

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 225**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2015 PCT/EP2015/050304**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15104359**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2015 E 15700117 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3092010**

54 Título: **Método de purificación de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a Cys**

30 Prioridad:

10.01.2014 EP 14150789

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

24.10.2018

73 Titular/es:

**SYNTHON BIOPHARMACEUTICALS B.V. (100.0%)
Microweg 22
6545 CM Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:

**ROO DE, GUY;
VERSTEGEN, RUUD MARTIN y
COUMANS, RUDY GERARDUS ELISABETH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 687 225 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 purificación de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a Cys

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método de purificación de una mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco (CAFs) unidos a cisteína (Cys), en particular de una mezcla en la que la cantidad de anticuerpo no conjugado se encuentra en el intervalo de 10-40 % en peso.

10 Tales CAFs unidos a Cys pueden tener un papel importante en los nuevos tratamientos contra el cáncer dirigidos. Por lo tanto, tener un método a escala (preparativa) industrial de purificación de una mezcla de CAFs unidos a Cys es un requisito clave para el futuro éxito comercial de tales CAFs.

15 **Antecedentes de la invención**

En los últimos años, decenas de CAFs se han tenido en desarrollo pre-clínico y clínico y dos CAFs han sido aprobados para su comercialización en el último par de años. Aparte de los desarrollos más recientes para conjugar enlazadores-fármacos a anticuerpos (monoclonales) (AMs), el fármaco en la mayoría de los CAFs en (pre)desarrollo clínico y los dos CAFs actualmente comercializados es o bien unido al anticuerpo a través del átomo N de un residuo de lisina o a través del átomo S de un residuo de cisteína. El producto comercializado Kadcyra® o adotrastuzumab emtansine (Roche/Genentech ImmunoGen) es un ejemplo de un CAF unido a lisina y Adcetris® o brentuximab vedotin (Seattle Genetics/Takeda Millennium) es un ejemplo de un CAF unido a cisteína. Uno de los CAFs actualmente en desarrollo (pre)clínico es un CAF unido a cisteína de fórmula (II) mostrado en la presente memoria a continuación en el que un fármaco que contiene duocarmicina está conjugado a través de un residuo de cisteína a trastuzumab.

30 Las duocarmicinas, primero aisladas de un caldo de cultivo de especies de *Streptomyces*, son miembros de una familia de antibióticos antitumorales que incluyen duocarmicina A, duocarmicina SA, y CC-1065. Estos agentes extremadamente potentes derivan supuestamente su actividad biológica de una capacidad para secuenciar selectivamente alquilato ADN en la posición N3 de la adenina en el surco menor, que inicia una cascada de eventos que termina en un mecanismo de muerte celular apoptótica.

35 Con el fin de realizar CAFs unidos a Cys, normalmente el anticuerpo es parcialmente reducido para convertir uno o más enlaces disulfuro intercatenarios en dos o más residuos de cisteína libres. Los grupos tiol o sulfhidrilo (SH) de los residuos de cisteína libres se conjugan entonces posteriormente con una molécula enlazador-fármaco para formar un CAF unido a Cys. Normalmente, este proceso de conjugación da una mezcla aleatoria, heterogénea de anticuerpos cargados con 0, 2, 4, 6 y 8 de enlazadores-fármacos. Cuanto más baja es la relación media fármaco a anticuerpo (RFA), mayor es la cantidad de anticuerpo no conjugado (RFA0) en la mezcla de reacción.

40 Se sabe que la carga de fármaco tiene un efecto sobre la actividad antitumoral del CAF como se describe por ejemplo por K.J. Hamblett *et al.* en *Clinical Cancer Research* 10 (2004) 7063-7070. También afecta a las propiedades QFC (química, fabricación y control) como la agregación.

45 El documento WO2011/133039 del solicitante desvela una serie de análogos innovadores del agente de alquilación de ADN CC-1065 y conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) de los mismos. En el Ejemplo 15, la preparación de una serie de conjugados de trastuzumab-duocarmicina se ha descrito utilizando 1,1 equivalentes molares de un agente reductor para generar 2 grupos tiol libres por AM. Después de la inactivación, los CAFs se purificaron utilizando una columna de r-proteína A para dar conjugados enlazador-fármaco que tiene una media RFA de aprox. 2.

50 La técnica anterior desvela el uso de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) como una etapa de pulido en procesos de purificación de proteínas (documento WO 99/31120) así como su uso como una etapa de pulido en numerosos procesos de purificación de anticuerpos monoclonales (AM) (p. ej., K.J. Hamblett *et al.* *Clinical Cancer Research* 10 (2004) 7063-7070; M.M.C Sun *et al.* *Bioconjugate Chemistry* 16 (2005) 1282-1290). Se menciona que este modo de cromatografía es particularmente útil para la eliminación de agregados, y proporciona buena depuración de otras impurezas relacionadas con el proceso tal como proteína(s) de la célula huésped, ADN, endotoxinas, proteína A lixiviada y virus endógenos.

60 CIH es también un método bien establecido de determinación (analítica) de RFA y la distribución de carga de fármaco para CAFs unidos a cisteína (Laurent Ducry (ed.), *Antibody-Drug Conjugates, Methods in Molecular Biology*, 1045 (2013) 275-283). El capítulo 17 de este libro de Jun Ouyang representa en la Fig. 2 en la página 276 un cromatograma de CIH representativo de un CAF unido a Cys (es decir, MC-VC-PABC-MMAE). Se menciona que la elución con un gradiente de una concentración salina decreciente y un modificador orgánico creciente impacta en la retención de la columna de las especies cargadas con un fármaco con la forma no conjugada menos hidrófoba, (es decir, anticuerpo no conjugado, RFA0) al eluirse primero, y el anticuerpo más hidrófobo con 8 enlazadores-fármacos (RFA8) al eluirse el último. Los datos de la Tabla 2 en la página 279 muestran que con un RFA promedio ponderado

de 3,6, la mezcla de CAFs unidos a Cys solo contiene 4,7 % de anticuerpo no conjugado. Métodos similares para la determinación analítica de RFA y/o distribución de carga de fármacos de CFAs unidos a Cys se desvelan en el documento WO2013/049410 y por K. Cumnock *et al.* en *Bioconjugate Chemistry* 24 (2013) 1154-1160 o solo se mencionan generalmente por B-Q. Shen *et al.* en *Nature Biotechnology* 30(2) (2012) 184-189.

El documento US4771128 describe un método de aislamiento y purificación de conjugados de toxinas utilizando CIH, en particular para la inmunoglobulina (anticuerpo) conjugada con la proteína ricina A tóxica que inactiva ribosomas. El método implica primero la eliminación de la ricina A no conjugada y agregados a través de cromatografía por tamaños (es decir, cromatografía de exclusión por tamaños, CET), seguido por cromatografía en gel hidrófobo (es decir, CIH, utilizando fenil sefarosa CL-4B, volumen 70 ml), en la que la mezcla de conjugado se separó por elución con soluciones salinas de fuerza iónica decreciente. La inmunoglobulina no conjugada se eluyó primero. El tampón utilizado tanto en la etapa de tamaños como en la etapa de separación cromatográfica subsiguiente contenía cloruro de sodio (1 M) a un caudal de aproximadamente 20-40 ml/h, cf. Ejemplo 1. En una realización alternativa, se proporciona una separación cromatográfica y purificación de "flujo rápido" (es decir, utilizando fenil sefarosa CL-4B, diámetro de la columna de 1 cm, volumen 3,14 ml) en la que la inmunoglobulina no conjugada se elimina con el primer volumen de columna de solución tampón fosfato/cloruro de sodio (1,5 M) en un caudal de aproximadamente 0,13 ml/h, cf. Ejemplo 2, y el inmunoconjugado se elimina con un segundo volumen de columna de tampón fosfato que contiene 10-60 % en vol. de un disolvente orgánico (es decir, 60 % en vol. de glicerol en el Ejemplo 2).

La principal desventaja de los métodos desvelados en la técnica anterior es el uso de un disolvente orgánico que no es deseable ni aceptable para un proceso a escala industrial.

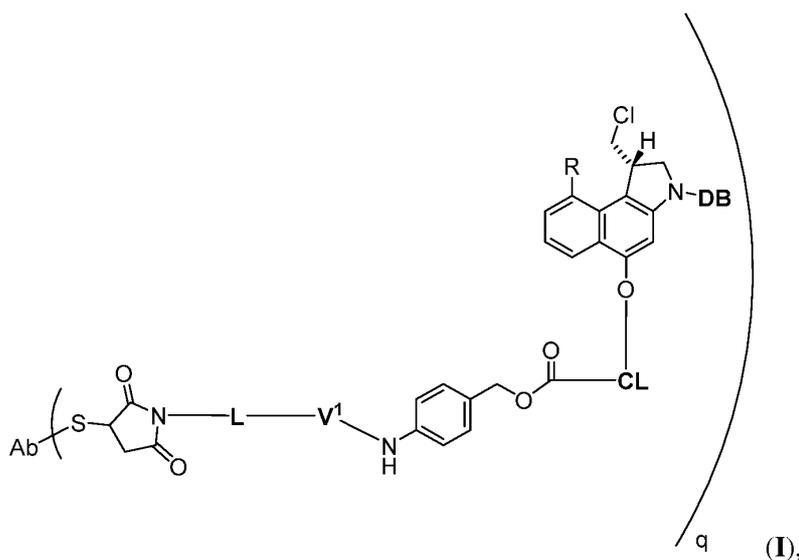
Un problema que no ha sido abordado en la técnica anterior para el mejor conocimiento del solicitante es la ampliación del proceso de purificación de CAF.

Habiendo examinado la técnica anterior, existe claramente una necesidad de un nuevo método de purificación de mezclas de CAFs unidos a Cys. En particular, sería deseable disponer de un método de purificación de mezclas de CAFs unidos a Cys que tuviesen un RFA promedio de aproximadamente 2-3, que normalmente contiene una cantidad relativamente alta de anticuerpo no conjugado, a veces tanto como 40 % en peso, a una escala preparativa industrial, y no se tuviese que utilizar múltiples etapas cromatográficas.

Sumario de la invención

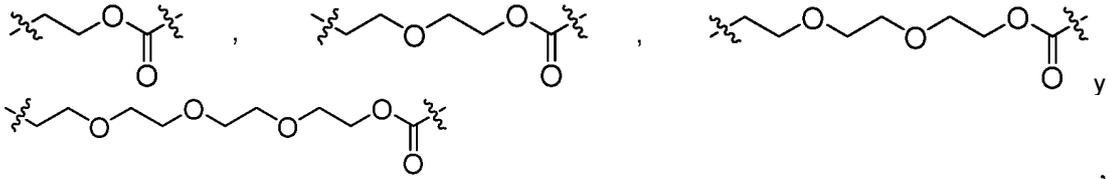
La presente invención se refiere a un nuevo método de purificación de una mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína, en particular de una mezcla que tiene un RFA promedio de aproximadamente 2-3 en el que la cantidad de anticuerpo no conjugado se encuentra en el intervalo de 10-40 % en peso.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de purificación de una mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína, de fórmula (I)



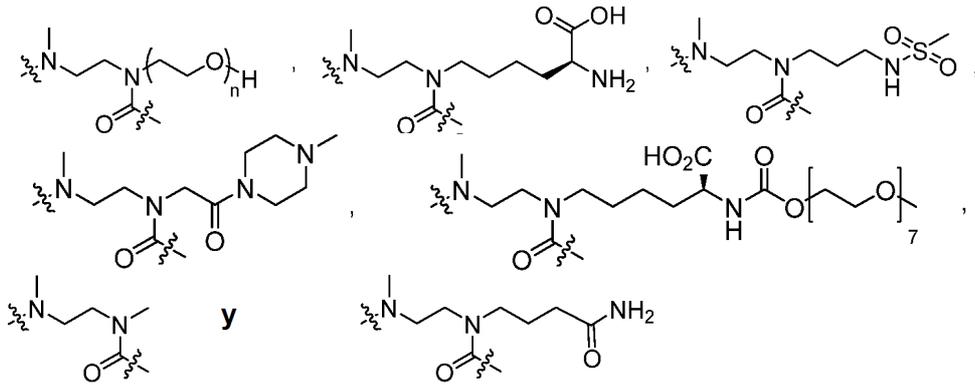
en la que

Ab es un anticuerpo,
L es un grupo enlazador seleccionado entre



V¹ es un dipéptido potencialmente escindible de aminoácidos naturales y/o no naturales,
 CL es un enlazador de ciclización seleccionado entre

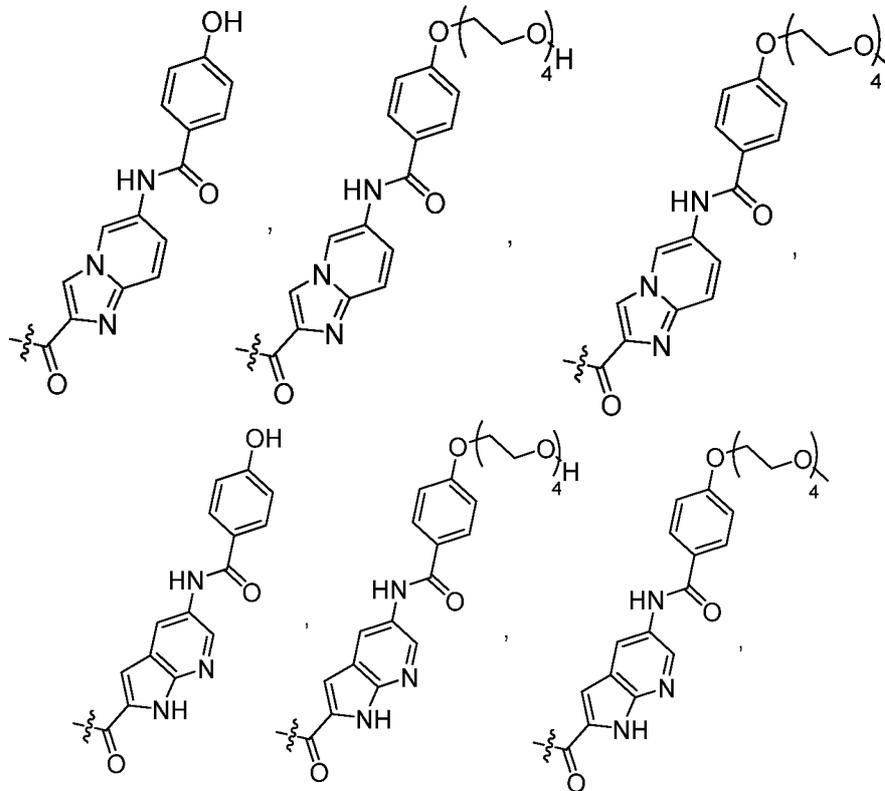
5

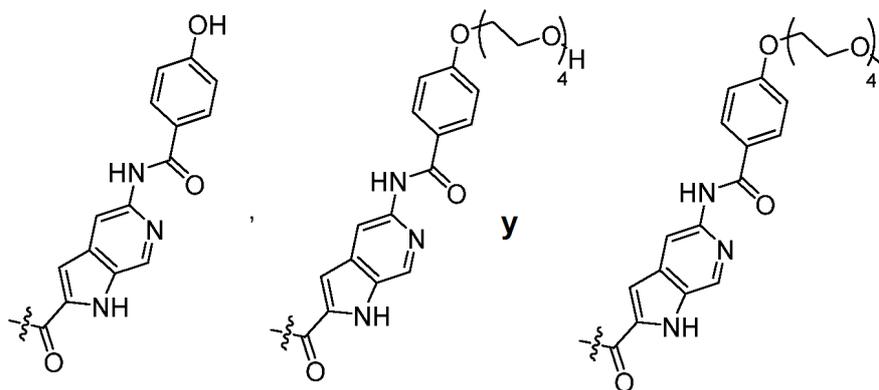


10

en el que n es un número entero de 1 a 16,
 R se selecciona entre H, CH₃, CH₂CH₃, OCH₃, OCH₂CH₃, CF₃, OCF₃, Cl, F,
 q oscila entre 0 y 8, y
 DB es una fracción de unión a ADN seleccionada entre

15





en la que la cantidad de anticuerpo no conjugado se encuentra en el intervalo de 10-40 % en peso que comprende:

5

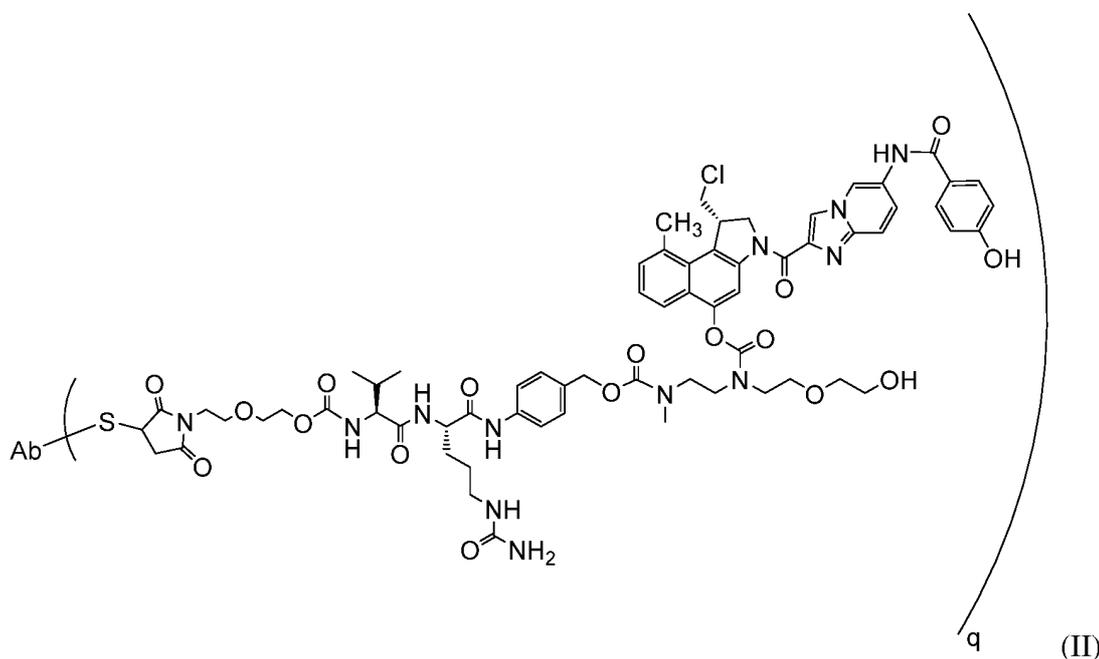
- proporcionar la mezcla en una solución salina acuosa a 0,2-1,5 M;
- cargar dicha solución en una columna de cromatografía por interacción hidrófoba preparativa;
- recoger una fracción de flujo que contiene un anticuerpo no conjugado;
- lavar dicha columna con una solución salina acuosa a 0,2-1,5 M mientras se recoge la fracción de flujo; y
- eluir dicha columna con una solución salina acuosa 0-100 mM para obtener una mezcla purificada de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína;

10

en el que ningún disolvente orgánico añadido se utiliza en la etapa a, b, d o e.

15

En una realización particularmente preferente de la presente invención, la mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína es de fórmula (II)



20 en la que

Ab es trastuzumab, y
q varía de 0 a 8.

25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un ejemplo de la influencia de la cantidad de reductor en la distribución de las especies RFA. Cuando se utilizan 1,0 equivalentes de reductor, el porcentaje de anticuerpo trastuzumab no conjugado RFA0 es de aproximadamente 20 % en peso.

30

La Figura 2 representa un cromatograma de CIH analítica de una mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco

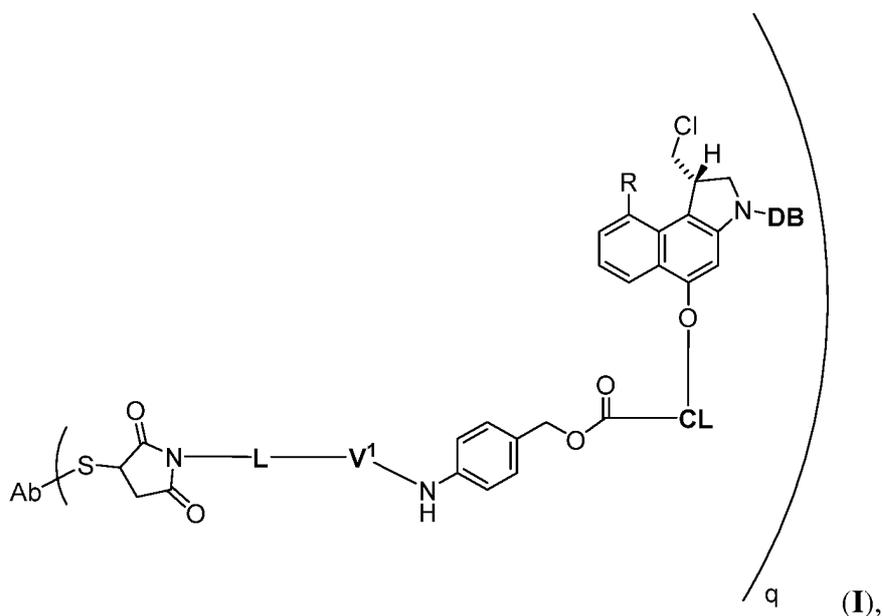
unidos a cisteína de acuerdo con la fórmula (II) antes y después de la purificación por CIH en una escala preparativa de acuerdo con la purificación en el Ejemplo 3.

La Figura 3 representa cromatogramas de CIH analítica de una mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína de acuerdo con la fórmula (II) antes y después de purificación por CIH en una escala preparativa de acuerdo con la purificación en el Ejemplo 4.

Descripción detallada de la invención

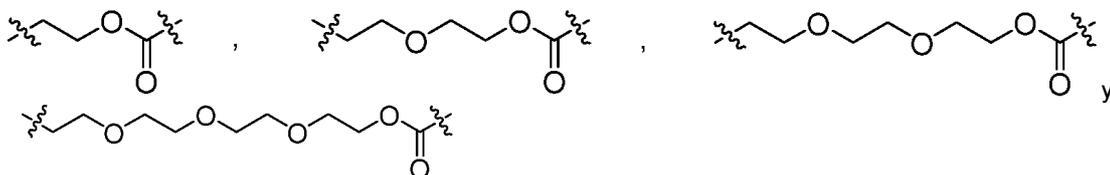
De acuerdo con la presente invención, se descubrió que una mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína (CAFs unidos a Cys) en la que la cantidad de anticuerpo no conjugado se encuentra en el intervalo de 10-40 % en peso se puede purificar ventajosamente a partir del anticuerpo no conjugado (RFA0) y un enlazador-fármaco no conjugado, que normalmente se inactivó después de la compleción de la reacción de conjugación, mediante cromatografía por interacción hidrófoba.

La presente invención se refiere a un método de purificación de una mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína, de fórmula (I)

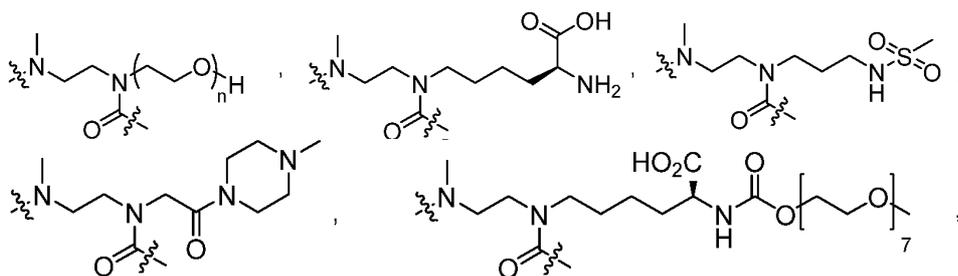


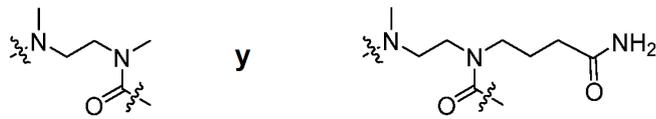
en la que

Ab es un anticuerpo,
L es un grupo de enlace seleccionado entre



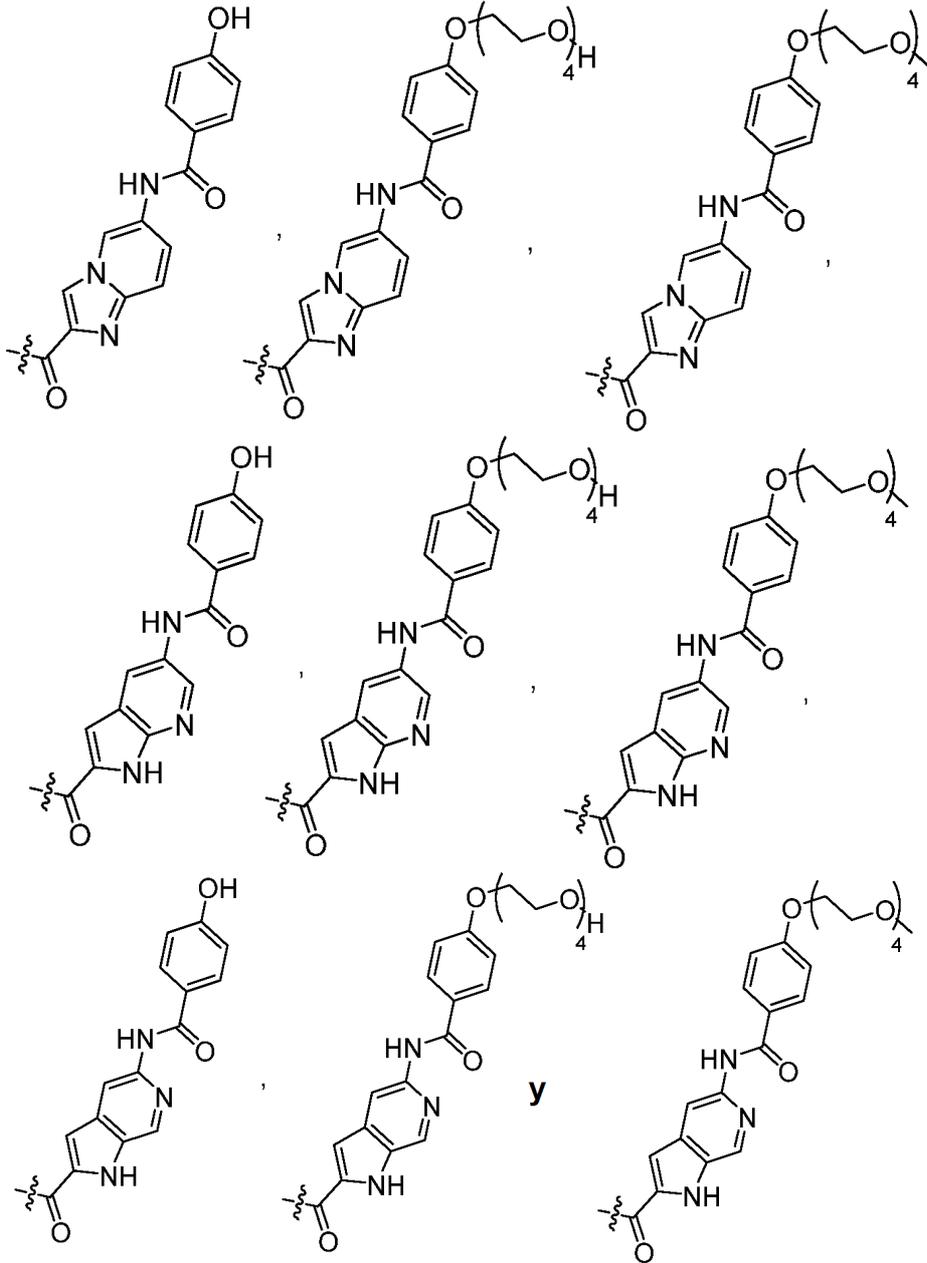
V¹ es un dipéptido potencialmente escindible de aminoácidos naturales y/o no naturales,
CL es un enlazador de ciclización seleccionado entre





en el que n es un número entero de 1 a 16,
 R se selecciona entre H, CH₃, CH₂CH₃, OCH₃, OCH₂CH₃, CF₃, OCF₃, Cl, F,
 q oscila entre 0 y 8, y
 DB es una fracción de unión a ADN seleccionada entre

5



10

en la que la cantidad de anticuerpo no conjugado se encuentra en el intervalo de 10-40 % en peso que comprende:

15

- a. proporcionar la mezcla en una solución salina acuosa a 0,2-1,5 M;
- b. cargar dicha solución en una columna de cromatografía por interacción hidrófoba preparativa;
- c. recoger una fracción de flujo que contiene un anticuerpo no conjugado;
- d. lavar dicha columna con una solución salina acuosa a 0,2-1,5 M mientras se recoge la fracción de flujo; y
- e. eluir dicha columna con una solución salina acuosa 0-100 mM para obtener una mezcla purificada de

conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína;

en el que ningún disolvente orgánico añadido se utiliza en la etapa a, b, d o e.

- 5 Dichas mezclas de CAFs unidos a Cys han sido descritas en detalle en el documento WO2010/062171 y en el documento WO2011/133039 del solicitante.

De acuerdo con el método de la presente invención, el dipéptido potencialmente escindible de aminoácidos naturales y/o no naturales se selecciona ventajosamente entre el grupo que consiste en fenilalanilisina, valilisina, valilalanina, alanilisina, valicitrulina, N-metilvalilcitrulina, fenilalanilcitrulina, isoleucilcitrulina, triptofanilisina, triptofanilcitrulina, fenilalanilarginina, fenilalanilalanina, fenilalanil-N⁹-tosilarginina, fenilalanil-N⁹-nitroarginina, leucilisina, leucilcitrulina y fenilalanil-O-benzoiltreonina. Preferentemente, el dipéptido es fenilalanilisina, valilisina o valilcitrulina.

15 De acuerdo con el método de la presente invención, el Ab se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo CD56, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD74, un anticuerpo anti-CD138, un anticuerpo anti-CLL-1, un anticuerpo anti-5T4, un anticuerpo anti-CD303, un anticuerpo anti-Tag 72, un anticuerpo anti-carbohidrato tipo Lewis A, un anticuerpo anti-EphB3, un anticuerpo anti-HMWV-MAA, un anticuerpo anti-CD38, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo anti-integrina, un anticuerpo anti-MN, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-CD203c, un anticuerpo anti-SLC44A4, un anticuerpo anti-Nectin-4, un anticuerpo anti-mesotelina, un anticuerpo anti-CD44, un anticuerpo anti-CD79, un anticuerpo anti-FcRL5, un anticuerpo anti-MUC16, un anticuerpo anti-NaPi2b, un anticuerpo anti-STEAP-1, un anticuerpo anti-ETBR, un anticuerpo anti-TF, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-HGFR, un anticuerpo anti-CD37, un anticuerpo anti-FOLR1, un anticuerpo anti-CEACAM, un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-GCC, un anticuerpo anti-Lewis Y, un anticuerpo anti-LIV1, un anticuerpo anti-DLL3 y un anticuerpo anti-EPCAM. El anticuerpo es preferentemente un anticuerpo monoclonal (AM).

De acuerdo con el método de la presente invención, el Ab, o preferentemente AM, es un anticuerpo anti-HER2.
30 Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-HER2, particularmente trastuzumab o un biosimilar del mismo.

En el contexto de la presente memoria descriptiva "sal" no se entiende como un "tampón" (sal). Ejemplos de sales y tampones adecuados para ser utilizados de acuerdo con el método de la presente invención se dan en la presente memoria a continuación. Ventajosamente, en el método de la presente invención se utilizan soluciones salinas acuosas tamponadas.

De acuerdo con el método de la presente invención, solo se utilizan soluciones acuosas, por ende, ningún disolvente orgánico añadido se utiliza, ya sea en la etapa a, b, d o e. Para ser claros, la etapa e se puede llevar a cabo en ausencia de sal.

El método reivindicado implica poner en contacto una mezcla de CAFs unidos a Cys con material de llenado de la columna CIH en una solución salina acuosa en condiciones de carga de columna que permiten la mezcla de anticuerpos cargados con 2 a 8 enlazadores-fármacos, el enlazador-fármaco no conjugado y las impurezas, normalmente agregados, se unen al material de llenado de la columna, mientras que el anticuerpo no conjugado no se une e inmediatamente se lava/fluye a través de la columna en condiciones de carga. La elución con una menor concentración de la solución salina acuosa separará los CAFs unidos a Cys del enlazador-fármaco no conjugado y las impurezas permanecen unidas al material de llenado de la columna/se quedan en la columna.

50 La solución salina acuosa utilizada para la carga (etapa b) y el lavado (etapa d) puede ser la misma o diferente. Ventajosamente, la solución salina acuosa utilizada para la carga (etapa b) y el lavado (etapa d) es la misma.

Como es conocido por el experto en la materia, y como se describe en el párrafo [0057] del documento US20100069617, la carga/unión y condiciones de elución óptimas en una columna de CIH dependerán de una serie de factores. Por lo tanto, la variación en las características de retención individuales de diferentes mezclas de CAFs, p. ej., debido a variaciones en anticuerpo, enlazador y fármaco, hace que sea deseable personalizar/optimar las condiciones operativas de la columna de CIH, de acuerdo con la presente invención. Esta optimización implica sobre todo la determinación de la hidrofobicidad de la mezcla de CAFs que han de ser purificados, p. ej., mediante la determinación de la hidrofobicidad (relativa) de las especies RFA2 de cualquier CAF específico, y la selección de la (hidrofobicidad de) material de llenado de la columna. Además implica elegir/optimar la carga/unión de la concentración salina acuosa, la elución de la concentración salina acuosa, la concentración de cualquier tamponante de sal y el pH.

Las mezclas de CAFs unidos a Cys de fórmulas (I) y (II) de acuerdo con la presente invención tienen el enlazador-fármaco conjugado con el anticuerpo a través del átomo S de un residuo de cisteína, es decir, que son conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína. Normalmente, el residuo de cisteína es un residuo de cisteína natural que está

presente en la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo (Ab) y forma enlaces disulfuro intercatenarios. La presente invención es particularmente creada para la purificación de compuestos de CAF en los que el enlazador-fármaco se conjuga a través de enlaces disulfuro intercatenarios de Abs, más particularmente AMs. Por ejemplo, los anticuerpos de IgG1 tienen normalmente cuatro enlaces disulfuro intercatenarios, los cuatro situados en la región bisagra de anticuerpos, y después de la reducción (parcial) de los enlaces disulfuro, el enlazador-fármaco está fijado al azar a grupos tiol libres.

Las mezclas de compuestos de CAF unidos a Cys de fórmulas (I) y (II) de acuerdo con la presente invención se pueden obtener de acuerdo con métodos y procedimientos que son bien conocidos por un experto en la materia. La conjugación a través de enlaces disulfuro intercatenarios puede ocurrir después de la reducción completa o parcial de dichos enlaces disulfuro. Los métodos adecuados de preparación de tales compuestos se pueden encontrar en la descripción y ejemplos del documento WO2011/133039 del solicitante. En particular, el Ejemplo 15 del documento WO2011/133039 describe la reducción parcial de trastuzumab para generar 2 grupos tiol libres por AM y la conjugación con un número de enlazadores-fármacos a CAFs que tienen un RFA medio de aprox. 2. Los Ejemplos 7 y 8 del documento WO2005/084390 describen estrategias de reducción parcial, reducción parcial/reoxidación parcial, y de reducción completa para la carga (parcial) de anticuerpos con el enlazador-fármaco vcMMAE.

La mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína (CAFs unidos a Cys) a purificar de acuerdo con la presente invención contiene una cantidad de anticuerpo no conjugado en el intervalo de 10-40 % en peso, más particularmente en el intervalo de 10-35 % en peso, incluso más particularmente en el intervalo de 15-35 % en peso. Es bien conocido en la técnica que la cantidad de anticuerpo no conjugado presente después de la conjugación disminuye con el aumento de la relación media fármaco a anticuerpo (RFA). Como un ejemplo, los presentes inventores han descubierto que cuando se utilizan más de 1,5 equivalentes de un agente reductor para reducir los puentes disulfuro intercatenarios del anticuerpo monoclonal trastuzumab, menos de 10 % en peso de anticuerpo no conjugado (RFA0) está presente en la mezcla de conjugados. Cuando se utilizan 1,0 equivalentes de un agente reductor, una cantidad máxima de aprox. 50 % en peso de RFA2 está presente en la mezcla de conjugados y el porcentaje de anticuerpo no conjugado (RFA0) trastuzumab es de aproximadamente 20 % en peso (véase la Figura 1). Cabe señalar que la distribución de especies RFA con la relación de reductor:AM varía dependiendo de los reactivos y las condiciones de reacción utilizados.

El método de acuerdo con la presente invención es particularmente ventajoso cuando el esfuerzo tiene un RFA promedio de aproximadamente 2-3, más particularmente de 2,6 a 2,9, aún más particularmente de 2,7 a 2,9.

La columna de CIH preparativa que se va a utilizar de acuerdo con el método de la presente invención puede ser cualquier columna preparativa que está disponible comercialmente. Los ejemplos de proveedores de tales columnas y/o de materiales de llenado de columna adecuados incluyen Tosoh Bioscience, GE Healthcare, Bio-Rad y Merck Millipore.

Dicha columna de CIH puede ser llenada con Fractogel EMD con propilo (Merck), Fractogel EMD con fenilo (Merck Millipore), butil-S sefarosa (GE Healthcare), octil sefarosa (GE Healthcare), Capto octilo (GE Healthcare), Capto butilo (GE Healthcare), Capto fenil ImpRes (GE Healthcare), Capto butil ImpRes (GE Healthcare), Toyopearl PPG-600M (Tosoh Bioscience), Toyopearl hexil-650 (Tosoh Bioscience), Toyopearl butil-650 (Tosoh Bioscience), Toyopearl fenil-650 (Tosoh Bioscience), Toyopearl éter-650 (Tosoh Bioscience), Macroprep t-butilo (Bio-Rad), Macroprep fenilo (Bio-Rad), Cellufine butilo (JNC Corporation), Cellufine fenilo (JNC Corporation) o Poros HP2 (Applied Biosystems).

Ventajosamente, dicha columna de CIH está llenada con resinas de butil-S sefarosa 6 de flujo rápido (FR) de GE Healthcare, Capto octilo, octil sefarosa 4 de flujo rápido, fenilo sefarosa 6 de flujo rápido, Capto butilo, butil sefarosa 4 de flujo rápido o Capto butil ImpRes, o resina Toyopearl PPG-600M de Tosoh Bioscience. La hidrofobicidad relativa y muchas otras características de los diversos materiales/resinas de llenado de columna se pueden derivar de folletos informativos sobre dichas resinas que se pueden obtener de los proveedores. Preferentemente, de acuerdo con el método de la presente invención, la columna de CIH está llenada con butil-S sefarosa 6 FR, Capto butilo, butil sefarosa 4 FR, Capto Butil ImpRes o Toyopearl PPG-600M, más preferentemente está llenada con butil sefarosa 4 FR, Capto butil ImpRes o Toyopearl PPG-600M, lo más preferentemente está llenada con butil sefarosa 4 FR o Toyopearl PPG-600M.

Normalmente, de acuerdo con el método de la presente invención, la altura del lecho de la columna es de aproximadamente 20-25 cm, ventajosamente aproximadamente 20 cm, y la presión en la columna se mantuvo por debajo de 2 bar.

Las dimensiones de la columna son dictadas por la cantidad de material de CAF que se desea o necesita cargar en la columna de CIH. Como es bien conocido por el experto en la materia, la cantidad de material de CAF que se puede cargar aumenta con un diámetro interno de la columna y longitud de la columna.

La columna de CIH preparativa que se va a utilizar de acuerdo con el método de la presente invención tiene normalmente un diámetro en el intervalo de 4,0-2.000 mm, preferentemente 15-2.000 mm, más preferentemente 80-

- 2.000 mm, lo más preferentemente 400-2.000 mm. Cuanto mayor sea el diámetro de la columna, más material de CAF puede cargarse en la parte superior de la columna. Ventajosamente, ya que se eligen así las condiciones de carga y lavado de la columna por el que el anticuerpo no conjugado (RFA0) que fluye a través de la columna, la capacidad de la columna aumenta. Por ejemplo, si la cantidad de anticuerpo no conjugado presente en la mezcla de
- 5 CFAs unidos a Cys es 30 % en peso, el proceso de purificación de acuerdo con la presente invención permite una carga aproximadamente un 30 % mayor de dicha columna.
- La cantidad de material de CAF que se carga en la columna preparativa utilizada de acuerdo con el método de la presente invención está normalmente en el intervalo de 5-50 g/l, preferentemente en el intervalo de 5-40 g/l, más
- 10 preferentemente 10-40 g/l, incluso más preferentemente 30-40 g/l de material de llenado de la columna.
- De acuerdo con el método de la presente invención, de manera ventajosa, las cantidades de lote de 20 a 2.000 g se pueden purificar, haciendo que el proceso de purificación por CIH actualmente reivindicado sea adecuado para una
- 15 producción a escala industrial del material de CAF con BPM (Buenas Prácticas de Manufactura).
- Aparte del diámetro y la longitud de la columna, también el tamaño promedio de partículas (d_{50} , volumen, tamaño medio de partículas de la distribución de volumen acumulativo) del material de llenado de la columna es de relevancia.
- 20 De acuerdo con el método de la presente invención, el tamaño de partículas elegido permite una buena separación a un caudal mínimo. De acuerdo con el método de la presente invención, el material de llenado de columna tiene un tamaño de partículas en el intervalo de 30-180 μm . Preferentemente, el material de llenado de la columna tiene un tamaño de partículas en el intervalo de 35-100 μm ; incluso más preferentemente, el material de llenado de la
- 25 columna tiene un tamaño de partículas en el intervalo de 45-90 μm .
- De acuerdo con el método de la presente invención, el caudal está en el intervalo de 50-300 cm/h. Preferentemente, el caudal está en el intervalo de 80-250 cm/h, más preferentemente 100-220 cm/h, más preferentemente de aproximadamente 100-110 cm/h.
- 30 De acuerdo con el método de la presente invención, la elución en la etapa e o bien se lleva a cabo en un modo normal (es decir, el flujo durante la elución se encuentra en la misma dirección que el flujo durante la carga y lavado) o bien en un modo inverso (es decir, el flujo durante la elución se encuentra en la dirección opuesta que el flujo durante la carga y lavado). La elución en modo inverso de la mezcla purificada de CAFs unidos a Cys es particularmente ventajosa en caso de que la (reacción de conjugación) mezcla de CAFs se purifique a partir de
- 35 enlazador-fármaco no conjugado, p. ej., sometiendo dicha (reacción de conjugación) mezcla a (p. ej., carbón activado) filtración antes de aplicar el método reivindicado de purificación.
- Ventajosamente, la sal de la solución salina acuosa se selecciona entre el grupo que consiste de tiocianato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio y sulfato de amonio. Preferentemente, la sal es cloruro de sodio o sulfato de amonio. Más preferentemente, la sal es sulfato de
- 40 amonio.
- De acuerdo con el método de la presente invención, la sal de la solución salina acuosa para la carga (etapa b) y el lavado (etapa d) puede ser la misma o diferente de la sal de la solución salina acuosa para la elución (etapa e).
- 45 Ventajosamente, la misma sal se utiliza para las etapas b, d y e.
- De acuerdo con el método de la presente invención, la solución salina acuosa para la carga (etapa b) y lavado de la columna (etapa d) tiene una concentración de 0,2-1,5 M. Preferentemente, la solución salina acuosa tiene una concentración de 0,2-1,0 M, más preferentemente de 0,45-0,9 M, lo más preferentemente de 0,55-0,9 M.
- 50 De acuerdo con el método de la presente invención, la solución salina acuosa para eluir la columna (etapa e) tiene una concentración de 0-100 mM. Preferentemente, la solución salina acuosa tiene una concentración de 0-90 mM, más preferentemente 0-80 mM, incluso más preferentemente 0-70 mM, lo más preferentemente 0-55 mM.
- 55 De acuerdo con el método de la presente invención, preferentemente la solución salina acuosa contiene además un tampón. Ventajosamente, cuando la solución salina acuosa tiene una concentración de 0 mM (etapa e), contiene un tampón. Ventajosamente, el tampón se selecciona entre el grupo que consiste en fosfato de sodio, fosfato de potasio, fosfato de amonio, acetato de sodio, acetato de potasio, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de amonio y mezclas de los mismos. Preferentemente, el tampón es un fosfato, acetato o citrato, o una mezcla de los
- 60 mismos, tal como un tampón de citrato y fosfato. Más preferentemente, el tampón es fosfato de sodio o acetato de sodio.
- De acuerdo con el método de la presente invención, el tampón para la carga (etapa b), lavado (etapa d) y elución de la columna (etapa e) tiene una concentración de 0-100 mM, con preferencia 0-50 mM, más preferentemente 20-30
- 65 mm. Ventajosamente, una solución salina acuosa tamponada se utiliza en todas las etapas (etapa a hasta e) del método de la presente invención.

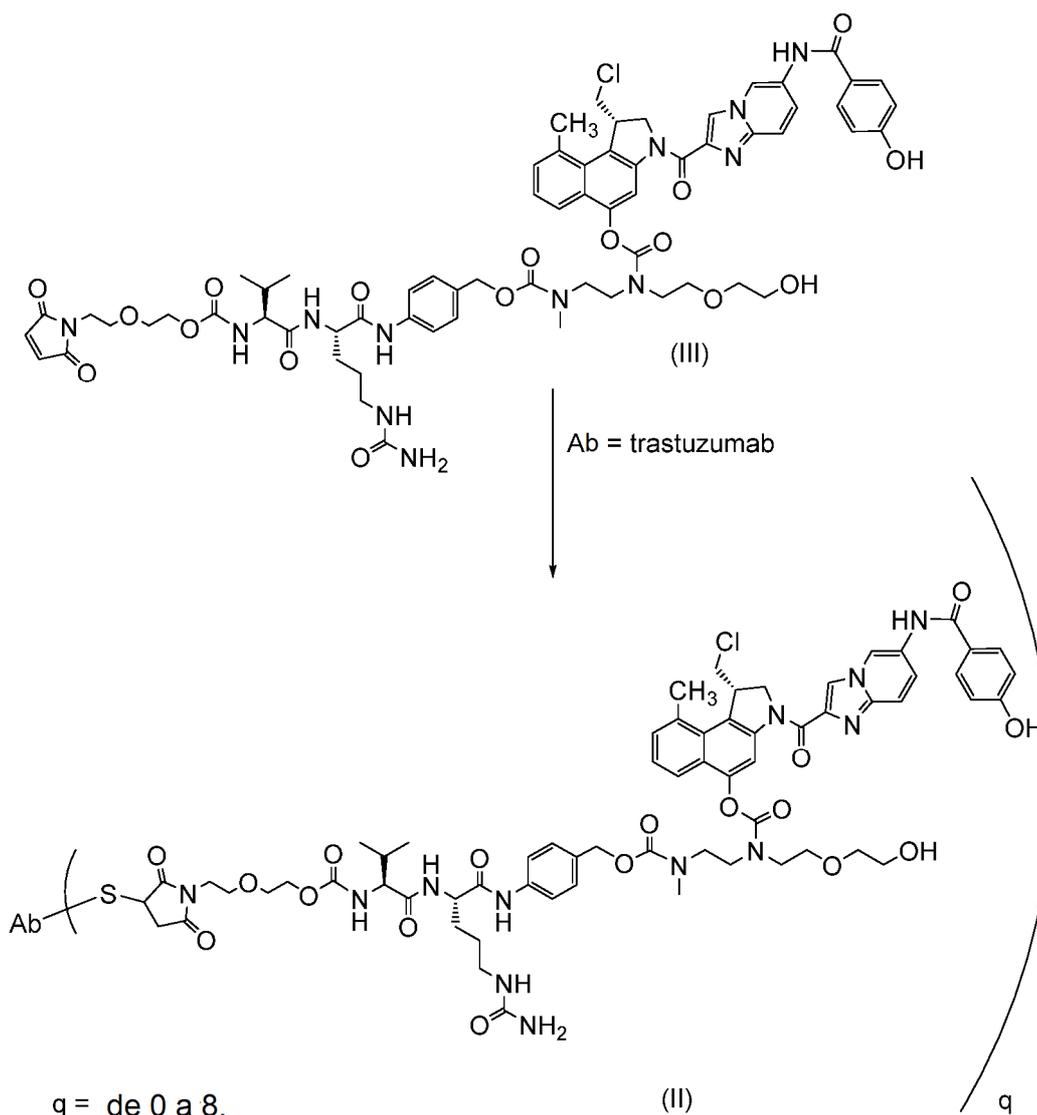
La solución salina acuosa tamponada que se utiliza ventajosamente de acuerdo con el método de la presente invención está tamponada preferentemente a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, más preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, más preferentemente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5.

5 La cromatografía por interacción hidrófoba de CAFs de acuerdo con el método de la presente invención hace uso de las diferencias en las propiedades hidrófobas de anticuerpos no conjugados, anticuerpos cargados con hasta 8 enlazadores-fármacos, enlazador-fármaco no conjugado y las impurezas, es decir, agregados, con el fin de conseguir la separación y el aislamiento de una mezcla purificada de CAFs unidos a Cys. Cuanto más hidrófobo es el anticuerpo, CAF, enlazador-fármaco o impureza, mejor va a interactuar con el material de llenado de la columna.

15 De acuerdo con el método de la presente invención, la hidrofobicidad del CAF deseado comprendido en la mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína se mide mediante la determinación del tiempo de retención en una columna CIH analítica con relación a una referencia, es decir, el tiempo de retención del AM trastuzumab disponible en el mercado (Herceptin®, Roche/Genentech). Para medir la hidrofobicidad, una muestra de CAF se prepara con una concentración final de 1 mg/ml de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína en sulfato de amonio 0,8 M y la columna CIH analítica utilizada es una columna TSKgel butil-NPR (Tosoh Bioscience). La muestra de CAF se eluye utilizando un gradiente lineal de 100 % de tampón C (fosfato de sodio 25 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 6,95) a 100 % de tampón D (fosfato de sodio 25 mM, pH 6,95, 20 % de isopropanol) a 0,4 ml/min durante 20 minutos y el tiempo de retención de las especies RFA2 en la muestra de CAF se mide por la absorbancia a 214 nm relativa a trastuzumab (Herceptin®).

25 De acuerdo con el método de la presente invención, utilizando la columna CIH analítica y el método descrito en el párrafo anterior, la especie de CAF unido a Cys RFA2 tiene una hidrofobicidad relativa en el intervalo de 0,1-0,6, en particular 0,2-0,5, más particularmente 0,2-0,45, trastuzumab (Herceptin®) tiene un tiempo de retención (Tr) de 6,7 minutos.

30 En una realización específica del método de la presente invención, una mezcla de CAFs unidos a Cys de acuerdo con la fórmula (II) se prepara mediante el uso del anticuerpo trastuzumab o un biosimilar del mismo, cuyo anticuerpo se reduce con tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 1,1 equivalentes molares por mol de anticuerpo) y se hace reaccionar con el enlazador-fármaco de fórmula (III) (1,3 equivalentes molares por grupo tiol libre). La conjugación se lleva a cabo normalmente en N,N-dimetilacetamida (DMAc) o sulfóxido de dimetilo (DMSO), preferentemente en DMAc.



$q = \text{de } 0 \text{ a } 8.$

(II)

q

5 En ciertas realizaciones del procedimiento de la presente invención, la mezcla de reacción de conjugación se trata con una solución madre de N-acetil cisteína (1 equivalente molar por conjugado enlazador-fármaco) para bloquear los grupos reactivos del enlazador-fármaco no conjugado de fórmula (III).

10 En ciertas realizaciones del procedimiento de la presente invención, la mezcla de reacción de conjugación se somete a una etapa de filtración para eliminar el exceso insoluble de enlazador-fármaco de fórmula (III). Eliminar el exceso de enlazador-fármaco antes de cargar la mezcla de reacción en la columna aumenta la capacidad de la columna. Se pueden utilizar filtros bien conocidos por los expertos en la materia. Normalmente, la etapa de filtración implica el uso de un pre-filtro seguido de un filtro con una calificación de tamaño de poro absoluto. Los pre-filtros adecuados son filtros de profundidad que contienen carbón activado. Se prefieren los filtros tales como ZetaCarbon SLP (3M).

15 Los filtros de tamaño de poro absoluto adecuados están fabricados de poliétersulfona (PES), acetato de celulosa (AC) o difluoruro de polivinilideno (PVDF). Los filtros preferidos son filtros de PVDF o PES, normalmente con un tamaño de poro absoluto de 0,2 μm .

20 En ciertas realizaciones del método de la presente invención, la mezcla de reacción de conjugación se prepara para la purificación en columna CIH mediante el uso de fosfato de sodio y sulfato de amonio, ajustada a una concentración final de 20-30 mM de fosfato de sodio y sulfato de amonio 0,55-0,65 M a pH 6,0-6,5 (tampón A).

25 En realizaciones alternativas del método de la presente invención, la mezcla de reacción de conjugación se prepara para la purificación en columna CIH mediante el uso de acetato de sodio y sulfato de amonio, ajustada a una concentración final de acetato de sodio 20-30 mM y sulfato de amonio 0,55-0,9 M a pH 5,0-5,5 (tampón A).

En una realización específica del método de la presente invención, el método implica el uso de una columna de CIH

(8 cm x 20 cm, butil sefarosa 4 de flujo rápido), que primero se equilibra con tres volúmenes de columna de tampón A (fosfato de sodio 20-30 mM, sulfato de amonio 0,55-0,65 M, pH 6,0-6,5) a un caudal de 100 cm/h, seguido por la carga en la columna de la mezcla de reacción de conjugación en tampón A (etapa b) y la recogida de una fracción de flujo que contiene el anticuerpo no conjugado (etapa c).

5 La etapa d implica lavar la columna de CIH con tres volúmenes de columna del mismo tampón A (fosfato de sodio 20-30 mM, sulfato de amonio 0,55-0,65 M, pH 6,0-6,5) a un caudal de 100 cm/h mientras que se recoge la fracción de flujo, eliminando de este modo las cantidades residuales de anticuerpo no conjugado.

10 La etapa e implica eluir la columna de CIH con tres volúmenes de columna de tampón B (fosfato de sodio 20-30 mM, sulfato de amonio 45-55 mM, pH 6,0-6,5) a un caudal de 100 cm/h para obtener la mezcla purificada de CAFs unidos a Cys. Dicha elución se puede realizar ya sea en un modo normal o en un modo inverso (como se ha explicado anteriormente).

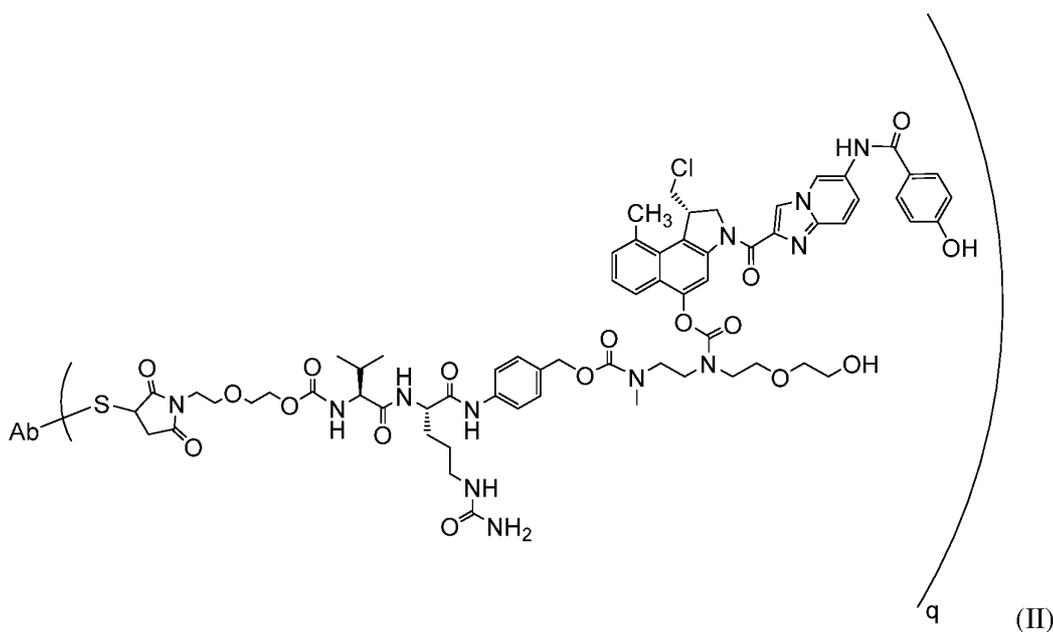
15 En otra realización específica del método de la presente invención, el método implica el uso de una columna de CIH (1 cm x 20 cm, Toyopearl PPG-600M), que primero se equilibra con tres volúmenes de columna de tampón A (acetato de sodio 20-30 mM, sulfato de amonio 0,55-0,9 M, pH 5,0-5,5) a un caudal de 100 cm/h, seguido por la carga en la columna de la mezcla de reacción de conjugación en tampón A (etapa b) y recogida de una fracción de flujo que contiene un anticuerpo no conjugado (etapa c).

20 Después de la carga, la columna CIH se lava con tres volúmenes de columna del mismo tampón A (acetato de sodio 20-30 mM, sulfato de amonio 0,55-0,9 M, pH 5,0-5,5) a un caudal de 100 cm/h mientras se recoge la fracción de flujo, eliminando de este modo las cantidades residuales de anticuerpo no conjugado.

25 La etapa e implica eluir la columna de CIH con tres volúmenes de columna de tampón B (acetato de sodio 20-30 mM, pH 5,0-5,5) a un caudal de 50-100 cm/h para obtener la mezcla purificada de CAFs unidos a Cys. Dicha elución se puede realizar ya sea en un modo normal o en un modo inverso (como se ha explicado anteriormente).

30 Como resultado, la mezcla de CAFs unidos a Cys se purifica para dar predominantemente la especie RFA2 y RFA4 deseadas. En las condiciones anteriores, la mayoría de las especies RFA6 y RFA8, el enlazador-fármaco no conjugado, así como cualquier impureza de agregados permanece en la columna de CIH. Al lavar la columna de CIH con agua para inyección (API) las especies RFA6 y RFA8 así como el enlazador-fármaco no conjugado se pueden eluir de la columna.

35 El método de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuado para la purificación de una mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína de fórmula (II)



40 en la que
 Ab es trastuzumab y
 q varía de 0 a 8.

Como resultado de utilizar el método de purificación de una mezcla de CAFs unidos a Cys de acuerdo con la presente invención, al eliminar notablemente un anticuerpo no conjugado a partir de dicha mezcla de CAFs, la media de RFA aumenta. Por ejemplo, como se muestra a continuación en el Ejemplo 3, RFA promedio de un compuesto CAF unido a Cys de acuerdo con la fórmula (II) se incrementa de 1,75 a 2,5 después de la purificación por CIH.

5 Después de la purificación por CIH, el tampón del CAF unido a Cys purificado normalmente se cambia en un tampón de liofilización y, posteriormente, el CAF unido a Cys se liofiliza para dar una torta liofilizada utilizando métodos y equipos convencionales.

10 Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de la solución enlazador-fármaco del compuesto de fórmula (III)

15 En el entorno de protección de un aislador (caja de guantes), una cantidad suficiente de sólido del compuesto de fórmula (III) se pesó en una botella. El sólido se disolvió en 100 % de DMAc a una concentración de aprox. 20 mM. A continuación, la botella se sacó del aislador y se almacenó a temperatura ambiente, pero protegida de la luz, en una campana extractora.

20 Después de determinar la concentración exacta, la solución enlazador-fármaco se diluyó a 40 mM.

Ejemplo 2 - Conjugación del enlazador-fármaco con trastuzumab

25 El anticuerpo monoclonal (AM) anti-HER2 trastuzumab se conjugó con el enlazador-fármaco de fórmula (III) dando una mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína de fórmula (II).

Todas las manipulaciones se realizaron bajo agitación continua en una campana extractora.

30 Inmediatamente antes de la conjugación, una solución de 60 mg/ml de trastuzumab en histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, 0,01 % de polisorbato 20, pH 6 se mezcló 2:1 con tampón de reducción (histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, EDTA 3 mM (ácido etilendiaminotetraacético) y 1 mM TCEP, pH 6). TCEP es el agente reductor y se añade en una relación molar de 1,15 equivalentes molares por 1 equivalente de trastuzumab para generar 2 grupos tiol libres por AM. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 60 min, una solución de N,N-dimetilacetamida (DMAc) (100 %) y el enlazador-fármaco de fórmula (III) (10 mM en DMAc, 2,2 equivalentes con respecto al AM) se añadieron de tal manera que la final concentración de DMAc era 2,5 % v/v.

35 Después de la conjugación durante una noche, la mezcla se filtró a través de un filtro de carbón activado (ZetaCarbon SLP, 3M) seguido de un filtro de 0,2 µm de poliétersulfona (PES) para eliminar el exceso insoluble del enlazador-fármaco de fórmula (III).

40 La Figura 2A y 3A muestran el cromatograma de la mezcla de reacción de conjugación obtenida de dos lotes diferentes en una columna de CIH analítica (descrito en la presente memoria a continuación). No se detectó RFA8. Se calculó que el promedio de RFA era 1,75.

Ejemplo 3 - Purificación utilizando CIH

45 Todas las etapas cromatográficas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

50 La mezcla de reacción de conjugación obtenida anteriormente se preparó por purificación en columna de CIH mediante la mezcla con un tampón de fosfato de sodio (84 mM) y sulfato de amonio (2,21 M) en una relación de 1 volumen de tampón a 2 volúmenes de mezcla de reacción de conjugación a una concentración final de fosfato de sodio (26 mM) y sulfato de amonio (0,62 M) a pH 6,5.

55 Una columna preparativa de 8 cm x 20 cm se llenó con butil sefarosa 4 de flujo rápido (GE Healthcare). La columna se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón A (fosfato de sodio 26 mM, sulfato de amonio 0,62 M, pH 6,5) a un caudal de 100 cm/h. La mezcla de reacción de conjugación se cargó en la columna hasta 10 g/l de material/resina de llenado de la columna. El caudal se fijó en 100 cm/h. En estas condiciones, el anticuerpo no conjugado (es decir, trastuzumab) no se unió a la columna/flujo y se lavó adicionalmente la columna con 3 volúmenes de columna de tampón A (fosfato de sodio 26 mM, sulfato de amonio 0,62 M, pH 6,5) a un caudal de 100 cm/h. La fracción de flujo de carga y lavado se recogió y se combinó. La elución de las especies RFA2 y RFA4 de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína se realizó por elución con 3 volúmenes de columna de tampón B (fosfato de sodio 25 mM, sulfato de amonio 50 mM, pH 6,2) a un caudal de 100 cm/h. En estas condiciones, cualquier enlazador-fármaco no conjugado restante y la mayoría de los conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína RFA6 se mantuvieron en la columna. Lavar la columna con 2 volúmenes de columna de agua para inyección (API) a un caudal de 100 cm/h eluyó cualquier enlazador-fármaco no conjugado restante y la mayoría de los conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína RFA6.

65

La Figura 2B muestra el cromatograma de la mezcla de reacción de conjugación en una columna analítica CIH (descrito en la presente memoria más adelante) después de la purificación por CIH en una escala preparativa. No fue detectable RFA0. Se calculó que el promedio de RFA era 2,50.

5 Ejemplo 4 - Purificación alternativa utilizando CIH

Todas las etapas cromatográficas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

10 Un lote separado de una mezcla de reacción de conjugación como se ha obtenido anteriormente se preparó por purificación en columna de CIH mediante la mezcla con un tampón de acetato de sodio (75 mM) y sulfato de amonio (2,4 M) en una relación de 1 volumen de tampón a 2 volúmenes de mezcla de reacción de conjugación a una concentración final de acetato de sodio (25 mM) y sulfato de amonio (0,8 M) a pH 5,3.

15 Una columna preparativa de 1 cm x 20 cm se llenó con Toyopearl PPG-600M (Tosoh Bioscience). La columna se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón A (acetato de sodio 25 mM, sulfato de amonio 0,8 M, pH 5,3) a un caudal de 100 cm/h. La mezcla de reacción de conjugación se cargó en la columna hasta 35 g/l de material/resina de llenado de la columna. El caudal se fijó en 100 cm/h. En estas condiciones, el anticuerpo no conjugado (es decir, trastuzumab) no se unió a la columna/flujo, y se lavó adicionalmente la columna con 3,5 volúmenes de columna de tampón A (acetato de sodio 25 mM, sulfato de amonio 0,8 M, pH 5,3) a un caudal de 100 cm/h. La fracción de flujo de carga y lavado se recogió y se combinó. La elución de las especies RFA2 y RFA4 de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína se realizó mediante elución con 3,5 volúmenes de columna de tampón B (acetato de sodio 25 mM, pH 5,3) a un caudal de 100 cm/h. En estas condiciones, cualquier enlazador-fármaco no conjugado restante y la mayoría de los conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína RFA6 se mantuvieron en la columna. Lavar la columna con 2 volúmenes de columna con 40 % de isopropanol a un caudal de 100 cm/h eluyó cualquier enlazador-fármaco no conjugado restante y la mayoría de los conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína RFA6.

La Figura 3B muestra el cromatograma de la mezcla de reacción de conjugación en una columna de CIH analítica (descrito en la presente memoria más adelante) después de la purificación por CIH en una escala preparativa. RFA0 no era detectable. Se calculó que el promedio de RFA era 2,80.

30

Ejemplo 5 - Análisis que utiliza CIH analítica

El análisis de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína se realizó por cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) analítica. La muestra se preparó por dilución de 10 µl de conjugado anticuerpo-fármaco unido a cisteína con 90 µl de solución de sulfato de amonio acuoso 0,89 M que resulta en una concentración final de 1 mg/ml de conjugado anticuerpo-fármaco unido a cisteína en sulfato de amonio 0,8 M. 10 µl de la muestra se inyectaron en una columna de TSKgel butil-NPR (Tosoh Bioscience). El método de elución consistió en un gradiente lineal de tampón C al 100 % (fosfato de sodio 25 mM, M sulfato de amonio 1,5, pH 6,95) al 100 % de tampón D (fosfato de sodio 25 mM, pH 6,95, 20 % de isopropanol) a 0,4 ml/min durante 20 minutos. Se utilizó un sistema Waters Acquity UPLC H-Class equipado con un detector PDA y software Empower. Se midió la absorbancia a 214 nm y se determinó el tiempo de retención de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína.

40

El mismo método de análisis se aplicó sobre una muestra de trastuzumab/Herceptin®, cuya muestra se preparó como se ha descrito anteriormente y a partir de cuya muestra se midió el tiempo de retención a 214 nm.

45

Ejemplo 6 - Determinación de hidrofobicidad relativa

La hidrofobicidad relativa de una especie de conjugado anticuerpo-fármaco unido a cisteína RFA2 se calculó utilizando el tiempo de retención (Tr) de dichas especies RFA2 en la mezcla de CAFs unidos a Cys y el tiempo de retención de trastuzumab/Herceptin® utilizando la siguiente fórmula:

50

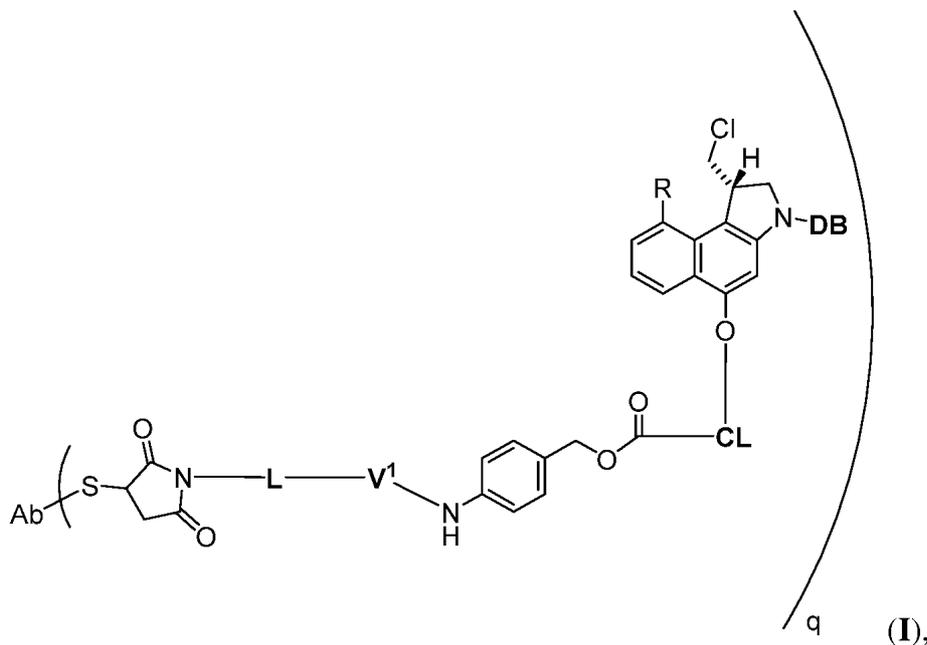
$$[\text{Tr (RFA2)} - \text{Tr(trastuzumab/Herceptin®)}] / \text{Tr(trastuzumab/Herceptin®)}$$

Las especies RFA2 del conjugado anticuerpo-fármaco unido a cisteína de fórmula (II) mostraron un tiempo de retención de 9,6 minutos y una hidrofobicidad relativa de 0,4 en la columna de CIH analítica que se ha descrito anteriormente, cuando el tiempo de retención de trastuzumab/Herceptin® fue de 6,7 minutos.

55

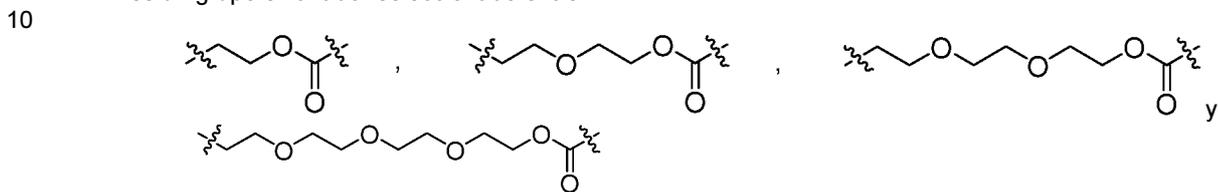
REIVINDICACIONES

1. Un método de purificación de una mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína de fórmula (I)

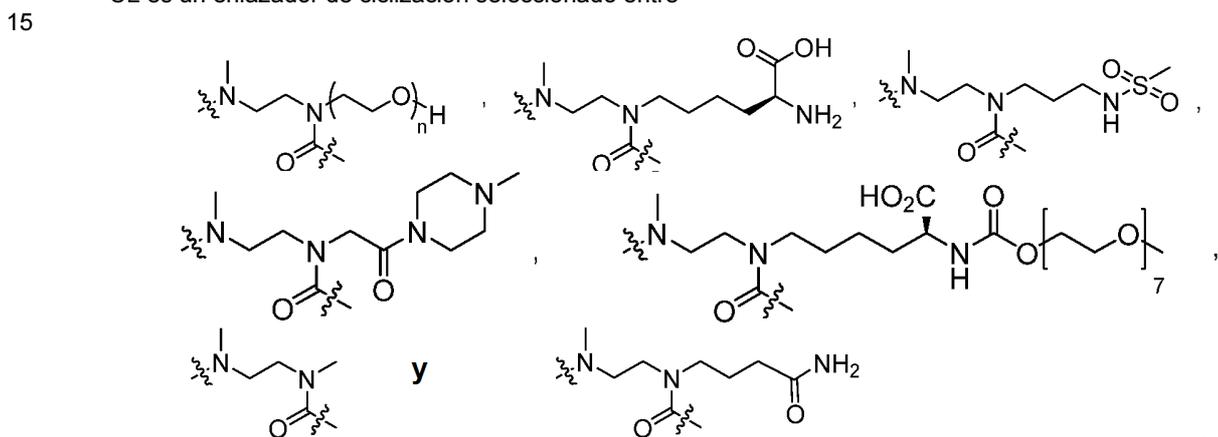


5 en la que

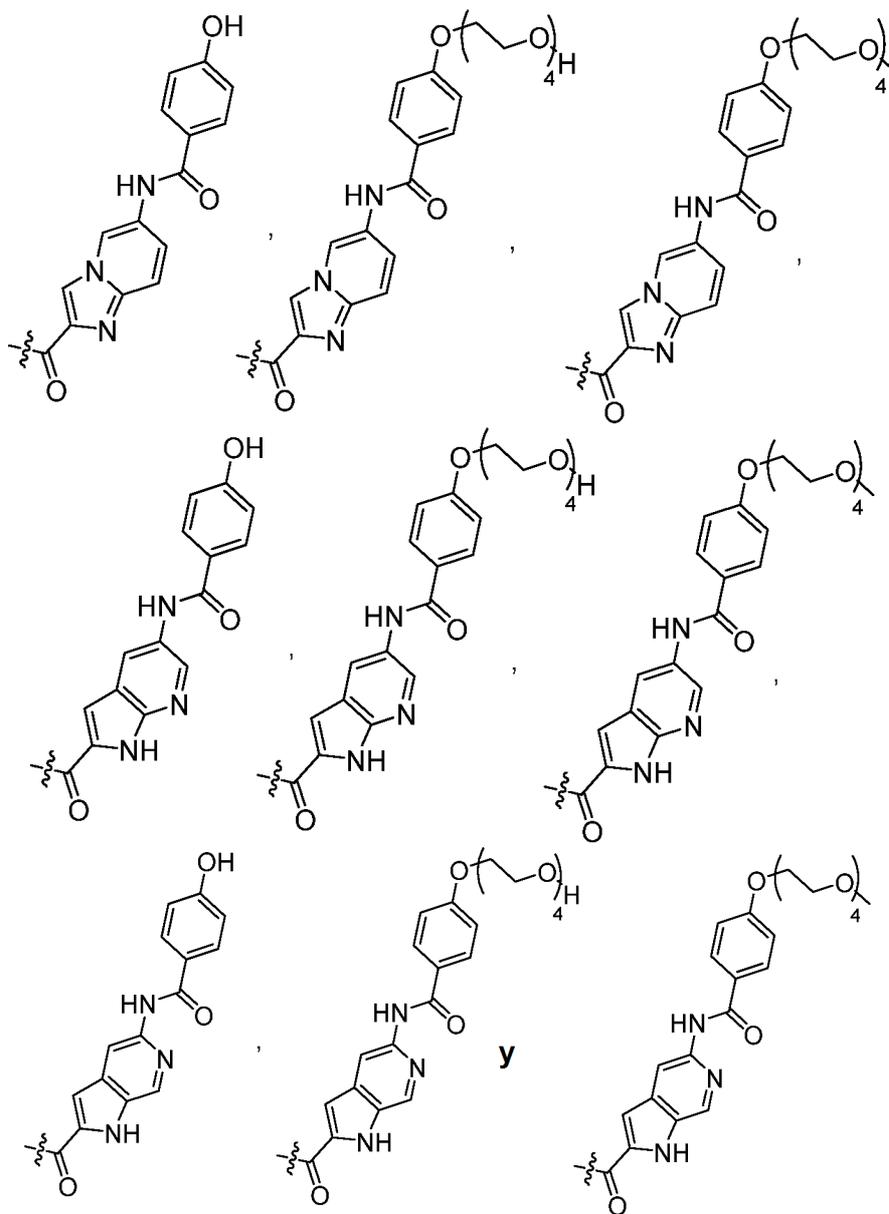
Ab es un anticuerpo,
L es un grupo enlazador seleccionado entre



V¹ es un dipéptido potencialmente escindible de aminoácidos naturales y/o no naturales,
CL es un enlazador de ciclización seleccionado entre



20 en donde n es un número entero de 1 a 16,
R se selecciona entre H, CH₃, CH₂CH₃, OCH₃, OCH₂CH₃, CF₃, OCF₃, Cl, F,
q oscila entre 0 y 8, y
DB es una fracción de unión a ADN seleccionada entre



5 en donde la cantidad de anticuerpo no conjugado se encuentra en el intervalo del 10-40 %, en peso que comprende:

- a. proporcionar la mezcla en una solución salina acuosa a 0,2-1,5 M;
- b. cargar dicha solución en una columna de cromatografía por interacción hidrófoba preparativa;
- 10 c. recoger una fracción de flujo que contiene un anticuerpo no conjugado;
- d. lavar dicha columna con una solución salina acuosa a 0,2-1,5 M mientras se recoge la fracción de flujo; y
- e. eluir dicha columna con una solución salina acuosa a 0-100 mM para obtener una mezcla purificada de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína.

15 en donde no se usa ningún disolvente orgánico añadido en las etapas a, b, d o e.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha columna se llena con Fractogel EMD propilo, Fractogel EMD fenilo, butil-S sefarosa, octil sefarosa, Capto octilo, Capto butilo, Capto fenil ImpRes, Capto butil ImpRes, Toyopearl PPG-600M, Toyopearl hexil-650, Toyopearl butil-650, Toyopearl fenil-650, Toyopearl éter-650, 20 Macroprep t-butilo, Macroprep fenilo, Cellufine butilo, Cellufine fenilo o Poros HP2.

3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha columna tiene un diámetro en el intervalo de 4,0-2.000 mm, preferentemente 15-2.000 mm.

25 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la carga de la columna está en

el intervalo de 5-50 g/l, preferentemente 5-40 g/l de material de llenado de la columna.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el material de llenado de la columna tiene un tamaño medio de partícula en el intervalo de 30-180 µm.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la sal de la solución salina acuosa se selecciona entre el grupo que consiste de tiocianato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio y sulfato de amonio, preferentemente la sal es cloruro de sodio o sulfato de amonio.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la solución salina acuosa contiene además un tampón.

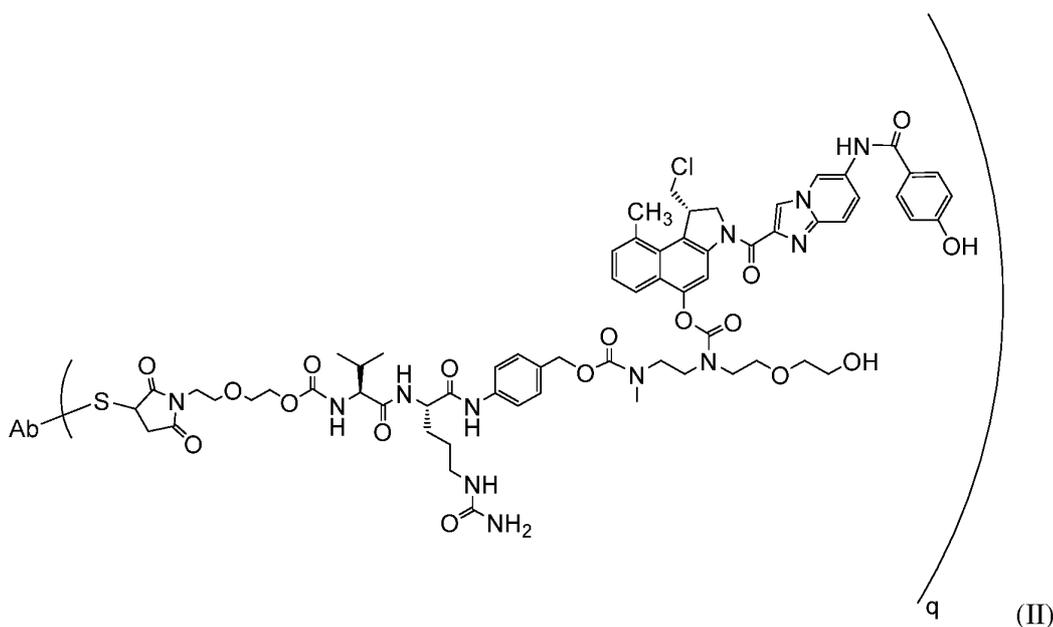
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el tampón se selecciona entre el grupo que consiste en fosfato de sodio, fosfato de potasio, fosfato de amonio, acetato de sodio, acetato de potasio, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de amonio y mezclas de los mismos, preferentemente el tampón es fosfato de sodio o acetato de sodio.

9. El método de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en el que dicha solución salina acuosa está tamponada a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la elución en la etapa e se realiza en modo inverso.

11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el Ac se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo CD56, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD74, un anticuerpo anti-CD138, un anticuerpo anti-CLL-1, un anticuerpo anti-5T4, un anticuerpo anti-CD303, un anticuerpo anti-Tag 72, un anticuerpo anti-carbohidrato de tipo Lewis A, un anticuerpo anti-EphB3, un anticuerpo anti-HMW-MAA, un anticuerpo anti-CD38, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo anti-integrina, un anticuerpo anti-MN, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-CD203c, un anticuerpo anti-SLC44A4, un anticuerpo anti-Nectin-4, un anticuerpo anti-mesotelina, un anticuerpo anti-CD44, un anticuerpo anti-CD79, un anticuerpo anti-FcRL5, un anticuerpo anti-MUC16, un anticuerpo anti-NaPi2b, un anticuerpo anti-STEAP-1, un anticuerpo anti-ETBR, un anticuerpo anti-TF, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-HGFR, un anticuerpo anti-CD37, un anticuerpo anti-FOLR1, un anticuerpo anti-CEACAM, un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-GCC, un anticuerpo anti-Lewis Y, un anticuerpo anti-LIV1, un anticuerpo anti-DLL3 y un anticuerpo anti-EPCAM.

12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína es de fórmula (II)



en la que

Ab es trastuzumab y
q varía de 0 a 8.

5 13. El método según la reivindicación 12, en el que la mezcla purificada de dichos conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína de fórmula (II) tiene una relación promedia de fármaco a anticuerpo (RFA) de 2,6 a 2,9.

14. El método según la reivindicación 13, en el que la RFA promedia es de 2,80.

Figura 1

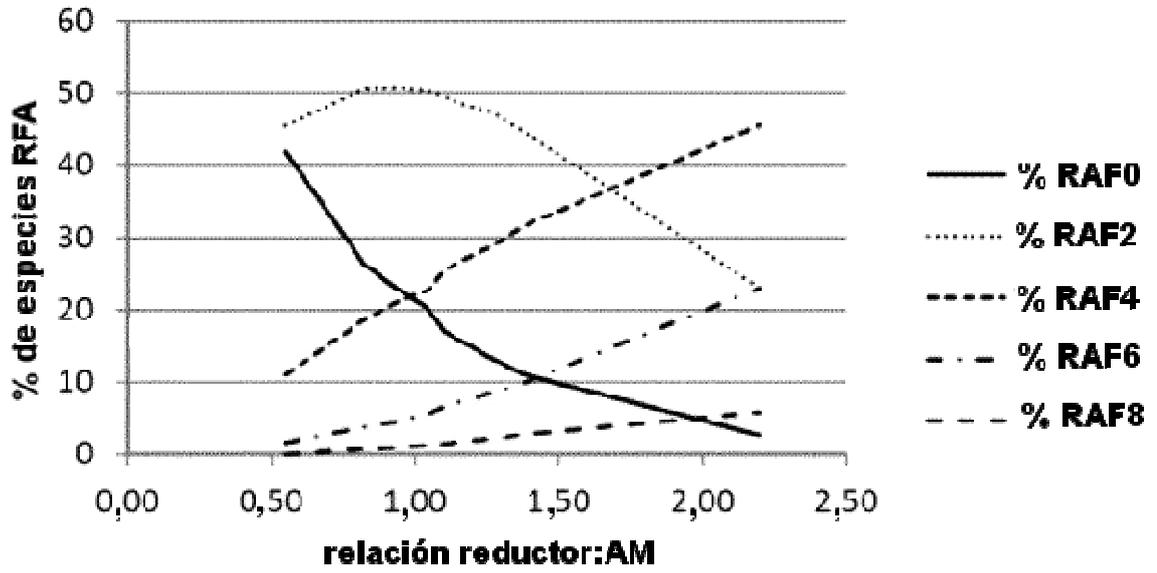
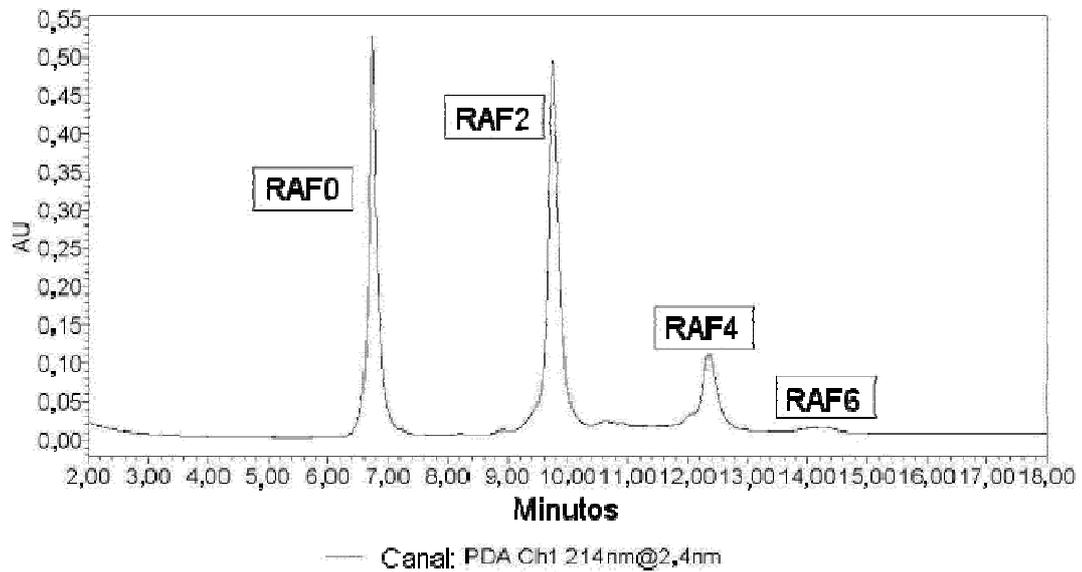
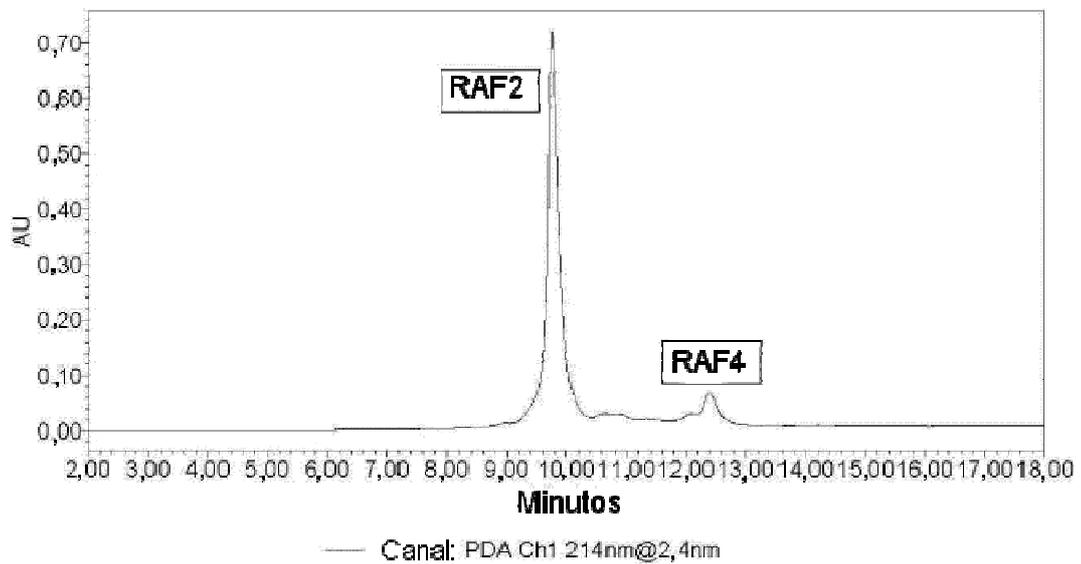


Figura 2

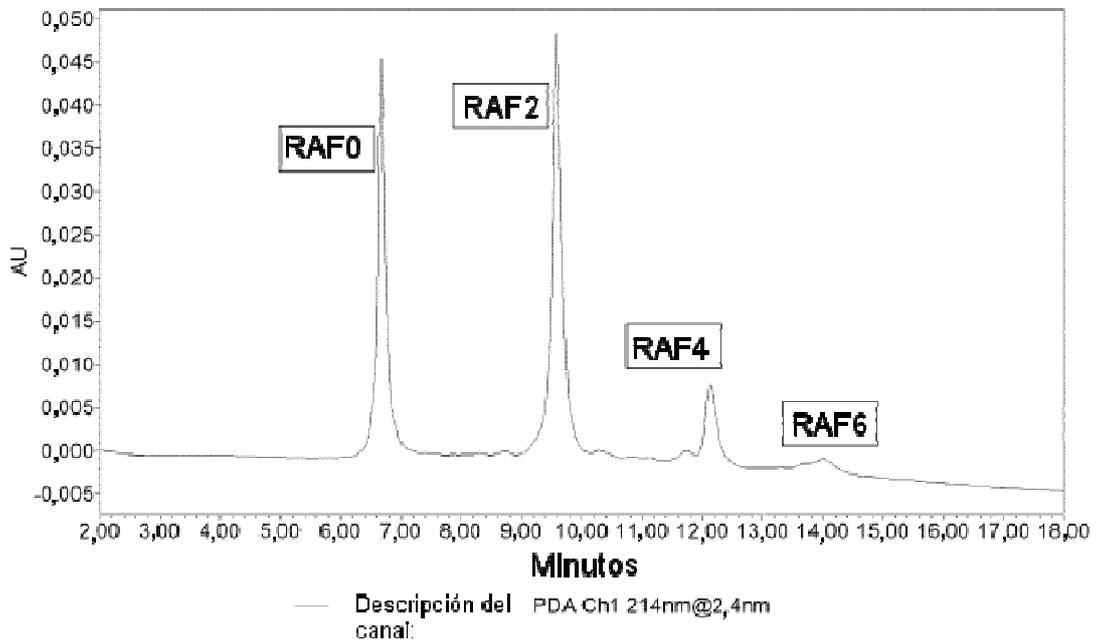


A. Mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína de acuerdo con la fórmula (II) antes de la purificación por CIH.

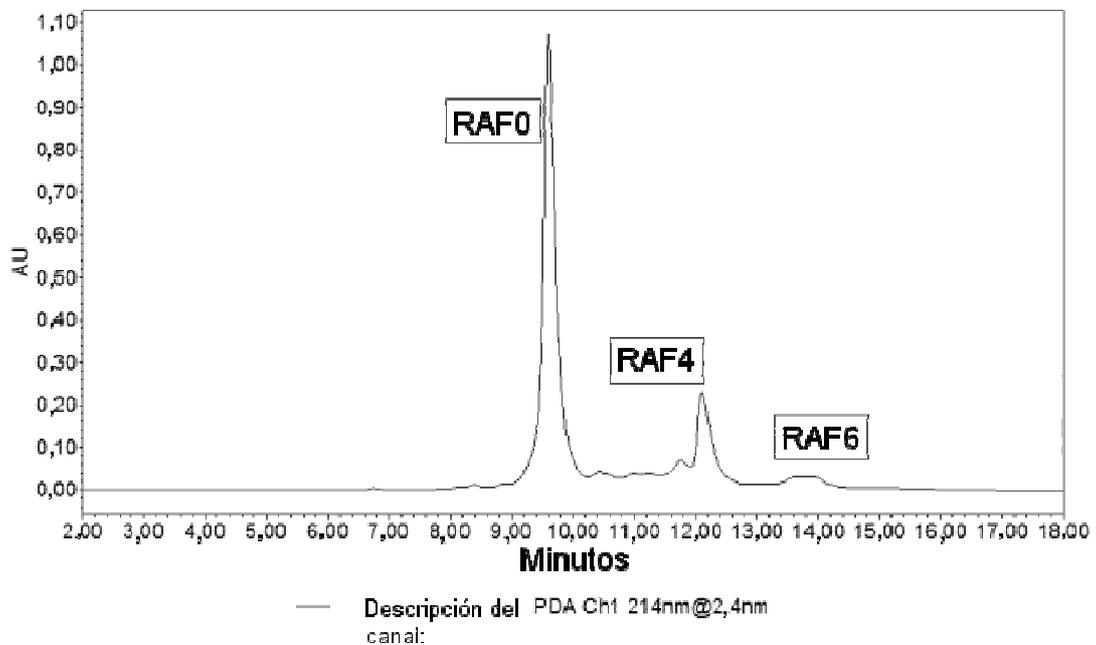


B. Eluato de CIH después de la purificación de acuerdo con el Ejemplo 3.

Figura 3



A. Mezcla de conjugados anticuerpo-fármaco unidos a cisteína de acuerdo con la fórmula (II) antes de la purificación por CIH.



B. Eluato de CIH después de la purificación de acuerdo con el Ejemplo 4.