la resina de captura es una resina de captura disponible comercialmente tal como resina MAbsorbent™.

Biomolécula:

5 En una realización, la biomolécula se produce naturalmente en un organismo vivo. Alternativamente, la biomolécula puede ser un derivado de un compuesto químico que se produce naturalmente en un organismo vivo. Por ejemplo, la biomolécula puede ser una biomolécula que ha sido alterada química o genéticamente de una manera que no afecta su actividad biológica.

En una realización, la biomolécula es un anticuerpo.

10 En una realización, la biomolécula es un anticuerpo modificado, por ejemplo, un anticuerpo que incluye un aminoácido no natural.

En una realización, la biomolécula es un fragmento de anticuerpo.

15 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En una realización, el anticuerpo es trastuzumab.

20 En una realización, el anticuerpo, anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo es una inmunoglobulina (Ig), por ejemplo, una de las cinco clases de inmunoglobulinas humanas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. El término anticuerpo abarca anticuerpos monoclonales. El término anticuerpo abarca anticuerpos policlonales. El término anticuerpo abarca fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo animal, un anticuerpo murino, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico que comprende secuencias humanas y animales.

25 La unidad básica de la estructura del anticuerpo es un complejo de glicoproteína heterotetramérica de por lo menos 20.000 Dalton, por ejemplo, aproximadamente 150.000 Dalton. Un anticuerpo puede tener al menos 900 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 1.400 aminoácidos de longitud. Un anticuerpo puede estar compuesto por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas, unidas entre sí por asociaciones no covalentes y por enlaces disulfuros. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intercatenarios separados regularmente. Cada cadena pesada es de aproximadamente 50.000 Daltons. Cada cadena pesada tiene al menos 300 aminoácidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 450 aminoácidos de longitud. El anticuerpo puede ser solo un anticuerpo de cadena pesada. Cada cadena ligera es de aproximadamente 20.000 Daltons. Cada cadena ligera tiene al menos 100 aminoácidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 250 aminoácidos de longitud.

35 Una biomolécula de anticuerpo puede contener dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada. Cada cadena liviana y cadena pesada a su vez consta de dos regiones: una región variable ("V") implicada en la unión del antígeno objetivo, y una región constante ("C") que interactúa con otros componentes del sistema inmunitario. Las regiones variables de cadena ligera y pesada se unen en un espacio tridimensional para formar una región variable que se une al antígeno (por ejemplo, un receptor en la superficie de una célula).

40 En una realización, la biomolécula es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la unión a antígeno o región variable de la misma.

45 Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, pFc', F(ab')₂ y scFv; diacuerpos; anticuerpos lineales; biomoléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Un fragmento de anticuerpo puede tener al menos 10 aminoácidos de longitud, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede ser al menos 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 o 300 aminoácidos de longitud.

50 En una realización, la biomolécula es un anticuerpo modificado o un fragmento de anticuerpo modificado. Por "anticuerpo modificado" o "fragmento de anticuerpo modificado" se entiende un anticuerpo que difiere de un anticuerpo parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo modificado se refiere a un anticuerpo, que, en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre, es diferente con respecto a su tamaño, o que es diferente con respecto a su glicosilación pero que tiene una afinidad similar a su ligando que el anticuerpo de tipo silvestre.

Fármaco:

60 El término "fármaco" incluye cualquier sustancia que, cuando se administra en el cuerpo de un organismo vivo, altera la función corporal normal. En general, un medicamento es una sustancia que se usa para el tratamiento, la curación, la

prevención o el diagnóstico de una enfermedad, o que se usa para mejorar el bienestar físico o mental. En una realización, el fármaco es un fármaco citotóxico.

5 Los principales candidatos de "ultrapotencia" (fármaco) hasta la fecha se definen en una de dos categorías: (i) inhibidores de tubulina; y (ii) agentes que interactúan con el ADN. Los inhibidores de tubulina modulan la polimerización de tubulina. Los agentes que interactúan con el ADN se dirigen al ADN celular

En una realización, el fármaco es un inhibidor de tubulina.

10 En una realización, el inhibidor de tubulina se selecciona del grupo que consiste en: (a) una auristatina; y (b) un derivado de maitansina.

En una realización, el fármaco es una auristatina.

15 Las auristatinas incluyen derivados sintéticos del compuesto natural Dolastatin-10. Las auristatinas son una familia de pseudopéptidos antineoplásicos/citostáticos. Las dolastatinas son estructuralmente únicas debido a la incorporación de 4 aminoácidos inusuales (Dolavaina, Dolaisoleuina, Dolaproina y Dolaproina) identificados en el producto biosintético natural. Además, esta clase de productos naturales tiene numerosos centros asimétricos definidos por los estudios de síntesis total de Pettit et al. (US 4,978,744). Parece a partir de las relaciones de actividad estructural que los residuos Dolaisoleuina y
20 Dolaproina parecen necesarios para la actividad antineoplásica (US 5.635.483 y US 5.780.588).

En una realización, la auristatina se selecciona del grupo que consiste en: Auristatina E (AE); Monometilauristatina E (MMAE); Auristatina F (MMAF); vcMMAE; y vcMMAF.

25 En una realización, el fármaco es una maitansina o un análogo estructural de maitansina.

En una realización, el fármaco es un maitansina.

30 Maitansinas incluyen policétidos antimetabólicos estructuralmente complejos. Las Maitansinas son inhibidores potentes del ensamblaje de microtubulina que conduce a la apoptosis de las células tumorales.

En una realización, la maitansina se selecciona del grupo que consiste en: Mertansina (DM1); y un análogo estructural de Maitansina como DM3 o DM4. Preferiblemente, el medicamento es mertansina (DM1).

35 En una realización, el fármaco es un agente de interacción de ADN. Los agentes que interactúan con el ADN se conocen como candidatos "ultrapotentes" (fármacos).

En una realización, el agente de interacción de ADN se selecciona del grupo que consiste en: (a) caliqueamicinas, (b) duocarmicinas y (c) pirrolobenzodiazepinas (PBD).

40

En una realización, el fármaco es una caliqueamicina.

La caliqueamicina es un potente agente citotóxico que causa roturas de ADN de doble cadena, lo que provoca la muerte celular. La caliqueamicina es un antibiótico de enedino natural (A. L. Smith et al., J. Med. Chem., 1996, 39, 11, 2103-2117).
45 Caliqueamicina se encontró en el microorganismo del suelo Micromonosporaechinospora.

En una realización, la caliqueamicina es caliqueamicina gamma 1.

En una realización, el fármaco es una duocarmicina.

50

Las duocarmicinas son potentes antibióticos antitumorales que ejercen sus efectos biológicos a través de la secuencia de unión selectiva en el surco menor del ADN dúplex y alquilando el N3 de la adenina (D. Boger, Pure & Appl. Chem., 1994, 66, 4, 837 - 844).

55 En una realización, la duocarmicina se selecciona del grupo que consiste en: Duocarmicina A; Duocarmicina B1; Duocarmicina B2; Duocarmicina C1; Duocarmicina C2; Duocarmicina D; Duocarmicina SA; Ciclopentilbenzoindol (CBI) duocarmicina; Centanamicina; Rachelmicina (CC-1065); Adozelesina; Bizelesina; y Carzelesina.

En una realización, el fármaco es una pirrolobenzodiazepina.

60

- Las pirrolobenzodiazepinas (PBD) son una clase de antibióticos antitumorales naturales. Las pirrolobenzodiazepinas se encuentran en *Streptomyces*. Las PBD ejercen su actividad antitumoral uniéndose covalentemente al ADN en el surco menor, específicamente en unidades de purina-guanina-purina. Se insertan en el N2 de la guanina a través de un enlace aminal y, debido a su forma, causan una interrupción mínima de la hélice del ADN. Se cree que la formación del aducto ADN-PBD inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y provoca roturas de cadena única y de doble cadena dependientes de la escisión en la hélice del ADN. Como derivados sintéticos, la unión de dos unidades de PBD mediante una unión flexible de polimetileno permite que los dímeros de PBD entrecrucen hebras de ADN opuestas produciendo lesiones altamente letales.
- En una realización, el fármaco es un derivado sintético de dos unidades de pirrolobenzodiazepinas unidas a través de un enlace flexible de polimetileno.
- En una realización, la pirrolobenzodiazepina se selecciona del grupo que consiste en: Antramycin (y dímeros de los mismos); Mazetramycin (y dímeros de los mismos); Tomamycin (y dímeros de los mismos); Protracarcin (y dímeros de la misma); Chicamycin (y dímeros de los mismos); Neotramycin A (y dímeros de los mismos); Neotrarmycin B (y dímeros de los mismos); DC-81 (y dímeros de los mismos); Sibiramicin (y dímeros de los mismos); Porotramycin A (y dímeros de los mismos); Porotramycin B (y dímeros de los mismos); Sibanomicin (y dímeros de los mismos); Abbeimycin (y dímeros de los mismos); SG2000; y SG2285.
- En una realización, el fármaco es un fármaco que se dirige a enlaces cruzados entre ADN mediante alquilación. Un fármaco que se dirige a los enlaces cruzados entre ADN a través de la alquilación se selecciona de entre: una mostaza dirigida al ADN; un agente alquilante específico de guanina; y un agente alquilante específico de adenina.
- En una realización, el fármaco es una mostaza dirigida a ADN. Por ejemplo, la mostaza dirigida a ADN puede seleccionarse del grupo que consiste en: un oligopirrol; un oligoimidazol; un vehículo de Bis-(bencimidazol); un portador de polibenzamida; y un vehículo 9-Anilinoacridina-4-carboxamida.
- En una realización, el fármaco se selecciona del grupo que consiste en: Netropsin; Distamicin; Lexitropsin; Tallimustin; Dibromotallimustin; PNU 157977; y MEN 10710.
- En una realización, el fármaco es un vehículo de Bis- (bencimidazol). Preferiblemente, el fármaco es Hoechst 33258.
- Un agente alquilante específico de guanina es un agente alquilante altamente regioespecífico que reacciona en posiciones específicas de nucleósidos.
- En una realización, el fármaco es un agente alquilante específico de guanina seleccionado del grupo que consiste en: un alquilante de G-N2; un alquilante A-N3; una mitomicina; un análogo de carmetizol; un análogo de ecteinascidina.
- En una realización, la mitomicina se selecciona de: mitomicina A; Mitomicina C; Porfiromycin; y KW-2149.
- En una realización, el análogo de carmetizol se selecciona de: bis- (hidroximetil) pirrolizidina; y NSC 602668.
- En una realización, el análogo de ecteinascidina es Ecteinascidina 743.
- Los agentes alquilantes específicos de adenina son regioespecíficos y alquiladores de surco menor específicos de secuencia que reaccionan en el N3 de adeninas en secuencias de polipirimidinas. Las ciclopropaindolonas y las duocamicinas se pueden definir como alquilantes específicos de adenina.
- En una realización, el fármaco es un análogo de ciclopropaindolona. Preferiblemente, el fármaco se selecciona de: adozelesina; y carzelesina.
- En una realización, el fármaco es una benz[e]indolona. Preferiblemente, el fármaco se selecciona de: CBI-TMI; e iso-CBI.
- En una realización, el fármaco es bizelesina.
- En una realización, el fármaco es un fármaco antitumoral marino. Los fármacos antitumorales marinos han sido un campo en desarrollo en el campo del desarrollo de fármacos antitumorales (I. Bhatnagar et al, Mar. Drugs 2010, 8, P2702-2720 y T.L. Simmons et al, Mol. Cancer Ther. 2005, 4(2), P333-342). Los organismos marinos, incluidas las esponjas, la asociación simbiótica esponja-microbio, la gorgonia, los actinomicetos y el coral blando han sido ampliamente explorados en busca de posibles agentes anticancerígenos.
- En una realización, el fármaco se selecciona de: citarabina, Ara-C; Trabectedin (ET-743); y Eribulin Mesilate.

5 En una realización, el EribulinMesilato se selecciona de: (E7389); Soblidotina (TZT 1027); Lactato de esqualamina; CemadotinPlinabulina (NPI-2358); Plitidepsina; Elisidepsin; Zaiipsis; Tasidotina, Sintadotina; (ILX-651); Discodermolida; HT1286; LAF389; Kahalalida F; KRN7000; Bryostatin 1; Hemiasterlina (E7974); Marizomib; Salinosporamida A; NPI-0052); LY355703; CRYPTO 52; Depsipéptido (NSC630176); Ecteinasidina 743; Sintadotina; Kahalalida F; Squalamina; Dehidrodidemnina B; Didemnina B; Cemadotina; Soblidotina; E7389; NVP-LAQ824; Discodermolida; HTI-286; LAF-389; KRN-7000 (Derivado de Agelasphin); Curacina A; DMMC; Salinosporamida A; Laulimalida; Vitilevuamida; Diazonamida; Eleuterobina; Sarcodictiina; Pelorusida A; Salicilialimidias A y B; Tiocoralina; Ascididemina; Variolinias; Lamellarina D; Dictiodendrinas; ES-285 (espisulosina); y Halicondrina B.

10 Los siguientes fármacos también están abarcados por la presente invención: Amatoxinas (α -amanitina)- octapéptidos bicíclicos producidos por basidiomicetos del género Amanita, por ejemplo, el hongo Green Deathcap; Tubulisinas; Citolisinas; dolabellaninas; Epotilona A, B, C, D, E, F.

15 Epotilonas: constituyen una clase de agentes de polimerización de tubulina que no son taxanos y se obtienen por fermentación natural de la mixobacteria Sorangiumcellulosum. Estas fracciones poseen potente actividad citotóxica que está vinculada a la estabilización de microtúbulos y resultados en el arresto mitótico en la transición G2/M. Las epotilonas han demostrado una citotoxicidad potente a través de un panel de estirpes celulares cancerosas y a menudo han mostrado una potencia mayor que paclitaxel (X. Pivot et al., European Oncology, 2008; 4(2), P42-45).

20 En una realización, el fármaco es amatoxina.

En una realización, el fármaco es tubulisina.

25 En una realización, el fármaco es citolisina.

En una realización, el fármaco es dolabellanina.

30 En una realización, el fármaco es epotilona.

Los siguientes fármacos también están abarcados por la presente invención. En una realización, el fármaco se selecciona de: doxorubicina; Epirubicina; Esorubicina; Detorubicina; Morfolino-doxorubicina; Metotrexato; etopterina; Bleomicina; Diclorometraxato; 5- Fluorouracilo; Citosina β -D-arabinofuranosida; Taxol; Anguidina; Melfalán; Vinblastina; Phomopsin A; Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP); Daunorubicin; Alcaloides de Vinca; Idarrubicina; Melfalán; Cisplatino; Ricino; Saporina; Antraciclina; Indolinobenzodiazepinas; 6-Mercaptopurina; Actinomomicina; Leurosina; Leurosidina; Carminomicina; Aminopterina; Tallisomicina; Podofilotoxina; Etopósido; Poliamidas en horquilla; Etopósido fosfato; Vinblastina; Vincristina; Vindesina; ácido retinoico Taxotere; N8-acetilspermidina; Camptotecina; Esperamicina; y Ene-diinas.

40 En una realización, el fármaco es Doxorubicina.

En una realización, el fármaco es Epirubicina.

En una realización, el fármaco es Esorubicina.

45 En una realización, el fármaco es Detorubicina.

En una realización, el fármaco es Morfolino-doxorubicina.

50 En una realización, el fármaco es Metotrexato.

En una realización, el fármaco es Metopterina.

En una realización, el fármaco es Bleomicina.

55 En una realización, el fármaco es Diclorometotrexato.

En una realización, el fármaco es 5-fluorouracilo.

En una realización, el fármaco es Citosina- β -D-arabinofuranosida.

60 En una realización, el fármaco es Taxol.

- En una realización, el fármaco es Anguidina.
- 5 En una realización, el fármaco es Melfalán.
- En una realización, el fármaco es Vinblastina.
- En una realización, el fármaco es Fomopsina A.
- 10 En una realización, el fármaco es proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP)
- En una realización, el fármaco es Daunorrubicina.
- En una realización, el fármaco es Alcaloides Vinca.
- 15 En una realización, el fármaco es Idarrubicina.
- En una realización, el fármaco es Melfalán.
- 20 En una realización, el fármaco es Cis-platino.
- En una realización, el fármaco es Ricina.
- En una realización, el fármaco es Saporina.
- 25 En una realización, el fármaco es Antraciclinas.
- En una realización, el fármaco es Indolino-benzodiazepinas.
- 30 En una realización, el fármaco es 6-mercaptopurina.
- En una realización, el fármaco es Actinomicina.
- En una realización, el fármaco es Leurosina.
- 35 En una realización, el fármaco es leurosideina.
- En una realización, el fármaco es Carminomicina.
- 40 En una realización, el fármaco es aminopterina.
- En una realización, el fármaco es Talisomicina.
- En una realización, el fármaco es Podofilotoxina.
- 45 En una realización, el fármaco es Etopósido.
- En una realización, el fármaco es Poliamida horquilla.
- 50 En una realización, el fármaco es Fosfato de etopósido.
- En una realización, el fármaco es Vinblastina.
- En una realización, el fármaco es Vincristina.
- 55 En una realización, el fármaco es Vindesina.
- En una realización, el fármaco es ácido retinoico Taxotere.
- 60 En una realización, el fármaco es N8-acetilespermidina

En una realización, el fármaco es Camptotecina.

En una realización, el fármaco es Esperamicina.

5 En una realización, el fármaco es Ene-diino.

Conjugados de biomolécula-fármaco:

10 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un conjugado de biomolécula-fármaco que se puede obtener mediante un proceso de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

15 Las realizaciones de la invención se describen adicionalmente a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

20 Figura 1 - Análisis de HIC de conjugados de Herceptina vcMMAE en fase sólida producidos por el Ejemplo 2. Trazas de abajo a arriba Herceptina-vcE_{1,3}, Herceptina-vcE_{2,4}, Herceptina-vcE_{3,4}, Herceptina-vcE_{4,4}. RT 4.3 min - Herceptina no conjugado, RT 5.9 min - Relación de anticuerpos de fármacos de 2, RT 7.5 min - Proporción de anticuerpos de fármacos de 4, RT 8.9 min - Proporción de anticuerpos de fármacos de 6 y RT 9.8 min - Proporción de anticuerpos de fármacos de 8.

Figura 2 - Análisis SEC de conjugados de Herceptina vcMMAE en fase sólida producidos por el Ejemplo 2. Trazas de abajo a arriba Herceptina, Herceptina-vcE_{1,3}, Herceptina-vcE_{2,4}, Herceptina-vcE_{3,4}, Herceptina-vcE_{4,4}.

25 Figura 3 - Análisis de HIC del flujo cromatográfico conjugados de Herceptina vcMMAE en fase sólida. Análisis de HIC de la fase de solución del conjugado de Herceptina vcMMAE (panel superior), Herceptina vcMMAE fabricado en columna A (columna central), vcMMAE fabricado en columna B (panel inferior).

30 Figura 4 - Análisis de SEC de conjugados de Herceptina vcMMAE en fase sólida. Análisis SEC de la fase de solución conjugado de Herceptina vcMMAE (panel superior), Herceptina vcMMAE fabricado en Columna A (panel central), vcMMAE fabricado en Columna B (panel inferior).

Descripción detallada

35 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta especificación, las palabras “comprender” y “contener” y las variaciones de ellas significan “incluidas, pero no limitadas a”, y no pretenden (y no lo están) excluir otras fracciones, aditivos, componentes, enteros o etapas. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta especificación, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, debe entenderse que la especificación contempla tanto la pluralidad como la singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

40 Las características, enteros, características, compuestos, fracciones químicas o grupos descritos junto con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención deben entenderse aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito aquí a menos que sea incompatible con los mismos. Todas las características reveladas en esta especificación (incluyendo cualquier reivindicación, resumen y dibujos), y/o todas las etapas de cualquier procedimiento o proceso así divulgado, pueden mezclarse en cualquier combinación, excepto combinaciones donde por lo menos algunas de dichas características y/o las etapas son mutuamente excluyentes.

EJEMPLOS:

50 Las siguientes técnicas se usan en los ejemplos.

Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)

55 La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó utilizando una columna TOSOH Bioscience TSK-Gel® GW3000SWxl en fosfato de potasio 0.2 M, pH 6.95 con cloruro de potasio 0.25 mM y IPA al 10% en un índice de fluidez de 0.5 ml/min. El estado de agregación del conjugado se determinó por integración de la absorbancia del área del pico eluida a 280 nm.

Cromatografía de Interacción Hidrófoba (HIC)

60

La cromatografía de interacción hidrófoba se realizó utilizando una columna de butil NPR TOSOH TSK-Gel® con un gradiente lineal de 0-100% de tampón A a B durante 12 minutos en un índice de fluidez de 0.8 ml/min. Donde el tampón A es 1.5 M de acetato de amonio pH 6.95 con fosfato de sodio 25 mM y el tampón B es fosfato de sodio 25 mM, pH 6.95 con IPA al 25%. La relación de fármaco de anticuerpo del conjugado se determinó por integración de la absorbancia de área de pico eluida a 280 nm.

Cromatografía de fase inversa (RP-PLRP)

La cromatografía de fase inversa (PLRP de los laboratorios de polímeros) se realizó utilizando una columna Agilent PLRP-S PL1912-1502 con un gradiente del 25-95% de tampón A a B durante 31 minutos en un índice de fluidez de 0.25 ml/min. Donde el tampón A es agua con 0.05% de TFA y el tampón B es ACN con 0.04% de TFA. Las muestras se redujeron antes de la inyección con borato de sodio 20 mM pH 8.4 que contenía DTT 50 mM a 37° durante 15 minutos. La relación de fármaco de anticuerpo del conjugado se determinó por integración de la absorbancia de área de pico eluida a 280 nm.

Relación de fármaco a anticuerpo por análisis UV

Para el análisis UV, la muestra se añadió a una cubeta de cuarzo de 400 ul con una longitud de trayectoria de 1 cm y la absorbancia a 252 nm y 280 nm medida en un espectrofotómetro GO multiskan Thermo Scientific. Los datos de 252 nm y 280 nm se usaron para calcular la relación de anticuerpos de fármacos basándose en los coeficientes de extinción molar publicados para Herceptina y DM1 en estas longitudes de onda.

Ejemplo 1 - Detección de conjugado de fármaco de anticuerpo en fase sólida

Este ejemplo demuestra que los anticuerpos inmovilizados pueden conjugarse con una carga de fármaco definida con un proceso genérico que niega la necesidad de un desarrollo de proceso. Este enfoque es adecuado para adaptarse al cribado de alto rendimiento de placas de 96 pozos.

Herceptina (0.5 de 1 mg/ml en PBS, pH 7.4) se unió a 100 µl (volumen de resina sedimentada) de resina F1P HF FAbsorbent™ equilibrada en PBS mezclando la suspensión de resina y la solución de anticuerpo suavemente durante 60 minutos. La Herceptina no unida se eliminó lavando la resina con PBS, EDTA 2 mM y la resina finalmente se resuspendió en 0.5 ml de PBS/EDTA.

La Herceptina (Her) unida se redujo mediante la adición de hidrócloruro de tris-(2-carboxietil) fosfina a una concentración final de 2 mM y luego se incubó la suspensión a temperatura ambiente durante 18 horas. La resina se lavó con PBS/EDTA para eliminar la TCEP sin reaccionar y luego se volvió a suspender en 475 µl de PBS/EDTA.

Se añadieron vcMMAE (vcE), N-etil maleimida (NEM) y dimetilacetamida (DMA) para conseguir las concentraciones finales de maleimida 1 mM (vcE total y NEM) y DMA al 5% v/v. La relación de vcE a NEM varió 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100. El anticuerpo reducido se conjugó incubando la suspensión de resina a temperatura ambiente durante 60 minutos. La resina se lavó secuencialmente con PBS/EDTA/DMA al 5% v/v y glicina 0.1 M pH 5.0.

Los conjugados se eluyeron con glicina 0.1 M pH 3.0. Los conjugados eluidos se recogieron en 2% v/v de tris(hidroximetil) aminoetano (TRIS) 1 M para neutralizarlos.

Los conjugados neutralizados fueron analizados por Cromatografía de Exclusión de Tamaño y Cromatografía de fase inversa (Polymer Labs, PLRP) Cromatografía para determinar el porcentaje agregado y la carga promedio de fármacos.

Los resultados se resumen en la Tabla 1 a continuación:

Masa de Unión Her (mg/ml de resina)	Relación de vcE:NEM	% Agregado	Relación de Fármaco a Anticuerpo (DAR)
10	100:0	9.72	7.9
10	75:25	4.69	5.7
10	50:50	3.08	4.4
10	25:75	0.80	2.8
10	0:100	0.42	0.0

El contenido agregado incluso de los conjugados más altos cargados con fármaco es aceptable para una evaluación adicional en ensayos de unión a antígeno y basados en células. Los lavados secuenciales con PBS/ETDA/5% v/v DMA y luego glicina 0.1 M de pH 5.0 aseguran que los conjugados finales están libres de enlazador de fármaco sin reaccionar,

NEM y solvente y no comprometen la interpretación de los datos del bioensayo. Con la resina F1P HF FAbsorbent™, este enfoque es útil para seleccionar paneles de monoclonales murinos como parte de la selección de clones para el posterior desarrollo de conjugación de fármacos con anticuerpos, para producir ADC directamente a partir de sobrenadantes de cultivos tisulares que contienen fragmentos intactos y fragmentos Fab.

5

Ejemplo 2 - Reducción de TCEP parcial en fase sólida en modo de lotes

Este ejemplo muestra que los anticuerpos inmovilizados pueden conjugarse con una carga de fármaco definida por reducción parcial de los enlaces disulfuro intercatenarios seguido de la conjugación con vcMMAE y que la calidad del producto aumenta con respecto a los mismos conjugados preparados en solución.

10

Herceptina (0.5 ml de 2 mg/ml de PBS, pH 7.4) se unió a 100 µl (volumen de resina sedimentada) de resina F1 P HF FAbsorbent™ equilibrada en PBS mezclando la suspensión de resina y la solución de anticuerpo suavemente durante 30 minutos. La Herceptina no unida se eliminó lavando la resina con PBS, EDTA 2 mM y la resina finalmente se resuspendió en 0.5 ml de PBS/EDTA.

15

La Herceptina unida se redujo mediante la adición de hidrocloreto de tris-(2-carboxietil)fosfina a una relación de 1 a 4 moles de TCEP por mol de Herceptina y luego incubando la suspensión a temperatura ambiente durante 2 horas.

20

Se añadieron vcMMAE y dimetilacetamida (DMA) para conseguir 2.5 a 10 moles de vcMMAE por mol de Herceptina y 5% v/v de DMA y la conjugación se dejó avanzar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió N-acetil cisteína (NAC) para inactivar vcMMAE sin reaccionar y se dejó reaccionar durante 20 minutos antes de lavar la resina secuencialmente con PBS/EDTA/DMA al 5% v/v y glicina 0.1 M pH 5.0.

25

Los conjugados se eluyeron con glicina 0.1 M pH 3.0. Los conjugados eluidos se recogieron en 2% v/v de tris (hidroximetil) aminoetano (TRIS) 1 M para neutralizarlos.

Se produjo y analizó una serie equivalente de conjugados en fase de solución de Herceptina con vcMMAE con DAR apareado para proporcionar una comparación de la calidad del conjugado en fase sólida y en fase de solución.

30

Los conjugados eluidos fueron luego analizados por Cromatografía de interacción hidrófoba (Figura 1) y Cromatografía de exclusión de tamaño (Figura 2) para determinar el porcentaje de agregado y la carga promedio de fármaco.

Los resultados se resumen en la Tabla 2 a continuación:

35

DAR	% de Agregado de Solución	% de Agregado de Sólido
0 (Herceptina)		0.2
1.3	0.4	0.3
2.4	0.7	0.3
3.4	1.1	0.3
4.4	1.5	0.3

Los datos muestran que en los soportes sólidos la relación entre TCEP a la proporción de anticuerpos y la carga final del fármaco es lineal. Además, cuando se compara con un conjugado equivalente hecho en solución, los conjugados en fase sólida muestran una menor agregación porcentual.

40

Ejemplo 3 - Reducción de TCEP parcial en fase sólida en columna

Este ejemplo muestra que la conjugación de anticuerpos inmovilizados se puede adaptar a un proceso de flujo cromatográfico con excelente reproducibilidad.

45

Herceptina (5 ml de 2 mg/ml de PBS, pH 7.4) se unió a una columna de 1 ml de Resina F1P HF FAbsorbent™ (previamente equilibrada en PBS) cargando a 120 cm/h. La Herceptina unida se preparó para la reducción equilibrando la resina con PBS, EDTA 2 mM.

50

Se usó una bomba microperistáltica para crear un circuito de recirculación de PBS/EDTA de pequeño volumen a través de la columna (aproximadamente 200 µL externa a la columna) a la que se añadió TCEP para dar una relación molar de 2 TCEP por mol de Herceptina. Esto permitió recircular durante 120 minutos a temperatura ambiente para reducir la Herceptina.

Los contenidos del depósito y la columna se lavaron para eliminarlos y se sustituyeron por PBS/EDTA/5% v/v DMA a los que se añadió vcMMAE para dar una relación molar de 5 vcMMAE por mol de Herceptina reducida. Esto se dejó recircular durante 60 minutos a temperatura ambiente para conjugar la Herceptina reducida.

5 Se añadió N-acetil cisteína (NAC) para inactivar vcMMAE sin reaccionar y se dejó reaccionar durante 20 minutos antes de lavar la resina secuencialmente con PBS/EDTA/DMA al 5% v/v y glicina 0.1 M pH 5.0.

Los conjugados se eluyeron con glicina 0.1 M, pH 3.0. Los conjugados eluidos se recogieron en 2% v/v de tris(hidroximetil)aminoetano (TRIS) 1 M para neutralizarlos.

10 El proceso se repitió en un segundo experimento independiente utilizando una segunda columna/operador.

Los conjugados eluidos fueron luego analizados por Cromatografía de interacción hidrófoba (Figura 3) y Cromatografía de exclusión de tamaño (Figura 4) para determinar el porcentaje de agregado y la carga promedio de fármaco.

15 Los resultados se resumen en la Tabla 3 a continuación:

Método de Preparación	DAR	% Agregado
Herceptina	0	0.2
Fase de Solución	2.4	0.6
Columna A	2.4	0.3
Columna B	2.4	0.3

20 Los datos muestran que cuando se adapta a un modo de flujo cromatográfico, la conjugación de vcMMAE a Herceptina es consistente con respecto a la carga de fármaco promedio y la generación de agregado. El DAR logrado en el modo por lotes y el modo cromatográfico es el mismo cuando se corresponde la relación TCEP con el anticuerpo.

Ejemplo 4 - Conjugación de Herceptina en fase sólida con DM1 en modo de lotes a través de activación SMCC de cadenas laterales de lisina.

25 Este ejemplo muestra que los anticuerpos inmovilizados pueden conjugarse en la cadena lateral de lisina mediante la modificación con SMCC seguida de la conjugación con DM1 y que la calidad del producto aumenta con respecto a los mismos conjugados preparados en solución.

30 Herceptina (0.5 ml de 4 mg/ml de PBS, pH 7.4) se unió a 100 µl (volumen de resina sedimentada) de resina F1P HF FAbsorbent™ equilibrada en PBS mezclando la suspensión de resina y la solución de anticuerpo suavemente durante 30 minutos. La Herceptina no unida se eliminó lavando la resina con PBS seguido de "tampón de modificación" (NaPi 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM pH 6.7) y la resina finalmente se resuspendió en tampón de modificación que contenía DMA al 5% v/v.

35 La Herceptina unida se modificó añadiendo succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexil-1-carboxilato (SMCC) a una relación de 5 a 20 moles de SMCC por mol de Herceptina y luego incubando la suspensión a temperatura ambiente durante 4 horas. El SMCC sin reaccionar se eliminó lavando la resina con PBS/DMA al 5% v/v seguido de "tampón de conjugación" (citrato sódico 35 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM pH 5.0) y la resina finalmente se resuspendió en tampón de conjugación que contenía 3% v/v DMA.

40 Se añadió DM1 para lograr 15 moles de DM1 por mol de Herceptina y la conjugación se dejó avanzar durante 18 horas a temperatura ambiente. La resina se lavó luego secuencialmente con PBS/EDTA/DMA al 5% v/v y glicina 0.1 M, pH 5.0.

45 Los conjugados se eluyeron con glicina 0.1 M pH 3.0. Los conjugados eluidos se recogieron en 2% v/v de tris(hidroximetil)aminoetano (TRIS) 1 M para neutralizarlos.

Un conjugado de fase de solución equivalente de Herceptina con DM1 con DAR apareado se produjo haciendo reaccionar Herceptina con 7.6 moles de SMCC seguido de 5 moles de DM1 por mol de Herceptina y se analizó para proporcionar una comparación de la calidad del conjugado en fase sólida y en fase solución. La concentración de Herceptina durante la modificación y las reacciones de conjugación fue de 10 y 5 mg/ml, respectivamente.

50 Los conjugados eluidos se analizaron luego mediante Cromatografía de exclusión por tamaño y UV para determinar el porcentaje de agregado y la carga promedio de fármaco.

55 Los resultados se resumen en la Tabla 4 a continuación:

Método de Producción	[Herceptina] durante conjugación mg/ml	DAR	% Agregado
Solución	5	3.6	3.2
Fase Sólida	20	1.7	1.8
		2.6	2.8
		3.5	3.0
		4.8	3.5

Los datos muestran que en los soportes sólidos es posible la conjugación de la cadena lateral de lisina y que la relación entre la relación SMCC a anticuerpo y la carga final del fármaco es lineal.

5

Además, cuando se compara con un conjugado equivalente hecho en solución, los conjugados en fase sólida muestran un porcentaje de agregación equivalente a pesar de un aumento de cuatro veces en la concentración de proteína durante la reacción de conjugación.

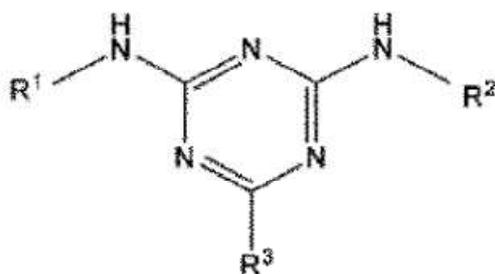
10

REIVINDICACIONES

1. Un método para sintetizar un conjugado de biomolécula-fármaco, comprendiendo el método:

5 (i) poner en contacto una biomolécula con resina F1P HF FAbsorbent, resina A1P MAbsorbent o resina A2P MAbsorbent o una resina de captura que comprende una fracción de captura para la biomolécula, en el que la fracción de captura es:

un andamio de ligando ramificado de fórmula:

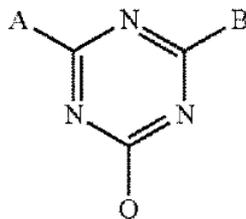


10

en el que R¹ y R² son iguales o diferentes y son cada uno de los ligandos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos, y R³ es un soporte sólido opcionalmente unido por un motivo separador;

15 o

un andamio de triacilo ramificado de fórmula:



20

en el que Q representa el punto de unión a una matriz de soporte sólido, opcionalmente con un motivo separador y los Grupos A y B son grupos fenilo o naftilo sustituidos con uno o más sustituyentes capaces de formar puentes de hidrógeno, preferiblemente uno o más de -OH, -SH o -CO₂H;

25 en condiciones adecuadas para inmovilizar la biomolécula y, por lo tanto, proporcionar una biomolécula inmovilizada; en donde la biomolécula es un anticuerpo, anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo;

(ii) opcionalmente poner en contacto la biomolécula inmovilizada con un agente de modificación química o un agente activador para proporcionar una biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente;

30

(iii) poner en contacto la biomolécula inmovilizada o la biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente con un componente de fármaco para formar un conjugado de biomolécula-fármaco inmovilizado;

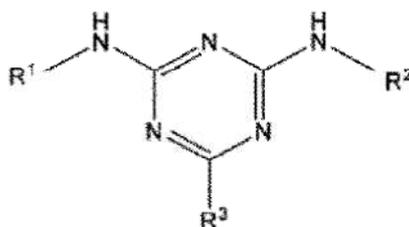
35

(iv) liberar el conjugado biomolécula-fármaco de la resina de captura.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (i) comprende incubar la biomolécula con la resina de captura; opcionalmente, en el que la incubación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 10 a aproximadamente 40°C, opcionalmente de aproximadamente 15 a aproximadamente 37°C; y/o en el que la incubación se lleva a cabo durante un período de tiempo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 18 horas; y/o en el que la incubación se lleva a cabo en una solución tampón, opcionalmente solución salina tamponada con fosfato (PBS) y/o; en el que la incubación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

40

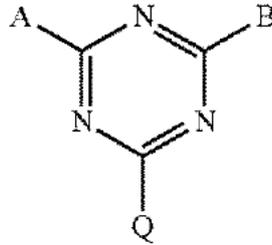
3. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que después de la etapa (i) la biomolécula inmovilizada se lava para eliminar cualquier biomolécula que no se haya inmovilizado en la resina de captura.
- 5 4. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa (ii) implica reducir la biomolécula; opcionalmente, en el que la biomolécula se reduce al ponerla en contacto con un agente reductor tal como tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditiotreitól (DTT), mercaptoetilamina u otro reductor adecuado.
- 10 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la etapa (ii) implica hacer reaccionar la biomolécula con una fracción entrecruzada, opcionalmente en donde la fracción entrecruzada es succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC).
- 15 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, etapa (ii) se lleva a cabo en una solución tampón tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS); y/o en el que la etapa (ii) se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8; y/o en el que la etapa (ii) se lleva a cabo en presencia de un agente quelante, tal como EDTA; y/o en el que la etapa (ii) implica incubar la biomolécula con el agente reductor durante un período de tiempo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 18 horas.
- 20 7. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que después de la etapa (ii), la biomolécula inmovilizada, activada, se lava para eliminar cualquier agente de modificación/activación.
- 25 8. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa (iii) implica poner en contacto la biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente con un componente de fármaco en una solución tampón; y/o en el que la etapa (iii) implica poner en contacto la biomolécula inmovilizada modificada o activada químicamente con un componente de fármaco a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente 7.4; y/o en el que la etapa (iii) se lleva a cabo en presencia de un agente quelante, tal como EDTA; y/o en el que la etapa (iii) implica incubar la biomolécula inmovilizada, modificada o activada químicamente, con el componente del fármaco durante un período de tiempo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 18 horas.
- 30 9. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que después de la etapa (iii) el conjugado de biomolécula-fármaco inmovilizado se lava para eliminar cualquier componente de fármaco que no haya reaccionado.
- 35 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (iv) implica alterar el pH para romper la unión soporte-biomolécula; opcionalmente, en donde el pH disminuye a menos de aproximadamente pH 5, opcionalmente alrededor de pH 3; y opcionalmente adicional en el que el conjugado de biomolécula-fármaco eluido se neutraliza después de la etapa de liberar el conjugado de la resina de captura, opcionalmente el conjugado se captura en 2% v/v de tris(hidroximetil)aminoetano (TRIS) 1M.
- 40 11. Una mezcla que comprende:
- i) una resina de captura sobre la que se inmoviliza un anticuerpo, anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo en el que la resina de captura es la resina F1P HF FAbsorbent, resina A1P MAbsorbent o resina A2P MAbsorbent o una resina de captura que comprende una fracción de captura para la biomolécula, en el que la fracción de captura es:
- 45 un andamio de ligando ramificado de la fórmula:



50 en el que R¹ y R² son iguales o diferentes y son cada uno de los ligandos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos, y R³ es un soporte sólido opcionalmente unido por un motivo separador;

o

un andamio de triacilo ramificado de fórmula:



5

en el que Q representa el punto de unión a una matriz de soporte sólido, opcionalmente con un motivo separador y los Grupos A y B son grupos fenilo o naftilo sustituidos con uno o más sustituyentes capaces de formar puentes de hidrógeno, preferiblemente uno o más de -OH, -SH o -CO₂H;

10 y

(ii) un agente de reducción o una fracción de entrecruzamiento.

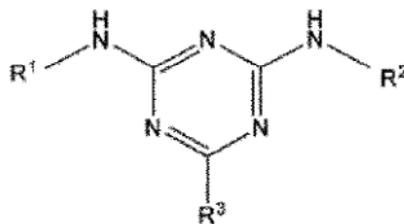
12. La mezcla de la reivindicación 11, en la que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en: tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditioneitol (DTT) y merceptoetilamina; y/o en donde la fracción entrecruzada es succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC).

13. La mezcla de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en la que la resina de captura incluye un anticuerpo inmovilizado, un anticuerpo modificado o un fragmento de anticuerpo en su superficie.

14. Un uso de una resina de captura en la que la resina de captura es resina F1P HF FAbsorbent, resina A1P MAbsorbent o resina MAbsorbent A2P o una resina de captura que comprende una fracción de captura para la biomolécula, en el que la fracción de captura es:

25

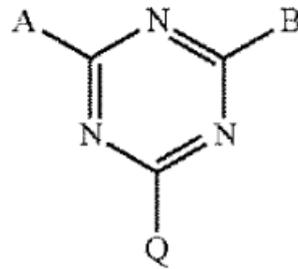
un andamio de ligando ramificado de fórmula:



30 en el que R¹ y R² son iguales o diferentes y son cada uno de los ligandos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos, y R³ es un soporte sólido opcionalmente unido por un motivo separador;

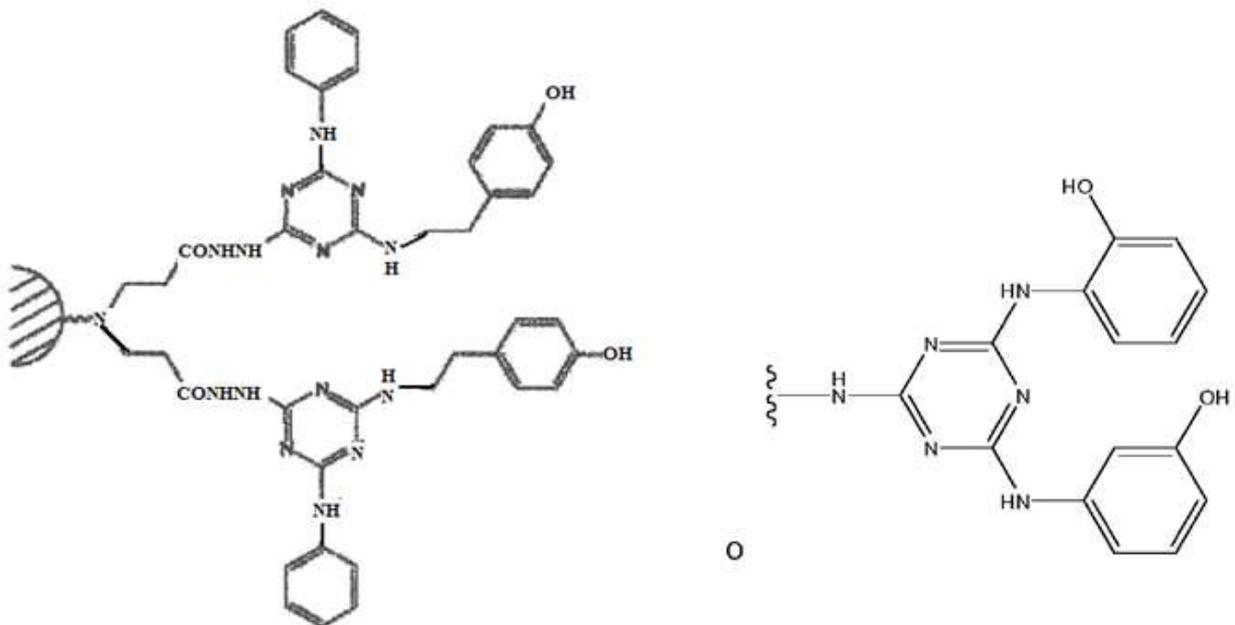
o

35 un andamio de triacilo ramificado de fórmula:



5 en el que Q representa el punto de unión a una matriz de soporte sólido, opcionalmente con un motivo separador y los Grupos A y B son grupos fenilo o naftilo sustituidos con uno o más sustituyentes capaces de formar puentes de hidrógeno, preferiblemente uno o más de -OH, -SH o -CO₂H en la síntesis de un conjugado de biomolécula-fármaco, en el que la biomolécula es un anticuerpo, un anticuerpo modificado o un fragmento de anticuerpo.

10 15. El método, mezcla o uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ligando de la resina de captura tiene una estructura:



15 16. El método, mezcla o uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la biomolécula es un anticuerpo, opcionalmente en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y/o en el que el anticuerpo es trastuzumab.

20 17. El método, mezcla o uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el fármaco es un inhibidor de tubulina o un agente de interacción de ADN; opcionalmente, en donde el inhibidor de tubulina se selecciona del grupo que consiste en: (a) una auristatina; y (b) un derivado de maitansina; opcionalmente, en donde el agente de interacción de ADN se selecciona del grupo que consiste de: (a) caliqueamicinas, (b) duocarmicinas y (c) pirrolobenzodiazepinas (PBD).

'DAD1 A, Sig=280,16 Ref=440,80 (ENE13\30HIC006.D)
'DAD1 A, Sig=280,16 Ref=440,80 (ENE13\30HIC003.D)
'DAD1 A, Sig=280,16 Ref=440,80 (ENE13\30HIC004.D)
'DAD1 A, Sig=280,16 Ref=440,80 (ENE13\30HIC005.D)

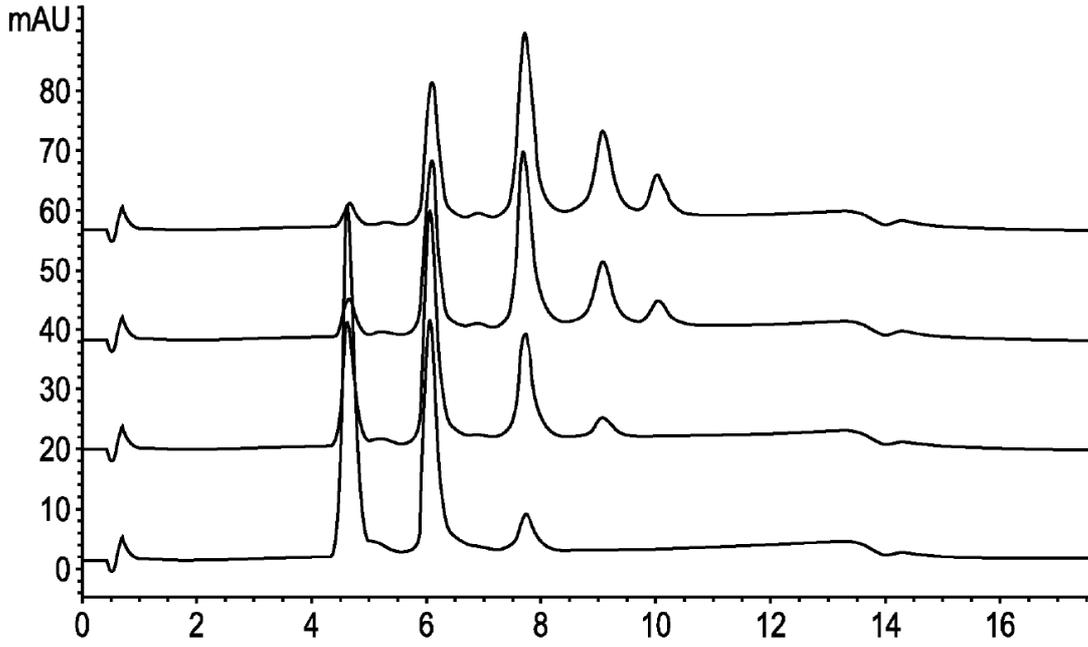


FIG. 1

Cromatogramas actuales

DAD1 A, Sig=280,16 Ref=440,8((ENE13\31SECB03.D)

DAD1 A, Sig=280,16 Ref=440,8((ENE13\31SECB04.D)

DAD1 A, Sig=280,16 Ref=440,8((ENE13\31SECB02.D)

DAD1 A, Sig=280,16 Ref=440,8((ENE13\31SECB05.D)

DAD1 A, Sig=280,16 Ref=440,8((ENE13\31SECB06.D)

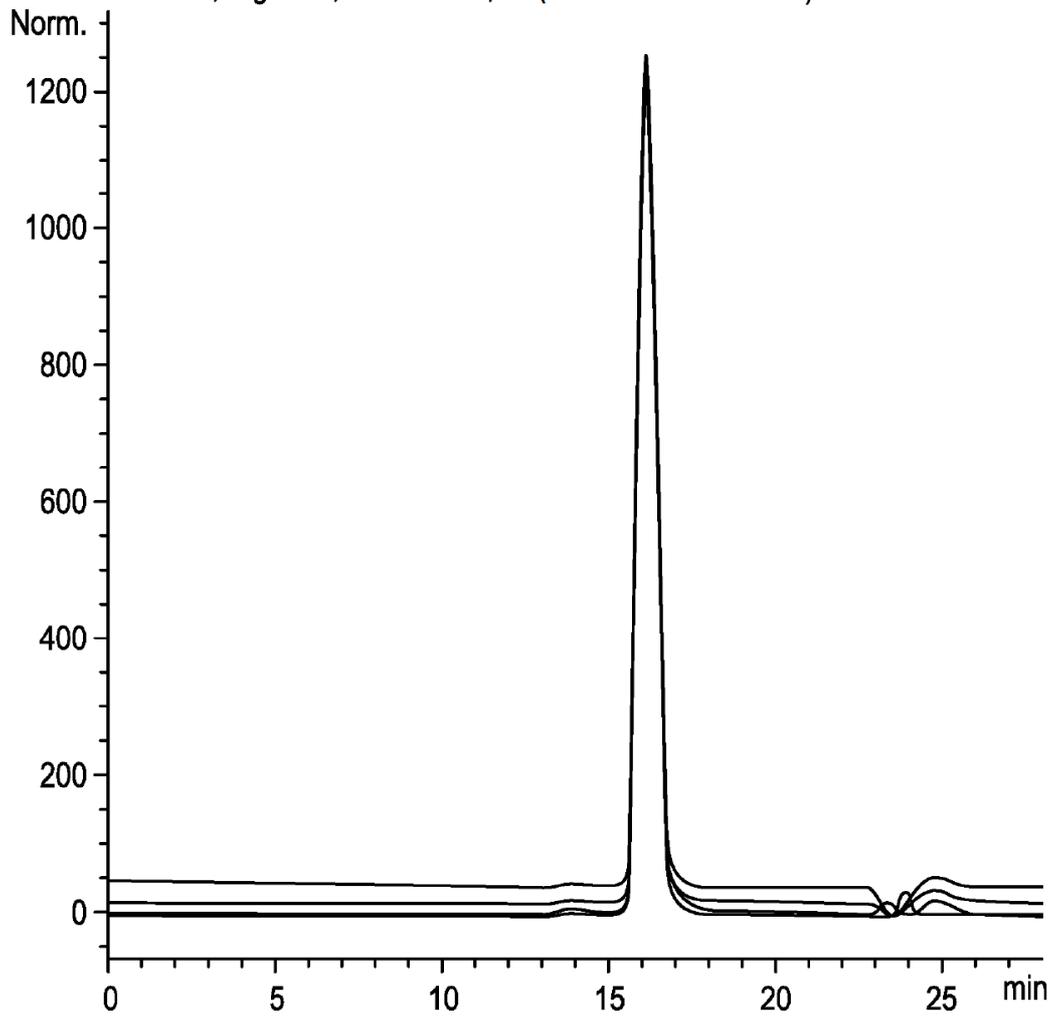


FIG. 2

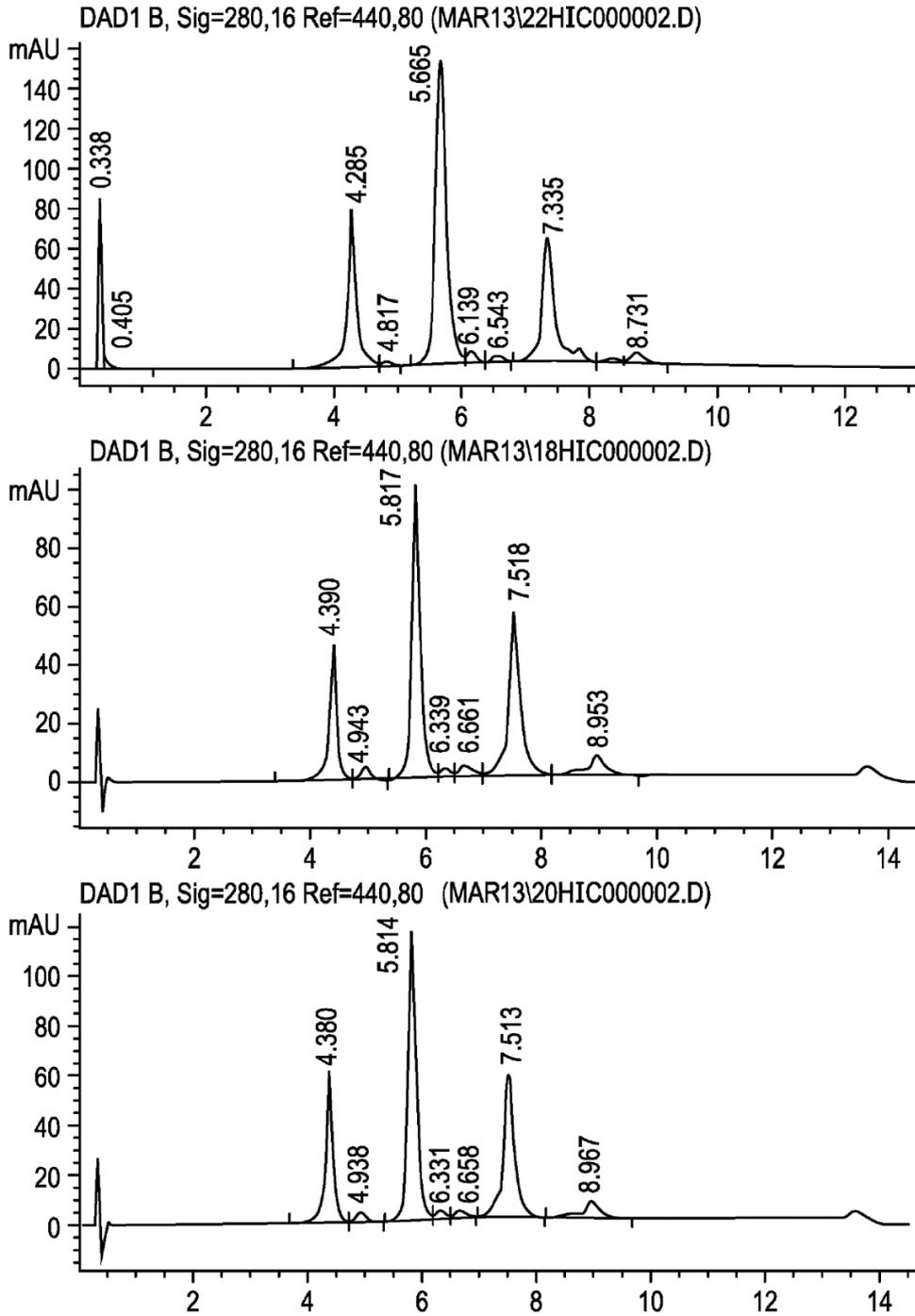


FIG. 3

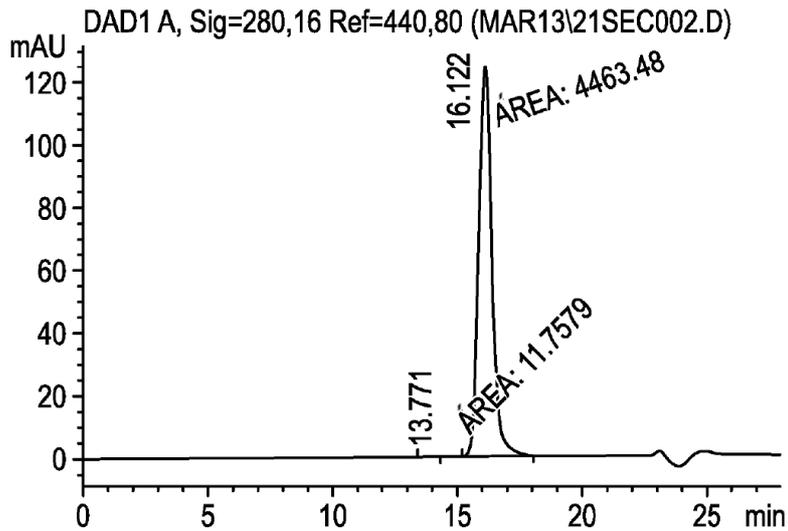
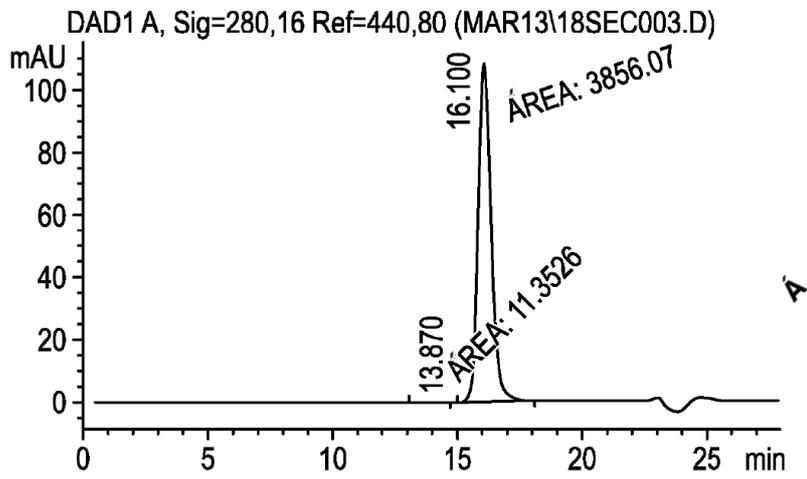
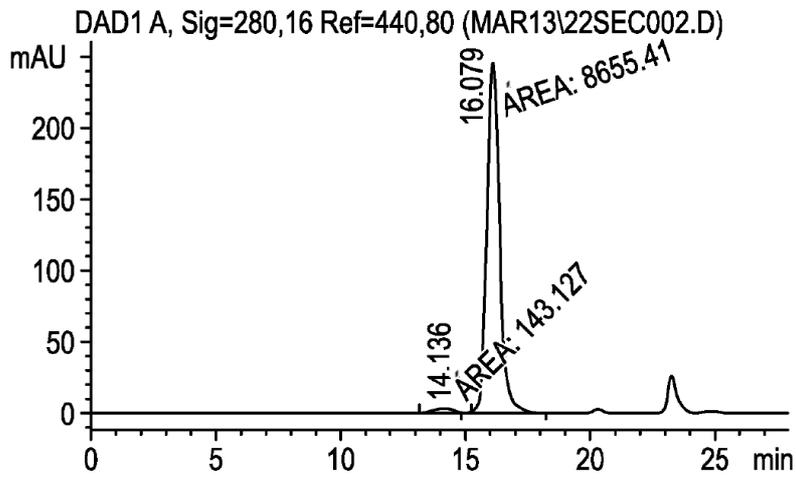


FIG. 4