

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 577**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2012 PCT/US2012/031243**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135517**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2012 E 12714160 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2691155**

54 Título: **Preparación de conjugados de maitansinoides y anticuerpos mediante un proceso de una sola etapa**

30 Prioridad:

29.03.2011 US 201161468997 P

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

16.04.2019

73 Titular/es:

**IMMUNOGEN, INC. (100.0%)
830 Winter Street
Waltham, MA 02451-1477, US**

72 Inventor/es:

**LI, XINFANG y
WORFUL, JARED M.**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 709 577 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

Preparación de conjugados de maitansinoides y anticuerpos mediante un proceso de una sola etapa

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N.º 61/468.997, presentada el 29 de marzo de 2011 y la solicitud provisional de EE.UU. N.º 61/468.981, presentada el 29 de marzo de 2011.

10 Antecedentes de la invención

Los conjugados de anticuerpos y fármacos (ADC, por sus siglas en inglés) que resultan útiles en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades están compuestos comúnmente por tres elementos distintos: un agente de unión celular, un conector y un agente citotóxico. El método convencional para conjugar un agente de unión celular, tales como un anticuerpo, con un agente citotóxico, emplea dos etapas de reacción distintas con el anticuerpo. En la primera etapa de reacción (la etapa de modificación), el anticuerpo se hace reaccionar con un conector heterobifuncional para producir un anticuerpo modificado por conector. El producto de anticuerpo modificado después se purifica opcionalmente del exceso de conector o de reactivo de conector hidrolizado. En la segunda etapa de reacción (la etapa de conjugación), el anticuerpo modificado con conector se hace reaccionar con el agente citotóxico que contiene un grupo reactivo, tales como tiol, para generar el conjugado de anticuerpo y agente citotóxico, el cual nuevamente se purifica en una etapa de purificación adicional.

Los procesos que se han descrito previamente para la fabricación de los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico son complejos porque están cargados de etapas que son engorrosas de realizar o producen inmunconjugados que son menos puros o menos estables que los óptimos deseados. Por lo tanto, sería conveniente modificar o eliminar una o más etapas de fabricación a la vez que se mejora la calidad del producto, tales como la pureza y/o la estabilidad.

En vista de lo anterior, existe la necesidad en la técnica de desarrollar procesos mejorados para preparar conjugados de agente de unión celular y agente citotóxico que tengan una pureza sustancialmente alta, y que puedan prepararse evitando etapas engorrosas, y mediante la reducción del tiempo y del costo para el usuario. La invención proporciona un proceso del mismo tipo. Estas y otras ventajas de la invención, así como otras características de la invención, serán evidentes a partir de la descripción de la invención que se proporciona en el presente documento.

35 Breve resumen de la invención

La invención proporciona un proceso para preparar un conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico es decir, un conjugado de maitansinoide y anticuerpo que comprende la etapa de poner en contacto un agente de unión celular es decir, un maitansinoide con un agente citotóxico es decir, un anticuerpo para formar una primera mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico, y después poner en contacto la primera mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico con un reactivo de reticulación bifuncional que comprende un conector, en una solución que tiene un pH de 4 a 9, para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico, donde el agente de unión celular se acopla químicamente a través del conector al agente citotóxico, (ii) agente citotóxico libre y (iii) subproductos de reacción. El proceso puede comprender adicionalmente la etapa de purificar la mezcla para proporcionar un conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico purificado.

Los procesos de la presente invención proporcionan un conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico con alta pureza y/o estabilidad. Para lograr la alta pureza y/o estabilidad del conjugado, es esencial que el agente citotóxico se ponga en contacto con el agente de unión celular primero para formar una mezcla que comprenda el agente de unión celular y el agente citotóxico, antes de que la mezcla se ponga en contacto con un reactivo de reticulación bifuncional.

La presente invención incluye también un conjugado que comprende un agente de unión celular que se acopla químicamente a un agente citotóxico preparado de acuerdo con los procesos descritos en el presente documento.

Basándose en la divulgación que se contiene en el presente documento, la presente invención proporciona un proceso para preparar un conjugado de maitansinoide y anticuerpo que comprende la etapa de: (a) poner en contacto un anticuerpo con un maitansinoide para formar una primera mezcla que comprende el anticuerpo y el maitansinoide, después poner en contacto la primera mezcla con un reactivo de reticulación bifuncional que comprende un conector, en una solución que tiene un pH de 4 a 9 para proporcionar una segunda mezcla que comprende (i) el conjugado de maitansinoide y anticuerpo, donde el anticuerpo se acopla químicamente a través del conector al maitansinoide, (ii) maitansinoide libre y (iii) subproductos de la reacción.

La presente invención y las realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

65

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un proceso de una etapa para preparar un conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico es decir, un conjugado de maitansinoide y anticuerpo. El proceso comprende poner en contacto un agente de unión celular (es decir, un anticuerpo) con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide para formar una primera mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico, y después poner en contacto la primera mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico con un reactivo de reticulación bifuncional que comprende un conector, en una solución que tiene un pH de 4 a 9, para proporcionar una segunda mezcla que comprende el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico, agente citotóxico libre y subproductos de reacción, donde el agente de unión celular se acopla químicamente al agente citotóxico a través del conector. La segunda mezcla después se somete a purificación para proporcionar un conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico purificado.

En una realización, la puesta en contacto se efectúa proporcionando el agente de unión celular, después poniendo en contacto el agente de unión celular con el agente citotóxico para formar una primera mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico, y después poniendo en contacto la primera mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico con el reactivo de reticulación bifuncional. Por ejemplo, en una realización, el agente de unión celular se proporciona en un recipiente de reacción, el agente citotóxico se añade al recipiente de reacción (que entra de la misma manera en contacto con el agente de unión celular), y después se añade el reactivo de reticulación bifuncional a la mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico (que entra de la misma manera en contacto con la mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico). En una realización, se proporciona el agente de unión celular en un recipiente de reacción, y se añade el agente citotóxico al recipiente de reacción inmediatamente después de colocar el agente de unión celular al recipiente. En otra realización, se proporciona el agente de unión celular en un recipiente de reacción, y el agente citotóxico se añade al recipiente de reacción después de un intervalo de tiempo después de proporcionar el agente de unión celular en el recipiente (por ejemplo, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1 día o más después de proporcionar el agente de unión celular en el receptáculo). El agente citotóxico puede añadirse rápidamente (es decir, dentro de un intervalo de tiempo corto, tales como aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos) o lentamente (tales como mediante el uso de una bomba).

La mezcla que comprende un agente de unión celular y un agente citotóxico puede después ponerse en contacto con el reactivo de reticulación bifuncional, ya sea inmediatamente después de poner en contacto el agente de unión celular con el agente citotóxico o en un momento posterior (por ejemplo, aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 8 horas o más) después de poner en contacto el agente de unión celular con el agente citotóxico. Por ejemplo, en una realización, el reactivo de reticulación bifuncional se añade a la mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico inmediatamente después de la adición del agente citotóxico al recipiente de reacción que comprende el agente de unión celular. De manera alternativa, la mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico puede ponerse en contacto con el reactivo de reticulación bifuncional aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas o más después de poner en contacto el agente de unión celular con el agente citotóxico.

En otra realización, el agente citotóxico y el agente bifuncional se añaden a través de múltiples ciclos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más ciclos). Por ejemplo, la invención proporciona un proceso que comprende las etapas de: a) poner en contacto un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con el agente citotóxico es decir, un maitansinoide para formar una primera mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico; y después poner en contacto la primera mezcla con un reactivo de reticulación bifuncional que comprende un conector, en una solución que tiene un pH de 4 a 9 para proporcionar una segunda mezcla que comprende el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico, agente citotóxico libre, y subproductos de reacción, donde el agente de unión celular está acoplado químicamente a través del conector al agente citotóxico; b) poner en contacto la segunda mezcla con el agente citotóxico para formar una tercera mezcla; y después poner en contacto la tercera mezcla con el reactivo de reticulación bifuncional a un pH de 4 a 9 para proporcionar una cuarta mezcla; y c) purificar la cuarta mezcla para proporcionar el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico purificado. En una realización, la etapa b) se lleva a cabo después de un intervalo de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas o más) después de la etapa a). En otra realización, la etapa b) puede repetirse varias veces (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más veces) antes de llevar a cabo la etapa c). La etapa b) adicional puede llevarse a cabo después de un intervalo de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas o más) después de la etapa b) inicial.

En otra realización, el reactivo de reticulación bifuncional se añade antes de que se completa la adición del agente citotóxico. Por ejemplo, en una realización, el agente citotóxico se añade al agente de unión celular de manera continua durante un intervalo de tiempo (por ejemplo, durante aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas o más) para formar una mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico. Antes de que la adición del

agente citotóxico esté completa, se añade el reactivo de reticulación bifuncional a la mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico, con la condición de que el agente citotóxico esté en todo momento en exceso molar respecto al reactivo de reticulación bifuncional. En una realización, el reactivo de reticulación bifuncional se añade de manera continua durante un intervalo de tiempo (por ejemplo, durante aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, o más).

Después de que la mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico se pone en contacto con el reactivo de reticulación bifuncional, la reacción se deja continuar durante aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas o más (por ejemplo, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 45 horas o aproximadamente 48 horas).

La puesta en contacto el agente de unión celular con el agente citotóxico y después el reactivo de reticulación bifuncional (es decir, la etapa de reacción) se produce en una solución que tiene un pH de 4 a 9 (por ejemplo, 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5 o 9). En una realización, la etapa de reacción se produce en una solución que tiene un pH de aproximadamente 6 o menos (por ejemplo, 4 a aproximadamente 6, 4 a aproximadamente 5,5, o aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5).

En otra realización, el proceso de la invención comprende poner en contacto un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y después un reactivo de reticulación bifuncional en una solución que tiene un pH de aproximadamente 6 o más (por ejemplo, aproximadamente 6 a 9, aproximadamente 6 a aproximadamente 7, aproximadamente 7 a 9, aproximadamente 7 a aproximadamente 8,5, aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5, aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,0 a 9,0, o aproximadamente 8,5 a 9,0). Por ejemplo, el proceso de la invención comprende poner en contacto un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y un reactivo de reticulación bifuncional en una solución que tiene un pH de aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,4, aproximadamente 8,5, aproximadamente 8,6, aproximadamente 8,7, aproximadamente 8,8, aproximadamente 8,9 o 9,0. En una realización específica, el proceso de la invención comprende poner un agente de unión celular es decir, un anticuerpo en contacto con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y un reactivo de reticulación bifuncional en una solución con un pH de aproximadamente 7,8 (por ejemplo, un pH de 7,6 a 8,0 o un pH de 7,7 a 7,9).

El proceso de la invención comprende llevar a cabo la reacción en una sola etapa (es decir, poner en contacto un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y después un reactivo de reticulación bifuncional) a cualquier temperatura adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, la reacción en una sola etapa puede ocurrir a aproximadamente 20 °C o menos (por ejemplo, aproximadamente -10 °C (con la condición de que se evite que la solución se congele, por ejemplo, mediante la presencia de un disolvente orgánico usado para disolver el agente citotóxico y el reactivo de reticulación bifuncional) a aproximadamente 20 °C, aproximadamente 0 °C a aproximadamente 18 °C, aproximadamente 4 °C a aproximadamente 16 °C), a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, o aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C), o a una temperatura elevada (por ejemplo, aproximadamente 30 °C a aproximadamente 37 °C). En una realización, la puesta en contacto de un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y un reactivo de reticulación bifuncional se produce a una temperatura de aproximadamente 16 °C a aproximadamente 24 °C (por ejemplo, aproximadamente 16 °C, aproximadamente 17 °C, aproximadamente 18 °C, aproximadamente 19 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C o aproximadamente 25 °C).

En otra realización, la puesta en contacto de un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y después con un reactivo de reticulación bifuncional se produce a una temperatura de aproximadamente 15 °C o menos (por ejemplo, aproximadamente -10 °C a aproximadamente 15 °C, o de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 15 °C). En este sentido, el proceso de la invención comprende poner un agente de unión celular es decir, un anticuerpo en contacto con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y después con un reactivo de reticulación bifuncional a una temperatura de 15 °C, aproximadamente 14 °C, aproximadamente 13 °C, aproximadamente 12 °C, aproximadamente 11 °C, aproximadamente 10 °C, aproximadamente 9 °C, aproximadamente 8 °C, aproximadamente 7 °C, aproximadamente 6 °C, aproximadamente 5

5 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 3 °C, aproximadamente 2 °C, aproximadamente 1 °C, aproximadamente 0 °C, aproximadamente -1 °C, aproximadamente -2 °C, aproximadamente -3 °C, aproximadamente -4 °C, aproximadamente -5 °C, aproximadamente -6 °C, aproximadamente -7 °C, aproximadamente -8 °C, aproximadamente -9 °C, o aproximadamente -10 °C, con la condición de que se evite que la solución se congele, por ejemplo, mediante la presencia de disolvente o disolventes orgánicos usados para disolver el reactivo de reticulación bifuncional. En una realización, el proceso de la invención comprende poner un agente de unión celular es decir, un anticuerpo en contacto con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y después con un reactivo de reticulación bifuncional a una temperatura de aproximadamente -10 °C a aproximadamente 15 °C, aproximadamente 0 °C a aproximadamente 15 °C, aproximadamente 0 °C a aproximadamente 10 °C, aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C, aproximadamente 5 °C a aproximadamente 15 °C, aproximadamente 10 °C a aproximadamente 15 °C, o aproximadamente 5 °C a aproximadamente 10 °C. En otra realización, el proceso de la invención comprende poner un agente de unión celular es decir, un anticuerpo en contacto con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y después con un reactivo de reticulación bifuncional a una temperatura de aproximadamente 10 °C (por ejemplo, una temperatura de 8 °C a 12 °C o una temperatura de 9 °C a 11 °C).

15 En una realización, el proceso de la invención comprende poner un agente de unión celular es decir, un anticuerpo en contacto con un agente citotóxico: es decir, un maitansinoide y después con un reactivo de reticulación bifuncional en una solución con un pH alto (por ejemplo, aproximadamente 7 o mayor) a una baja temperatura (por ejemplo aproximadamente 15 °C o menor). Por ejemplo, en una realización, el proceso de la invención comprende poner un agente de unión celular es decir, un anticuerpo en contacto con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y después con un reactivo de reticulación bifuncional en una solución con un pH de aproximadamente 7,5 a una temperatura de aproximadamente 15 °C, en una solución con un pH de aproximadamente 7,8 a una temperatura de aproximadamente 10 °C, en una solución con un pH de 8,2 a una temperatura de aproximadamente 0 °C o en una solución con un pH de 8,5 a una temperatura de aproximadamente 0 °C. En otra realización, el proceso de la invención comprende poner un agente de unión celular en contacto con un agente citotóxico y después con un reactivo de reticulación bifuncional en una solución con un pH de 7,0 a 8,5 (por ejemplo, un pH de 7,5 a 8,0) a una temperatura de 5 °C a 15 °C.

30 En una realización, el proceso de la invención comprende adicionalmente una etapa de inactivación para inactivar cualquier agente citotóxico sin reaccionar y/o reactivo de reticulación bifuncional sin reaccionar. La etapa de inactivación se lleva a cabo antes de la purificación del agente de unión celular y el agente citotóxico. Por ejemplo, el proceso de la invención comprende (a) poner en contacto a un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide para formar una mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico, y después poner en contacto la mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico con un reactivo de reticulación bifuncional, que comprende un conector, en una solución con un pH de 4 a 9 para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico, donde el agente de unión celular está acoplado químicamente al agente citotóxico mediante el conector, (ii) agente citotóxico libre y (iii) subproductos de la reacción, (b) inactivar la mezcla preparada en la etapa (a) para inactivar cualquier agente citotóxico sin reaccionar y/o cualquier reactivo de reticulación bifuncional sin reaccionar, y (c) purificar la mezcla para proporcionar un conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico.

45 En una realización, la mezcla se inactiva mediante la puesta en contacto de la mezcla con un reactivo de inactivación. Tales como se usa en el presente documento, el "reactivo de inactivación" se refiere a un reactivo que reacciona con el reactivo de reticulación bifuncional y/o el agente citotóxico libre.

50 En una realización, los reactivos de inactivación de maleimida o haloacetamida, tales como ácido 4-maleimidobutírico, ácido 3-maleimidopropiónico, N-etilmaleimida, yodoacetamida o ácido yodoacetamidopropiónico, pueden usarse para asegurarse de que se inactive cualquier grupo sin reaccionar (tales como tiol) en el agente citotóxico. La etapa de inactivación puede ayudar a prevenir la dimerización del agente citotóxico, en particular del agente citotóxico que tiene un grupo tiol sin reaccionar (tales como DM1). El agente citotóxico dimerizado puede ser difícil de retirar. La etapa de inactivación también puede minimizar cualquier reacción de intercambio tiol-disulfuro no deseada con los grupos disulfuro de anticuerpos naturales. Después de la inactivación con reactivos de inactivación de tiol cargados y polares (tales como ácido 4-maleimidobutírico o ácido 3-maleimidopropiónico), el exceso de agente citotóxico sin reaccionar se convierte en un aducto soluble en agua cargado y polar, que puede separarse fácilmente del conjugado unido covalentemente durante la etapa de purificación. También puede emplearse la inactivación con reactivos de inactivación de tiol neutros y no polares.

60 En una realización, la mezcla se inactiva poniendo en contacto la mezcla con un reactivo de inactivación que reacciona con el reactivo de reticulación bifuncional sin reaccionar. Por ejemplo, pueden añadirse nucleófilos a la mezcla para inactivar cualquier reactivo de reticulación bifuncional sin reaccionar. El nucleófilo es preferentemente un grupo amino que contiene nucleófilos, tales como lisina, taurina o hidroxilamina.

65 En una realización preferida, la reacción (es decir, poner en contacto un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y después un reactivo de reticulación bifuncional) se deja avanzar hasta completar antes de poner en contacto la mezcla con un reactivo de inactivación. En este aspecto, el agente de inactivación se añade a la mezcla entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 48 horas (por ejemplo,

aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 25 horas a aproximadamente 48 horas) después de que se ponga en contacto a la mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico con el reactivo de reticulación bifuncional.

El proceso de la invención puede incluir opcionalmente la adición de sacarosa a la etapa de reacción (es decir, poner en contacto a un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y un reactivo de reticulación bifuncional) para aumentar la solubilidad y recuperación de los conjugados de agente de unión celular y agentes citotóxicos. De forma deseable, la sacarosa se añade en una concentración de aproximadamente el 0,1 % (p/v) a aproximadamente el 20 % (p/v) (por ejemplo, aproximadamente el 0,1 % (p/v), el 1 % (p/v), el 5 % (p/v), el 10 % (p/v), el 15 % (p/v), o el 20 % (p/v)). Preferentemente, la sacarosa se añade en una concentración de aproximadamente el 1 % (p/v) a aproximadamente el 10 % (p/v) (por ejemplo, aproximadamente el 0,5 % (p/v), aproximadamente el 1 % (p/v), aproximadamente el 1,5 % (p/v), aproximadamente el 2 % (p/v), aproximadamente el 3 % (p/v), aproximadamente el 4 % (p/v), aproximadamente el 5 % (p/v), aproximadamente el 6 % (p/v), aproximadamente el 7 % (p/v), aproximadamente el 8 % (p/v), aproximadamente el 9 % (p/v), aproximadamente el 10 % (p/v), o aproximadamente el 11 % (p/v)). A su vez, la etapa de reacción también puede comprender la adición de un agente tamponante. Puede utilizarse cualquier agente tamponante adecuado conocido en la técnica. Los agentes tamponantes adecuados incluyen, por ejemplo, un tampón de citrato, un tampón de acetato, un tampón de succinato y un tampón de fosfato. En una realización, el agente tamponante se selecciona del grupo que consiste en HEPPSO (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-hidroxi-propanosulfónico)), POPSO (deshidrato de piperazina-1,4-bis-(ácido 2-hidroxi-propano-sulfónico)), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico), HEPPS (EPPS) (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-propanosulfónico), TES (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico) y combinaciones de los mismos.

Después de la etapa de reacción, el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico se somete a una etapa de purificación. En este sentido, el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico puede purificarse a partir de los otros componentes de la mezcla (por ejemplo, agente citotóxico libre y subproductos de reacción) usando filtración de flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés), el cual es un proceso de filtración de flujo tangencial en base a membranas, cromatografía de no adsorción, cromatografía de adsorción, filtración de adsorción, precipitación selectiva, o cualquier otro proceso de purificación adecuada, así como combinaciones de los mismos. En una realización de la invención, el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico se purifica usando una única etapa de purificación (por ejemplo, TFF). Preferentemente, el conjugado se purifica e intercambia en la formulación adecuada usando una única etapa de purificación (por ejemplo, TFF). En otra realización de la invención, el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico se purifica usando dos etapas de purificación secuenciales. Por ejemplo, el conjugado puede primero purificarse mediante precipitación selectiva, filtración de adsorción, cromatografía de adsorción o cromatografía de no adsorción, seguida de purificación con TFF. Un experto en la materia entenderá que la purificación del conjugado de agente citotóxico y agente de unión celular permite que se aísle un conjugado estable que comprende el agente de unión celular acoplado químicamente al agente citotóxico.

Puede utilizarse cualquier sistema adecuado de TFF para la purificación, incluyendo un sistema tipo Pellicon (Milipore, Billerica, MA), un sistema de casete Sartoco (Sartorius AG, Edgewood, NY), y un sistema de tipo Centrasette (Pall Corp., East Hills, NY).

Puede utilizarse cualquier resina adecuada para cromatografía de adsorción para la purificación. Las resinas para cromatografía por adsorción que se prefieren incluyen cromatografía con hidroxiapatita, cromatografía hidrofóbica inducida por carga (HCIC), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico de modo mixto, cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), cromatografía usando pigmentos como ligandos, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa, y combinaciones de las mismas. Los ejemplos de resinas adecuadas para hidroxiapatita incluyen cerámicas de hidroxiapatita (CHT Tipo I y Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), hidroxiapatita HA Ultrogel (Pall Corp., East Hills, NY) y cerámicas de fluorapatita (CFT Tipo I y Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Un ejemplo de una resina adecuada para HCIC es la resina MEP Hypercel (Pall Corp., East Hills, NY). Los ejemplos de resinas adecuadas para HIC incluyen resinas de Butyl-Sepharose, Hexyl-Sepharose, Phenyl-Sepharose, y Octyl Sepharose (todas de GE Healthcare, Piscataway, NJ), así como resinas de metilo Macro-prep y t-butilo Macro-Prep (Biorad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas de intercambio iónico adecuadas incluyen SP-Sepharose, CM-Sepharose, y Q-Sepharose (todas de GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resinas S Unosphere (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de intercambiadores iónicos mixtos adecuados incluyen resinas Bakerbond ABx (JT Baker, Phillipsburg NJ). Los ejemplos de resinas para IMAC adecuadas incluyen resinas Sepharose de quelación (GE Healthcare, Piscataway, NJ), y resinas Profinity para IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas para ligandos de pigmentos incluyen resinas Blue Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resinas Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas de afinidad adecuadas incluyen resinas Protein A Sepharose (por ejemplo, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ), donde el agente de unión celular es un

anticuerpo, y resinas de afinidad a la lectina, por ejemplo resinas Lentil Lectin Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ), donde el agente de unión celular presenta sitios de unión de lectina adecuados. De manera alternativa, se puede utilizar un anticuerpo específico para el agente de unión celular. Dicho anticuerpo se puede inmovilizar a, por ejemplo, una resina Sepharose 4 Fast Flow (GE, Healthcare, Piscataway, NJ). Los ejemplos de resinas adecuadas para fase invertida incluyen resinas C4, C8 y C18 (Grace Vydac, Hesperia, CA).

Puede utilizarse cualquier resina adecuada para cromatografía de no adsorción para la purificación. Los ejemplos de resinas adecuadas para cromatografía de no adsorción incluyen, pero no se limitan a, SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, resinas SEPHACRYL™ (por ejemplo, S-200 y S-300), resinas SUPERDEX™ (por ejemplo, SUPERDEX™ 75 y SUPERDEX™ 200), resinas BIO-GEL® (por ejemplo, P-6, P-10, P-30, P-60, y P-100) y otras conocidas para los expertos en la técnica.

En una realización, el proceso de la invención comprende también una etapa de retención para liberar los conectores acoplados de manera inestable del agente de unión celular. La etapa de retención comprende retener la mezcla antes de la purificación del conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico (por ejemplo, después de la etapa de reacción, entre la etapa de reacción y la etapa de inactivación, o después de la etapa de inactivación). Por ejemplo, el proceso de la invención comprende (a) poner en contacto a un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide para formar una mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico; y después poner en contacto la mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico con un reactivo de reticulación bifuncional, el cual proporciona un conector, en una solución con un pH de 4 a 9 para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico, donde el agente de unión celular está acoplado químicamente al agente citotóxico mediante el conector, (ii) agente citotóxico libre y (iii) subproductos de la reacción, (b) retener la mezcla tales como se preparó en la etapa (a) para liberar los conectores unidos de forma inestable del agente de unión celular, y (c) purificar la mezcla para proporcionar un conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico purificado.

En otra realización, el proceso de la invención comprende (a) poner en contacto a un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide para formar una mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico, y después poner en contacto la mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico con un reactivo de reticulación bifuncional, el cual proporciona un conector, en una solución con un pH de 4 a 9 para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico, donde el agente de unión celular está acoplado químicamente al agente citotóxico mediante el conector, (ii) agente citotóxico libre y (iii) subproductos de la reacción, (b) inactivar la mezcla preparada en la etapa (a) para inactivar todo agente citotóxico sin reaccionar y/o reactivo de reticulación bifuncional sin reaccionar, (c) retener la mezcla tales como se preparó en la etapa (b) para liberar los conectores unidos de forma inestable del agente de unión celular, y (d) purificar la mezcla para proporcionar un conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico purificado.

De manera alternativa, la etapa de retención puede tener lugar después de la purificación del conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico, y ser seguida de una etapa de purificación adicional.

En una realización preferida, la reacción (es decir, poner en contacto un agente de unión celular es decir, un anticuerpo con un agente citotóxico es decir, un maitansinoide y después un reactivo de reticulación bifuncional) se puede completar antes de la etapa de retención. En este aspecto, la etapa de retención se puede llevar a cabo aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas) después de que se ponga en contacto a la mezcla que comprende el agente de unión celular y el agente citotóxico con el reactivo de reticulación bifuncional.

La etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura adecuada (por ejemplo, entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 37 °C) durante un período adecuado de tiempo (por ejemplo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 1 hora a aproximadamente 8 horas o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas) para liberar los conectores acoplados de manera inestable del agente de unión celular sin liberar cantidades considerables de los conectores acoplados de manera estable al agente de unión celular. En una realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a aproximadamente 20 °C o menos (por ejemplo, de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 18 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 16 °C), a temperatura ambiente (por ejemplo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C), o a temperaturas elevadas (por ejemplo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 37 °C). En una realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura de aproximadamente 16 °C a aproximadamente 24 °C (por ejemplo, aproximadamente 15 °C, aproximadamente 16 °C, aproximadamente 17 °C,

aproximadamente 18 °C, aproximadamente 19 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C, o aproximadamente 25 °C). En otra realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C (por ejemplo, aproximadamente 0 °C, aproximadamente 1 °C, aproximadamente 2 °C, aproximadamente 3 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 6 °C, aproximadamente 7 °C, aproximadamente 8 °C, aproximadamente 9 °C, o aproximadamente 10 °C). En otra realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura de alrededor 37 °C (por ejemplo, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C, o aproximadamente 40 °C).

La duración de la etapa de retención depende de la temperatura y del pH a los cuales se lleve a cabo la etapa de retención. Por ejemplo, la duración de la etapa de retención puede reducirse considerablemente si la etapa de retención se lleva a cabo a temperaturas elevadas, donde la temperatura máxima está limitada por la estabilidad del conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico. La etapa de retención puede comprender mantener la solución por alrededor 1 hora a aproximadamente 1 día (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 22 horas, o aproximadamente 24 horas), de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 14 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 16 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 1 semana (por ejemplo, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, o aproximadamente 7 días), o de aproximadamente 1 día a aproximadamente 1 semana.

En una realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C por un período de al menos aproximadamente 12 horas hasta una semana. En otra realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C durante la noche (por ejemplo, aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas, preferentemente aproximadamente 20 horas).

El valor de pH para la etapa de retención es preferentemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 10. En una realización, el valor de pH para la etapa de retención es de aproximadamente 4 o más, pero menor que aproximadamente 6 (por ejemplo 4 a 5.9) o aproximadamente 5 o más, pero menor que aproximadamente 6 (por ejemplo, 5 a 5.9). En otra realización, los valores de pH para la etapa de retención varían de entre aproximadamente 6 a aproximadamente 10 (por ejemplo, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8). Por ejemplo, los valores de pH para la etapa de retención pueden ser aproximadamente 6, aproximadamente 6.5, aproximadamente 7, aproximadamente 7.5, aproximadamente 8, aproximadamente 8.5, aproximadamente 9, aproximadamente 9.5, o aproximadamente 10.

En realizaciones específicas, la etapa de retención puede comprender incubar la mezcla a 25 °C a un pH de aproximadamente 6-7,5 por aproximadamente 12 horas a aproximadamente 1 semana, incubar la mezcla a 4 °C a un pH de aproximadamente 4,5-5,9 por aproximadamente 5 horas a aproximadamente 5 días, o incubar la mezcla a 25 °C a un pH de aproximadamente 4,5-5,9 por aproximadamente 5 horas a aproximadamente 1 día.

La invención proporciona un proceso para la preparación de composiciones de conjugados estables que comprenden un agente de unión celular es decir, un anticuerpo acoplado químicamente a un agente citotóxico es decir, un maitansinoide, donde las composiciones se encuentran sustancialmente libres de conjugados inestables. En este sentido, la invención proporciona un proceso para preparar un conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico de pureza y estabilidad considerablemente altas. Dichas composiciones pueden usarse para tratar enfermedades dada la elevada pureza y estabilidad de los conjugados. Se describen composiciones que comprenden un agente de unión celular, como un anticuerpo, acoplado químicamente a un agente citotóxico, como un maitansinoide, en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 7.374.762. En un aspecto de la invención, un conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico de pureza considerablemente alta tiene una o más de las siguientes características: (a) más que aproximadamente 90 % (por ejemplo, más que o aproximadamente 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %), preferentemente más que aproximadamente 95 %, de las especies del conjugado son monoméricas, (b) el nivel de conectores sin conjugar en la preparación del conjugado es menos que aproximadamente 10 % (por ejemplo, menos que o igual a aproximadamente 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o 0 %) (con relación al total de conectores), (c) menos que 10 % de las especies del conjugado presentan reticulación (por ejemplo, menos que o igual a aproximadamente 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o 0 %), (d) el nivel de agente citotóxico libre en la preparación del conjugado es menos que aproximadamente 2 % (por ejemplo, menos que o igual a aproximadamente 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1,0 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, o 0 %) (mol/mol con relación al total de agente citotóxico), y/o (e) no presenta un aumento considerable en el

5 nivel de agente citotóxico libre cuando se almacena (por ejemplo, después de aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, alrededor 4 años o aproximadamente 10 5 años). Un "aumento considerable" en los niveles de agente citotóxico libre significa que, después de cierto tiempo de almacenamiento (por ejemplo, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años o aproximadamente 5 años), el aumento en el nivel de agente 10 citotóxico es menor que aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 1,1 %, aproximadamente 1,2 %, aproximadamente 1,3 %, aproximadamente 1,4 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1,6 %, aproximadamente 1,7 %, aproximadamente 1,8 %, aproximadamente 1,9 %, 15 aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 2,2 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2,7 %, aproximadamente 3,0 %, aproximadamente 3,2 %, aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 3,7 %, o aproximadamente 4,0 %.

20 Como se utiliza en el presente documento, la frase "conector sin conjugar" se refiere al agente de unión celular que se enlaza, mediante enlaces covalentes, al reactivo de reticulación bifuncional, donde el agente de unión celular no se encuentra enlazado mediante enlaces covalentes al agente citotóxico por medio del conector del reactivo de reticulación bifuncional (es decir, el "conector sin conjugar" puede representarse como CBA-L, donde CBA representa el agente de unión celular y L representa el reactivo de reticulación bifuncional. Por el contrario, el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico se puede representar como CBA-L-D, donde D representa al agente citotóxico).

25 En una realización, la razón molar promedio del agente citotóxico al agente de unión celular en el conjugado de agente de unión celular y agente citotóxico es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 2 a aproximadamente 7, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,5 (por ejemplo, de aproximadamente 2,5, de aproximadamente 2,6, de aproximadamente 2,7, de aproximadamente 2,8, 30 de aproximadamente 2,9, de aproximadamente 3,0, de aproximadamente 3,1, de aproximadamente 3,3, de aproximadamente 3,4, de aproximadamente 3,5, de aproximadamente 3,6, de aproximadamente 3,7, de aproximadamente 3,8, de aproximadamente 3,9, de aproximadamente 4,0, de aproximadamente 4,1, de aproximadamente 4,2, de aproximadamente 4,3, de aproximadamente 4,4, de aproximadamente 4,5), de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,0, de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 4,2 o de 35 aproximadamente 4,5 a 5,5 (por ejemplo, de aproximadamente 4,5, de aproximadamente 4,6, de aproximadamente 4,7, de aproximadamente 4,8, de aproximadamente 4,9, de aproximadamente 5,0, de aproximadamente 5,1, de aproximadamente 5,2, de aproximadamente 5,3, de aproximadamente 5,4 o de aproximadamente 5,5).

40 La presente invención proporciona un proceso más eficaz para preparar composiciones de conjugados estables que comprenden un agente de unión celular es decir, un anticuerpo que se acopla químicamente a un agente citotóxico es decir, un maitansinoide. En una realización, en comparación con los procesos tradicionales para la preparación de conjugados de un agente de unión celular y un agente citotóxico, se necesita menor cantidad de agente citotóxico para alcanzar la misma razón molar promedio de agente citotóxico a agente de unión celular para los conjugados.

45 Los agentes de unión celular adecuados incluyen anticuerpos (por ejemplo anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos).

50 Cuando el agente de unión celular es un anticuerpo, se une a un antígeno que es un polipéptido o un glicotopo y puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, receptor) o un ligando como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen moléculas tales como renina; una hormona de crecimiento, incluyendo hormona de crecimiento humana y hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona de estimulación de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona folículo-estimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación como el factor vmc, factor IX, factor tisular (TF) y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes como la Proteína C; 55 factor natriurético auricular; tensorio pulmonar; un activador de plasminógeno, como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulada al momento de la activación normalmente expresada y secretada por células T); proteína inflamatoria de macrófago humana (MIP-1-alfa); una albúmina sérica, como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora Muelleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado con la gonadotropina de ratones; una proteína microbiana, como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado con el linfocito T citotóxico (CTLA), como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico, como un factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento de nervios como NGF-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento de transformación (TGF) como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 o TGF-β5; factor 65

de crecimiento de tipo insulina I y II (IGF-I y IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral); proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina; EpCAM; GD3; FLT3; PSMA; PSCA; MUC1; MUC16; STEAP; CEA; TENB2; receptores EphA; receptores EphB; receptor de folato; FOLR1; mesotelina; cripto; alfa_vbeta₆; integrinas; VEGF; VEGFR; receptor EGFR de transferrina; IRTA1; IRTA2; IRTA3; IRTA4; IRTA5; proteínas CD como CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 o un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados con tumores o receptores de la superficie celular descritos en la Publicación de EE.UU. N.º 2008/0171040 o la Publicación de EE.UU. N.º 2008/0305044; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, como interferón alfa, beta y gamma; factores de estimulación de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana superficial; factor de aceleración del deterioro; antígenos virales como, por ejemplo, una parte de la envoltura del VIH; proteínas de transporte; receptores de alojamiento; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas, como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, un ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado con tumores como el receptor de HER2, HER3 o HER4; endogлина; c-Met; IGF1R; antígenos prostáticos como PCA3, PSA, PSGR, NGEF, PSMA, PSCA, TMEFF2 y STEAP1; LGR5; B7H4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos listados anteriormente.

Adicionalmente puede usarse GM-CSF, que se une a células mieloides, como agente de unión celular para células enfermas de leucemia mielógena aguda. La IL-2 que se une a células T activadas se puede usar para la prevención del rechazo de injertos en trasplantes, para la terapia y la prevención de la enfermedad de injerto contra el huésped y para el tratamiento de leucemia aguda de células T. Se pueden usar MSH que se unen a melanocitos, se puede usar para el tratamiento del melanoma, así como anticuerpos dirigidos hacia melanomas. El ácido fólico se puede usar para dirigirse al receptor de folato expresado en tumores de ovarios y de otro tipo. El factor de crecimiento epidérmico se puede usar para dirigirse a cánceres escamosos como el de pulmón y el de cabeza y cuello. La somatostatina se puede usar para dirigirse a neuroblastomas y otros tipos tumorales.

El término "anticuerpo" como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier inmunoglobulina, cualquier fragmento de inmunoglobulina, como Fab, Fab', F(ab')₂, dsFv, sFv, minicuerpos, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos (Parham, *J. Immunol.* 131: 2895-2902 (1983); Spring et al. *J. Immunol.* 113: 470-478 (1974); Nisonoff et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 89: 230-244 (1960), Kim et al., *Mol. Cancer Ther.*, 7: 2486-2497 (2008), Carter, *Nature Revs.*, 6: 343-357 (2006)), o inmunoglobulina quimérica, que se pueden unir a un antígeno en la superficie de una célula (por ejemplo, que contiene una región determinante de complementariedad (CDR)). Se puede utilizar cualquier anticuerpo adecuado como el agente de unión celular. Un experto en la materia entenderá que la selección de un anticuerpo apropiado dependerá de la población celular diana. En este sentido, el tipo y número de moléculas de la superficie celular (es decir, antígenos) que se expresan selectivamente en una población celular particular (típica y preferiblemente una población celular enferma) regirá la selección de un anticuerpo apropiado para ser utilizado en la composición inventiva. Se conocen los perfiles de expresión de la superficie celular para varios tipos celulares, incluyendo tipos de células tumorales, o, en caso de desconocerse, estos se pueden determinar utilizando técnicas de rutina de biología molecular e histoquímica.

El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, pero preferentemente es un anticuerpo monoclonal. Como se utiliza en el presente documento, anticuerpo "policlonal" hace referencia a poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos, típicamente encontradas en suero de animales inmunizados. Anticuerpo "monoclonal" se refiere a poblaciones homogéneas de moléculas de anticuerpos que son específicas para un antígeno particular. Típicamente, los anticuerpos monoclonales son producidos por un clon simple de linfocitos B ("células B"). Se pueden obtener anticuerpos monoclonales utilizando varias técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo tecnología estándar de hibridoma (véase, por ejemplo, Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5: 511-519 (1976), Harlow y Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), y C.A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York, NY (2001)). En resumen, el método de hibridoma para producir anticuerpos monoclonales suele implicar inyectar a cualquier animal adecuado, típica y preferentemente un ratón, un antígeno (es decir, un "inmunógeno"). Después el animal es sacrificado, y los linfocitos B que se aíslan de su bazo se fusionan con las células de mieloma humano. Se produce una célula híbrida (es decir, un "hibridoma"), la cual prolifera indefinidamente y secreta, de forma continua, titulaciones elevadas de anticuerpos con la especificidad deseada *in vitro*. Se puede utilizar cualquier método apropiado conocido en la técnica para identificar células hibridoma que producen un anticuerpo con la especificidad deseada. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), análisis de transferencia Western y radioinmunoensayo. La población de hibridomas se analiza para aislar clones individuales, cada uno de los cuales secreta una única especie de anticuerpo para el antígeno. Dado que cada hibridoma es un clon derivado de la fusión con un único linfocito B, todas las moléculas de anticuerpo que produce son idénticas en cuanto a su estructura, incluyendo sus sitios de unión al antígeno y su isotipo. También se pueden generar anticuerpos monoclonales utilizando otras técnicas adecuadas incluyendo tecnología de hibridoma-EBV (véase, por ejemplo Haskard y Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2): 361-67 (1984), y Roder et al., *Methods Enzymol.*, 121: 140-67 (1986)), sistemas de vectores de expresión bacteriófagos (véase, por ejemplo, Huse et al., *Science*, 246: 1275-81 (1989)), o bibliotecas de expresión en fagos que comprenden fragmentos de anticuerpos, como Fab y scFv (región variable de cadena simple) (véase, por ejemplo las patentes de EE.UU. 5.885.793 y 5.969.108, y las publicaciones de solicitudes de patentes internacionales WO 92/01047 y WO 99/06587).

El anticuerpo monoclonal puede aislarse de o producirse en cualquier animal adecuado, pero preferentemente se produce en un mamífero, más preferentemente un ratón o un humano, y más preferentemente un humano. Se conocen en la técnica y se describen en el presente documento métodos para producir un anticuerpo en ratones. En lo que respecta a anticuerpos humanos, el experto en la técnica entenderá que se pueden aislar anticuerpos policlonales del suero de sujetos humanos vacunados o inmunizados con el antígeno adecuado. De manera alternativa, se pueden generar anticuerpos humanos adaptando técnicas conocidas para producir anticuerpos humanos en animales que no son humanos, como ratones (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352, y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2002/0197266 A1).

Mientras que son la opción ideal para aplicaciones terapéuticas en humanos, los anticuerpos humanos, en especial los anticuerpos monoclonales humanos, son típicamente más difíciles de generar que los anticuerpos monoclonales de ratón. Los anticuerpos monoclonales de ratón, sin embargo, inducen una rápida respuesta de anticuerpos del huésped cuando se administran a humanos, lo que puede reducir el potencial diagnóstico o terapéutico del conjugado de anticuerpo y agente citotóxico. Para evitar estas complicaciones, preferentemente un anticuerpo monoclonal no es considerado "extraño" por el sistema inmunitario humano.

Con este fin, puede utilizarse la expresión en fagos para generar el anticuerpo. En este sentido, las bibliotecas de fagos que codifican dominios variables (V) de unión a antígenos para anticuerpos pueden generarse utilizando técnicas de rutina de la biología molecular y el ADN recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001)). Se seleccionan regiones variables de codificación de fagos con la especificidad deseada para la unión específica al antígeno deseado, y se reconstituyen anticuerpos humanos completos que comprenden el dominio variable seleccionado. Se introducen secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo reconstituido a una línea celular adecuada, como una célula de mieloma utilizada para la producción de hibridomas, de manera tal que la célula secreta anticuerpos humanos con las características de anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Janeway et al., *supra*, Huse et al., *supra*, y la patente de EE.UU. 6,265,150). De manera alternativa, se pueden generar anticuerpos monoclonales con ratones que sean transgénicos para genes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada específicos para humanos. Dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 5.545.806 y 5.569.825 y en Janeway et al., *supra*.

Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo "humanizado" es uno en que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal de ratón, que forman los lazos de unión del anticuerpo, se injertan al marco de una molécula de anticuerpo humano. Dadas las similitudes en los marcos de los anticuerpos de ratón y de humano, se acepta mayoritariamente en la técnica que este método produce un anticuerpo monoclonal que es antigénicamente idéntico al anticuerpo humano, pero se une al mismo antígeno que el anticuerpo monoclonal de ratón del que se derivaron las secuencias de CDR. Se describen detalladamente métodos conocidos en la técnica para generar anticuerpos humanizados, por ejemplo, en Janeway et al., *supra*, las patentes de EE.UU. 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, la patente europea n.º 0239400 B1, y la patente del Reino Unido n.º 2188638. También se pueden generar anticuerpos humanizados utilizando la tecnología de revestimiento de anticuerpos que se describe en la patente de EE.UU. 5.639.641 y Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235: 959-973 (1994). Mientras que el anticuerpo utilizado en el conjugado de la composición inventiva es, más preferentemente, un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal humano y un anticuerpo monoclonal de ratón, como se describe anteriormente, también se encuentran dentro del alcance de la invención.

También se incluyen dentro del alcance de la invención fragmentos de anticuerpos que tienen al menos un sitio de unión de antígeno y que por lo tanto reconocen y se unen a al menos un antígeno o receptor que se encuentra en la superficie de la célula diana. En este sentido, la escisión proteolítica de una molécula de anticuerpo intacta puede producir múltiples fragmentos de anticuerpos que mantienen la capacidad de reconocer y unirse a antígenos. Por ejemplo, la digestión limitada de una molécula de anticuerpo con la papaína de proteasa típicamente produce tres fragmentos, dos de los cuales son idénticos y se los llama fragmentos Fab, ya que pueden mantener la actividad de unión a antígenos de la molécula madre de anticuerpo. La escisión de una molécula de anticuerpo con la enzima pepsina suele producir dos fragmentos de anticuerpo, uno de los cuales mantiene ambos brazos de unión a antígenos de la molécula de anticuerpo, y por lo tanto se lo llama fragmento F(ab')₂. La reducción de un fragmento F(ab')₂ con ditiotereitol o mercaptoetilamina produce el fragmento que se llama fragmento Fab'. Se puede generar un fragmento de anticuerpo de región variable de cadena sencilla (sFv), que consiste en un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo unido a un dominio V de una cadena ligera de anticuerpo mediante un péptido sintético, utilizando técnicas de rutina de tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo Janeway et al., *supra*). De manera similar, se pueden preparar fragmentos de región variable estabilizados con disulfuro (dsFv) usando tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Reiter et al., *Protein Engineering*, 7: 697-704 (1994)). Sin embargo, en el contexto de la invención los fragmentos de anticuerpo no se ven limitados a estos ejemplos de tipos de fragmentos de anticuerpos. Se puede utilizar todo fragmento de anticuerpo adecuado que reconozca y se una a un receptor o antígeno deseado de la superficie de una célula. Los fragmentos de anticuerpos se describen adicionalmente, por ejemplo, en Parham, *J. Immunol.*, 131: 2895-2902 (1983), Spreng et al., *J. Immunol.*, 113: 470-478 (1974), y Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 89: 230-244 (1960). La unión entre anticuerpos y antígenos se puede analizar utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica como, por ejemplo,

radioinmunoensayos (RIA), ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición competitiva (véase, por ejemplo, Janeway et al., *supra*, y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2002/0197266 A1).

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

Puede usarse cualquier anticuerpo adecuado en el contexto de la invención. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal J5 es un anticuerpo IgG2a murino que es específico para el antígeno de leucemia linfoblástica aguda común (CALLA) (Ritz et al., *Nature*, 283: 583-585 (1980)), y se puede utilizar para dirigirse a las células que expresan CALLA (por ejemplo, células de leucemia linfoblástica aguda). El anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG1 murino que se une específicamente a el antígeno CD33 (Griffin et al., *Leukemia Res.*, 8: 521 (1984)), y se puede utilizar para combatir células que expresan CD33 (por ejemplo células de leucemia mielógena aguda (AML)).

De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 (también llamado B4) es un anticuerpo IgG1 murino que se une al antígeno CD19 en linfocitos B (Nadler et al., *J. Immunol.*, 131: 244-250 (1983)), y se puede utilizar para combatir linfocitos B o células enfermas que expresen CD19 (por ejemplo, células de linfoma no-Hodgkin y células de leucemia linfocítica crónica). el N901 es un anticuerpo monoclonal murino que se une al antígeno CD56 (molécula de adhesión celular neural) presente en células de origen neuroendocrino, incluyendo tumores de pulmón de células pequeñas, que pueden ser usadas en el conjugado para dirigir fármacos a células de origen neuroendocrino. Los anticuerpos J5, MY9 y B4 preferentemente se revisten o humanizan antes de ser utilizados como parte del conjugado. El revestimiento o la humanización de anticuerpos se describe, por ejemplo, en Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 969-73 (1994).

Además, el anticuerpo monoclonal C242 se une al antígeno CanAg (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.552.293), y se puede utilizar para dirigir el conjugado a tumores que expresan CanAg, como pueden ser el cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de células no pequeñas, y cáncer gástrico. El HuC242 es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal C242 (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.552.293). El hibridoma a partir del cual se forma el HuC242 se encuentra registrado con el número de identificación ECACC 90012601. El HuC242 se puede preparar utilizando métodos de injerto de CDR (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762) o tecnología de revestimiento (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.639.641). El HuC242 se puede utilizar para dirigir al conjugado hacia células tumorales que expresan el antígeno CanAg como, por ejemplo, células de cáncer colorrectal, pancreático, de pulmón de células no microcíticas y gástrico.

Para combatir células de cáncer de ovario y cáncer de próstata, puede utilizarse un anticuerpo anti-MUC1 como el agente de unión celular en el conjugado. Los anticuerpos anti-MUC1 incluyen, por ejemplo, anti-HMFG-2 (véase, por ejemplo, Taylor-Papadimitriou et al., *Int. J. Cancer*, 28: 17-21 (1981)), hCTM01 (véase, por ejemplo, van Hof et al., *Cancer Res.*, 56: 5179-5185 (1996)), y DS6. Las células de cáncer de próstata también pueden combatirse con el conjugado utilizando un antígeno prostático específico de membrana (PSMA) como el agente de unión celular, como un J591 (véase, por ejemplo, Liu et al., *Cancer Res.*, 57: 3629-3634 (1997)). Además, las células cancerosas que expresan el antígeno Her2, tales como los cánceres de seno, de próstata y de ovario, se pueden combatir con el conjugado usando anticuerpos anti-Her2, por ejemplo, trastuzumab, como el agente de unión celular. Las células que expresan el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y sus variantes, como un mutante por delección tipo III, EGFRvIII, pueden combatirse con el conjugado usando anticuerpos anti-EGFR. Los anticuerpos anti-EGFR se describen en las solicitudes internacionales de patente n.º PCT/US11/058385 y PCT/US11/058378. Se describen anticuerpos anti-EGFRvIII en las patentes de EE.UU. 7.736.644 y 7.628.986, y en las publicaciones de solicitud de EE.UU. 2010/0111979, 2009/0240038, 2009/0175887, 2009/0156790, y 2009/0155282. Los anticuerpos anti-IGF-IR que se unen al receptor de factor de crecimiento similar a la insulina, como los que se describen en la patente de EE.UU. 7.982.024, también se pueden usar en el conjugado. También pueden usarse en el conjugado los anticuerpos que se unen a CD27L, Cripto, CD138, CD38, EphA2, integrinas, CD37, folato, CD20, PSGR, NGEP, PSCA, TMEFF2, STEAP1, endoglina, y Her3.

En una realización, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en huN901, huMy9-6, huB4, huC242, un anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, trastuzumab), bivatuzumab, sibrotuzumab, rituximab, huDS6, anticuerpos anti-mesotelina descritos en la publicación de solicitud de patente internacional WO 2010/124797 (como MF-T), anticuerpos anti-cripto descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2010/0093980 (como huB3F6), anticuerpos anti-CD138 descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2007/0183971 (como huB-B4), anticuerpos anti-EGFR descritos en las solicitudes de patente internacional n.º PCT/US11/058385 y PCT/US11/058378 (como EGFR-7), anticuerpos anti-EGFRvIII descritos en las patentes de EE.UU. 7.736.644 y 7.628.986 y las publicaciones de solicitudes de patentes de EE.UU. 2010/0111979, 2009/0240038, 2009/0175887, 2009/0156790 y 2009/0155282, los anticuerpos humanizados EphA2 descritos en las publicaciones de solicitudes

5 internacionales de patentes WO 2011/039721 y WO 2011/039724 (como 2H11R35R74); anticuerpos anti CD38 descritos en la publicación de solicitud de patente internacional WO 2008/047242 (como hu38SB19), anticuerpos anti-folato descritos en la publicación de solicitud de patente internacional WO 2011/106528 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2012/0009181 (por ejemplo, huMov19), anticuerpos anti-IGF1R descritos en las patentes de EE.UU. 5.958.872, 6.596.743, y 7.982.024; anticuerpos anti-CD37 descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2011/0256153 (por ejemplo, huCD37-3); anticuerpos anti-integrina $\alpha_v\beta_6$ descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. 2006/0127407 (por ejemplo, CNTO95); y anticuerpos anti-Her3 descritos en la publicación de solicitud de patente internacional WO 2012/019024.

10 Los anticuerpos particularmente preferidos son los anticuerpos monoclonales humanizados que se describen en el presente documento. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, huN901, huMy9-6, huB4, huC242, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-Her2 (por ejemplo, trastuzumab), bivatuzumab, sibrotuzumab, CNTO95, huDS6, y rituximab (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.639.641 y 5.665.357, la solicitud de patente de EE.UU. provisional n.º 60/424.332 (qué está conectada con la patente de EE.UU. 7.557.189), la publicación de solicitud de patente internacional (PCT) WO 02/16401, Pedersen et al., *supra*, Roguska et al., *supra*, Liu et al., *supra*, Nadler et al., *supra*, Colomer et al., *Cancer Invest.*, 19: 49-56 (2001), Heider et al., *Eur. J. Cancer*, 31A: 2385-2391 (1995), Welt et al., *J. Clin. Oncol.*, 12: 1193-1203 (1994), y Maloney et al., *Blood*, 90: 2188-2195 (1997)). Se conocen en la técnica otros anticuerpos monoclonales humanizados y pueden utilizarse en relación con la invención.

20 En una realización, el agente de unión celular es un anticuerpo anti-folato humanizado o un fragmento de antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor de folato humano 1, donde el anticuerpo comprende: (a) un CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN; un CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃; y un CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY; y (b) un CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH; un CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA; y un CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT; donde Xaa₁ se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa₂ se selecciona de Q, H, N y R; y Xaa₃ se selecciona de G, E, T, S, A y V. Preferentemente, la secuencia de CDR2 de cadena pesada comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG.

30 En otra realización, el anticuerpo anti-folato es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al receptor de folato humano 1, que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDG
DTFYNQKFQKGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

35 En otra realización, el anticuerpo anti-folato es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo codificado por el ADN del plásmido registrado en el ATCC el 7 de abril de 2010, y que tiene como n.º de depósito en el ATCC PTA-10772 y PTA-10773 o 10774.

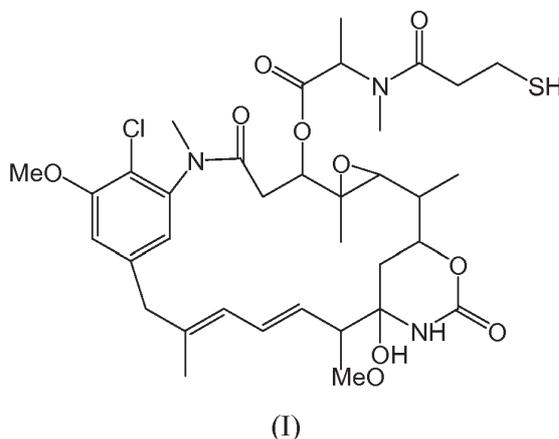
40 En otra realización, el anticuerpo anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, un 99 % o un 100 % idéntica a

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDG
DTFYNQKFQKGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQG
TTVTVSS,

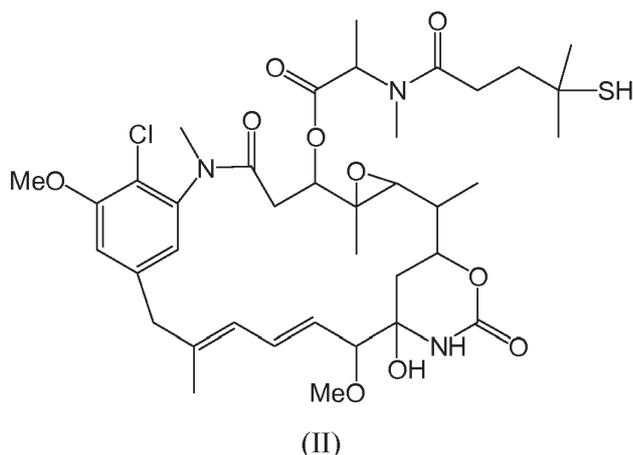
45 y un dominio variable de cadena ligera al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, un 99 % o un 100 % idéntico a

DIVLTQSPSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQQPRLLIYRASNL
 EAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKR; o
 DIVLTQSPSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQQPRLLIYRASNL
 EAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKR.

- 5 El agente citotóxico es un maitansinoide, incluyendo maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides son compuestos que inhiben la formación de microtúbulos y son altamente tóxicos para las células mamíferas. Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 4.256.746, 4.294.757, 4.307.016, 4.313.946, 4.315.929, 4.322.348, 4.331.598, 4.361.650, 4.362.663, 4.364.866, 4.424.219, 4.371.533, 4.450.254, 5.475.092, 5.585.499, 5.846.545 y 6.333.410.
- 10 Los ejemplos de análogos de maitansinol con un anillo aromático modificado incluyen: (1) C-19-decloro (patente de EE.UU. 4.256.746) (preparado por reducción LAH de ansamitocina P2), (2) C-20-hidroxi (o C-20-demetilado) +/-C-19-decloro (patentes de EE.UU. 4.361.650 y 4.307.016) (preparadas mediante desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o decloración utilizando LAH), y (3) C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (patente de EE.UU. 4.294.757) (preparada mediante acilación utilizando cloruros de acilo).
- 15 Los ejemplos de análogos de maitansinol con modificaciones de las posiciones que no son anillos aromáticos incluyen: (1) C-9-SH (patente de EE.UU. 4.424.219) (preparada mediante la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅), (2) C-14-alcoximetil (demetoxi/CH₂OR) (patente de EE.UU. 4.331.598), (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (patente de EE.UU. 4.450.254) (preparada a partir de *Nocardia*), (4) C-15-hidroxi/aciloxi (patente de EE.UU. 4.364.866) (preparada mediante la conversión de maitansinol por *Streptomyces*), (5) C-15-metoxi (patentes de EE.UU. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*), (6) C-18-N-demetilado (patentes de EE.UU. 4.362.663 y 4.322.348) (preparada mediante la desmetilación de maitansinol por medio de *Streptomyces*), y (7) 4,5-deoxi (patente de EE.UU. 4.371.533) (preparada mediante reducción de tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).
- 20 En una realización preferida de la invención, el conjugado utiliza el maitansinoide DM1 que contiene tiol, también conocido como N²-desacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maitansina, como agente citotóxico. La estructura de DM1 está representada por la fórmula (I):
- 25

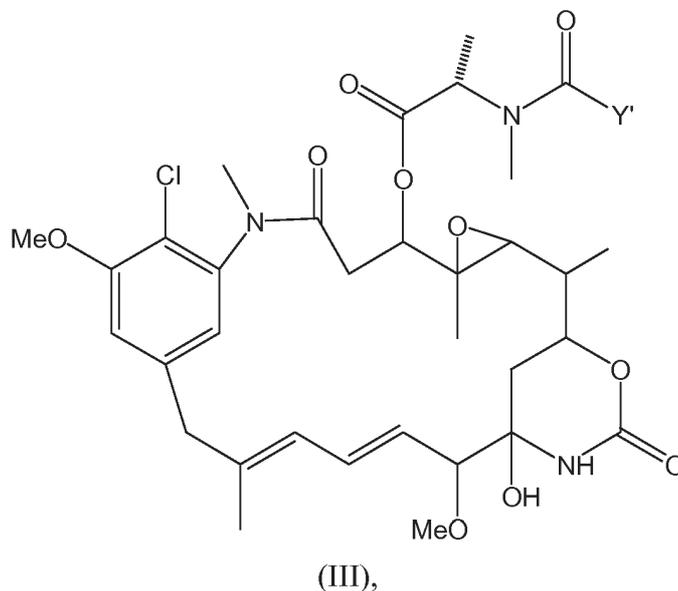


- 30 En otra realización preferida de la invención, el conjugado utiliza el maitansinoide DM4 que contiene tiol, también conocido como N²-desacetil-N²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, como agente citotóxico. La estructura de DM4 está representada por la fórmula (II):



5 Pueden usarse otros maitansinoides en el contexto de la invención, incluyendo, por ejemplo, maitansinoides que
 10 contienen tiol o disulfuro que tienen una sustitución mono o dialquilo en el átomo de carbono que porta el átomo de
 azufre. Se prefiere particularmente un maitansinoide que tiene en la posición C-3 (a) funcionalidad de hidroximetilo C-
 14, hidroxilo C-15 o desmetilo C-20 y (b) una cadena lateral de aminoácido acilada con un grupo acilo que tiene un
 grupo sulfhidrilo impedido, donde el átomo de carbono del grupo acilo que tiene la funcionalidad de tiol tiene uno o dos
 15 sustituyentes, dichos sustituyentes son CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos
 de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un aromático
 heterocíclico o un radical de heterocicloalquilo, y adicionalmente donde uno de los sustituyentes puede ser H, y donde
 el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad de
 carbonilo y el átomo de azufre.

15 Los maitansinoides adicionales que pueden usarse en el contexto de la invención incluyen los compuestos
 representados por la fórmula (III):

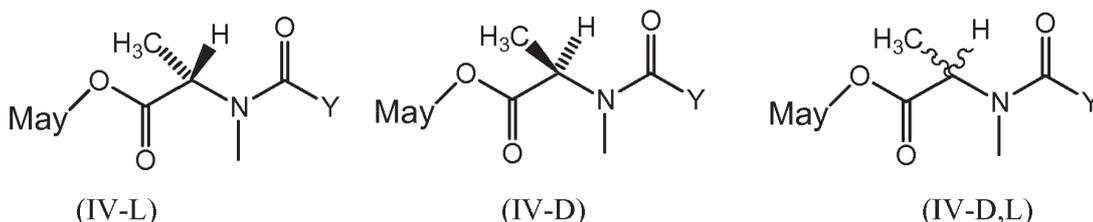


20 donde Y' representa (CR₇R₈)_l(CR₉=CR₁₀)_p(C≡C)_qA_o(CR₅R₆)_mD_u(CR₁₁=CR₁₂)_r(C≡C)_sB_t(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ,
 donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal de 1 a 10 átomos de carbono,
 alquilo o alqueno ramificado o cíclico con 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un aromático
 heterocíclico o un radical de heterocicloalquilo, y donde R₂ también puede ser H,
 donde A, B, D son cicloalquilo o cicloalqueno que tiene de 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un
 25 aromático heterocíclico, o un radical de heterocicloalquilo,
 donde R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno
 lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico con 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo
 sustituido o un aromático heterocíclico o un radical de heterocicloalquilo,
 donde l, m, n, o, p, q, r, s y t son cada uno independientemente cero o un entero de 1 a 5, con la condición de que al
 menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento, y donde Z es H, SR o COR, donde R es un
 30 alquilo o alqueno lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico con 3 a 10 átomos de

carbono, o un arilo simple o sustituido o un aromático heterocíclico, o un radical de heterocicloalquilo.

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

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



donde Y representa (CR₇R₈)(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ, donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un aromático heterocíclico o un radical de heterocicloalquilo, y donde R₂ también puede ser H,

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

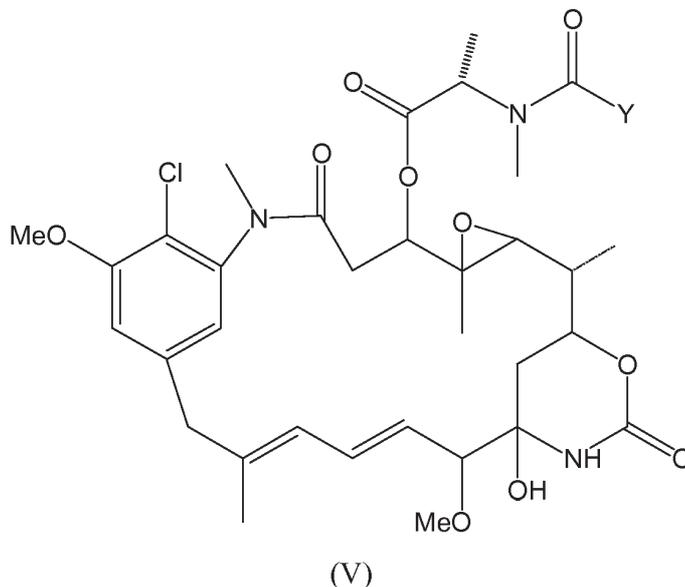
donde l, m y n son cada uno independientemente un entero de 1 a 5, y además n puede ser cero, donde Z es H, SR, o COR donde R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un aromático heterocíclico o un radical de heterocicloalquilo, y

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

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

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

Los maitansinoides adicionales preferidos también incluyen compuestos representados por la fórmula (V):



donde Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

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

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

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

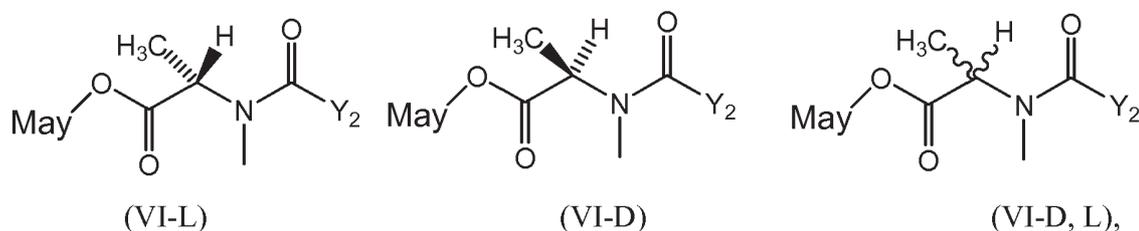
y

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

Las realizaciones preferidas de la fórmula (V) incluyen compuestos de la fórmula (V) donde (a) R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H, (b) R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H; l y m son 1; n es 0; y Z es H; (c) R_1 es H, R_2 es metilo; R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es $-SCH_3$, o (d) R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es $-SCH_3$.

Los maitansinoides preferidos incluyen compuestos representados por la fórmula (VI-L), (VI-D), o (VI-D,L):

20



donde Y_2 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

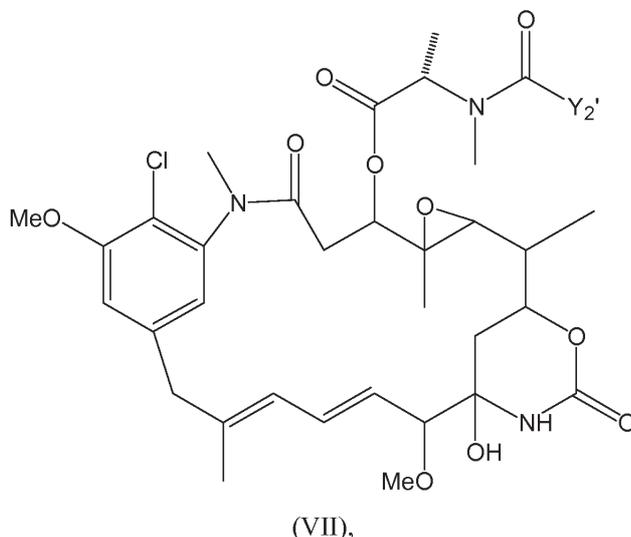
25 donde R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un aromático heterocíclico o un radical de heterocicloalquilo, y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

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

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

donde Z_2 es SR, o COR, donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un aromático heterocíclico o un radical de heterocicloalquilo, y donde May es la estructura macrocíclica de anillo del maitansinoide.

35 Los maitansinoides adicionales preferidos incluyen compuestos representados por la fórmula (VII):



donde Y_2 representa $(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_o(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,
 donde R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico con 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un aromático heterocíclico o un radical de heterocicloalquilo, y R_2 también puede ser H,

donde A, B, D son cada uno independientemente cicloalquilo o cicloalqueno que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un aromático heterocíclico, o un radical de heterocicloalquilo, donde R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico con 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un aromático heterocíclico o un radical de heterocicloalquilo,

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

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

Las realizaciones preferidas de la fórmula (VII) incluyen compuestos de la fórmula (VII), donde R_1 es H y R_2 es metilo.

Los conjugados de agente de unión celular y agente citotóxico pueden prepararse mediante métodos *in vitro*. Para poder unir un agente citotóxico al anticuerpo se usa un grupo de enlace. Los grupos de enlace adecuados son conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos de ácidos lábiles, grupos fotolábiles, grupos de peptidasa lábiles, y grupos de esterasa lábiles, así como grupos de enlace no escindibles. Por ejemplo, el agente de unión celular puede estar acoplado químicamente al agente citotóxico por medio de enlaces químicos seleccionados del grupo que consiste en enlaces disulfuro, enlaces ácidos lábiles, enlaces fotolábiles, enlaces peptidasa lábiles, enlaces tioéter y enlaces esterasa lábiles.

De acuerdo con la invención, el agente de unión celular se enlaza a un agente citotóxico por medio de un reactivo de reticulación bifuncional. Tales como se usa en el presente documento, un "reactivo de reticulación bifuncional" se refiere a un reactivo que posee dos grupos reactivos, uno de los cuales es capaz de reaccionar con un agente de unión celular mientras que el otro es capaz de reaccionar con el agente citotóxico para unir el agente de unión celular con el agente citotóxico, formando así un conjugado.

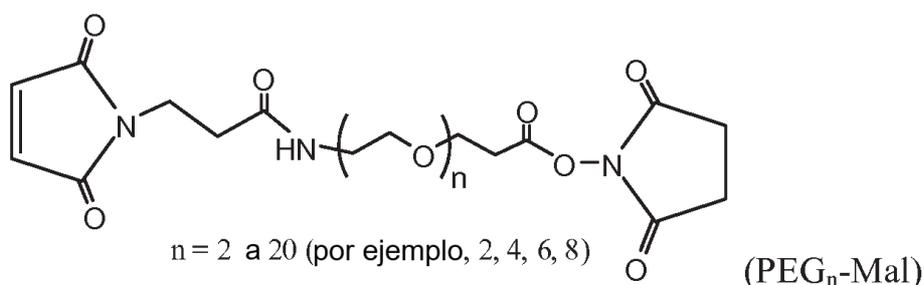
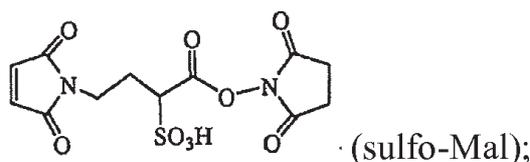
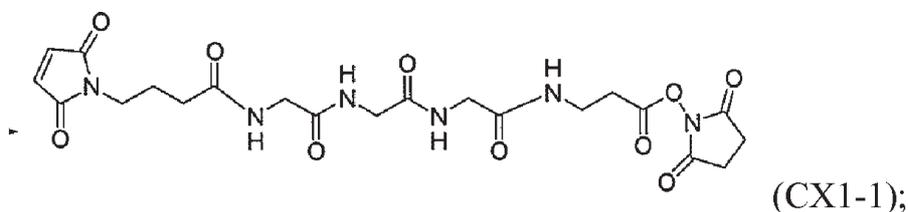
Puede usarse cualquier reactivo de reticulación bifuncional adecuado en conexión con la invención, mientras el reactivo conector proporcione la retención del agente terapéutico, por ejemplo, citotoxicidad, y las características objetivo del agente citotóxico y del agente de unión celular, respectivamente, sin toxicidad indebida. Preferentemente, la molécula conectora une al agente citotóxico con el agente de unión celular a través de enlaces químicos (tales como se describió anteriormente), de manera que el agente citotóxico y el agente de unión celular se acoplen químicamente, (por ejemplo, unidos covalentemente) entre ellos.

En una realización, el reactivo de reticulación bifuncional comprende conectores no escindibles. Un conector no escindible es cualquier resto químico que sea capaz de unir un agente citotóxico, tales como un maitsanoide, un taxano o un análogo de CC-1065, con un agente de unión celular de forma estable y covalente. Por lo tanto, los conectores no escindibles son esencialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, escisión inducida por luz, escisión inducida por peptidasa, escisión inducida por esterasa y escisión de enlace de disulfuro, en condiciones en las que el agente citotóxico o el agente de unión a la célula permanece activo.

Los reactivos de reticulación adecuados que forman conectores no escindibles entre un agente citotóxico y el agente de unión celular son conocidos en la técnica. En una realización, el agente citotóxico está unido a un agente de unión celular a través de un enlace tioéter. Los ejemplos de conectores no escindibles incluyen conectores que tienen un resto basado en haloacetilo o maleimido para la reacción con el agente citotóxico. Dichos agentes de reticulación bifuncionales son conocidos en la técnica (véanse las publicaciones de patente de EE.UU. N° 2010/0129314, 2009/0274713, 2008/0050310, 20050169933, 2009/0274713, 2010/0129314 y aquellas disponibles de Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA) e incluyen, pero no se limitan a, 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), éster de N-succinimidilo del ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), éster de N-succinimidilo del ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α -maleimidocetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB) y N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPPI). Los reactivos de reticulación que comprenden un resto basado en haloacetilo incluyen N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA), y 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidilo (SBAP), bis-maleimidopoliétilenglicol (BMPEO), BM(PEO)₂, BM(PEO)₃, éster de N-(β -maleimidopropiloxi)succinimida (BMPS), ácido 5-maleimidovalérico NHS, HBVS, ácido 4-(4-N-maleimidofenil)-butírico hidrazida•HCl (MPBH), Succinimidil-(4-vinilsulfonil)benzoato (SVSB), ditiobis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), bis-maleimidohexano (BMH), bis-maleimidoetano (BMOE), 4-(N-maleimido-metil)ciclohexan-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC), sulfosuccinimidil(4-yodo-acetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), éster de m-

Maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBS), éster de N-(γ -maleimidobutirilo) sulfosuccinimida (sulfo-GMBS), éster de N-(ϵ -maleimidocaproilo) sulfosuccinimida (sulfo-EMCS), éster de N-(κ -maleimidoundecanoilo) sulfosuccinimida (sulfo-KMUS), 4-(p-maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMPB), CX1-1, sulfo-Mal y PEG_n-Mal. Preferentemente, el reactivo de reticulación bifuncional es SMCC.

5



En una realización, el reactivo conector es un conector escindible. Los ejemplos de conectores escindibles adecuados incluyen conectores de disulfuro, conectores lábiles de ácido, conectores fotolábiles, conectores lábiles de peptidasa y conectores lábiles de estearasa. Los conectores que contienen disulfuro son conectores escindibles a través del intercambio de disulfuro, que puede ocurrir en condiciones fisiológicas. Los conectores lábiles de ácido son conectores escindibles a pH ácido. Por ejemplo, determinados compartimentos intracelulares, tales como endosomas y lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5), y proporcionan condiciones adecuadas para escindir conectores lábiles de ácido. Los conectores fotolábiles son útiles en la superficie corporal y en muchas cavidades corporales que son accesibles a la luz. Asimismo, la luz infrarroja puede penetrar el tejido. Los conectores lábiles de peptidasa pueden usarse para escindir determinados péptidos dentro o fuera de las células (véase por ejemplo, Trouet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 626-629 (1982), y Umemoto et al., *Int. J. Cancer*, 43: 677-684 (1989)). En una realización, el conector escindible se escinde bajo condiciones moderadas, es decir, condiciones dentro de una célula en la que la actividad del agente citotóxico no se ve afectada.

10

15

20

En otra realización, el agente citotóxico está enlazado a un agente de unión celular es decir, un anticuerpo a través de un enlace de disulfuro. La molécula conectora comprende un grupo químico reactivo que puede reaccionar con el agente de unión celular. Los grupos químicos reactivos preferidos para su reacción con el agente de unión celular son ésteres de *N*-succinimidilo y ésteres de *N*-sulfosuccinimidilo. Adicionalmente la molécula conectora comprende un grupo químico reactivo, preferentemente un grupo ditiopiridilo, que puede reaccionar con el agente citotóxico para formar un enlace disulfuro. Los reactivos de reticulación bifuncionales que permiten el enlace del agente de unión celular con el agente citotóxico a través de los enlaces disulfuro son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP) (véase, por ejemplo, Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)), 4-(2-piridilditio)butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB) (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.563.304), 4-(2-piridilditio)pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP) (véase, por ejemplo, número de Registro CAS 341498-08-6), y *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB) (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de EE.UU. N.º 2009/0274713). En la técnica se conocen otros reactivos de reticulación bifuncionales que pueden usarse para introducir grupos disulfuro y se describen en las patentes de EE.UU. 6.913.748, 6.716.821 y en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. 2009/0274713 y 2010/0129314.

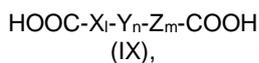
25

30

35

Otros reactivos de reticulación que carecen de un átomo de azufre que forman conectores no escindibles pueden usarse también en el método de la invención. Dichos conectores pueden derivar de restos a base de ácido dicarboxílico. Los restos a base de ácido dicarboxílico adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácidos α,ω -dicarboxílicos de la fórmula general (IX):

40



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

Muchos de los conectores no escindibles divulgados en el presente documento se describen en detalle en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2005/0169933 A1.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, no deberían entenderse como que limitan de manera alguna su alcance.

Ejemplo 1

Se hizo reaccionar el anticuerpo CD37-3 humanizado con el reactivo de reticulación heterobifuncional SMCC y el maitansinoide DM1 usando un proceso descrito previamente (por ejemplo La patente de EE.UU. 5-208-020), así como el proceso de una etapa que es el objeto de la presente solicitud.

Para el proceso descrito previamente, huCD37-3 (15 mg/ml) se hizo reaccionar primero con SMCC (exceso molar de 6,5 veces en relación a la cantidad de anticuerpo) para formar el anticuerpo modificado. La reacción de modificación se llevó a cabo a 16 °C en tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,9) que contenía EDTA 2 mM y DMA al 10 % durante 90 minutos. La reacción se inactivó con acetato 1 M para ajustar el pH a 4,5 y el anticuerpo modificado se purificó usando una columna de resina Sephadex G-25F equilibrada y eluida con acetato de sodio 20 mM (pH 4,5) que contenía EDTA 2 mM. Después de la purificación, el anticuerpo modificado (5 mg/ml) se hizo reaccionar con el maitansinoide DM1 (exceso molar de 6,8 veces en relación con la cantidad de anticuerpo; exceso de 1,3 veces en relación con la cantidad medida de conector en el anticuerpo) para formar el anticuerpo conjugado. La reacción de conjugación se llevó a cabo a 20 °C en tampón de acetato de sodio 20 mM (pH 5,0) que contenía EDTA 2 mM y DMA al 5 % durante aproximadamente 20 horas. La mezcla de reacción se purificó usando una columna de resina Sephadex G-25F equilibrada y eluida en succinato de sodio 10 mM (pH 5,0).

Para el proceso de la invención, huCD37-3 (2,5 mg/ml) se mezcló con DM1 (exceso molar de 6,2 veces en relación con la cantidad de anticuerpo) y después con SMCC (exceso de 5,2 veces en relación a la cantidad de anticuerpo). La reacción se llevó a cabo a 20 °C en tampón EPPS [ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinpropanosulfónico] 50 mM (pH 8,1) que contenía EDTA 2 mM y DMA al 10 % durante aproximadamente 2 horas. La reacción se inactivó mediante la adición de acetato 1 M para ajustar el pH a 5,0. Después la mezcla de reacción se retuvo a 2 – 8 °C durante aproximadamente 20 horas. Después de la retención, la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de PVDF de 0,2 µm y se purificó y sometió a diafiltración en succinato de sodio 10 mM (pH 5,0) usando filtración de flujo tangencial (TFF).

El conjugado derivado de los dos procesos se analizó mediante: espectroscopía UV para verificar la concentración y la carga de agente citotóxico (relación de maitansinoide respecto al anticuerpo, MAR); espectrometría de masas para determinar el nivel de conector no conjugado; electroforesis SDS PAGE reducida para determinar el nivel de la especie no reducible; y SEC-HPLC para determinar el monómero conjugado; y estabilidad durante el almacenamiento respecto a la liberación de maitansinoide libre y monómero del conjugado.

La concentración y la relación de maitansinoide respecto al anticuerpo (MAR) se determinaron mediante la medición de la absorbancia del conjugado a 252 y 280 nm en un espectrofotómetro UV-VIS y usando los coeficientes de extinción molar de DM1 y del anticuerpo a las dos longitudes de onda, para calcular las concentraciones molares del anticuerpo y de DM1.

El nivel de conector no conjugado de los conjugados se analizó mediante espectrometría de masas: se midieron las áreas de pico de la especie conjugada individual (incluyendo conjugados con o sin conectores no conjugados); se calculó el nivel de conector no conjugado mediante la proporción de la suma de áreas que contenían conectores no conjugados (pesada mediante el número de conectores) respecto a la suma de áreas de todas las especies conjugadas (también pesada mediante el número de conectores).

El nivel de especies no reducibles de los conjugados se analizó mediante electroforesis en gel SDS reducida: se midieron las áreas pico de las especies de conjugados individuales reducidas (incluyendo cadena ligera reducida, cadena pesada reducida, cadena ligera-ligera reticulada, cadena ligera-pesada reticulada, etc.); en nivel de especies no reducibles se calculó mediante la proporción de la suma de áreas de especies no reducibles respecto a la suma de las áreas de todas las especies.

El nivel de monómeros de los conjugados se analizó mediante HPLC de exclusión por tamaño: las áreas pico de especies de bajo peso molecular, monómeros, dímeros y añadidos se midieron usando un detector de absorbancia a

una longitud de onda de 252 nm o 280 nm; el nivel de monómero se calculó mediante la proporción de área de monómero respecto al área total.

5 La cantidad de maitansinoide libre presente en el conjugado se analizó mediante HPLC en doble columna (columnas HiSep y C18): las áreas pico del total de especies de maitansinoide libre (eluido en el gradiente e identificado en comparación con el tiempo de elusión con estándares conocidos) se midieron usando un detector de absorbancia a una longitud de onda de 252 nm; la cantidad de maitansinoide libre se calculó usando una curva estándar generada por las áreas pico de la cantidad conocida de estándares.

10 Como se muestra en la Tabla 1 a continuación, el conjugado elaborado usando el proceso de la invención fue superior al elaborado usando el proceso previamente descrito, con respecto al conector no conjugado, especie no reducible y monómero del conjugado. A su vez, la estabilidad del conjugado elaborado mediante el proceso de la invención resultó considerablemente superior con respecto a la liberación de maitansinoide libre después de su almacenamiento durante cinco meses a 4 °C. Los niveles de monómeros de los conjugados elaborados mediante ambos procesos resultaron estables.

Tabla 1. Comparación de propiedades clave del conjugado CD37-3 elaborado mediante el proceso de la invención en comparación con el proceso anterior

	Proceso anterior	Proceso de la invención
Concentración de conjugado	3,9	8,1
Relación de anticuerpo respecto al maitansinoide	4,1	3,4
Conector sin conjugar (%)	12	< 1
Especies no reducibles (%)	9,4	0,9
Monómero de conjugado, (%) (t=0)	97,8	98,9
Monómero de conjugado, (%) (después de 5 meses a 4 °C)	97,8	98,4
Maitansinoide libre, (%) (t=0)	0,4	0,2
Maitansinoide libre, (%) (después de 5 meses a 4 °C)	3,3	0,5

20 Los resultados de los experimentos reflejados en este ejemplo demuestran un proceso mejorado para preparar conjugados de agente de unión celular y agente citotóxico que tienen una pureza considerablemente alta. Además de las mejoras a la pureza y estabilidad del conjugado utilizando el proceso de la invención, también se presentan mejoras en los tiempos de procesamiento y conveniencia, como resultado de la eliminación de dos etapas del proceso (la reacción de modificación y la purificación del anticuerpo modificado).

25 Ejemplo 2

30 El anticuerpo huMov19 receptor de folato humanizado (véase la publicación de solicitud de EE.UU. 2012/0009181) se hizo reaccionar con el reactivo de reticulación bifuncional sulfo-SPDB y el maitansinoide DM4 usando dos procesos descritos previamente, así como el proceso mejorado que es el sujeto de la presente solicitud.

35 Para el Proceso A descrito anteriormente (proceso de dos etapas, por ejemplo Chari et al., US 5.208.020), se hizo reaccionar el anticuerpo huMov19 (20 mg/ml) en primer lugar con sulfo-SPDB (exceso molar de 5,7 veces en relación a la cantidad de anticuerpo, disuelto en DMA, dimetilacetamida) para formar el anticuerpo modificado. La reacción de modificación se llevó a cabo a 20 °C en un tampón de EPPS (4-(ácido 2-hidroxiethyl)piperazin-1-propansulfónico) 50 mM (pH 8,1) con 5 % DMA durante 180 minutos. El anticuerpo modificado se purificó usando una columna de resina Sephadex G-25F equilibrada y eluida en EPPS 50 mM (pH 8,1) con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 2 mM. Después de la purificación, el anticuerpo modificado (5,0 mg/ml) se hizo reaccionar con el maitansinoide DM4 (Disuelto en DMA; exceso molar de 9,7 veces en relación a la cantidad del anticuerpo; exceso de 1,7 veces en relación con la cantidad medida de conector en el anticuerpo) para formar el anticuerpo conjugado. La reacción de conjugación se llevó a cabo a temperatura ambiente en EPPS 50 mM (pH 8,1) que contenía EDTA 2mM y DMA al 5 % durante aproximadamente 18 horas. Después, la mezcla de reacción se purificó usando una columna de resina G-25F Sephadex equilibrada y eluida en succinato de sodio 10 mM (pH 5,0).

45 Para el Proceso B descrito anteriormente (proceso en un solo recipiente, Dai et al., patente de EE.UU. 7.811.572), se hizo reaccionar el anticuerpo huMov19 (10 mg/ml) en primer lugar con sulfo-SPDB (exceso molar de 4,9 veces en relación a la cantidad de anticuerpo, disuelto en DMA) para formar el anticuerpo modificado. La reacción de modificación se llevó a cabo a 20 °C en tampón de EPPS 50 mM (pH 7,5) que contenía EDTA 2 mM y DMA al 10 % durante 60 minutos. El anticuerpo modificado no se purificó previo a la reacción de conjugación. En su lugar, el anticuerpo modificado sin purificar se hizo reaccionar a 10 mg/ml con el maitansinoide DM4 (exceso molar de 8,3 veces en relación a la cantidad de anticuerpo, disuelto en DMA) para formar el anticuerpo conjugado. La reacción de conjugación se llevó a cabo a temperatura ambiente en tampón EPPS 50 mM (pH 7,5) que contenía EDTA 2mM y DMA al 10 % durante aproximadamente 18 horas. La mezcla de reacción se purificó usando una columna de resina

G-25F Sephadex equilibrada y eluida en succinato de sodio 10 mM (pH 5,0).

Para el proceso de la invención en que se utilizó Sephadex G-25 (Proceso C, proceso en una sola etapa) para purificar el conjugado, se mezcló anticuerpo huMov19 (6,0 mg/ml) con DM4 (exceso molar de 9,7 veces en relación a la cantidad de anticuerpo, disuelto en DMA) y después se añadió sulfo-SPDB (exceso molar de 5,7 veces en relación a la cantidad de anticuerpo, disuelto en DMA). La reacción se llevó a cabo a 20 °C en tampón de EPPS 50 mM (pH 8,1) que contenía EDTA 2 mM y DMA al 10 % durante aproximadamente 20 horas. La mezcla de reacción se purificó usando una columna de resina G-25F Sephadex equilibrada y eluida en succinato de sodio 10 mM (pH 5,0).

Para el proceso de la invención en que se utilizó filtración de flujo tangencial (TFF) (Proceso D, proceso en una sola etapa) para purificar el conjugado, se mezcló anticuerpo huMov19 (5,0 mg/ml) con DM4 (exceso molar de 10,2 veces en relación a la cantidad de anticuerpo, disuelto en DMA) y después con sulfo-SPDB (exceso molar de 6,0 veces en relación a la cantidad de anticuerpo, disuelto en DMA). La reacción se llevó a cabo a 20 °C en tampón de EPPS 50 mM (pH 8,5) que contenía EDTA 2 mM y DMA al 10 % durante aproximadamente 20 horas. Después, la mezcla de reacción se purificó y se lo sometió a diafiltración utilizando una TFF en succinato de sodio 10 mM (pH 5,0).

El conjugado derivado de los diferentes procesos se analizó mediante: Espectroscopía UV (para concentración y la relación de maitansinoide respecto a anticuerpo, MAR); HPLC de fase inversa para determinar los maitansinoides libres; Espectrometría de masas para la determinación de niveles de conectores sin conjugar perfil de distribución de masa; electroforesis SDS PAGE reducida para determinar el nivel de especies no reducibles; electroforesis SDS PAGE no reducida para la determinación del nivel de fragmentación; SEC-HPLC para determinar los monómeros del conjugado. La estabilidad durante el almacenamiento se evaluó en lo que refiere al monómero del conjugado y la liberación de maitansinoide libre. Se suministra información adicional sobre las metodologías analíticas en el Ejemplo 1,

Como se muestra en la Tabla 2, a continuación, el conjugado elaborado usando el proceso de la invención fue superior al elaborado usando los procesos previamente descritos con respecto al monómero. El conjugado elaborado utilizando los procesos de un recipiente y una etapa en que la purificación final del conjugado se realizó utilizando Sephadex G-25, Procesos B y C, respectivamente, presentaron un nivel más alto de maitansinoide libre que el conjugado elaborado utilizando el proceso de dos etapas, Proceso A. Sin embargo, cuando se utilizó un proceso de purificación final diferente, TFF (Proceso D), el nivel de maitansinoide libre fue muy bajo y comparable con el encontrado en los procesos de dos etapas, ambos después de la purificación inicial y después del almacenamiento a 4 °C durante seis semanas. En lo que respecta a los otros atributos importantes del conjugado (por ejemplo fragmentación, especies no reducibles, perfil de distribución de masa y conector sin conjugar), el conjugado elaborado utilizando el proceso de la invención fue equivalente al elaborado mediante los procesos descritos anteriormente.

Tabla 2. Comparación de propiedades clave del conjugado huMov19 elaborado mediante el proceso de la invención en comparación con procesos anteriores.

Proceso	Proceso A*	Proceso B*	Proceso C*	Proceso D**
Número de operaciones de unidad	5	4	3	3
Concentración (mg/ml)	1,0	1,0	1,0	4,2
MAR (UV)	4	3,8	3,7	3,6
Monómeros del Conjugado, (%) en t = 0	94,8	97,4	98,9	98,6
Monómeros del Conjugado, (%) en t = 6 semanas, 4 °C	94,4	97,5	98,8	98,1
Maitansinoide libre, (%) en t = 0	0,6	6,3	3,1	0,1
Maitansinoide libre, (%) en t = 6 semanas, 4 °C	0,6	5,4	2,7	0,4
Fragmentación mediante fragmento de gel no reductor (%)	10	14	14	12
Especies no reducibles mediante fragmento de gel reductor (%)	0,7	0,8	0,7	0,5
Perfil de distribución de masa (MDP)	Comparable			

Proceso	Proceso A*	Proceso B*	Proceso C*	Proceso D**
Conector no conjugado (MDP)	No Detectable			

* Purificado con Sephadex G-25

** Purificado utilizando TFF

5 Los resultados de los experimentos reflejados en este ejemplo demuestran un proceso mejorado para preparar conjugados de agente de unión celular y agente citotóxico que tienen una pureza considerablemente alta. Además de las mejoras a la pureza y estabilidad del conjugado utilizando el proceso de la invención, también se presentan mejoras en los tiempos de procesamiento y conveniencia, como resultado de la eliminación de dos etapas del proceso (la reacción de modificación y la purificación del anticuerpo modificado).

10

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que el proceso en una sola etapa que se describe en el presente documento puede utilizarse para elaborar conjugados a partir de diversos conectores y agentes citotóxicos de maitansinoide.

15

El anticuerpo humanizado huN901 se mezcló con maitansinoide (DM1 o DM4) y después con un conector (Sulfo-SMCC, SMCC, SPDB, o SPP). La reacción se realizó a 20 °C en tampón de fosfato 50 mM (pH 7,5) que contenía EDTA 2 mM y 10 % DMA durante aproximadamente 20-24 horas. La mezcla de reacción después se purificó usando una columna de resina G25F Sephadex, equilibrada y eluida en succinato de sodio 10 mM (pH 5,0).

20

Como se muestra en la Tabla 3 a continuación, la reacción en una sola etapa puede realizarse con diferentes combinaciones de conector y maitansinoide y producir un conjugado con buenos niveles de MAR y de monómeros.

Tabla 3. Elaboración de conjugados utilizando diferentes combinaciones de conector y maitansinoide

	Conector	DMx	MAR del conjugado	Monómero del conjugado (%)
Dos etapas	SPP	DM1	3,5	96,8
Una sola etapa (de la invención)	SPP	DM1	3,4	97,5
	SPDB	DM1	4,6	97,7
	SMCC	DM4	4,5	95,1
	S-SMCC	DM1	3,5	98,0
	SPDB	DM4	3,8	97,3

25

El uso de los términos "un", "una" y "el" y referentes similares utilizados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deben interpretar como abarcativos tanto del singular como del plural, salvo que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (esto es, como que significan "que incluye, pero no se limitan a"), a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en el presente documento meramente pretende servir como un método taquigráfico para referirse individualmente a cada valor separado que está dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado, salvo que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cualquiera de los ejemplos o las expresiones de ejemplo (por ejemplo, "tales como") que se proporcionan en el presente documento, pretende meramente esclarecer la invención y no representa una limitación al alcance de la invención, a menos que se reivindique lo contrario. No se debe interpretar ninguna expresión en la memoria descriptiva como una indicación de que algún elemento no reivindicado es esencial para la puesta en práctica de la invención.

30

Las realizaciones preferidas de la misma invención se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para desarrollar la invención. Las variaciones de esas realizaciones preferidas serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la descripción que antecede. Los inventores esperan que los expertos utilicen tales variaciones según sea apropiado y pretenden que la invención se practique de una forma diferente a la que se describe específicamente en el presente documento. Por lo tanto, la presente invención incluye todas las modificaciones y los equivalentes de la materia mencionada en las reivindicaciones adjuntas al presente documento según permita la legislación pertinente. Adicionalmente, toda combinación de los elementos listados anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos se encuentra incluida en la invención, salvo que se indique lo contrario en el presente documento o que lo contradiga claramente el contexto.

45

50

ES 2 709 577 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ImmunoGen, Inc.
<120> PREPARACIÓN DE CONJUGADOS DE MAITANSINOIDES Y ANTICUERPOS MEDIANTE UN PROCESO DE UNA SOLA ETAPA
5
<130> P41532EP-PCT
<140> EP12714160.4
10 <141> 29-03-2012
<150> US 61/468.997
<151> 29-03-2011
15 <160> 11
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> CDR1 de cadena pesada
<400> 1

Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

30 <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> CDR2 de cadena pesada
<220>
40 <221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa es Lys, Gln, His o Arg
<220>
45 <221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa es Gln, His, Asn o Arg
<220>
50 <221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Xaa es Gly, Glu, Thr, Ser, Ala o Val
<400> 2
55

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Phe Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 3
<211> 9

ES 2 709 577 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> CDR3 de cadena pesada

<400> 3

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr
1 5

10 <210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR1 de cadena ligera

<400> 4

20 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2 de cadena ligera

30 <400> 5

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
1 5

35 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR3 de cadena ligera

<400> 6

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

45 <210> 7
<211> 17
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2 de cadena pesada

55 <400> 7

ES 2 709 577 T3

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 8
 <211> 448
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada

10 <400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

ES 2 709 577 T3

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

ES 2 709 577 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 11

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio variable de cadena ligera

<400> 11

ES 2 709 577 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

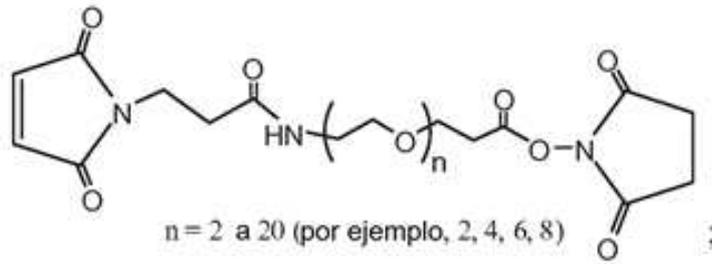
105

110

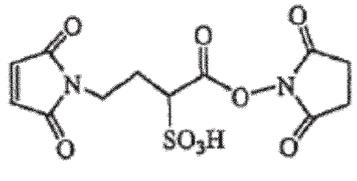
REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un conjugado de anticuerpo y maitansinoide que comprende la etapa de:
- 5 (a) poner en contacto un anticuerpo con un maitansinoide para formar una primera mezcla que comprende el anticuerpo y el maitansinoide, después poner en contacto la primera mezcla con un reactivo de reticulación bifuncional que comprende un conector, en una solución que tiene un pH de 4 a 9 para proporcionar una segunda mezcla que comprende (i) el conjugado de anticuerpo y maitansinoide, donde el anticuerpo está acoplado químicamente a través del conector al maitansinoide, (ii) maitansinoide libre, y (iii) subproductos de reacción.
- 10 2. El proceso de la reivindicación 1, donde el proceso comprende adicionalmente la etapa de:
- (b) purificar la segunda mezcla que comprende el conjugado de anticuerpo y maitansinoide para proporcionar un conjugado de anticuerpo y maitansinoide purificado.
- 15 3. El proceso de la reivindicación 2, donde la segunda mezcla se purifica al someter la mezcla a filtración de flujo tangencial, precipitación selectiva, filtración de adsorción, cromatografía de adsorción, cromatografía de no adsorción o una combinación de las mismas, para purificar el conjugado de anticuerpo y maitansinoide del maitansinoide libre y de los subproductos de reacción, preferentemente la segunda mezcla se purifica al someter la mezcla a filtración de flujo tangencial.
- 20 4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la puesta en contacto en la etapa (a) se efectúa proporcionando el agente de unión celular en un recipiente de reacción, añadiendo el maitansinoide al recipiente de reacción para formar la primera mezcla que comprende el anticuerpo y el maitansinoide, y después añadiendo el reactivo de reticulación bifuncional a la primera mezcla.
- 25 5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, que comprende adicionalmente retener la segunda mezcla entre las etapas (a) – (b) para liberar los conectores unidos de manera inestable del anticuerpo y/o inactivar la segunda mezcla entre las etapas (a) – (b) para inactivar cualquier maitansinoide sin reaccionar y/o reactivo de reticulación bifuncional sin reaccionar.
- 30 6. El proceso de la reivindicación 5, donde la segunda mezcla se retiene durante aproximadamente 20 horas a una temperatura de 2º C a 8º C.
7. El proceso de la reivindicación 5, donde la mezcla se inactiva poniendo en contacto de la segunda mezcla con un reactivo de inactivación que reacciona con el maitansinoide libre.
- 35 8. El proceso de la reivindicación 7, donde el reactivo de inactivación se selecciona del grupo que consiste en ácido 4-maleimidobutírico, ácido 3-maleimidopropiónico, N-etilmaleimida, yodoacetamida y ácido yodoacetamidopropiónico.
9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el contacto en la etapa (a) se produce en una solución que tiene un pH de 7 a 9.
- 40 10. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el contacto en la etapa (a) se produce a una temperatura de 16 °C a 24 °C o de 0 °C a 15 °C.
- 45 11. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, preferentemente un anticuerpo monoclonal humanizado.
12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, CNTO95, huDS6, rituximab, anti-Her2, anti-EGFR, anti-CD27L, anti-EGFRvIII, Cripto, anti-CD138, anti-CD38, anti-EphA2, anticuerpo dirigido a integrina, anti-CD37, anti-folato, anti-Her3 y anti-IGFIR.
- 50 13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el maitansinoide es N²-desacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) o N²-desacetil-N²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM4).
- 55 14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el anticuerpo está acoplado químicamente al maitansinoide por medio de enlaces químicos seleccionados del grupo que consiste en enlaces disulfuro, enlaces ácidos lábiles, enlaces fotolábiles, enlaces peptidasa lábiles, enlaces tioéter y enlaces estearasa lábiles.
- 60 15. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el reactivo de reticulación bifuncional comprende un resto de éster de N-succinimidilo, un resto de éster de N-sulfosuccinimidilo, un resto a base de maleimido o un resto a base de haloacetilo, preferentemente el reactivo de reticulación bifuncional se selecciona del grupo que consiste en SPDP, SPP, SPDB, sulfo-SPDB, SMCC, PEG-mal, sulfo-Mal y CX1-1; donde
- 65

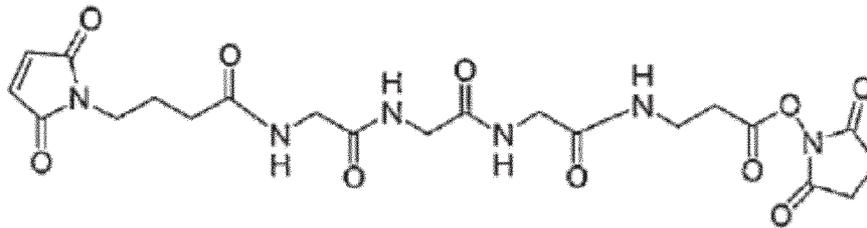
PEG-Mal es:



5 sulfo-Mal es



10 y CX1-1 es:



15 16. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde la solución en la etapa (a) comprende sacarosa y/o un agente tamponante seleccionado del grupo que consiste en un tampón citrato, un tampón acetato, un tampón succinato, un tampón fosfato, HEPPSO (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-hidroxi-propanosulfónico)), POPSO (deshidrato de piperazina-1,4-bis-(ácido 2-hidroxi-propano-sulfónico)), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico), HEPPS (EPPS) (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-propanosulfónico), TES (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico) y una combinación de los mismos.