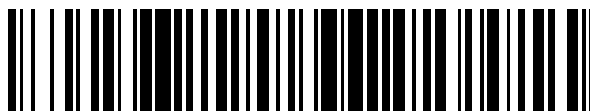


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 945**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 51/00** (2006.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2010 PCT/US2010/037046**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10141566**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2010 E 10783998 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2437790**

54 Título: **Métodos de conjugación**

30 Prioridad:

**03.06.2009 US 183774 P**

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

**10.10.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KELLOGG, BRENDA A.;  
SINGH, RAJEEVA y  
CHARI, RAVI V.J.**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 726 945 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

Métodos de conjugación

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos no. 61/183,774, presentada el 3 de junio de 2009.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un nuevo método para conjugar un grupo efector (es decir, maitansinoide) con un agente de unión celular (es decir, un anticuerpo o un fragmento del mismo), a través de un enlazador bifuncional, de manera tal que el proceso elimina las etapas que dan lugar a la formación de especies hidrolizadas no deseadas o especies reticuladas no deseadas formadas debido a las reacciones intra-moleculares o inter-moleculares.

10 **Antecedentes de la invención**

Los conjugados de agentes de unión celular, tales como los anticuerpos, con grupos efectores, tales como pequeños agentes citotóxicos o proteínas citotóxicas, son de gran interés para el desarrollo de agentes terapéuticos contra el cáncer (Richart, A. D. y Tolcher, A. W., 2007, *Nature Clinical Practice*, 4, 245-25). Estos conjugados son específicos para tumores, debido a la alta especificidad de los anticuerpos seleccionados hacia los antígenos expresados en la superficie celular de las células tumorales. Después de la unión específica a la célula tumoral, el conjugado de anticuerpo-agente citotóxico se internaliza y se degrada dentro de la célula cancerosa diana, liberando de esta manera el agente citotóxico activo que inhibe funciones celulares esenciales, tales como la dinámica de los microtúbulos o la replicación del ADN, dando lugar a la muerte de la célula cancerosa. Se han empleado varios enlazadores para unir los anticuerpos con los agentes citotóxicos, con el objetivo de incrementar la administración del agente dentro de la célula tras la internalización y el procesamiento del conjugado, mientras que se mantiene la estabilidad deseada del conjugado en el plasma. Estos enlazadores incluyen enlazadores disulfuros diseñados con diferentes grados de impedimento estérico para influir en sus cinéticas de reducción con el tiol intracelular, enlazadores peptídicos escindibles tales como el enlace valina-citrulina y enlazadores no escindibles tales como el enlace tioéter (Widdison, W., et al., *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 4392-4408; Erickson, H., et al., *Cancer Res.*, 2006, 66, 4426-4433).

Los conjugados de agentes de unión celular, tales como los anticuerpos, con grupos marcadores o informadores son útiles para aplicaciones de obtención de imágenes de tumores en pacientes con cáncer, aplicaciones de inmunoensayo para el diagnóstico de varias enfermedades, la terapia del cáncer usando conjugados de radionúcleido-ligando y aplicaciones en cromatografía de afinidad para la purificación de agentes bioactivos tales como proteínas, péptidos y oligonúcleidos. Los grupos marcadores o informadores que se conjugan con los agentes de unión celular incluyen fluoróforos y marcadores de afinidad, tales como la biotina.

El método convencional de conjugación del agente de unión celular, tal como un anticuerpo (Ac), con un grupo efector (p.ej., un agente citotóxico) o un grupo informador (p. ej., un radiomarcador) que se unen a través de un enlace no reducible (tal como el enlace tioéter) emplea dos etapas de reacción distintas con el anticuerpo y necesita el uso de etapas de purificación. En la primera etapa de la reacción, el anticuerpo se hace reaccionar con un enlazador heterobifuncional, que tiene dos grupos reactivos diferentes (p. ej., X e Y). Por ejemplo, en una estrategia, la reacción de los residuos reactivos de un anticuerpo (tal como los residuos amino de la lisina) con el grupo reactivo X (tal como el éster de *N*-hidroxisuccinimida) del reactivo heterobifuncional, da lugar a la incorporación del enlazador con el grupo reactivo Y en uno o más residuos reactivos en el anticuerpo (tal como los residuos amino de la lisina). El producto del anticuerpo modificado inicialmente debe purificarse a partir del enlazador en exceso o del reactivo enlazador hidrolizado, antes de que pueda producirse la siguiente etapa. En la segunda etapa de la reacción, el anticuerpo modificado con el enlazador que contiene el grupo reactivo Y (tal como maleimida o haloacetamida) se hace reaccionar con el efector, tal como un grupo efector (C) (p. ej., un agente citotóxico) que contiene un grupo reactivo tal como el tiol, para generar el conjugado de anticuerpo-efector, el cual se purifica de nuevo en una etapa de purificación adicional (véanse, p. ej., las patentes de los EE.UU. 5,208,020, 5,416,064, o 5,024,834). De esta manera, en el proceso anterior, se necesitan al menos dos etapas de purificación.

Otra estrategia que implica dos etapas de reacción y purificación para conjugar el anticuerpo con un grupo efector o informador, usa la reacción de los residuos de tiol en el anticuerpo (generados a través de la modificación del anticuerpo con reactivos que generan tioles tales como el 2-iminotiolano o mediante mutagénesis para incorporar residuos de cisteína no nativos o a través de la reducción de puentes disulfuro nativos) con un enlazador homobifuncional Y-L-Y que contiene grupos reactivos Y (tales como maleimida o haloacetamida).

Los mayores inconvenientes de incorporar un grupo reactivo Y tal como maleimida (o haloacetamida) en un anticuerpo o un péptido, son la propensión de los grupos reactivos maleimida (o haloacetamida) de sufrir reacción intra o inter-molecular con los residuos de histidina, lisina, tirosina, cisteína nativos en el anticuerpo o péptido (Papini, A. et al., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1992, 39, 348-355, Ueda, T. et al., *Biochemistry*, 1985, 24, 6316-6322) y la inactivación acuosa del grupo maleimida Y. La reacción intra-molecular o inter-molecular no deseada de los

grupos maleimida (o haloacetamida) Y incorporados en el anticuerpo con los residuos de histidina, lisina, o cisteína nativos en el anticuerpo y la inactivación acuosa del grupo maleimida Y antes de que ocurra la segunda reacción con el grupo efector o informador C, da lugar a proteínas reticuladas o conjugados heterogéneos y reduce la eficiencia de la segunda reacción con el grupo efector o informador C. El producto conjugado heterogéneo – de proteína o péptido reticulado generado a partir de la reacción no deseada del grupo Y inicialmente incorporado (tal como el grupo maleimida) con los grupos nativos en el anticuerpo o péptidos (tales como histidina, lisina, tirosina, o cisteína) o con los residuos maleimida inactivos generados por la inactivación acuosa, pueden tener una actividad y estabilidad inferiores a las del producto conjugado homogéneo deseado.

Los procesos para conjugar los anticuerpos a los agentes citotóxicos que contienen tiol a través de enlaces disulfuro se han descrito anteriormente (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. 5,208,020, 5,416,064, 6,441,163, Publicación de Patente de EE.UU. No. 2007/0048314 A1). Estos procesos implican la reacción inicial de los anticuerpos con un reactivo heterobifuncional, seguido de una segunda reacción con un agente citotóxico que contiene tiol. Un proceso alternativo se ha descrito en la patente de EE.UU. 6,441,163 B1, en el que el éster reactivo unido por disulfuro del agente citotóxico se purifica primero y luego se hace reaccionar con el anticuerpo, pero que implica una etapa adicional de reacción y purificación partiendo del agente citotóxico que contiene el grupo tiol antes de la etapa de reacción con el anticuerpo.

Un inconveniente adicional del presente proceso para preparar los conjugados de agentes de unión celular es la necesidad de dos etapas de purificación, lo que reduce el rendimiento general y también hace que el proceso sea engorroso y poco económico para el aumento de escala. La Publicación de Patente de EE.UU. No. US 2004/192900 describe un método para preparar conjugados de derivado de caliqueamicina anticuerpo anti-CD22. El documento WO 2007/024536 y la Publicación de Patente de EE.UU. No. 2004/235840 describen métodos para preparar conjugados de maitansinoide-anticuerpo.

En vista de lo anterior, existe una necesidad en la técnica de desarrollar métodos mejorados de preparación de composiciones de conjugados de agentes de unión celular-fármacos que tengan una pureza sustancialmente alta y que se puedan preparar evitando etapas engorrosas y reduciendo tiempo y coste para el usuario. La invención proporciona dicho método. Estas y otras ventajas de la invención, así como las características inventivas adicionales, serán evidentes a partir de la descripción de la invención que se proporciona en la presente memoria.

### Compendio de la invención

La presente invención describe un método de conjugación para preparar conjugados enlazados mediante tioéter no reducibles de la fórmula C-L-CBA, en donde C representa un agente citotóxico, L es un enlazador y CBA es un agente de unión celular (es decir, un anticuerpo o un fragmento del mismo), mediante la utilización de una reacción directa del agente citotóxico que contiene tiol (es decir, maitansinoides) con un reactivo hetero- u homo- bifuncional, (p. ej., un enlazador escindible o no escindible), seguido por el mezclado de la mezcla de reacción sin purificar con un agente de unión celular (es decir, un anticuerpo o un fragmento del mismo), generando de esta manera el conjugado enlazado mediante tioéter no reducible, mediante un proceso que es más eficiente, tiene un alto rendimiento y es susceptible de aumento de escala. Otra ventaja importante es que dicho método de conjugación produce conjugados enlazados mediante tioéter no reducibles sin reticulación intercatenaria de las proteínas o residuos inactivados (p. ej., los residuos maleimida o haloacetamida). Los métodos novedosos descritos en esta solicitud pueden aplicarse para la preparación de cualquier conjugado representado mediante la fórmula anterior.

Basándose en la descripción que está contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona un proceso para preparar un conjugado purificado en una disolución, en donde el conjugado comprende un maitansinoide que comprende un grupo tiol unido a un anticuerpo, comprendiendo el proceso las etapas de: (a) poner en contacto el maitansinoide con un reactivo enlazador bifuncional para unir covalentemente el enlazador al maitansinoide y, de esta manera, preparar una primera mezcla no purificada que comprende el maitansinoide que tiene enlazadores unidos a él, (b) conjugar un anticuerpo al maitansinoide que tiene enlazadores unidos a él haciendo reaccionar la primera mezcla no purificada con el anticuerpo para preparar una segunda mezcla y (c) someter la segunda mezcla a una filtración de flujo tangencial, diálisis, filtración en gel, cromatografía de adsorción, precipitación selectiva o una combinación de las mismas para preparar de esta manera el conjugado purificado. La presente invención y realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la conjugación del anticuerpo con una mezcla de reacción del maitansinoide DM1 (o DM4) y el enlazador maleimida-PEG<sub>n</sub>-NHS.

La Figura 2 muestra la SDS-PAGE reductora de los conjugados de Ac-(PEG<sub>4</sub>-Mal)-DM4 preparados usando el método descrito en esta invención, frente a los conjugados preparados usando el método tradicional de 2 etapas. Cada carril de muestra contenía 10 µg de proteína; el gel se tiñó con azul de Coomassie. Los carriles 1 y 2 contenían los marcadores de peso molecular. El carril 3 contenía el conjugado preparado mediante el método

tradicional de dos etapas con un 6.1 DM4 por Ac. El carril 4 contenía el conjugado preparado mediante el método descrito en esta invención y contenía 6.2 DM4 por Ac.

5 La Figura 3 muestra la electroforesis de proteínas LabChip de los conjugados de Ac-(PEG<sub>4</sub>-Mal)-DM4 preparados usando el método descrito en esta invención, frente a los conjugados preparados usando el método tradicional de 2 etapas. A. Electroforesis de proteínas LabChip en condiciones reductoras (Bioanalizador Agilent 2100 /kit Agilent Protein 230) de los conjugados de Ac-(PEG<sub>4</sub>-Mal)-DM4. Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2: Ac-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM4, 6.2 D/Ac, sintetizado usando el método descrito en esta invención; carril 3: Ac-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM4, 6.1 D/Ac, sintetizado usando el método de conjugación de 2 etapas; carril 4: Ac sin conjugar (0.24 microgramos de proteína total en cada carril). Las bandas del marcador superior, del pico del sistema y del marcador inferior representan los marcadores externos añadidos procedentes del kit. B. Cuantificación de las bandas de proteínas a partir de la electroforesis de proteínas LabChip.

15 La Figura 4 muestra la MS de los conjugados de Ac-(PEG<sub>4</sub>-Mal)-DM4 preparados usando el método descrito en esta invención, frente a los conjugados preparados usando el método tradicional de 2 etapas. A. MS del conjugado preparado mediante el método tradicional de dos etapas con 6.1 DM4 por Ac. Debido a la heterogeneidad significativa del conjugado, los picos de la MS no se pudieron resolver bien. B. MS del conjugado preparado mediante el método descrito en esta invención y que contenía 6.2 DM4 por Ac. Debido a la homogeneidad del conjugado, los picos de MS se resolvieron bien.

20 La Figura 5 muestra la unión de un conjugado del anticuerpo anti-CanAg-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM1 con 6.7 DM1 por anticuerpo (preparado usando el método descrito en esta invención) frente a la unión del anticuerpo sin modificar a células COLO205 que expresan el antígeno CanAg. La unión se midió en unidades de fluorescencia.

25 La Figura 6 muestra la citotoxicidad *in vitro* de un conjugado de anticuerpo anti-CanAg-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM1 con 6.7 DM1 por anticuerpo (preparado usando el método descrito en esta invención) hacia las células COLO205 que expresan el antígeno CanAg. El conjugado se añadió a las células COLO205 y después de 5 días de incubación continua con el conjugado, la viabilidad de las células se midió usando el ensayo WST-8. Un experimento de control para demostrar la especificidad del conjugado se llevó a cabo usando un exceso del anticuerpo anti-CanAg sin conjugar, para bloquear la unión y la citotoxicidad del conjugado hacia las células cancerosas diana.

La Figura 7 muestra la conjugación del anticuerpo con una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y el enlazador maleimida-Sulfo-NHS.

30 La Figura 8 muestra la SDS-PAGE reductora de conjugados de Ac-(Sulfo-Mal)-DMI preparados usando el método descrito en esta invención, frente a conjugados preparados con el método tradicional de 2 etapas. Cada carril de muestra contenía 10 µg de proteína; el gel se tiñó con azul de Coomassie. El carril 1 contenía los marcadores de peso molecular. Los carriles 3 y 5 contenían los conjugados preparados por el método descrito en esta invención y contenían 3.6 y 5.6 DM1 por Ac, respectivamente. Los carriles 2 y 4 contenían los conjugados preparados por el método tradicional de dos etapas y contenían 4.0 y 5.7 DM1 por Ac, respectivamente.

35 La Figura 9 muestra la electroforesis de proteínas LabChip del conjugado de Ac-(Sulfo-Mal)-DM1 preparado usando el método descrito en esta invención frente al conjugado preparado usando el método tradicional de 2 etapas. A. Electroforesis de proteínas LabChip en condiciones reductoras (Bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer/kit Agilent Protein 230) de los conjugados de Ac-(Sulfo-Mal)-DM1. Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2: Ac sin conjugar; carril 3: Ac-Sulfo-Mal-DM1, 5.7 D/Ac, sintetizado usando el método de conjugación de 2 etapas; carril 4: Ac-Sulfo-Mal-DM1, 5.6 D/Ac, sintetizado usando el método descrito en esta invención; 0.22 microgramos de proteína total se cargaron por cada pocillo. Las bandas del marcador superior, del pico del sistema y del marcador inferior representan los marcadores externos añadidos procedentes del kit (0.24 microgramos de proteína total por pocillo). B. Cuantificación de las bandas de proteínas a partir de la electroforesis de proteínas LabChip.

45 La Figura 10 muestra la comparación de LC-MS del conjugado de anticuerpo-(Sulfo-Mal)-DMI preparado mediante el método descrito en esta invención, frente al método de conjugación tradicional de dos etapas. A. La MS del conjugado con 3.6 DM1/Ac preparado usando el método descrito en esta invención muestra un conjugado homogéneo con picos discretos del conjugado que tienen 1-6 DM1. B. MS del conjugado con 4.0 DM1/Ac preparado mediante el método de conjugación tradicional de dos etapas. La MS para el conjugado preparado mediante el método tradicional de dos etapas muestra los picos correspondientes a los conjugados y los conjugados con enlazadores hidrolizados o reticulados (tal como el conjugado con 2 DM1, más un L, 2L y 3L), lo que indica un producto heterogéneo.

La Figura 11 muestra la unión de un conjugado de anticuerpo anti-CanAg-Sulfo-Mal-DMI con 5.6 DM4 por anticuerpo (preparado usando el método descrito en esta invención) frente a la unión del anticuerpo sin modificar hacia células COLO205 que expresan el antígeno CanAg. La unión se midió en unidades de fluorescencia.

55 La Figura 12 muestra la citotoxicidad *in vitro* de un conjugado de anticuerpo anti-CanAg-Sulfo-Mal-DMI con 5.6 DM4 por anticuerpo (preparado usando el método descrito en esta invención) hacia células COLO205 que expresan el

antígeno CanAg. El conjugado se añadió a las células COLO205 y después de 5 días de incubación continua con el conjugado, la viabilidad de las células se midió usando el ensayo WST-8. Un experimento de control para demostrar la especificidad del conjugado se llevó a cabo usando un exceso del anticuerpo anti-CanAg sin conjugar, para bloquear la unión y la citotoxicidad del conjugado hacia las células cancerosas diana.

5 La Figura 13 muestra la conjugación de un anticuerpo con una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y el enlazador Sulfo-NHS SMCC.

La Figura 14 muestra la SDS-PAGE reductora del conjugado de Ac-(SMCC)-DM1 preparado usando el método descrito en esta invención frente al conjugado preparado usando el método tradicional de 2 etapas. Cada carril de muestra contenía 10 µg de proteína; el gel se tiñó con azul de Coomassie. El carril 1 contiene los marcadores de peso molecular, el carril 2 contiene el Ac sin conjugar, el carril 3 contiene el conjugado preparado mediante el método de conjugación de dos etapas con 3.1 DM1 por Ac y el carril 4 contiene el conjugado preparado mediante el método descrito en esta invención con 3.1 DM1 por Ac.

10

La Figura 15 muestra la electroforesis de proteínas LabChip del conjugado de Ac-(SMCC)-DM1 preparado usando el método descrito en esta invención frente al conjugado preparado usando el método tradicional de 2 etapas. A. Electroforesis de proteínas LabChip en condiciones reductoras (Bioanalizador Agilent 2100/kit Agilent Protein 230) de los conjugados de Ac-SMCC-DM1. Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2: Ac-SMCC-DM1, 3.1 D/Ac, sintetizado usando el método descrito en esta patente; carril 3: Ac sin conjugar; carril 4: Ac-SMCC-DM1, 3.1 D/Ac, sintetizado usando el método de conjugación de 2 etapas; (0.24 microgramos de proteína total en cada carril). Las bandas del marcador superior, del pico del sistema y del marcador inferior representan los marcadores externos añadidos procedentes del kit. B. Cuantificación de las bandas de proteínas a partir de la electroforesis de proteínas LabChip.

15

20

La Figura 16 muestra la comparación de LC-MS del conjugado de anticuerpo-(SMCC)-DM1 preparado mediante el método descrito en esta invención frente al conjugado preparado mediante el método de conjugación tradicional de dos etapas. A. MS del conjugado preparado mediante el método de dos etapas secuenciales con 3.1 DM1 por Ac. Cada pico principal del conjugado tiene picos secundarios asociados debido a la presencia de fragmentos del enlazador hidrolizado y reticulado. B. MS del conjugado preparado mediante el método descrito en esta invención con 3.1 DM1 por Ac. Debido a la homogeneidad del conjugado, los picos de MS se resolvieron bien.

25

La Figura 17 muestra los mecanismos propuestos para la reticulación intercatenaria y la inactivación de la maleimida durante la conjugación por el método tradicional de 2 etapas.

La Figura 18 muestra la SDS-PAGE no reductora del conjugado de Ac-(Sulfo-Mal)-DM4 preparado usando el método descrito en esta invención e inactivando el tiol libre de DM4 (después de la reacción inicial de acoplamiento del reactivo heterobifuncional DM4 + NHS-Sulfo-Mal), usando ácido 4-maleimidobutírico antes de la reacción de conjugación con el anticuerpo. Cada muestra contenía 10 µg de proteína; el gel se tiñó con azul de Coomassie. Los carriles 1 y 5 contenían los marcadores de peso molecular. El carril 2 contenía el Ac solo. El carril 3 contenía el conjugado preparado mediante el método descrito en esta invención, sin adición de ácido 4-maleimidobutírico. El carril 4 contenía el conjugado preparado mediante el método descrito en esta invención, con la adición de ácido 4-maleimidobutírico después del reactivo heterobifuncional inicial DM4 + NHS-Sulfo-Mal (antes de la etapa de conjugación con el anticuerpo).

30

35

La Figura 19 muestra la preparación del conjugado enlazado mediante disulfuro del anticuerpo usando una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y el enlazador SPDB.

40

La Figura 20 muestra la preparación del conjugado de anticuerpo-maitansinoide, con enlazadores PEG<sub>4</sub>-Mal tanto disulfuro como no escindibles, a través de la conjugación del anticuerpo con una mezcla de reacción sin purificar de DM1 (o DM4) y enlazadores tanto SPDB como NHS-PEG<sub>4</sub>-Mal.

La Figura 21 muestra la MS del conjugado de anticuerpo-maitansinoide con enlazadores PEG<sub>4</sub>-Mal tanto disulfuro como no escindibles (preparados mediante conjugación del anticuerpo con una mezcla de reacción sin purificar de DM1, o DM4 y enlazadores tanto SPDB como NHS-PEG<sub>4</sub>-Mal).

45

La Figura 22 muestra la conjugación del anticuerpo con una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y el enlazador SMCC.

La Figura 23 muestra la MS del conjugado de anticuerpo-SMCC-DMI preparado usando SMCC mediante el método descrito en esta invención, que contienen de media 3.1 DM1 por anticuerpo.

50

La Figura 24 muestra la preparación del conjugado enlazado con disulfuro del anticuerpo usando una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y el enlazador SSNPB.

La Figura 25 muestra la conjugación del anticuerpo con una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y el enlazador heterobifuncional con la cadena de carbono alifática lineal.

### Descripción detallada de la invención

5 A continuación, se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas adjuntas. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones enumeradas, se entenderá que estas no pretenden limitar la invención a esas realizaciones. Por el contrario, se desea que la invención abarque todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que se puedan incluir dentro del alcance de la presente invención tal como se define por las reivindicaciones. Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, los cuales podrían usarse en la práctica de la presente invención.

10 Esta divulgación describe un método novedoso para conjugar un efector que contiene tiol (p. ej., un agente citotóxico) o un grupo informador (p. ej., un radiomarcador) con un agente de unión celular (p. ej., un anticuerpo), en donde el efector o el informador que contiene el grupo tiol se hace reaccionar primero con un reactivo enlazador bifuncional en un disolvente orgánico, acuoso o en una mezcla de disolventes orgánicos/acuosos, seguido de la reacción de la mezcla de reacción sin purificar con el agente de unión celular en un disolvente orgánico, acuoso o en una mezcla de disolventes orgánicos/acuosos.

Abreviaturas de las leyendas

Las abreviaturas que se han usado en las descripciones de los Esquemas y los Ejemplos que siguen son:

C = Efector o un grupo informador (p. ej., un agente citotóxico o un radiomarcador)

20 L = Enlazador (p. ej., enlazador escindible o no escindible)

X = grupo reactivo con amina (p. ej., éster de *N*-hidroxisuccinimida (NHS éster), éster de sulfo-NHS, éster de *p*-nitrofenol, éster de tetrafluorosulfonato de fenilo, éster del ácido 1-hidroxi-2-nitro-benceno-4-sulfónico)

Y = Maleimida o haloacetamida (yodoacetamida, bromoacetamida)

25  $Y_b$  es un grupo disulfuro mixto reactivo (p. ej., 2-piridilditio, 4-piridilditio, 2-nitro-piridilditio, 5-nitro-piridilditio, 2-carboxi-5-nitro-piridilditio)

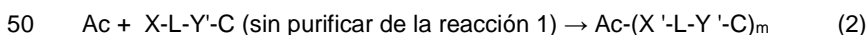
X' = enlace amida

Y' = enlace tioéter (R-S-R') o selenoéter (R-Se-R')

$Y_b'$  = enlace disulfuro (R-S-S-R')

30 En una realización de esta invención, se describe un proceso para la preparación de un conjugado enlazado por tioéter de un agente de unión celular con una molécula efectora o informadora, comprendiendo el proceso las siguientes etapas: a) poner en contacto un enlazador heterobifuncional de la fórmula X-L-Y con una molécula efectora o informadora C que contiene tiol (es decir, un maitansinoide) en mezclas de reacción de un disolvente orgánico, disolvente acuoso o disolventes orgánicos/acuosos mixtos, lo cual produce un producto intermedio de fórmula X-L-Y'-C; b) mezclar la mezcla de reacción sin purificar con un anticuerpo (Ac) para producir un conjugado de fórmula Ac-(X'-L-Y'-C)<sub>m</sub>, en donde, L es un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico, sustituido o no sustituido, que tiene de 1-10 átomos de carbono, una unidad de arilo simple o sustituido (sustituyentes seleccionados a partir de alquilo, alcoxi, halógeno, nitro, fluoro, carboxi, sulfonato, fosfato, amino carbonilo, piperidino) o una unidad que contiene polietilenglicol (preferentemente 1-500 de espaciador PEG, o más preferentemente 1-24 de espaciador PEG, o aún más preferentemente 2-8 de espaciador PEG), X e Y son grupos reactivos con amina o tiol, tales como éster de *N*-hidroxisuccinimida y maleimida o haloacetamida, Ac es un anticuerpo; m es un número entero de 1-20; X' es el sitio X modificado (p. ej., un enlace amida) tras la reacción con el anticuerpo; Y' es el sitio Y modificado (p. ej., el enlace tioéter) tras la reacción con, por ejemplo, un agente citotóxico o un radiomarcador del grupo efector o informador y c) purificación del conjugado mediante filtración de flujo tangencial, diálisis o cromatografía (p. ej., filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba) o una combinación de las mismas. Preferentemente, Y es un grupo que reacciona con tiol seleccionado de maleimida o haloacetamida. Preferentemente, L es un grupo alquilo lineal o ramificado con 1-6 átomos de carbono o 2-8 de espaciador PEG. C es un maitansinoide.

Esta secuencia de reacción representada en las fórmulas 1 y 2:



no implica la purificación del producto intermedio **X-L-Y'-C** y, por lo tanto, proporciona la ventaja de mezclarlo directamente con el anticuerpo (el producto intermedio sin purificar se añade al anticuerpo o el anticuerpo se añade al producto intermedio sin purificar), haciendo, de esta manera, que el método sea ventajoso para la conjugación, ya que elimina la necesidad de una etapa de purificación engorrosa. Es importante destacar que este método produce el conjugado homogéneo, sin reticulación intercatenaria de las proteínas o sin residuos de maleimida inactivados, a diferencia de la reticulación intercatenaria de las proteínas y los residuos de maleimida inactivados observados en los conjugados preparados mediante la secuencia de reacción y purificación tradicional de dos etapas.

La reacción **1** puede llevarse a cabo a altas concentraciones del enlazador heterobifuncional, X-L-Y y el grupo efector o informador C en disolvente acuoso, disolvente orgánico o mezclas de reacción orgánicas/acuosas, lo que da lugar a velocidades de reacción más rápidas que a concentraciones más bajas en disoluciones acuosas para los conjugados preparados mediante la secuencia de reacción y purificación tradicional de dos etapas.

El producto intermedio X-L-Y'-C generado en la reacción **1** se puede almacenar sin purificar en un estado congelado, a temperaturas bajas en disolvente acuoso a pH bajo apropiado (p. ej., pH ~ 4-6), en disolventes orgánicos o en mezclas orgánicas/acuosas mixtas o en estado liofilizado, durante periodos prolongados y puede mezclarse posteriormente con la disolución del anticuerpo para la reacción de conjugación final a un valor de pH superior de aproximadamente 4-9, por lo tanto, aumenta la conveniencia de esta secuencia de reacción. El producto intermedio se puede diluir según se requiera con disolvente orgánico o con tampón acuoso o una mezcla de disolvente orgánico y tampón acuoso, antes de mezclarse con el agente de unión celular. El término "aproximadamente", tal como se usa en la presente memoria en relación con un valor numérico, debe entenderse que se refiere a todos esos números, incluyendo todos los números y las pequeñas variaciones de los mismos. La reacción del producto intermedio X-L-Y'-C con el anticuerpo puede llevarse a cabo a valores de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente pH 9, preferentemente en el intervalo de pH de aproximadamente 5 a 8.7, más preferentemente, en el intervalo de pH de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8.5, tal como, pH 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, y 8.5, un intervalo de pH en el mismo o pequeñas variaciones del mismo. Los tampones usados para la reacción del anticuerpo con el producto intermedio X-L-Y'-C en el intervalo de pH preferencial de aproximadamente 6.5 a 8.5 son tampones con valores de  $pK_a$  de alrededor de este intervalo de pH, tales como los tampones fosfato y HEPES. Estos tampones preferidos no deben tener grupos amino primarios o secundarios u otros grupos reactivos, que puedan reaccionar con el enlazador X (tal como el éster de *N*-hidroxisuccinimida).

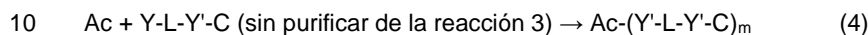
En la primera reacción se usa una cantidad estequiométrica o un ligero exceso de C con respecto del enlazador heterobifuncional X-L-Y para asegurar que todo el grupo Y (tal como maleimida) reaccione antes de que la mezcla sin purificar se añada el anticuerpo. Puede hacerse un tratamiento adicional opcional con un reactivo inactivador (tal como ácido 4-maleimidobutírico, ácido 3-maleimidopropiónico, *N*-etilmaleimida o yodoacetamida o ácido yodoacetamidopropiónico) para asegurar que cualquier C que no haya reaccionado se inactive antes de la mezcla con el anticuerpo, para minimizar cualquier reacción de intercambio tiol-disulfuro no deseada con los grupos disulfuro nativos del anticuerpo. Después de la inactivación con reactivos polares cargados que inactivan los tioles (tales como ácido 4-maleimidobutírico o ácido 3-maleimidopropiónico), el exceso de C que no ha reaccionado se convierte en un aducto cargado polar, el cual se puede separar fácilmente del conjugado enlazado covalentemente. Opcionalmente, la mezcla de reacción final **2**, antes de la purificación, se trata con nucleófilos, tales como nucleófilos que contienen grupos amino (p. ej., lisina, taurina e hidroxilamina) para inactivar cualquier enlazador (X-L-Y'-C) que no haya reaccionado.

Un método alternativo para la reacción del anticuerpo con la mezcla de reacción inicial sin purificar de maitansinoides (DMx) y el enlazador heterobifuncional implica mezclar la mezcla de reacción inicial de DMx y enlazador heterobifuncional (tras la compleción de la reacción de DMx-enlazador) con el anticuerpo a pH bajo (pH ~ 5) seguido por la adición de tampón o base para aumentar el pH hasta aproximadamente 6.5-8.5 para la reacción de conjugación.

Este nuevo método se aplica a la preparación de un conjugado del anticuerpo con el fármaco citotóxico maitansinoide. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide preparados usando este método esquematizado en la secuencia de reacción 1-2, fueron inesperadamente muy superiores en homogeneidad en comparación con los conjugados preparados mediante la secuencia de reacción y purificación tradicional de dos etapas, basándose en la caracterización de los conjugados mediante SDS-PAGE reductora, electroforesis de proteínas LabChip y espectrometría de masas. El método de conjugación descrito en esta invención, que implica la secuencia de reacción 1-2, tampoco requiere de ninguna etapa intermedia de purificación y es, por lo tanto, significativamente más conveniente que el método tradicional de dos etapas.

En un caso de la divulgación, se describe un proceso para la preparación de un conjugado enlazado por tioéter de un agente de unión celular con una molécula efectora o informadora, comprende las siguientes etapas: a) poner en contacto un enlazador homobifuncional de fórmula Y-L-Y con un grupo efector o informador C que contiene tiol o amina (tal como un agente citotóxico) en un disolvente acuoso, un disolvente orgánico, o en mezclas de reacción acuosas/orgánicas mixtas, para producir Y-L-Y'-C, b) mezclar la mezcla de reacción sin purificar con un anticuerpo

en disolución acuosa o en una mezcla acuosa/orgánica, para producir un conjugado de fórmula  $Ac-(Y'-L-Y'-C)_m$ , en donde, L es como se definió anteriormente; Y es un grupo que reacciona con tiol o amina, tal como una maleimida o haloacetamida, o *N*-hidroxisuccinimida o sulfo *N*-hidroxisuccinimida, Ac es un anticuerpo; m es un número entero del 1 al 20; Y' es el sitio Y modificado (tal como un enlace tioéter o amida) tras la reacción con el anticuerpo o un sitio Y modificado (tal como un enlace tioéter o amida) tras la reacción con el agente citotóxico o el grupo efector o informador y c) purificar el conjugado mediante filtración de flujo tangencial, diálisis o cromatografía (filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba) o una combinación de las mismas. La secuencia de reacción representada en las fórmulas 3 y 4:



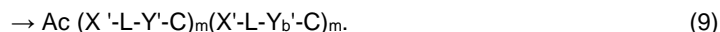
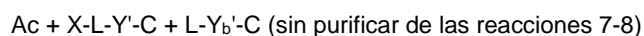
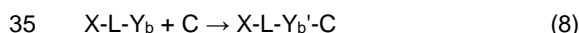
no implica ninguna purificación del producto intermedio  $Y-L-Y'-C$  y, por lo tanto, es un método ventajoso para la conjugación.

En un caso adicional, se describe un proceso para la preparación de un conjugado enlazado a través de disulfuro de un agente de unión celular con una molécula efectora o informadora que comprende las siguientes etapas: a) poner en contacto un enlazador heterobifuncional de fórmula  $X-L-Y_b$  con el grupo efector o informador C (tal como un agente citotóxico) en un disolvente acuoso, un disolvente orgánico o mezclas de reacción orgánicas/acuosas mixtas, para producir el producto intermedio  $X-L-Y_b'-C$ ; b) mezclar la mezcla de reacción sin purificar con el anticuerpo en una disolución acuosa o mezcla acuosa/orgánica para producir un conjugado de fórmula  $Ac-(X'-L-Y_b'-C)_m$ , en donde L es como se describió anteriormente,  $Y_b$  es un disulfuro reactivo, tal como un disulfuro piridilo o un disulfuro nitropiridilo; X es un grupo que reacciona con amina, tal como éster de *N*-hidroxisuccinimida o éster de sulfo *N*-hidroxisuccinimida, Ac es un anticuerpo; m es un número entero de 1 a 20; X' es el sitio X modificado (tal como el enlace amida) tras la reacción con el anticuerpo;  $Y_b'$  es el sitio  $Y_b$  modificado (disulfuro) tras la reacción con el agente citotóxico o grupo efector o informador y c) purificar el conjugado mediante filtración de flujo tangencial, diálisis o cromatografía (filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba) o una combinación de las mismas. La secuencia de reacción se representa en las fórmulas 5 y 6:



En un caso adicional, se describe un proceso para la preparación de conjugados de anticuerpos con grupos efectores o informadores con dos tipos de enlazadores -no escindible (enlace tioéter) y escindible (enlace disulfuro)- que comprende las siguientes etapas:

a) poner en contacto los enlazadores  $X-L-Y$  y  $X-L-Y_b$  con el agente citotóxico C para generar compuestos intermedios de fórmulas  $X-L-Y'-C$  y  $X-L-Y_b'-C$ , b) mezclar las mezclas de reacción sin purificar con el anticuerpo, ya sea en una secuencia o simultáneamente, como se indica en las fórmulas de reacción 7-9:



para proporcionar un conjugado de  $Ac-(X'-L-Y'-C)_m(X-L-Y_b'-C)_m$ , en donde las definiciones de X, L, Y', C,  $Y_b'$ , y m son como se han proporcionado anteriormente y m' es un número entero de 1 a 20 y c) purificar el conjugado mediante filtración de flujo tangencial, diálisis o cromatografía (filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba) o una combinación de las mismas. Estos dos intermedios enlazador-efector ( $X-L-Y'-C$  y  $X-L-Y_b'-C$ ) se mezclan sin purificar con el anticuerpo en diferentes secuencias (primero  $X-L-Y'-C$  y después  $X-L-Y_b'-C$  o primero  $X-L-Y_b'-C$  y después  $X-L-Y'-C$  o simultáneamente) en varias proporciones.

Las reacciones 1, 3, 5 y 7-8, pueden llevarse a cabo a altas concentraciones del enlazador bifuncional ( $X-L-Y$ ,  $X-L-Y_b$ , o  $Y-L-Y$ ) y el grupo efector o informador C en disolvente acuoso, disolvente orgánico o mezclas de reacción orgánicas/acuosas, lo que da como resultado velocidades de reacción más rápidas que a bajas concentraciones en disoluciones acuosas para los conjugados preparados mediante la secuencia de reacción y purificación tradicional de dos etapas, donde la solubilidad de los reactivos es limitante.

Los productos intermedios  $X-L-Y'-C$  o  $Y-L-Y'-C$  o  $X-L-Y_b'-C$  generados en las reacciones 1, 3, 5 y 7-8, se pueden almacenar sin purificar en un estado congelado, a bajas temperaturas en disolvente acuoso a pH apropiado, en disolventes orgánicos o mezclados en mezclas orgánicas/acuosas o en estado liofilizado, durante períodos



prolongados y se pueden añadir posteriormente a la disolución de anticuerpo para la reacción de conjugación final, aumentando por tanto la conveniencia de esta secuencia de reacción.

5 En la primera reacción se usa una cantidad estequiométrica o un ligero exceso de C con respecto al enlazador heterobifuncional X-L-Y o Y-L-Y o X-L-Y<sub>b</sub>, para asegurar que todo el grupo Y (tal como maleimida) reaccione antes de que la mezcla sin purificar se añada al anticuerpo. Se puede hacer un tratamiento adicional opcional con un reactivo inactivador (tal como ácido 4-maleimidobutírico o ácido 3-maleimidopropiónico o *N*-etilmaleimida o yodoacetamida o ácido yodoacético) para asegurar que cualquier grupo que no haya reaccionado en C (tal como el tiol), se inactive antes de la adición del anticuerpo, para minimizar cualquier reacción de intercambio tiol-disulfuro no deseada con los grupos disulfuro nativos del anticuerpo. La inactivación del exceso de C usando un reactivo polar cargado que inactiva tioles, después de la reacción inicial de C con el enlazador bifuncional, convierte el exceso de C en un aducto soluble en agua altamente polar, el cual se separa fácilmente del conjugado enlazado covalentemente mediante filtración en gel, diálisis o TFF. El producto conjugado final no contiene ningún C asociado no covalentemente. Opcionalmente, las mezclas de reacción finales **2**, **4**, **6** y **9**, antes de la purificación, se tratan con nucleófilos, tales como nucleófilos que contienen grupos amino (p. ej., lisina, taurina, hidroxilamina) para inactivar cualquier enlazador que no haya reaccionado (X-L-Y'-C, Y-L-Y'-C, o X-L-Yb'-C).

Un método alternativo para la reacción del anticuerpo con la mezcla de reacción inicial sin purificar de DMx y enlazador bifuncional, implica mezclar la mezcla de reacción inicial de DMx y el enlazador bifuncional (tras la compleción de la reacción de DMx-enlazador) con un anticuerpo a un pH bajo (pH ~ 5) seguido por la adición de tampón o base para aumentar el pH hasta aproximadamente 6.5 a 8.5 para la reacción de conjugación.

20 Se pueden conjugar múltiples copias de más de un tipo de efector al anticuerpo mediante la adición de dos o más intermedios enlazador-efector derivados a partir de dos o más efectores diferentes, sin purificar, al anticuerpo, ya sea en una secuencia o simultáneamente.

#### Grupo(s) efector(es)

25 Los términos grupo efector o molécula efectora se utilizan indistintamente y el término "**grupo(s) efector(es)**" o "molécula(s) efectora(s)", tal y como se usa en la presente memoria, se entiende que incluye agentes citotóxicos. En ciertos aspectos, puede ser deseable que los grupos o moléculas efectoras estén unidos por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. Se pueden conjugar múltiples copias de más de un tipo de efector al anticuerpo mediante la adición de dos o más intermedios enlazador-efector derivados a partir de dos o más efectores diferentes, sin purificar, al anticuerpo, ya sea en una secuencia o simultáneamente.

30 Los agentes citotóxicos que pueden usarse en la presente divulgación incluyen los agentes quimioterapéuticos o análogos estructurales de agentes quimioterapéuticos. "Agente quimioterapéutico" es un compuesto químico que es útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocuoona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (que incluye sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongiostatina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro de óxido de mecloretamina, melfalano, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (p. ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 1 y caliqueamicina theta I, véase, p. ej., Angew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de cromoproteínas de enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina; cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (que incluye morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, nitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestán, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico, tal como ácido frolnico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y

ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-tríclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. En esta definición se incluyen, además, los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores, tales como anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromataza, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; ARNsi y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Otros agentes quimioterapéuticos que pueden usarse con la presente descripción se describen en la Publicación de EE.UU. No. 20080171040 o la Publicación de EE.UU. No. 20080305044.

En un caso preferido, los agentes citotóxicos quimioterapéuticos son esencialmente agentes citotóxicos de molécula pequeña. Un "fármaco de molécula pequeña" se usa ampliamente en la presente memoria para hacer referencia a un compuesto orgánico, inorgánico u organometálico que puede tener un peso molecular de, por ejemplo, 100 a 1500, más apropiadamente de 120-1200, favorablemente de 200 a 1000 y típicamente tiene un peso molecular menor de aproximadamente 1000. Los agentes citotóxicos de molécula pequeña de la descripción engloban oligopéptidos y otras biomoléculas que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 1000. Los agentes citotóxicos de molécula pequeña están bien caracterizados en la técnica, tal como en el documento WO05058367A2, las Solicitudes de Patente Europea Nos. 85901495 y 8590319 y en la Patente de EE.UU. No. 4,956,303.

Los agentes citotóxicos de molécula pequeña preferidos son los que permiten el enlazamiento con el agente de unión celular. La descripción incluye agentes citotóxicos conocidos, así como aquellos que puedan ser conocidos. Los agentes citotóxicos de molécula pequeña especialmente preferidos incluyen agentes citotóxicos.

El agente citotóxico puede ser cualquier compuesto que dé lugar a la muerte de una célula o induzca la muerte celular o de alguna manera disminuye la viabilidad celular, en donde cada agente citotóxico comprende un resto tiol.

Los agentes citotóxicos preferidos son los compuestos maitansinoides, los compuestos de taxano, los compuestos CC-1065, compuestos de daunorrubicina y los compuestos de doxorrubicina, los dímeros de pirrolobenzodiazepina, caliqueamicinas, auristatinas y análogos y derivados de los mismos, algunos de los cuales se describen a continuación.

Otros agentes citotóxicos, que no son necesariamente moléculas pequeñas, tales como el ARNsi, también están englobados dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, los ARNsi pueden enlazarse a los agentes de reticulación de la presente divulgación mediante métodos usados comúnmente para la modificación de los oligonucleótidos (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de EE.UU. Nos. 20050107325 y 20070213292). Así, el ARNsi en su forma de 3' o 5'-fosforomidita se hace reaccionar con un extremo del agente de reticulación que porta una funcionalidad hidroxilo para dar un enlace éster entre el ARNsi y el agente de reticulación. De forma similar, la reacción de la fosforomidita del ARNsi con un agente de reticulación que porta un grupo amino terminal da como resultado el enlace del agente de reticulación al ARNsi a través de una amina. Los ARNsi se describen en detalle en las Publicaciones de las Solicitudes de Patentes de EE.UU. Números: 20070275465, 20070213292, 20070185050, 20070161595, 20070054279, 20060287260, 20060035254, 20060008822, 20050288244, 20050176667.

#### *Maitansinoides*

Los maitansinoides que se pueden usar en la presente invención son muy conocidos en la técnica y pueden aislarse a partir de fuentes naturales según métodos conocidos o prepararse por vía sintética según métodos conocidos.

Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen el maitansinol y análogos del maitansinol. Los ejemplos de análogos del maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

Los ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

(1) C-19-descloro (Patente de EE.UU. No. 4,256,746) (preparado por reducción LAH de ansamitocina P2);

(2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo) +/-C-19-descloro (Patentes de EE.UU. Nos. 4,361,650 y 4,307,016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración usando LAH); y

(3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (Patente de EE.UU. No. 4,294,757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo).

5 Los ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen:

(1) C-9-SH (Patente de EE.UU. No. 4,424,219) (preparado por la reacción de maitansinol con H<sub>2</sub>S o P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>);

(2) C-14-alcoximetilo (desmetoxi/CH<sub>2</sub>OR) (Patente de EE.UU. No. 4,331,598);

10 (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH<sub>2</sub>OH o CH<sub>2</sub>OAc) (Patente de EE.UU. No. 4,450,254) (preparado de *Nocardia*);

(4) C-15-hidroxi/aciloxi (Patente de EE.UU. No. 4,364,866) (preparado por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*);

(5) C-15-metoxi (Patentes de EE.UU. Nos. 4,313,946 y 4,315,929) (aislado de *Trewia nudiflora*);

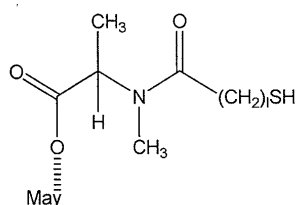
15 (6) C-18-N-desmetilo (Patentes de EE.UU. Nos. 4,362,663 y 4,322,348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y

(7) 4,5-desoxi (Patente de EE.UU. No. 4,371,533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

La síntesis de maitansinoides que contienen tiol útiles en la presente invención se describe completamente en las Patentes de EE.UU. Nos. 5,208,020, 5,416,064, y la Solicitud de Patente de EE.UU. No. 20040235840.

20 Se espera que todos los maitansinoides con un resto tiol en la posición C-3, la posición C-14, la posición C-15, o la posición C-20 sean útiles. Se prefiere la posición C-3 y la posición C-3 de maitansinol es especialmente preferida. Se prefiere, además, un maitansinoide con resto tiol C-3 que contiene *N*-metil-alanina y un maitansinoide con resto tiol C-3 que contiene *N*-metil-cisteína y análogos de cada uno.

25 Los ejemplos específicos de derivados de maitansinoide con resto tiol C-3 que contienen *N*-metil-alanina útiles en la presente invención se representan por las fórmulas **M1**, **M2**, **M3**, **M6** y **M7**.

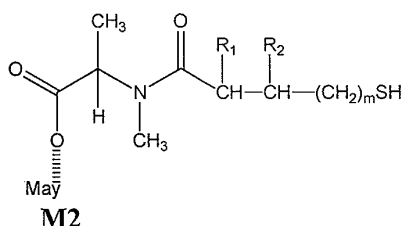


**M1**

en donde:

*l* es un número entero de 1 a 10; y

May es un maitansinoide.



**M2**

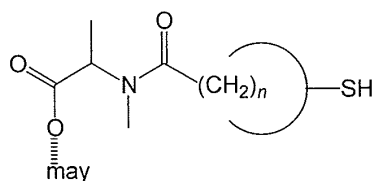
30

en donde:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son H, CH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> y pueden ser iguales o diferentes;

$m$  es 0, 1, 2 o 3; y

May es un maitansinoide.

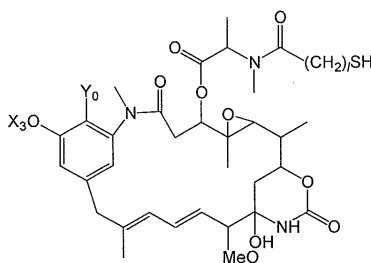


**M3**

en donde:

5  $n$  es un número entero de 3 a 8; y

May es un maitansinoide.



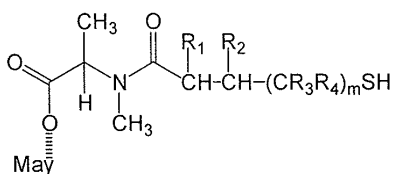
**M6**

en donde:

$l$  es 1, 2 o 3;

10  $Y_0$  es Cl o H; y

$X_3$  es H o  $CH_3$ .



**M7**

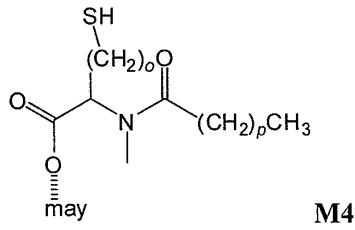
en donde:

$R_1, R_2, R_3, R_4$  son H,  $CH_3$  o  $CH_2CH_3$  y pueden ser iguales o diferentes;

15  $m$  es 0, 1, 2 o 3; y

May es un maitansinoide.

Los ejemplos específicos de derivados de maitansinoide con resto tiol C-3 que contienen *N*-metil-cisteína útiles en la presente invención se representan por las fórmulas **M4** y **M5**.

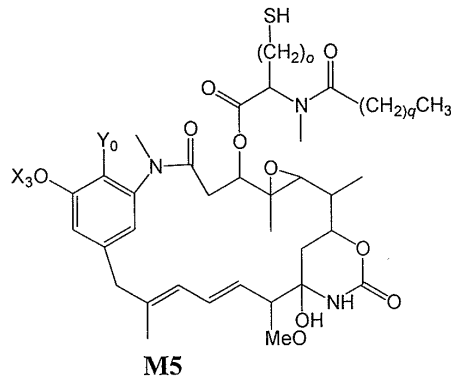


en donde:

$o$  es 1, 2 o 3;

$p$  es un número entero de 0 a 10; y

- 5 May es un maitansinoide.



en donde:

$o$  es 1, 2 o 3;

$q$  es un número entero de 0 a 10;

- 10  $Y_0$  es Cl o H; y

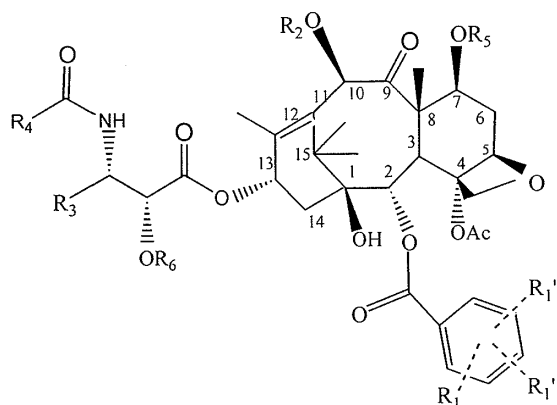
$X_3$  es H o CH<sub>3</sub>.

Los maitansinoides preferidos son los descritos en las Patentes de EE.UU. Nos. 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,441,163; 6,716,821; RE39,151 y 7,276,497.

*Taxanos*

- 15 El agente citotóxico de acuerdo con la presente divulgación puede ser también un taxano.

Los taxanos que se pueden usar en la presente descripción se han modificado para contener un resto tiol. Algunos taxanos útiles en la presente descripción tienen la fórmula T1 que se muestra a continuación:



T1

Los taxoides preferidos son los descritos en las Patentes de EE.UU. Nos. 6,340,701; 6,372,738; 6,436,931; 6,596,757; 6,706,708; 7,008,942; 7,217,819 y 7,276,499.

#### Análogos de CC-1065

- 5 El agente citotóxico de acuerdo con la presente divulgación puede ser también un análogo de CC-1065.

De acuerdo con la presente divulgación, los análogos de CC-1065 contienen una subunidad A y una subunidad B o B-C. Los análogos de CC-1065 preferidos son los descritos en las Patentes de EE.UU. Nos. 5,475,092; 5,595,499; 5,846,545; 6,534,660; 6,586,618; 6,756,397 y 7,049,316.

#### Análogos de daunorrubicina/doxorubicina

- 10 El agente citotóxico según la presente descripción puede ser también un análogo de la daunorrubicina o un análogo de la doxorubicina.

Los análogos de la daunorrubicina y doxorubicina de la presente descripción pueden modificarse para comprender un resto tiol. Los análogos de doxorubicina/daunorrubicina modificados de la presente descripción, que tienen un resto tiol, se describen en el documento WO 01/38318. Los análogos de doxorubicina/daunorrubicina modificados

- 15 pueden sintetizarse según métodos conocidos (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. No. 5,146,064).

La auristatina incluye auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometil auristatina E (MMAE) y se describen en la Patente de EE.UU. No. 5,635,483, *Int. J. Oncol.* 15:367-72 (1999); *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 3, No. 8, p. 921-932 (2004); Solicitud de EE.UU. Número 11/134826, Publicaciones de Patentes de EE.UU. Nos. 20060074008, 2006022925.

- 20 Los agentes citotóxicos de acuerdo con la presente divulgación incluyen dímeros de pirrolobenzodiazepina que se conocen en la materia (Patentes de EE.UU. Nos. 7,049,311; 7,067,511; 6,951,853; 7,189,710; 6,884,799; 6,660,856).

#### Análogos y derivados

- 25 Un experto en la técnica de los agentes citotóxicos entenderá fácilmente que cada uno de los agentes citotóxicos descritos en la presente memoria puede modificarse de manera tal que el compuesto resultante mantenga la especificidad y/o actividad del compuesto de partida. El experto en la técnica entenderá, además, que muchos de estos compuestos pueden usarse en lugar de los agentes citotóxicos descritos en la presente memoria. Así, los agentes citotóxicos de la presente descripción incluyen análogos y derivados de los compuestos descritos en la presente memoria.

- 30 **Grupo(s) informador(es)**

- Los términos grupo informador o molécula informadora se utilizan indistintamente y la expresión "grupo(s) informador(es)" o "molécula(s) informador(as)", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una sustancia que se administra a la sustancia o a las células específicas mediante el resto de afinidad específica del reactivo, con un fin diagnóstico o terapéutico; los ejemplos son los radioisótopos, agentes de contraste paramagnéticos, y agentes anticancerosos. Varios marcadores o grupos informadores son útiles para aplicaciones de obtención de imágenes de tumores en pacientes con cáncer, aplicaciones de inmunoensayo para el diagnóstico de diversas enfermedades, la terapia del cáncer usando conjugados de ligando-núcleo radiactivo y aplicaciones de cromatografía de afinidad para la purificación de agentes bioactivos, tales como proteínas, péptidos y oligonucleídos. Los marcadores o grupos
- 35 informadores que se conjugan con los agentes de unión celular incluyen fluoróforos y marcadores de afinidad tales

como biotina. Estas referencias de grupos informadores se pueden encontrar en la publicación de EE.UU. número 2007/0092940. Los grupos informadores, que incluyen, por ejemplo, biotina o fluoresceína, también se pueden unir a un residuo conjugado de PEG. Un número de grupos informadores adecuados son conocidos en la técnica, p. ej., de la Patente de EE.UU. No. 4,152,411 y la Patente de EE.UU. No. 4,166,105 de Hirschfeld, la Patente de EE.UU. No. 5,223,242, la Patente de EE.UU. No. 5,501,952, la publicación de los EE.UU. 20090136940.

### Enlazadores

Los conjugados se pueden preparar mediante métodos *in vitro*. Con el objetivo de enlazar un fármaco al agente de unión celular, se usa un grupo de enlace. Los grupos de enlace apropiados son muy conocidos en la técnica e incluyen enlazadores no escindibles o escindibles. Un enlazador no escindible es cualquier resto químico que es capaz de enlazar un agente citotóxico a un agente de unión celular de una manera covalente estable. Los enlazadores no escindibles son sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, escisión inducida por luz, escisión inducida por peptidasa, escisión inducida por esterasa y escisión del enlace disulfuro. Los ejemplos de enlazadores no escindibles incluyen los enlazadores que tienen un resto éster de N-succinimidilo, éster de N-sulfosuccinimidilo, resto basado en maleimido o haloacetilo para la reacción con el fármaco, el grupo informador o el agente de unión celular. Los reactivos de reticulación que comprenden un resto basado en maleimido incluyen 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), el cual es un análogo de "cadena larga" del SMCC (LC-SMCC), N-succinimidil éster del ácido  $\kappa$ -maleimidoundecanoico (KMUA), N-succinimidil éster del ácido  $\gamma$ -maleimidobutírico (GMBS), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido  $\epsilon$ -maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-( $\alpha$ -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-( $\beta$ -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), N-succinimidil 4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB) y N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI). 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).

Además, en el método de la invención pueden usarse otros reactivos de reticulación que carecen de un átomo de azufre que forma enlazadores no escindibles. Dichos enlazadores pueden proceder de restos basados en ácido dicarboxílico. Los restos basados en ácido dicarboxílico incluyen, pero sin limitación, los ácidos  $\alpha,\omega$ -dicarboxílicos de la fórmula general que se muestra a continuación:

### HOOC-X<sub>1</sub>-Y<sub>n</sub>-Z<sub>m</sub>-COOH

en 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 que porta de 3 a 10 átomos de carbono, Z es un grupo aromático sustituido o no sustituido que porta de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el heteroátomo se selecciona de N, O o S y en donde 1, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que 1, m y n no sean todos cero al mismo tiempo.

Muchos de los enlazadores no escindibles descritos en la presente memoria se describen en detalle en la publicación de Patente de EE.UU. número 20050169933.

Los enlazadores escindibles son enlazadores que se pueden escindir en condiciones suaves, es decir, en condiciones en las cuales la actividad del agente citotóxico no se ve afectada. Muchos enlazadores conocidos entran en esta categoría y se describen a continuación.

Los enlazadores lábiles a ácido son enlazadores escindibles a pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimentos intracelulares, tales como los endosomas y lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5), y proporcionan las condiciones adecuadas para escindir los enlazadores lábiles a ácido.

Los enlazadores que son foto-lábiles son útiles en la superficie del cuerpo y en muchas cavidades del cuerpo que sean accesibles a la luz. Además, la luz infrarroja puede penetrar el tejido.

Algunos enlazadores pueden escindirse mediante peptidasas. Sólo ciertos péptidos se pueden escindir fácilmente dentro o fuera de las células, véase, p. ej., Trouet et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sciences. USA, 626-629 (1982), Umemoto et al., 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989) y el enlace valina-citrulina escindible por la hidrolasa lisosomal (Patente de EE.UU. 6,214,345 B1). Además, los péptidos están compuestos por alfa-aminoácidos y enlaces peptídicos, los cuales químicamente son enlaces amida entre el grupo carboxilato de un aminoácido y el grupo alfa-amino de un segundo aminoácido. Se entiende que otros enlaces amida, tal como el enlace entre un carboxilato y el grupo épsilon-amino de la lisina, no son enlaces peptídicos y se consideran no escindibles.

Algunos enlazadores pueden escindirse mediante esterasas. De nuevo, solo ciertos ésteres pueden escindirse por las esterasas presentes dentro o fuera de las células. Los ésteres se forman por la condensación de un ácido carboxílico y un alcohol. Los ésteres simples son ésteres producidos con los alcoholes simples, tales como los alcoholes alifáticos y los alcoholes cíclicos pequeños y aromáticos pequeños. Por ejemplo, los presentes inventores

no encontraron ninguna esterasa que escindiera el éster en el C-3 de la maitansina, ya que el componente de alcohol del éster, el maitansinol, es muy grande y complejo.

5 Las moléculas enlazadoras escindibles preferidas incluyen, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (véase, p. ej., Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)), 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB) (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. 4,563,304), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) (véase, p. ej., el Número de Registro CAS 341498-08-6), y otros reticuladores reactivos, tales como los descritos en la Patente de EE.UU. 6,913,748.

Otros enlazadores que pueden usarse en la presente invención incluyen enlazadores cargados o enlazadores hidrófilos y se describen en las Solicitudes de Patente de EE.UU. Nos. 12/433,604 y 12/433,668, respectivamente.

## 10 Agentes de unión celular

Los agentes de unión celular usados en esta descripción son proteínas (p. ej., proteínas de inmunoglobulina y no inmunoglobulina) que se unen específicamente a antígenos diana en las células cancerosas. Estos agentes de unión celular incluyen:

- anticuerpos que incluyen:

15 - anticuerpos modificados en superficie (Patente de EE.UU. no. 5,639,641);

20 - anticuerpos humanizados o completamente humanos (los anticuerpos humanizados o completamente humanos se seleccionan de, pero no están limitados asin limitación, huMy9-6, huB4, huC242, huN901, DS6, CD38, IGF-IR, CNTO 95, B-B4, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab (véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. Nos. 5,639,641, 5,665,357, y 7 342 110, la Solicitud de Patente Internacional WO 02/16,401, la Publicación de EE.UU. número 20060045877, la Publicación de EE.UU. número 20060127407, la Publicación de EE.UU. número 20050118183, Pedersen et al., (1994) *J. Mol. Biol.* 235, 959-973, Roguska et al., (1994) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 91, 969-973, 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)); y

25 - fragmentos de anticuerpo, tales como sFv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> que se unen preferentemente a una célula diana (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)).

Los agentes de unión celular adicionales incluyen otras proteínas y polipéptidos de unión celular ejemplificados por, pero sin limitación:

30 - Proteínas de repetición de anquirina (DARPs; Zahnd et al., *J. Biol. Chem.*, 281, 46, 35167-35175, (2006); Binz, H.K., Amstutz, P. y Pluckthun, A. (2005) *Nature Biotechnology*, 23, 1257-1268) o proteínas de repetición similares a la anquirina o péptidos sintéticos descritos, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. número 20070238667; la Patente de EE.UU. No. 7,101,675; el documento WO/2007/147213; y el documento WO/2007/062466);

35 - interferones (p. ej.,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ );

- linfocinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;

- hormonas tales como insulina, TRH (hormonas de liberación de tiotropina), MSH (hormonas de estimulación de melanocitos), hormonas esteroideas, tales como andrógenos y estrógenos; y

40 - factores de crecimiento y factores de estimulación de colonias tales como EGF, TGF- $\alpha$ , IGF-1, G-CSF, M-CSF y GM-CSF (Burgess, *Immunology Today* 5:155-158 (1984)).

45 Cuando el agente de unión celular es un anticuerpo, este se une a un antígeno que es un polipéptido y puede ser una molécula transmembrana (p. ej., un receptor) o un ligando, tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen moléculas tales como la renina; una hormona de crecimiento, que incluye la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; el factor de liberación de la hormona de crecimiento; la hormona paratiroidea; la hormona estimulante de la tiroides; las lipoproteínas; la alfa-1-antitripsina; la cadena A de la insulina; la cadena B de la insulina; la proinsulina, la hormona estimulante de los folículos; la calcitonina; la hormona luteinizante; el glucagón; los factores de coagulación, tales como el factor de vmc, el factor IX, el factor tisular (FT) y el factor de von Willebrand; los factores anti-coagulantes, tales como la proteína C; el factor natriurético atrial; el surfactante pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como la uroquinasa o el activador del plasminógeno de la orina humana o de tipo tisular (t-PA); la bombesina; la trombina; el factor de crecimiento hematopoyético; el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ ; la encefalina; RANTES (expresado y secretado por células T normales en función de su



grado de activación); la proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina sérica, tal como la albúmina sérica humana; la sustancia inhibidora mülleriana; la cadena A de la relaxina; la cadena B de la relaxina; la prorrelaxina; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como la beta-lactamasa, DNasa; IgE; un antígeno asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como el CTLA-4; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); los receptores de hormonas o factores de crecimiento; la proteína A o D; los factores reumatoides; un factor neurotrófico, tal como el factor neurotrófico derivado de los huesos (BDNF), las neurotrofinas 3, 4, 5 o 6 (NT-3, NT4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso tal como el NGF-β; el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); el factor de crecimiento de fibroblastos, tal como el aFGF y bFGF; el factor de crecimiento epidérmico (EGF); el factor de crecimiento transformante (TGF), tal como el TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-betal, TGF-β2, TGF-β3, TGF-(β4 o TGF-β5); el factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I del cerebro), las proteínas de unión del factor de crecimiento similar a la insulina; las proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD40; la eritropoyetina; los factores osteoinductores; las inmunotoxinas; una proteína morfogenética del hueso (BMP); un interferón tal como el interferón alfa, beta y gamma; los factores estimulantes de colonias (CSF), p. ej., M-CSF, GM-CSF y G-CSF; las interleucinas (IL), p. ej., IL-1 a IL-10; la superóxido dismutasa; los receptores de células T; las proteínas de superficie de membrana; el factor acelerante del decaimiento; antígenos virales, tales como, por ejemplo, una porción de la envoltura del VIH; proteínas de transporte; receptores de direccionamiento; adresinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM, la subunidad alfa-V de un receptor de la integrina humana heterodimérico; un antígeno asociado a tumores, tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y los fragmentos de cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente.

Los antígenos preferidos para los anticuerpos englobados por la presente invención incluyen las proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 y CD46; los miembros de la familia de receptores ErbB, tales como el receptor del EGF, HER2, HER3 o HER4; las moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Macl, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, la integrina alfa4/beta7 y la integrina alfa v/beta3, que incluyen las subunidades alfa o beta de las mismas (p. ej., los anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b), los factores de crecimiento tales como el VEGF, el factor tisular (TF), TGF-β; interferón alfa (IFN alfa); una interleucina, tal como IL-8; IgE; antígenos del grupo sanguíneo Apo2, el receptor de muerte; el receptor de flk2/flt3; el receptor de obesidad (OB); el receptor mpl; CTLA-4; la proteína C, etc. Las dianas más preferidas en la presente memoria son el IGF-IR, CanAg, EGF-R, EphA2, MUC1, MUC16, VEGF, TF, CD19, CD20, CD22, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD138, CA6, Her2/neu, CRIPTO (una proteína producida a niveles elevados en la mayoría de las células de cáncer de mama humano), integrina alfa v/beta3, integrina alfa v/beta5, TGF-β, CD11a, CD18, Apo2 y C24.

Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes de unión celular específicos en la forma de anticuerpos monoclonales. Particularmente, son muy conocidas en la materia las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos mediante la inmunización de ratones, ratas, hámsteres o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés, tal como la célula diana intacta, antígenos aislados de la célula diana, virus enteros, virus enteros atenuados y proteínas víricas, tales como proteínas de la envoltura viral. También pueden usarse células humanas sensibilizadas. Otro método para crear anticuerpos monoclonales es el uso de fagotecas de sFv (región variable de cadena sencilla), específicamente los sFv humanos (véase, p. ej., Griffiths et al., Patente de EE.UU. no. 5,885,793; McCafferty et al., documento WO 92/01047, Liming et al., documento WO 99/06587).

La selección del agente de unión celular apropiado es una cuestión de elección que depende de la población celular particular que se va a usar como diana, pero, en general, se prefieren los anticuerpos monoclonales y los fragmentos de los mismos que se unen preferentemente a una célula diana, si está disponible uno apropiado.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal My9 es un anticuerpo IgG<sub>2a</sub> murino que es específico para el antígeno CD33 que se encuentra en las células de la leucemia mieloide aguda (AML), (Roy et al., Blood 77:2404-2412 (1991)) y se puede usar para el tratamiento de pacientes con AML. De forma similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es una IgG<sub>1</sub> murina, que se une al antígeno CD19 en las células B (Nadler et al., J. Immunol. 131:244-250 (1983)) y se puede usar si las células diana son las células B o células enfermas que expresan este antígeno tal como en el linfoma no de Hodgkin o en la leucemia linfoblástica crónica. De forma similar, el anticuerpo N901 es un anticuerpo monoclonal IgG<sub>1</sub> murino que se une a CD56 que se encuentra en las células del carcinoma de pulmón microcítico y en las células de otros tumores de origen neuroendocrino (Roy et al., J. Nat. Cancer Inst. 88:1136-1145 (1996)), el anticuerpo huC242 que se une al antígeno CanAg, Trastuzumab que se une a HER2/neu y el anticuerpo anti-receptor del EGF que se une al receptor del EGF.

### Métodos de purificación

El conjugado, es decir, el producto finalizado, de la presente invención se purifica para eliminar cualquier molécula efectora o informadora que no haya reaccionado o no se haya conjugado o el enlazador que no haya reaccionado o el enlazador hidrolizado que no se haya conjugado. El método de purificación puede ser una filtración de flujo tangencial (TFF, también conocida como filtración de flujo cruzado, ultrafiltración o diafiltración), filtración en gel, cromatografía de adsorción, precipitación selectiva o combinaciones de las mismas. Los métodos de cromatografía de adsorción incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de

interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC), cromatografía de intercambio iónico de modo mixto, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC), cromatografía de ligando coloreado, cromatografía de afinidad y cromatografía en fase inversa. Por ejemplo, el conjugado de  $Ac-(X'-L-Y'-C)_m$  descrito en la fórmula 2 se purifica a partir de C que ha reaccionado o del enlazador X-L-Y o X-L-C-Y' que no ha reaccionado o se ha hidrolizado. De forma similar, se purifican los conjugados descritos en las fórmulas 4, 6 y 9. Dichos métodos de purificación son conocidos por un experto en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en la Publicación de EE.UU. No. 2007/0048314.

### Enlazador hidrolizado o reticulación de proteínas no deseados en los conjugados

Los métodos de conjugación tradicionales que emplean la reacción inicial de una proteína con un enlazador heterobifuncional con el residuo de maleimida o haloacetamida reactivo, adolecen de dos desventajas principales: (i) el producto del conjugado puede consistir en el enlazador hidrolizado, debido a la inactivación acuosa del enlazador incorporado en el anticuerpo antes de la reacción con la molécula efectora o informadora y (ii) reticulación inter o intracatenaria del conjugado, debido a la reacción del grupo maleimida (o haloacetamida) con los residuos nativos de histidina, lisina, tirosina o cisteína en la proteína o péptido (A. Papini et al., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1992, 39, 348-355; T. Ueda et al., *Biochemistry*, 1985, 24, 6316-6322). Dicha reticulación intercatenaria en el anticuerpo podría dar lugar a varios enlaces covalentes no reducibles entre las cadenas pesada y ligera o entre dos cadenas pesadas, lo que sería evidente en el análisis de SDS-PAGE reductora como bandas de mayor peso molecular que las bandas de las cadenas pesada y ligera esperadas. Dicha reticulación intercatenaria o intracatenaria en el anticuerpo también sería evidente por MS como picos de masas aberrantes diferentes de las masas esperadas del anticuerpo más los grupos efectores o informadores unidos. A diferencia de los métodos de conjugación tradicionales, el método descrito en esta solicitud da lugar a conjugados con alta homogeneidad sin reticulación intercatenaria o enlazador hidrolizado sustancial.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos, los cuales son solamente ilustrativos, no pretenden limitar la presente invención.

#### 25 **Ejemplo 1. Conjugación del anticuerpo con el agente citotóxico DM1/DM4 usando el enlazador heterobifuncional Maleimida-PEG<sub>n</sub>-NHS mediante este método (Figura 1) frente al método tradicional de dos etapas.**

Las disoluciones madre del tiol DM1 [*N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina] o DM4 [*N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)maitansina] (DMx) y el enlazador bifuncional Maleimida-PEG<sub>n</sub>-NHS se constituyeron en *N,N*-dimetilacetamida (DMA) a las concentraciones de 30-60 mM. El enlazador y el tiol DMx se mezclaron conjuntamente en DMA que contenía hasta 50% v/v de tampón succinato 200 mM, EDTA 2 mM, pH 5.0 para dar una relación molar de DMx con respecto al enlazador de 1.6:1 y una concentración final de DMx igual a 15 mM. Después de mezclar, la mezcla de reacción se dejó durante 1-4 h y después una parte alícuota de la mezcla de reacción se diluyó 10 veces y se midió su absorbancia a 302-320 nm para determinar la presencia de cualquier maleimida restante que no hubiese reaccionado, usando el coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) de la maleimida a 302 nm = 620 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, y  $\epsilon_{320\text{ nm}} \sim 450\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ . (El análisis de HPLC de fase inversa adicional de una parte alícuota congelada de la mezcla de reacción se llevó a cabo posteriormente monitorizando la absorbancia a 302 nm y 252 nm, para verificar la desaparición completa de la maleimida del enlazador y la formación del reactivo enlazador-DMx deseado en el momento de la adición de la mezcla de reacción al anticuerpo). Cuando se determinó por UV que no había más maleimida presente, se añadió una parte alícuota de la mezcla de reacción sin purificar a una disolución del anticuerpo en tampón fosfato (pH 7.5) en condiciones de conjugación final de 4 mg/ml del Ac, tampón fosfato al 90%/DMA al 10%, pH 7.5. La reacción de conjugación se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 2 horas. El conjugado de Ac-DMx se purificó a partir del exceso de los reactantes DMx de molécula pequeña y el enlazador usando una columna de filtración en gel G25 equilibrada en tampón fosfato a pH 7.5 o usando filtración de flujo tangencial (TFF). La mezcla de conjugación se mantuvo adicionalmente a 4 °C durante 2 días en tampón a pH 7.5 para permitir la disociación de cualquier especie de DMx unida al anticuerpo de forma no covalente o a través de un enlace lábil. El conjugado se dializó entonces durante la noche en un tampón histidina/glicina a pH 5.5 y luego se filtró a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  para el almacenamiento final. El número de moléculas de DMx por molécula de anticuerpo Ac (promedio) en el conjugado final se midió mediante la determinación de la absorbancia del conjugado a 252 y 280 nm y usando los coeficientes de extinción conocidos para DMx y el anticuerpo a estas dos longitudes de onda.

Se usaron varias condiciones de reacción diferentes para la reacción inicial del tiol DMx con el reactivo heterobifuncional maleimida-PEG<sub>4</sub>-NHS: DMA al 50%/tampón succinato acuoso 200 mM al 50%, pH 5.0, EDTA 2 mM (v/v); o DMA al 60%/tampón succinato 200 mM al 40% a pH 5.0, EDTA 2 mM (v/v) o DMA al 100% con 1.5 equivalentes molares de una base orgánica (por ejemplo *N,N'*-diisopropil etilamina, DIPEA o 4-metilmorfolina) por mol de tiol DM4.

En una serie de experimentos, el equivalente molar de DMx con respecto al enlazador maleimida-PEG<sub>4</sub>-NHS (comprado en Pierce Endogen) se varió desde 1.2 - 2.4, y el tiempo de reacción fue de 30 min. El número de DMx/Ac medido en los conjugados purificados se midió como una función de los equivalentes añadidos de DMx por enlazador. Las condiciones 1.2 - 2.0 equivalentes de DM1/enlazador dieron conjugados con similares cargas de DMx/Ac, lo que indica que la reacción indeseada del tiol DMx en el lado éster de NHS del enlazador no es un problema significativo. La cantidad de reticulación presente en los conjugados finales también se analizó mediante SDS-PAGE reductora, mostrando que la presencia de contaminantes reticulados disminuye significativamente con el incremento de la relación DM1/enlazador.

Una etapa de inactivación opcional usando reactivos de maleimida o haloacetamida (tales como el ácido maleimidobutírico o el ácido maleimidopropiónico o *N*-etilmaleimida o yodoacetamida o ácido yodoacético) se introdujo después de la compleción de la reacción inicial de DMx y el enlazador heterobifuncional (antes de la adición de la mezcla de reacción al anticuerpo) para inactivar el exceso del grupo tiol de DMx, con el objetivo de prevenir cualquier reacción no deseada del tiol DMx con el anticuerpo.

Un método alternativo para la reacción del anticuerpo con la mezcla de reacción sin purificar inicial de DMx y el enlazador heterobifuncional, implicó mezclar la mezcla de reacción inicial de DMx y enlazador heterobifuncional (tras la compleción de la reacción de DMx-enlazador) con el anticuerpo a un pH bajo (pH ~ 5) seguido por la adición de tampón o base para incrementar el pH a 6.5-8.5 para la reacción de conjugación.

Se preparó un conjugado de anticuerpo-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM1 o DM4 por el método de conjugación tradicional de dos etapas para la comparación con el método de conjugación descrito en esta invención. El anticuerpo humanizado a una concentración de 8 mg/ml en tampón fosfato a pH 7.5 (fosfato de potasio 50 mM, cloruro de sodio 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7.5) y DMA al 5% se modificó con exceso del reactivo enlazador maleimida-PEG<sub>4</sub>-NHS heterobifuncional (comprado en Pierce Endogen). Después de 2 horas a 25 °C, el anticuerpo modificado se purificó por cromatografía en gel G25 para eliminar el exceso del enlazador no incorporado que no había reaccionado. La recuperación del Ac purificado se determinó por absorbancia UV a 280 nm. El número de grupos maleimida enlazados en el Ac modificado se determinó usando una pequeña parte alícuota del anticuerpo modificado mediante la adición de una cantidad conocida de tiol (tal como 2-mercaptoetanol), añadido en exceso sobre la maleimida, para que reaccionara con los residuos maleimida en el anticuerpo modificado y entonces ensayar el tiol remanente mediante el ensayo de Ellman, usando el reactivo DTNB (coeficiente de extinción de tiolato de TNB a 412 nm = 14150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; Riddles, P. W. et al., *Methods Enzymol*, 1983, 91, 49-60.; Singh, R., *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 348-351). La conjugación del Ac modificado con el tiol DM1 o DM4 se llevó a cabo a una concentración del Ac de 2.5 mg/ml en una mezcla de reacción que consistió en tampón fosfato al 95% a pH 7.5 (fosfato de potasio 50 mM, cloruro de sodio 50 mM, EDTA 2 mM, a pH 7.5) y DMA al 5%. Se añadió un exceso de 1.7 equivalentes molares de tiol DM1 o DM4 por mol de maleimida enlazada en el Ac. Después de reaccionar durante la noche a 25 °C, el conjugado se filtró de forma estéril usando un filtro de 0.22 µm y se purificó en gel del exceso de DM1 o DM4 sin reaccionar mediante una columna G25 equilibrada en tampón fosfato a pH 7.5 (fosfato potásico 50 mM, cloruro de sodio 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7.5). El conjugado purificado se mantuvo a 4 °C durante 2 días en tampón fosfato a pH 7.5 (fosfato de potasio 50 mM, cloruro de sodio 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7.5) para permitir la disociación de cualquier especie de DM1 o DM4 unida al anticuerpo de forma no covalente o a través de un enlace lábil. El conjugado se dializó posteriormente durante 2 días en tampón histidina/glicina a pH 5.5 (glicina 130 mM/histidina 10 mM, pH 5.5) y se filtró de forma estéril usando un filtro de 0.22 µm. El número de moléculas de DM1 o DM4 por cada molécula de Ac en el conjugado final se midió mediante determinación de la absorbancia del conjugado a 252 y 280 nm, usando los coeficientes de extinción conocidos para DM1/DM4 y el Ac a estas dos longitudes de onda.

La SDS-PAGE reductora se llevó a cabo en muestras del conjugado y del anticuerpo usando el sistema de electroforesis NuPage con Bis Tris Gel al 4-12% (Invitrogen). Las muestras desnaturalizadas por calor y reducidas se cargaron a 10 µg/carril. La SDS-PAGE reductora de los conjugados preparados usando el método descrito en esta invención mostró solamente las bandas de las cadenas pesada y ligera esperadas (50 kDa y 25 kDa, respectivamente) como bandas principales (Figura 2). En contraste, los conjugados preparados por el método de conjugación tradicional de dos etapas mostraron bandas reticuladas no deseadas con pesos moleculares de 75, 100, 125 y 150 kDa, presumiblemente correspondientes a especies reticuladas entre las cadenas HL, H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>L y H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>, respectivamente (Figura 2).

El análisis de la electroforesis de proteínas LabChip (en condiciones reductoras) del conjugado de anticuerpo-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM4 preparado mediante el método descrito en esta invención mostró las bandas de las cadenas pesada y ligera esperadas, con porcentajes del 58 y 30% (de la proteína total), las cuales son similares a las del anticuerpo sin conjugar del 65 y 30% respectivamente (Figura 3). En contraste, el conjugado preparado usando el método de conjugación tradicional de dos etapas mostró bandas pesada y ligera de solamente el 16 y 8% respectivamente y bandas principales de pesos moleculares más altos que varían de 94-169 kDa, presumiblemente debido a la reticulación intercatenaria. Sobre la base del análisis cuantitativo de proteínas LabChip, el conjugado preparado mediante el método descrito en esta solicitud es muy superior al preparado usando el proceso convencional de dos etapas (Figura 3).

El análisis de MS de los conjugados preparados mediante el método descrito en esta invención mostró picos discretos del conjugado de anticuerpo-DMx para el anticuerpo que porta números crecientes de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo (Figura 4). En contraste, la MS del conjugado obtenido usando el método tradicional de 2 etapas quedó apenas sin resolverse, sugiriendo la falta de homogeneidad de la preparación del conjugado presumiblemente debida a la reticulación o a la inactivación del enlazador maleimida. Sobre la base de la MS, por lo tanto, el conjugado preparado usando el método descrito en esta invención es superior al sintetizado por el método tradicional de dos etapas.

La unión de un conjugado de Ac anti-CanAg-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM1 preparado mediante el método descrito en esta invención, se midió por citometría de flujo usando células COLO205 que expresan el antígeno y se encontró que era similar a la del anticuerpo sin conjugar, lo que sugiere que la conjugación no tuvo ningún efecto perjudicial en la unión del anticuerpo (Figura 5). La actividad citotóxica del conjugado de Ac anti-CanAg-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM1 preparado mediante el método descrito en esta invención se midió *in vitro* usando células de cáncer de colon COLO205 que expresan el antígeno CanAg (Figura 6). Las células cancerosas que expresan el antígeno se sembraron en placas a aproximadamente 1000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio de cultivo celular que contenía suero fetal bovino y se expusieron a diferentes concentraciones del conjugado de Ac-DMx. Después de una exposición de 5 días al conjugado, las células viables que permanecieron en cada pocillo se midieron usando el ensayo WST-8 (Dojindo Molecular Technologies). Como se muestra en la Figura 6, el conjugado de Ac anti-CanAg-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM1 preparado usando este método fue altamente potente a bajas concentraciones frente a las células de cáncer de colon COLO205 que expresan el antígeno CanAg. La citotoxicidad del conjugado de Ac anti-CanAg-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM1 preparado mediante el método descrito en esta invención fue específica para las células COLO205, ya que pudo bloquearse por la adición de exceso del anticuerpo, sin conjugar.

#### **Ejemplo 2. Conjugación del anticuerpo con DM1/DM4 usando el enlazador maleimida-Sulfo-NHS mediante este método (Figura 7) frente al método tradicional de dos etapas secuenciales.**

Las disoluciones madre del tiol DMx y del enlazador maleimida-Sulfo-NHS heterobifuncional se constituyeron en *N,N*-dimetilacetamida (DMA) a las concentraciones de 30-60 mM. El enlazador y el tiol DMx se mezclaron conjuntamente en DMA que contenía hasta un 40% v/v de tampón succinato 200 mM, EDTA 2 mM, pH 5.0 para dar una relación de DMx con respecto al enlazador de 1.6 y una concentración final de DMx igual a 15 mM. Después de mezclar, la reacción se dejó durante 1-4 h y después una parte alícuota de la mezcla de reacción se diluyó 10 veces para medir la absorbancia a 302-320 nm para la evaluación de la compleción de la reacción y la ausencia de maleimida. (El análisis de HPLC de fase inversa adicional de una parte alícuota congelada de la mezcla de reacción se llevó a cabo posteriormente monitorizando la absorbancia a 302 nm y 252 nm, para verificar la desaparición completa de la maleimida del enlazador y la formación del reactivo enlazador-DMx deseado en el momento de la adición de la mezcla de reacción al anticuerpo). Cuando se determinó mediante UV que no había más maleimida presente, una parte alícuota de la mezcla de reacción se añadió a una mezcla del anticuerpo en tampón fosfato (pH 7.5) en condiciones de conjugación final de 4 mg/ml del Ac, tampón fosfato al 90%/DMA al 10%, pH 7.5. La reacción de conjugación se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 2 h. El conjugado de Ac-DMx se purificó a partir del exceso de los productos de DMx sin reaccionar y del enlazador sin conjugar usando una columna de filtración en gel G25 equilibrada en tampón fosfato a pH 7.5 o mediante filtración de flujo tangencial. El conjugado se mantuvo a 4 °C durante 2 días en tampón a pH 7.5 para permitir la disociación de cualquier especie de DMx unida al anticuerpo de forma no covalente o a través de un enlace lábil. El conjugado se dializó entonces durante la noche en un tampón histidina/glicina a pH 5.5 y luego se filtró a través de un filtro de 0.22 µm para el almacenamiento final. El número de moléculas de DMx por molécula de anticuerpo Ac (promedio) en el conjugado final se midió mediante la determinación de la absorbancia del conjugado a 252 y 280 nm y usando los coeficientes de extinción conocidos para DMx y el anticuerpo a estas dos longitudes de onda.

Para la comparación, se prepararon conjugados de Ac-Sulfo-Mal-DMx usando el método de conjugación tradicional de 2 etapas. El anticuerpo (Ac) a una concentración de 8 mg/ml en tampón fosfato a pH 7.5/tampón DMA al 5% se modificó con exceso del enlazador maleimida-Sulfo-NHS bifuncional. La reacción se dejó transcurrir a 20 °C durante 2 h y luego el Ac modificado se purificó a partir del exceso enlazador sin reaccionar usando cromatografía G25. La recuperación del Ac purificado se determinó por absorbancia de UV a 280 nm. El número de grupos maleimida enlazados en el Ac modificado se determinó usando una pequeña parte alícuota del anticuerpo modificado mediante la adición de una cantidad conocida de tiol (tal como el 2-mercaptoetanol), añadido en exceso con respecto a la maleimida, para reaccionar con los residuos de maleimida en el anticuerpo modificado y luego ensayando el tiol remanente mediante el ensayo de Ellman usando el reactivo DTNB (coeficiente de extinción de tiolato de TNB a 412 nm = 14150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; Riddes, P. W. et al., *Methods Enzymol*, 1983, 91, 49-60.; Singh, R., *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 348-351). La conjugación del Ac modificado con DMx se llevó a cabo a una concentración del anticuerpo de 2.5 mg/ml en tampón fosfato al 95%, pH 7.5/DMA al 5% (v/v), con 1.7 equivalentes molares del tiol DMx añadidos por mol de maleimida enlazada en el Ac. La reacción se dejó durante 8-24 horas a 18 °C y el conjugado se separó a partir del exceso de DMx sin reaccionar a través de cromatografía de exclusión por tamaño G25. Después de la purificación, el conjugado se mantuvo a 4°C durante 2 días en tampón a pH 7.5 para permitir la disociación de cualquier especie de DMx unida al anticuerpo de forma no covalente o por medio de un enlace lábil. El conjugado se

dializó entonces durante la noche en un tampón histidina/glicina a pH 5.5 y luego se filtró a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  para el almacenamiento final. El número de moléculas de DMx por molécula de Ac en el conjugado final se midió mediante la determinación de la absorbancia del conjugado a 252 y 280 nm y usando los coeficientes de extinción conocidos de DMx y del anticuerpo a estas dos longitudes de onda.

5 La SDS-PAGE reductora se llevó a cabo usando muestras del conjugado y de anticuerpo (10  $\mu\text{g}$ /carril), usando el sistema de electroforesis NuPage (Invitrogen) con un Mini Gel NuPage Bis Tris al 4-12% y tampón de operación NuPAGE MOPS SDS (Figura 8). Las bandas en el gel con pesos moleculares de 75, 125 y 150 kDa fueron indicativas de especies reticuladas entre cadenas (HL, H<sub>2</sub>L y H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>, respectivamente). Una comparación de los conjugados de Ac-Sulfo-Mal-DM1 con ~4 DM1/Ac (carril 3, por este método y carril 2, por el método de conjugación tradicional de 2 etapas, respectivamente) y ~6 DM1/Ac (carril 5, por este método y carril 4, por el método de conjugación tradicional de 2 etapas, respectivamente) muestra claramente que los conjugados preparados a través del método descrito en esta invención (carriles 3 y 5) tuvieron una proporción mucho menor de especies reticuladas de alto peso molecular que los conjugados preparados por el método tradicional de 2 etapas (carriles 2 y 4).

15 El análisis por electroforesis de proteínas LabChip (en condiciones reductoras) del conjugado de anticuerpo-Sulfo-Mal-DM1 preparado mediante el método descrito en esta invención, mostró las bandas principales de las cadenas pesada y ligera con porcentajes del 70 y el 28% (de la proteína total), que son similares a las del anticuerpo sin conjugar del 70 y 30% respectivamente (Figura 9). En contraste, el conjugado preparado usando el método tradicional de dos etapas mostró bandas pesada y ligera de sólo el 53 y 23% respectivamente y bandas principales de pesos moleculares más altos en el rango de 99-152 kDa, debido presumiblemente a la reticulación intercatenaria. Sobre la base del análisis cuantitativo de proteína LabChip, el conjugado preparado mediante el método descrito en esta solicitud es muy superior en términos de ausencia de reticulación intercatenaria en comparación con el preparado usando el proceso convencional de dos etapas (Figura 9).

25 Los conjugados de Ac-Sulfo-mal-DM1 con cargas de fármaco similares preparados a través del método descrito en esta invención y por el método tradicional de dos etapas, se compararon mediante análisis de LC/MS de exclusión por tamaño (Figura 10). Los conjugados preparados a través del método descrito en esta invención muestran el espectro de MS deseado, que contiene solamente la distribución de picos esperada con igual masa a Ac-(enlazador-DMx)<sub>n</sub>. En el caso de los conjugados preparados usando el método tradicional de dos etapas, todos los picos principales en el espectro contenían uno o más fragmentos del enlazador hidrolizado o reticulado, además de los restos de Ac-(enlazador-DMX)<sub>n</sub> deseados. El supuesto mecanismo de la reticulación intercatenaria o inactivación acuosa de la maleimida en la secuencia de reacción tradicional de 2 etapas se muestra en la Figura 17, mediante el cual el residuo de maleimida (o haloacetamida) incorporado a partir de la reacción inicial del anticuerpo con el enlazador heterobifuncional puede reaccionar con los residuos de histidina, lisina, tirosina, o cisteína intramoleculares (o intermoleculares), lo que da lugar a la reticulación intercatenaria o el residuo de maleimida (o haloacetamida) incorporado inicialmente puede quedar inactivado (tal como por escisión hidrolítica del anillo maleimida o por adición acuosa a la maleimida) y, por lo tanto, ya no está disponible para la reacción rápida con el grupo efector o informador que porta tiol. De esta manera, el análisis de CL-EM muestra claramente que el método descrito en esta invención tiene la ventaja de producir el conjugado homogéneo con poco o ningún fragmento de enlazador hidrolizado o reticulado unido al anticuerpo.

40 La unión de un conjugado de Ac anti-CanAg-Sulfo-Mal-DM1 con una carga de 5.6 de maitansinoide por molécula de anticuerpo (promedio), preparado mediante el método descrito en esta invención se midió por citometría de flujo usando las células COLO205 que expresan el antígeno y se encontró que era similar a la del anticuerpo sin conjugar, lo que sugiere que la conjugación no afectó la unión del anticuerpo al antígeno diana (Figura 11). La actividad citotóxica del conjugado de Ac anti-CanAg-Sulfo-Mal-DM1 preparado mediante el método descrito en esta invención se midió *in vitro* usando células de cáncer de colon COLO205 que expresan el antígeno CanAg (Figura 12). Las células cancerosas que expresan el antígeno se sembraron en placas a aproximadamente 1000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio de cultivo celular que contenía suero fetal bovino y se expusieron a diferentes concentraciones del conjugado de Ac-DMx. Después de una exposición de 5 días al conjugado, las células viables remanentes se midieron usando el ensayo WST-8 (Dojindo Molecular Technologies). Como se muestra en la Figura 12, el conjugado de Ac anti-CanAg-Sulfo-Mal-DM1 preparado usando este método fue altamente potente a bajas concentraciones frente a las células COLO205 de cáncer de colon que expresan el antígeno CanAg. La citotoxicidad de este conjugado fue específica, ya que pudo bloquearse por la competición con exceso del anticuerpo, sin conjugar.

55 Un método alternativo de conjugación usando el método descrito en esta invención implicó una etapa de inactivación usando reactivos de maleimida o haloacetamida (tal como ácido 4-maleimidobutírico o ácido 3-maleimidopropiónico o *N*-etilmaleimida o yodoacetamida o ácido yodoacético) después de la compleción de la reacción inicial de DMx y el enlazador heterobifuncional (antes de la adición de la mezcla de reacción al anticuerpo) para inactivar el exceso del grupo tiol de DMx con el fin de prevenir cualquier reacción no deseada del tiol de DMx con el anticuerpo. En un ejemplo específico, después de la compleción de la reacción inicial de DMx y el enlazador heterobifuncional (antes de la adición de la mezcla de reacción al anticuerpo), se añadió ácido 4-maleimidobutírico para inactivar el exceso del grupo tiol de DMx con el fin de prevenir cualquier reacción no deseada del tiol de DMx con el anticuerpo durante

la reacción de conjugación. A una mezcla de reacción de DM4 y el reactivo Sulfo-Mal-NHS heterobifuncional que contenía un exceso de DM4 (3 mM), después de la compleción del acoplamiento deseado del tiol de DM4 al grupo maleimida del reactivo heterobifuncional, se añadió un exceso molar de dos veces de ácido 4-maleimidobutírico (6 mM) a la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 minutos para inactivar el DM4 remanente de la reacción de acoplamiento inicial. Sin purificación de la mezcla de reacción, una parte alícuota se mezcló con una disolución del anticuerpo en tampón fosfato (pH 7.5) en condiciones de conjugación final de 4 mg/ml del Ac, tampón fosfato acuoso al 90%/DMA al 10%, pH 7.5. La reacción de conjugación se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 2 h. El conjugado de anticuerpo-DM4 se purificó del exceso de los reactantes DM4 de molécula pequeña y el enlazador usando una columna de filtración en gel G25 equilibrada en tampón fosfato a pH 7.5. La mezcla de conjugación se mantuvo adicionalmente a 4 °C durante 2 días en tampón a pH 7.5 para permitir la disociación de cualquier especie de DMx unida al anticuerpo de forma no covalente o a través de un enlace lábil. Después, el conjugado se dializó durante la noche en un tampón de histidina/glicina a pH 5.5 y se filtró a través de un filtro de 0.22 µm para el almacenamiento final. El número promedio de moléculas de DM4 por molécula de Ac en el conjugado final se midió mediante la determinación de la absorbancia del conjugado a 252 y 280 nm y usando los coeficientes de extinción conocidos para DM4 y el anticuerpo a estas dos longitudes de onda. Las muestras de los conjugados se analizaron mediante SDS-PAGE no reductora usando el sistema de electroforesis NuPage con un Gel de Bis Tris al 4-12% (Invitrogen). Las muestras desnaturalizadas por calor se cargaron a razón de 10 µg/carril. La SDS-PAGE no reductora del conjugado preparado usando el método descrito en esta invención (sin inactivación) mostró evidencia de una banda de la cadena ligera (~ 25 kDa) y la banda de mitad de anticuerpo (cadena pesada-ligera; ~75 kDa) (Figura 18). Por otra parte, el conjugado preparado usando el método descrito en esta invención, el cual se trató con ácido 4-maleimidobutírico (para limitar el exceso de tiol de DMx) tuvo cantidades significativamente menores de estas bandas no deseadas (a niveles comparables con los de la muestra del anticuerpo sin modificar). Otra ventaja de la inactivación de la mezcla de reacción inicial de DMx y el enlazador heterobifuncional (antes de la conjugación con el anticuerpo) mediante reactivos inactivadores del tiol, tales como el ácido 4-maleimidobutírico, es que durante la reacción de conjugación del anticuerpo no hay especies de DMx (DM1 o DM4) "libres" y por lo tanto, el conjugado final después de la purificación no contiene especies de DMx sin conjugar o "libres". El aducto de DMx con ácido 4-maleimidobutírico (u otros reactivos polares inactivadores del tiol) es más soluble en agua que DMx y, por lo tanto, puede separarse más fácilmente del conjugado anticuerpo-DMx unido covalentemente.

### 30 **Ejemplo 3. Conjugación del anticuerpo con maitansinoide (DM1/DM4) usando el enlazador sulfo-NHS-SMCC (Figura 13).**

Las disoluciones madre de tiol DM1 o DM4 (DMx) y el enlazador heterobifuncional sulfo-SMCC con el grupo sulfo-NHS (comprado en Pierce Endogen; Figura 13) se prepararon en DMA a las concentraciones de 30-60 mM. El enlazador y el tiol DM1 o DM4 se mezclaron conjuntamente en DMA que contenía hasta un 40% v/v de tampón succinato 200 mM acuoso, EDTA 2 mM, pH 5.0 para dar una relación de DM1 o DM4 (DMx) con respecto al enlazador de 1.6:1 y una concentración final de DMx de 6 mM. Después de mezclar, la mezcla de reacción se dejó durante 1-4 h a temperatura ambiente y entonces una parte alícuota de la mezcla de reacción se diluyó 10 veces para medir su absorbancia a 302-320 nm para evaluar si toda la maleimida había reaccionado (El análisis de HPLC de fase inversa adicional de una parte alícuota congelada de la mezcla de reacción se llevó a cabo posteriormente con la monitorización a 302 nm y 252 nm para verificar la desaparición completa de la maleimida del enlazador y la formación del reactivo deseado sulfo-NHS-enlazador-Mal-DMx en el momento de la adición de la mezcla de reacción al anticuerpo). Cuando se determinó mediante UV que no había más maleimida presente, una parte alícuota de la reacción se añadió a una disolución acuosa de un anticuerpo en tampón fosfato (pH 7.5) en condiciones de conjugación final de 4 mg/ml del Ac, tampón fosfato al 90% (acuoso)/DMA al 10% (v/v), pH 7.5. La reacción de conjugación se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 2 h. El conjugado de Ac-DMx se purificó del exceso de reactivo que no había reaccionado y del exceso de DMx usando una columna de filtración en gel G25 equilibrada en tampón fosfato (acuoso) a pH 7.5. El conjugado se mantuvo a 4 °C durante 2 días en tampón a pH 7.5 para permitir la disociación de cualquier especie de DMx unida al Ac de forma no covalente o a través de un enlace lábil. El conjugado se dializó entonces durante la noche en un tampón de histidina/glicina a pH 5.5 y luego se filtró a través de un filtro de 0.22 µm para el almacenamiento final. El número de moléculas de DMx por molécula de Ac en el conjugado final se midió mediante la determinación de la absorbancia del conjugado a 252 y 280 nm y usando los coeficientes de extinción conocidos de DMx y del anticuerpo a estas dos longitudes de onda.

Para la comparación, se prepararon conjugados de Ac-SMCC-DMx usando el método de conjugación tradicional de 2 etapas. El anticuerpo (Ac) a una concentración de 8 mg/ml en tampón fosfato al 95% a pH 6.5/tampón DMA al 5% se modificó con exceso del enlazador sulfo-SMCC bifuncional con el grupo sulfo-NHS (comprado en Pierce Endogen). La reacción se dejó transcurrir a 25 °C durante 2 h y luego el Ac modificado se purificó del exceso del enlazador sin reaccionar usando cromatografía G25. La recuperación del Ac purificado se determinó por absorbancia de UV a 280 nm. El número de grupos maleimida enlazados en el Ac modificado se determinó usando una pequeña parte alícuota del anticuerpo modificado mediante la adición de una cantidad conocida de tiol (tal como el 2-mercaptoetanol), añadido en exceso con respecto a la maleimida, para reaccionar con los residuos de maleimida en el anticuerpo modificado y luego ensayando el tiol remanente mediante el ensayo de Ellman usando el reactivo DTNB (coeficiente de extinción de tiolato de TNB a 412 nm = 14150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; Riddes, P. W. et al., Methods

Enzymol, 1983, 91, 49-60; Singh, R., Bioconjugate Chem., 1994, 5, 348-351). La conjugación del Ac modificado con DM1 o DM4 se llevó a cabo en una concentración del anticuerpo de 2.5 mg/ml en tampón fosfato al 95% a pH 6.5/DMA al 5% (v/v), con 1.7 equivalentes molares de tiol DM1 o DM4 añadido por mol de maleimida enlazada en el Ac. La reacción se dejó durante 8-24 horas a 18 °C y el conjugado se separó del exceso de DM1 (o DM4) sin reaccionar a través de cromatografía G25. Después de la purificación, el conjugado se mantuvo a 4 °C durante 2 días en tampón a pH 6.5 para permitir la hidrólisis de cualquier especie de DM1/DM4 enlazada débilmente. El conjugado se dializó entonces durante la noche en un tampón de histidina/glicina a pH 5.5 y luego se filtró a través de un filtro de 0.22 µm para el almacenamiento final. El número de moléculas de DM1/DM4 por molécula de Ac en el conjugado final se midió mediante la determinación de la absorbancia del conjugado a 252 y 280 nm y usando los coeficientes de extinción conocidos de DM1/DM4 y del anticuerpo a estas dos longitudes de onda.

La SDS-PAGE reductora se llevó a cabo en muestras del conjugado y del anticuerpo (10 µg/carril), usando el sistema de electroforesis NuPage (Invitrogen) con un Mini Gel de NuPage de Bis Tris al 4-12% y tampón de operación NuPAGE MOPS SDS (Figura 14). Las bandas en el gel con pesos moleculares de 75, 125 y 150 kDa fueron indicativas de especies reticuladas entre cadenas (HL, H<sub>2</sub>L y H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>, respectivamente). Una comparación de los conjugados de Ac-SMCC-DM1 con 3.1 D/Ac (carril 4, mediante este método y carril 3, mediante el método tradicional de 2 etapas, respectivamente) muestra claramente que el conjugado preparado a través del método descrito en esta invención (carril 4) tiene muchas menos especies reticuladas de alto peso molecular que los conjugados preparados mediante el método tradicional de 2 etapas (carril 3).

El análisis por electroforesis de proteínas LabChip (en condiciones reductoras) del conjugado de anticuerpo-SMCC-DMI preparado mediante el método descrito en esta invención, mostró las principales bandas de las cadenas pesada y ligera con porcentajes del 67 y 30% (de la proteína total), las cuales son similares a las del anticuerpo sin conjugar del 68 y 30% respectivamente (Figura 15). En contraste, el conjugado preparado usando el método tradicional de dos etapas mostró bandas de las cadenas pesada y ligera solamente del 54 y 24% respectivamente y las principales bandas de pesos moleculares más altos en el rango de 96-148 kDa, debido presumiblemente a la reticulación intercatenaria. Basándose en el análisis cuantitativo de proteínas LabChip, el conjugado preparado mediante el método descrito en esta solicitud es muy superior, en términos de ausencia de reticulación intercatenaria, en comparación con el preparado usando el proceso convencional de dos etapas (Figura 15).

Los conjugados de Ac-SMCC-DM1 con cargas de fármacos similares preparados a través del método descrito en esta invención y mediante el método tradicional de dos etapas, se compararon mediante análisis por LC/MS de exclusión por tamaño (Figura 16). El conjugado preparado a través del método descrito en esta invención muestra el espectro de MS deseado que contiene solamente la distribución esperada de picos con una masa igual a Ac-(enlazador-DMx)<sub>n</sub>. En el caso del conjugado preparado usando el método tradicional de dos etapas, el espectro muestra una mezcla heterogénea de especies las cuales incluyen la especie Ac-(enlazador-DMx)<sub>n</sub> deseada más especies adicionales que contienen maleimida inactivada y fragmentos del enlazador reticulado. Los posibles mecanismos de reticulación intercatenaria y de inactivación de la maleimida en la secuencia de reacción tradicional de 2 etapas, se muestran en la Figura 17, mediante los cuales la maleimida incorporada (o el residuo de haloacetamida) a partir de la reacción inicial del anticuerpo con el enlazador heterobifuncional puede reaccionar con los residuos de histidina, lisina, tirosina o cisteína intramoleculares (o intermoleculares), lo que da lugar a la reticulación intercatenaria, o el residuo de maleimida (o haloacetamida) incorporado inicialmente puede quedar inactivado por la hidrólisis o hidratación del residuo maleimida antes de la etapa de reacción con el agente DM1 o DM4 (DMx) que porta tiol. De esta manera, el análisis por LC-MS muestra claramente que el método descrito en esta invención tiene la ventaja de producir un conjugado homogéneo con poca o ninguna maleimida inactivada o fragmentos reticulados del enlazador unido al anticuerpo.

#### **Ejemplo 4. Conjugación del anticuerpo con DM1/DM4 (DMx) con enlazadores disulfuro escindibles mediante este método (Figura 19).**

Las disoluciones madre que contienen tiol DM1 o DM4 (DMx) y el enlazador heterobifuncional éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido 4-(2-piridilditio) butanoico (SPDB) se prepararon en DMA a las concentraciones de 30-60 mM. El enlazador y el tiol DMx se mezclaron conjuntamente en DMA que contenía hasta un 40% v/v de tampón acuoso succinato 200 mM, EDTA 2 mM, pH 5.0, para dar una relación de DM1 o DM4 (DMx) con respecto al enlazador de 1.6:1 y una concentración final de DMx de 8 mM. Después de mezclar, la reacción se dejó durante 1 h a temperatura ambiente y luego una parte alícuota de la reacción se añadió a una disolución acuosa del anticuerpo en tampón fosfato (pH 7.5) en condiciones de conjugación final de 4 mg/ml del Ac, tampón fosfato (acuoso) al 90%/DMA al 10% (v/v), pH 7.5. La reacción de conjugación se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 2 h. El conjugado de Ac-DMx se purificó del exceso de reactivo sin reaccionar y del exceso de DMx usando una columna de filtración en gel G25 equilibrada en tampón fosfato (acuoso) a pH 7.5. El conjugado se mantuvo a 4 °C durante 2 días en tampón a pH 7.5, para permitir la disociación de cualquier especie de DMx unida al Ac no covalentemente o mediante un enlace lábil. El conjugado se dializó entonces durante la noche en un tampón de histidina/glicina a pH 5.5 y luego se filtró a través de un filtro de 0.22 µm para el almacenamiento final. El número de moléculas de DMx por cada molécula del Ac en el conjugado final se midió mediante la determinación de la absorbancia del conjugado

a 252 y 280 nm usando los coeficientes de extinción conocidos de DMx y del anticuerpo a estas dos longitudes de onda.

**Ejemplo 5. Preparación del conjugado anticuerpo-DM1/DM4 (Ac-DMx) tanto con enlazadores disulfuro como no escindibles usando este método (Figura 20).**

5 Las disoluciones madre de tiol DM1 o DM4 (DMx) y el enlazador heterobifuncional NHS-PEG<sub>n</sub>-Maleimida, se prepararon en N,N-dimetilacetamida (DMA) a las concentraciones de 30-80 mM. El enlazador NHS-PEG<sub>4</sub>-Maleimida y el tiol DMx se mezclaron conjuntamente en DMA que contenía hasta 40% v/v de tampón succinato 200 mM, EDTA 2 mM, pH 5.0, para dar una relación molar de DMx con respecto al enlazador de 1.6:1 y una concentración final de DMx igual a 8.0 mM. La mezcla de reacción se dejó reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. En una reacción paralela separada, el enlazador SPDB y el tiol DMx se mezclaron conjuntamente y se hicieron reaccionar de una manera similar a las condiciones usadas para la reacción de NHS-PEG<sub>4</sub>-maleimida, a excepción del tiempo de reacción que fue de 1 h. Después de la compleción de ambas reacciones y sin purificar, se combinaron volúmenes iguales de la mezcla PEG<sub>4</sub>-Mal-DM4 y de la mezcla SPDB-DM4. Una parte alícuota de las mezclas de reacción combinadas se añadió sin purificar a una disolución del anticuerpo en tampón fosfato (pH 7.5) en condiciones de conjugación final de 4 mg/ml del Ac, tampón fosfato (acuoso) al 90%/DMA al 10% (v/v), pH 7.5. La reacción de conjugación se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 2 h. El conjugado de Ac-DMx se purificó del exceso de reactivos sin reaccionar y del exceso de DMx usando una columna de filtración en gel G25 equilibrada en tampón fosfato (acuoso) a pH 7.5. El conjugado se mantuvo a 4 °C durante 2 días en tampón a pH 7.5 para permitir la disociación de las especies de DMx enlazadas al Ac no covalentemente o a través de enlaces lábiles. El conjugado se dializó entonces durante la noche en un tampón de histidina/glicina a pH 5.5 y luego se filtró a través de un filtro de 0.22 µm para el almacenamiento final. El número de moléculas de DMx por molécula del Ac en el conjugado final se midió mediante la determinación de la absorbancia del conjugado a 252 y 280 nm usando los coeficientes de extinción conocidos de DMx y del anticuerpo a estas dos longitudes de onda.

El conjugado de Ac-(enlazadores SPDB y PEG<sub>4</sub>-Mal mezclados)-DMx preparado a través del método descrito en esta invención, se ensayó para determinar el porcentaje de incorporación del enlazador escindible frente a no escindible en el Ac mediante la comparación de la relación de DMx por anticuerpo (D/A) antes y después del tratamiento del conjugado con DTT (ditiotreitól) para reducir el enlace disulfuro. Con el fin de mantener el pH de la reacción a 7.5 durante la reducción con DTT, el conjugado se dializó primero en tampón HEPES 250 mM, pH 7.5. El conjugado se redujo entonces mediante la reacción con DTT 25 mM durante 20 min a 37 °C. Después de la reacción con DTT, el DMx liberado y el DTT se separaron de la mezcla de reacción usando una columna de filtración en gel G25 equilibrada en tampón HEPES 250 mM, pH 7.5. El número promedio de moléculas de DMx por molécula de Ac en el producto purificado se midió mediante la determinación de la absorbancia del conjugado a 252 y 280 nm y usando los coeficientes de extinción conocidos de DMx y del anticuerpo a estas dos longitudes de onda. La relación entre D/A del conjugado tratado con DTT y de D/A del conjugado no tratado con DTT, se usó para calcular el porcentaje de DMx enlazado al Ac a través de enlaces no escindibles. Dos muestras adicionales, los conjugados de Ac-SPDB-DM4 y de Ac-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM4, se trataron con DTT como controles positivos y negativos, respectivamente. Mediante la comparación de la relación de D/A antes y después del tratamiento con DTT, el conjugado de control no escindible de Ac-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM4 mostró que aproximadamente todos los enlazadores unidos eran no escindibles (93%) como se esperaba. El conjugado de Ac-(enlazadores SPDB y PEG<sub>4</sub>Mal mezclados)-DMx que contiene tanto enlazadores y no escindibles como disulfuro, preparado a través del método descrito en esta invención tuvo un 41% menos de DMx escindido por el tratamiento con DTT con respecto a la cantidad de pérdida de DMx a partir del conjugado de Ac-SPDB-DMx que consiste completamente en enlazador escindible. Esto demostró que el conjugado de Ac-( SPDB y PEG<sub>4</sub>Mal mezclados)-DMx preparado a través del método descrito en esta invención estaba compuesto por aproximadamente un 40% de enlazadores no escindibles y un 60% de enlazadores escindibles. Al cambiar la relación inicial de los reactivos enlazadores no escindibles y escindibles, los conjugados del anticuerpo con el maitansinoide u otro efector, se pueden preparar con una relación diferente de enlazadores no escindibles y escindibles. La Figura 21 muestra el espectro de masa del conjugado desglucosilado descrito anteriormente, el cual comprende el anticuerpo con un promedio de 3.5 moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo enlazado a través tanto de enlazadores disulfuro (SPDB) como enlazadores no escindibles (PEG). La MS muestra las especies discretas del conjugado que llevan ambos enlazadores, escindibles y no escindibles (Figura 21). Por ejemplo, el pico del conjugado designado como D2-PEG-SPDB lleva una molécula de maitansinoide enlazada mediante disulfuro y una molécula de maitansinoide enlazada mediante tioéter no escindible; el pico del conjugado designado como D3-PEG-2SPDB lleva dos moléculas de maitansinoide enlazadas mediante disulfuro y una molécula de maitansinoide enlazada mediante tioéter no escindible; y el pico del conjugado designado como D3-2PEG-SPDB lleva una molécula de maitansinoide enlazada mediante disulfuro y dos moléculas de maitansinoide enlazadas mediante tioéter no escindible.

**Ejemplo 6. Conjugación del anticuerpo con maitansinoide usando el enlazador SMCC (Figura 22).**

Las disoluciones madre de tiol DM1 y el enlazador heterobifuncional SMCC (Pierce) se prepararon en DMA a las concentraciones de 30-60 mM. El enlazador y el tiol DM1 se mezclaron conjuntamente en DMA que contenía hasta un 50% v/v de tampón succinato 200 mM acuoso, EDTA 2 mM, pH 5.0, para dar una relación de DM1 con respecto



al enlazador de 1.4:1 equivalente molar y una concentración final de DM1 de 1 a 6 mM. Después de mezclar, la reacción se dejó durante hasta 4 h a temperatura ambiente y entonces una parte alícuota de la mezcla de reacción se diluyó 10 veces para medir la absorbancia a 302-320 nm para evaluar si toda la maleimida había reaccionado con el tiol. Cuando se determinó mediante UV que no había más maleimida presente, una parte alícuota de la reacción se añadió a una disolución acuosa de un anticuerpo en tampón fosfato (pH 7.5-8.5) en condiciones de conjugación final de 2.5 mg/ml del Ac, tampón fosfato (acuoso) al 70-80%/DMA al 30-20% (v/v). La reacción de conjugación se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 3 h. El conjugado de Ac-DM1 se purificó del exceso del reactivo sin reaccionar o hidrolizado y del exceso de DM1 usando una columna de filtración en gel G25 equilibrada en tampón fosfato (acuoso) a pH 7.4. El conjugado se dializó entonces durante la noche en tampón fosfato (acuoso) a pH 7.4 y luego se filtró a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  para el almacenamiento final. El número de moléculas de DM1 por molécula de Ac en el conjugado final se midió mediante la determinación de la absorbancia del conjugado a 252 y 280 nm y usando los coeficientes de extinción conocidos de DM1 y del anticuerpo a estas dos longitudes de onda. De forma similar, se pueden preparar los conjugados del anticuerpo con tiol DM4 y SMCC. Estos conjugados del anticuerpo con DM1 o DM4 usando el enlazador SMCC contienen el enlazador de tioéter no escindible.

El conjugado de Ac-SMCC-DM1 preparado a través del método descrito en esta invención se caracterizó mediante el análisis por MS del conjugado desglucosilado (Figura 23). El conjugado preparado a través del método descrito en esta invención muestra el espectro de MS deseado que contiene la distribución de picos esperada con la masa igual a Ac-(enlazador-DM1)<sub>n</sub>.

#### **Ejemplo 7. Conjugación del anticuerpo con maitansinoide usando enlazadores heterobifuncionales que contienen disulfuro (SSNPB, SPP).**

Los enlazadores heterobifuncionales que contienen disulfuro SSNPB (*N*-sulfosuccinimidil-4-(5-nitro-2-piridilditio)butirato) y SPP (*N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato) se pueden usar para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide enlazados por disulfuro, mediante un método similar al descrito para el enlazador SPDB en el Ejemplo 4. La estructura del conjugado enlazado a través de disulfuro preparado usando SPDB (Figura 19) es idéntica a la del conjugado preparado con SSNPB (Figura 24). La MS de un conjugado enlazado a través de disulfuro preparado usando SPDB mostró picos discretos con valores de masa correspondientes a diferentes números de moléculas de maitansinoide unidas al anticuerpo.

#### **Ejemplo 8. Conjugación del anticuerpo con maitansinoide que contiene enlazadores no escindibles con cadena de carbono de alquilo lineal.**

Los conjugados que contienen el enlazador no escindible con la cadena de carbono del alquilo lineal se prepararon usando la mezcla de reacción de maitansinoide y los enlazadores heterobifuncionales con la cadena de carbono de alquilo lineal, de forma similar al método descrito para el enlazador SMCC en el ejemplo 6. Por ejemplo, los conjugados de un anticuerpo humanizado con DM1 se prepararon usando los enlazadores BMPS (éster de *N*-[ $\beta$ -maleimidopropiloxi]succinimida) o GMBS ((éster de (*N*-[ $\gamma$ -maleimidobutiriloxi]succinimida) como se muestra en la Figura 26. La mezcla de reacción inicial que contenía BMPS o GMBS (8 mM) y tiol DM1 (10,4 mM) en DMA al 60%/tampón succinato 200 mM al 40% (v/v), pH 5, mostró una reacción completa del residuo de maleimida (basándose en la caída de la absorbancia de la maleimida a 302-320 nm) cuando se verificó a los 15 min. Esta mezcla de reacción se añadió, en dos porciones separadas entre sí por 30 min, a una disolución del anticuerpo humanizado a 2.5 mg/ml en tampón EPPS acuoso al 80%, pH 8.1, que contenía DMA al 20% (v/v) con el enlazador total añadido a 8 equivalentes molares al anticuerpo. La mezcla del conjugado se purificó en gel después de 4 h y se sometió a 2 rondas de diálisis. Los conjugados con una relación de DM1/anticuerpo de 3.8 y 5.1 se prepararon con una recuperación del 71-75%, y alto % del monómero (96.2-97.6%). Estos conjugados preparados con GMBS o BMPS no mostraron fármaco libre sin conjugar mediante el análisis por HPLC HISEP. Se pueden preparar conjugados similares que contienen enlazadores no escindibles con cadenas de alquilo lineales usando AMAS (éster de *N*-[ $\beta$ -maleimidoacetoxisuccinimida) o EMCS (éster de *N*-[ $\beta$ -maleimidocaproiloxi]succinimida) o los ésteres de sulfato-*N*-hidroxisuccinimida (sulfato-GMBS, sulfato-EMCS) como se muestra en la Figura 25. La Tabla 1 muestra el % de monómeros para los conjugados seleccionados preparados mediante el método descrito en esta invención, todos los cuales mostraron elevados % de monómeros mediante análisis por cromatografía de exclusión por tamaño. Para la comparación, el % de monómeros también se muestra para los conjugados preparados por el método de conjugación tradicional de dos etapas (mediante la reacción inicial del anticuerpo con el enlazador heterobifuncional seguido por la reacción con el tiol del maitansinoide).

**Tabla 1.** % de monómero para los conjugados seleccionados preparados mediante el método descrito en esta solicitud frente a los métodos de conjugación tradicionales de dos etapas.

Conjugado	D/A	Método de conjugación	% de Monómero
Ac-PEG <sub>4</sub> -Mal-DM1	6.6	esta invención	99.0

ES 2 726 945 T3

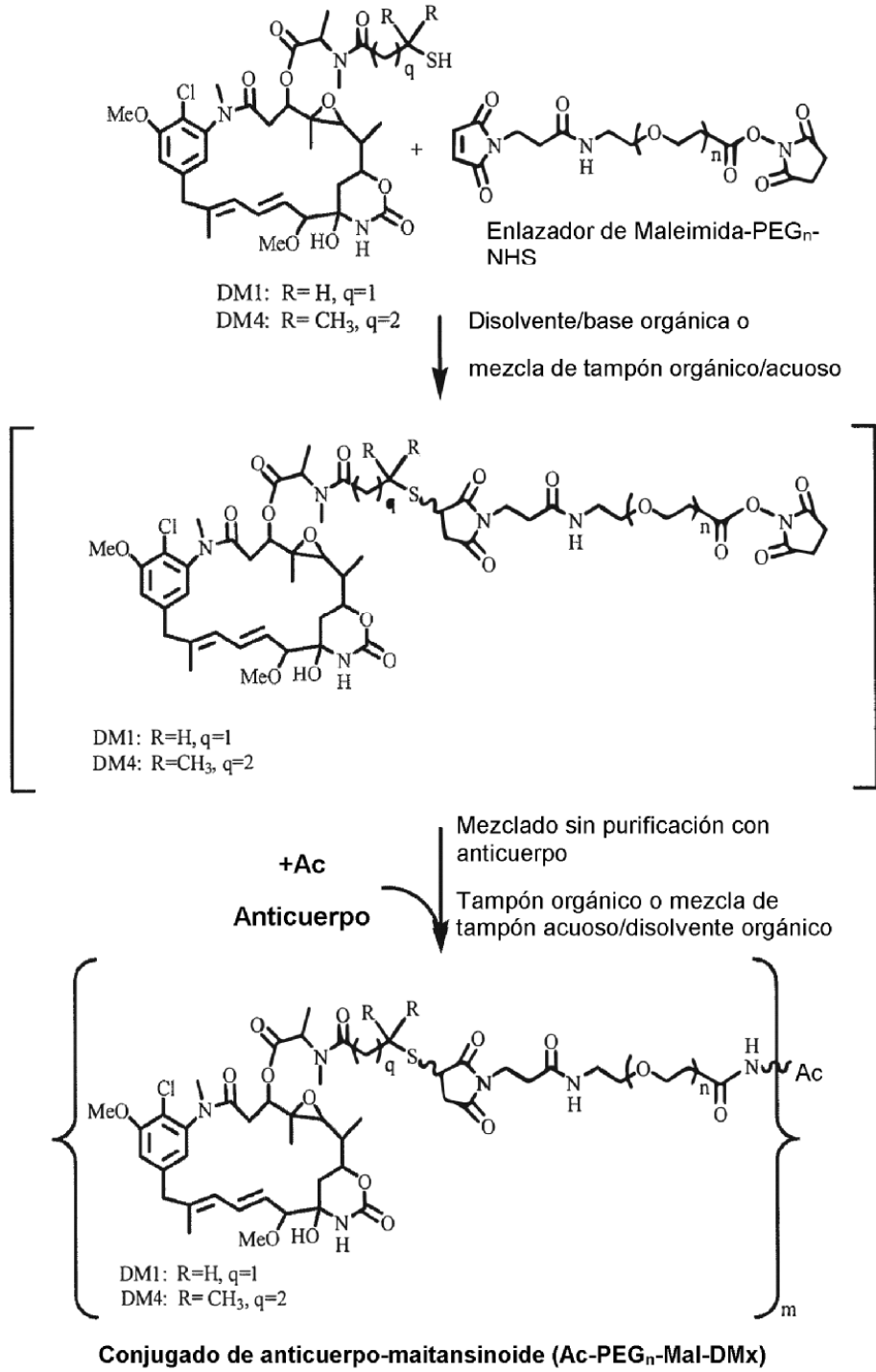
Ac-PEG <sub>4</sub> -Mal-DM1	6.8	dos etapas	98.0
Ac-Sulfo- Mal-DM1	3.6	esta invención	99.0
Ac-Sulfo- Mal-DM1	4.0	dos etapas	96.7
Ac-SMCC-DM1	4.0	esta invención	98.6
Ac-SMCC-DM1	3.8	dos etapas	97.0
Ac-PEG <sub>4</sub> -Mal-DM4	6.2	esta invención	96.9
Ac-PEG <sub>4</sub> -Mal-DM4	6.1	dos etapas	84.5
Ac-SPDB-DM4	4.1	esta invención	99.4
Ac-SPDB-DM4	3.9	dos etapas	95.7

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un conjugado purificado en una disolución, en donde el conjugado comprende un maitansinoide que comprende un grupo tiol enlazado a un anticuerpo, comprendiendo el proceso las etapas de: (a) poner en contacto el maitansinoide con un reactivo enlazador bifuncional para unir covalentemente el enlazador al maitansinoide y preparar así una primera mezcla sin purificar que comprende el maitansinoide que tiene enlazadores unidos al mismo, (b) conjugar un anticuerpo al maitansinoide que tiene enlazadores unidos al mismo haciendo reaccionar la primera mezcla sin purificar con el anticuerpo para preparar una segunda mezcla y (c) someter la segunda mezcla a una filtración de flujo tangencial, diálisis, filtración en gel, cromatografía de adsorción, precipitación selectiva o una combinación de las mismas para preparar así el conjugado purificado.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) se lleva a cabo en una disolución a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.
3. El proceso de la reivindicación 1, en donde la segunda mezcla en la etapa (b) carece sustancialmente de especies hidrolizadas, reticuladas indeseadas, formadas debido a reacciones intramoleculares o intermoleculares.
4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el maitansinoide es DM1.
5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el maitansinoide es DM4.
6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
7. El proceso de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado.
8. El proceso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es MY9, anti-B4, C242 o un anticuerpo que se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD19, CD20, CD22, CD26, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD79, CD105, CD138, receptores de EphA, receptores de EphB, EGFR, EGFRvIII, HER2, HER3, mesotelina, cripto, integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 5 y  $\alpha$ v $\beta$ 6.
9. El proceso de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo humano o humanizado es huMy9-6, huB4, huC242, huN901, DS6, CNTO 95, B-B4, trastuzumab, pertuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, rituximab o un anticuerpo humano o humanizado que se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en receptor de EphA2, CD38 e IGF-IR.
10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el enlazador es un enlazador escindible.
11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el enlazador es un enlazador no escindible.
12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el pH de la disolución en la etapa (b) es de 5 a 8.7.
13. El proceso de la reivindicación 12, en donde el pH de la disolución en la etapa (b) es de 6.5 a 8.5.
14. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el proceso comprende además la etapa de inactivar el maitansinoide en la primera mezcla sin purificar con un reactivo de inactivación entre las etapas (a) y (b).
15. El proceso de la reivindicación 14, en donde el reactivo de inactivación se selecciona del grupo que consiste en ácido 4-maleimidobutírico, ácido 3-maleimidopropiónico, N-etilmaleimida, yodoacetamida y ácido yodoacetamidopropiónico.
16. El proceso de la reivindicación 1, en donde el reactivo enlazador bifuncional se selecciona del grupo que consiste en 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), N-succinimidil éster del ácido  $\kappa$ -maleimidoundecanoico (KMUA), N-succinimidil éster del ácido  $\gamma$ -maleimidobutírico (GMBS), N-hidroxisuccinimida éster del ácido  $\epsilon$ -maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-( $\alpha$ -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-( $\beta$ -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI), N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA), 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidilo (SBAP), 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB) y 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP).

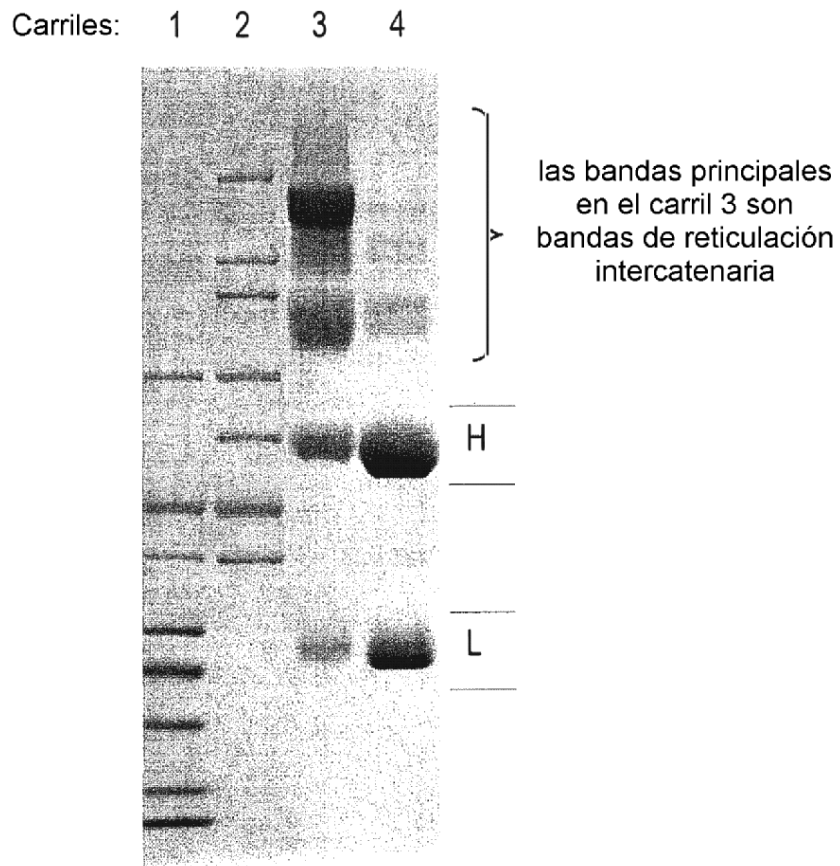
FIG. 1

Conjugación de anticuerpo con una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y enlazador de Maleimida-PEG<sub>n</sub>-NHS



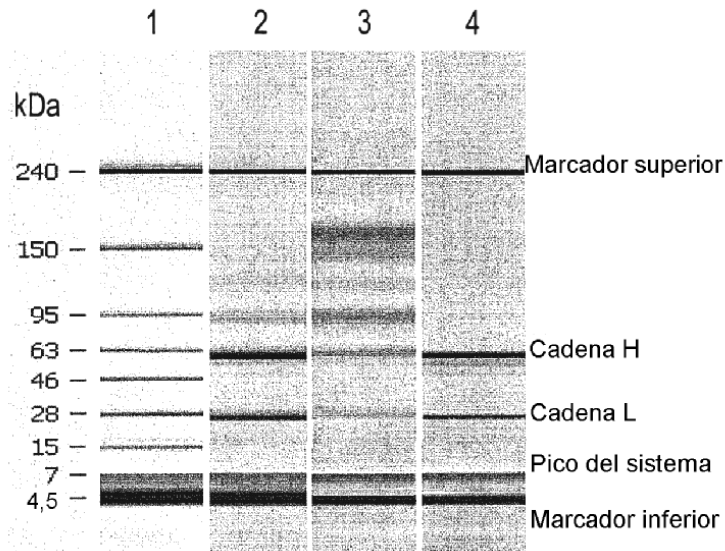
## FIG. 2

SDS-PAGE reductora de conjugados de Ac-(PEG<sub>4</sub>-Mal)-DM4 preparados usando el método descrito en esta invención frente a conjugados preparados usando el método tradicional de 2 etapas



**FIG. 3A**

Electroforesis LabChip de proteína del conjugado anticuerpo-(PEG<sub>4</sub>-Mal)-DM4 preparado usando el método descrito en esta invención frente al conjugado preparado usando el método tradicional de 2 etapas.

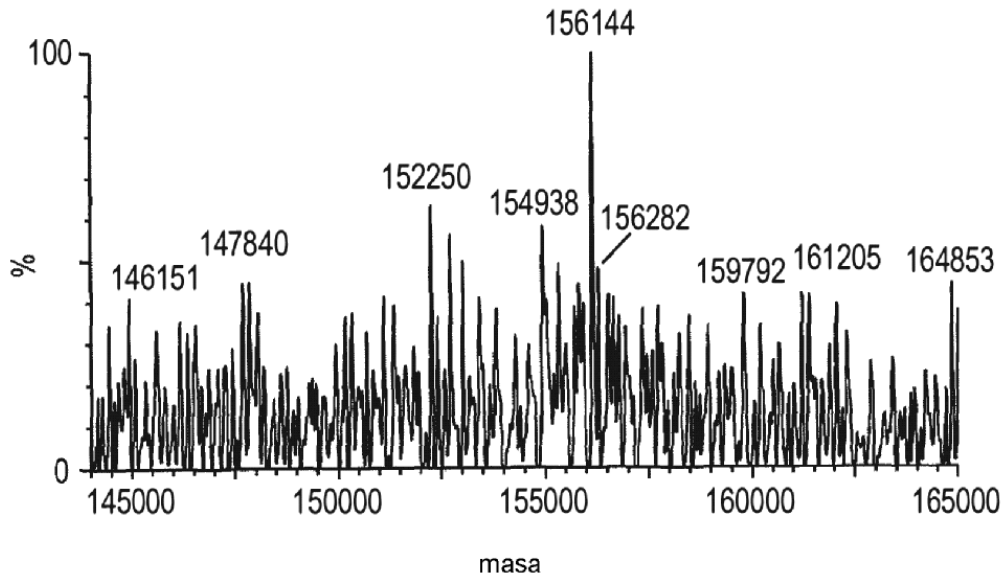


**FIG. 3B**

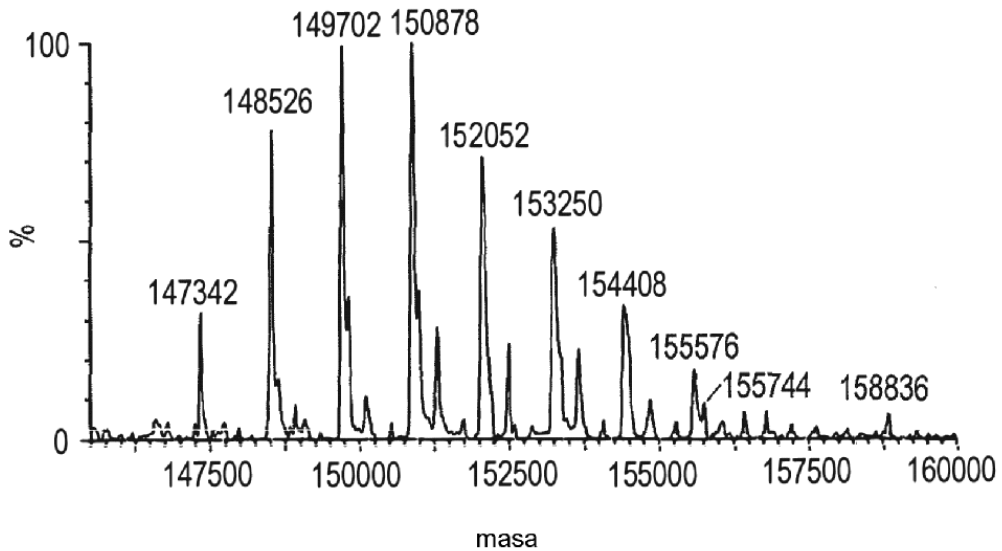
		% de masa total de proteína cargada		
Banda de PM (kDa)		Ac no conjugado	Ac-PEG4-Mal-DM4 Este método	Ac-PEG4-Mal-DM4 2 etapas
Cadena L	17	1	2	1
	<b>27</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>8</b>
	56	4	2	-
Cadena H	<b>61</b>	<b>65</b>	<b>58</b>	<b>16</b>
	94	-	6	26
	122	-	2	7
	147	-	-	12
	169	-	-	31

**FIG. 4A**

EM del conjugado de anticuerpo-(PEG4-Mal)-DM4 preparado usando el método descrito en esta invención frente al conjugado preparado usando el método tradicional en 2 etapas (las muestras de conjugado desglucosiladas se analizaron mediante EM).

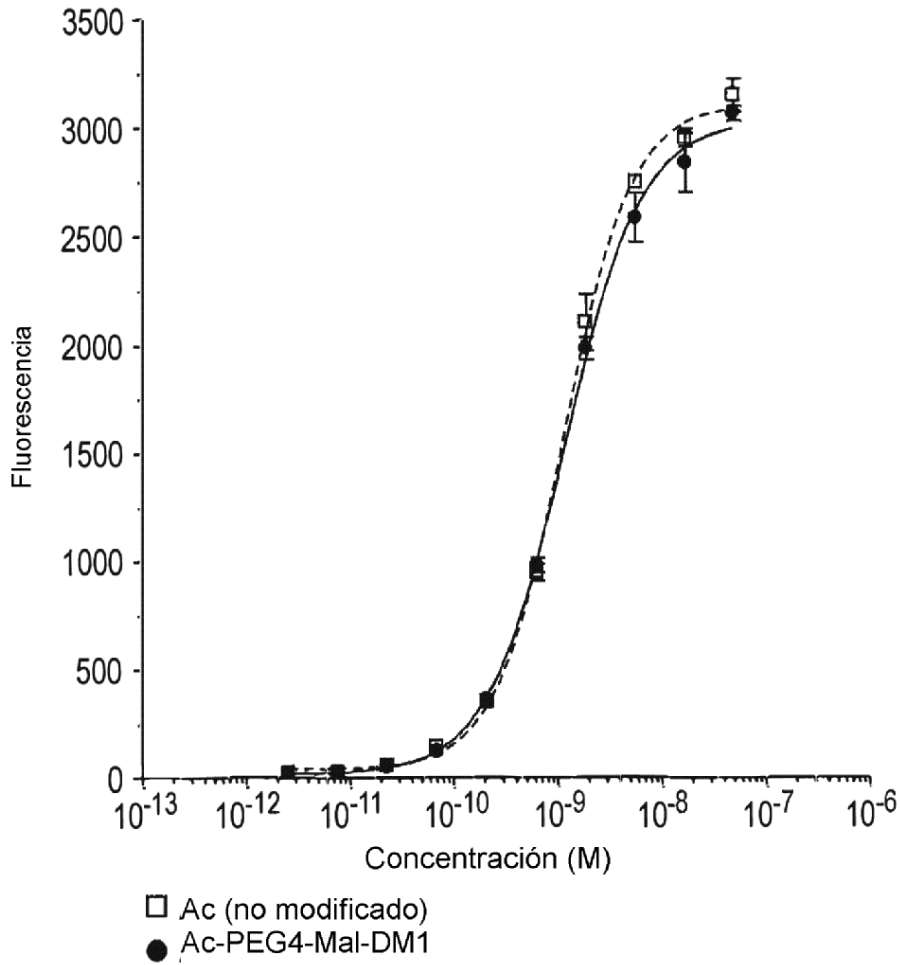


**FIG. 4B**



**FIG. 5**

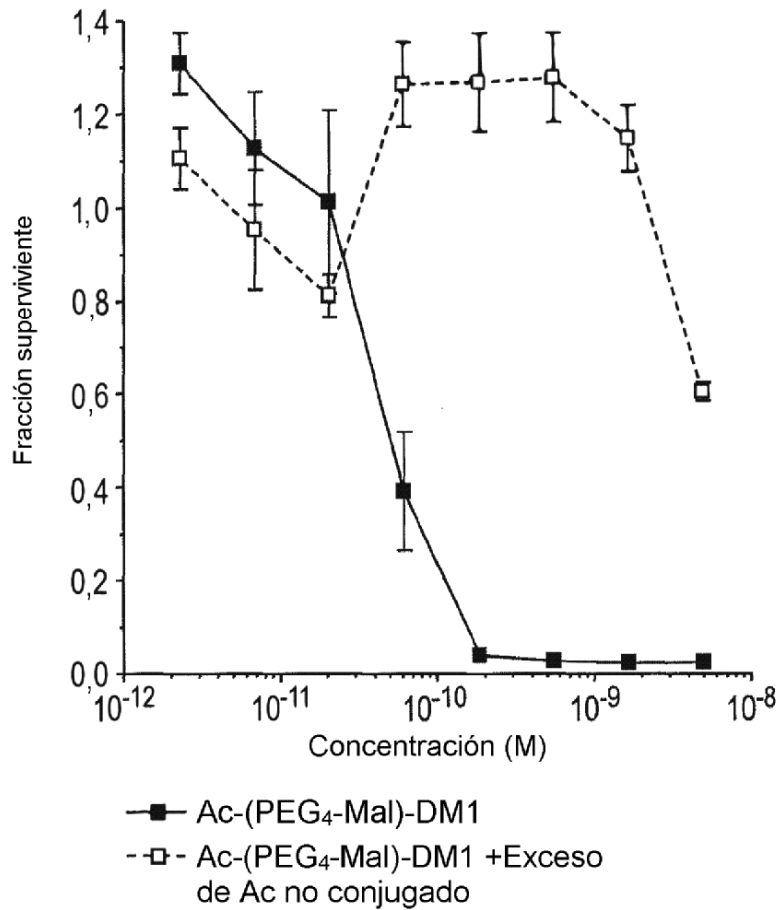
Unión de un conjugado de anticuerpo anti-CanAg-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM1 con 6,7 DM1 por anticuerpo (preparado usando el método descrito en esta invención) frente a la unión del anticuerpo no modificado hacia células COLO205 que expresan antígeno CanAg





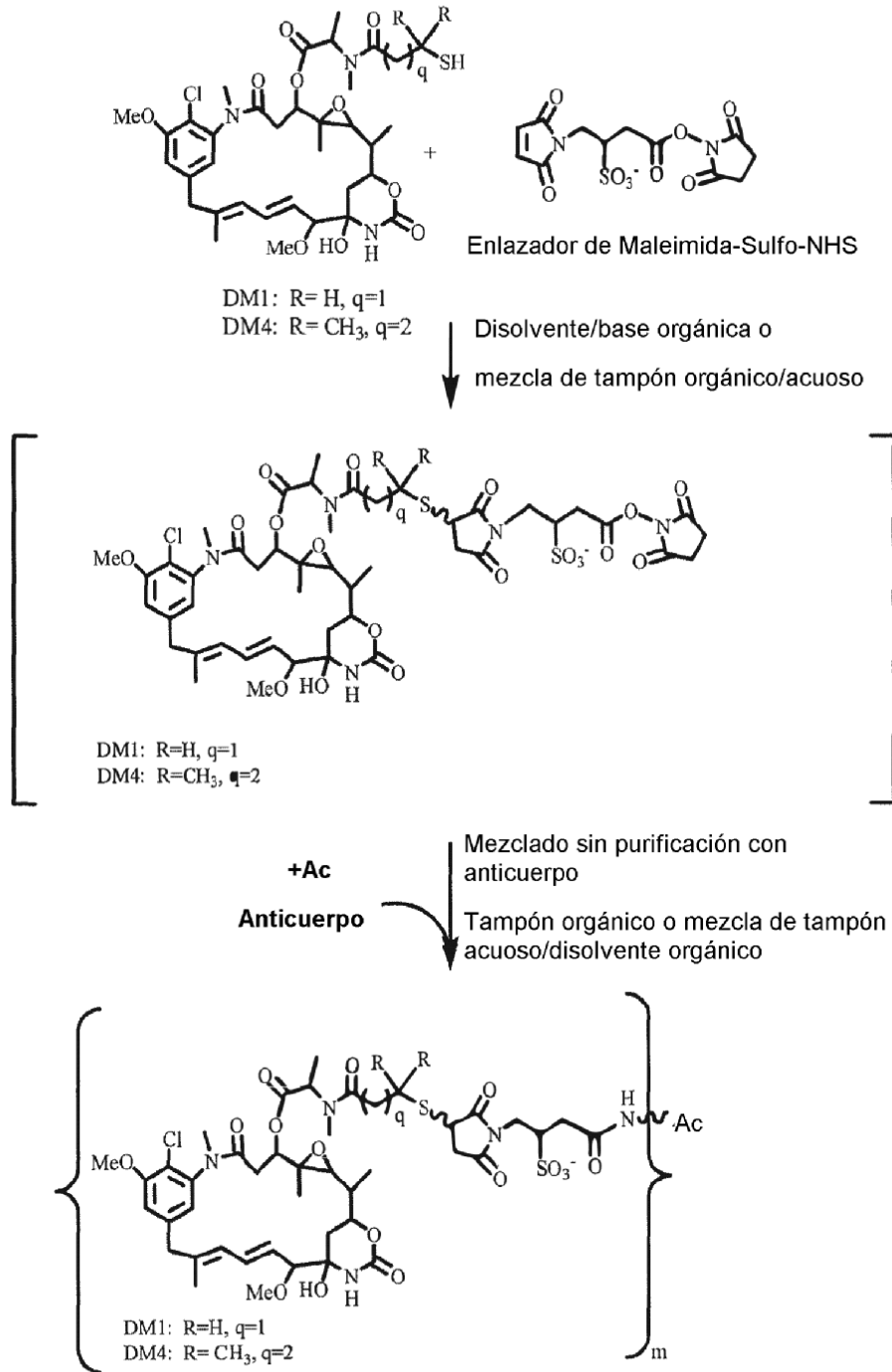
## FIG. 6

Citotoxicidad *in vitro* de un conjugado de anticuerpo anti-CanAg-PEG<sub>4</sub>-Mal-DM1 con 6,7 DM1 por anticuerpo (preparado usando el método descrito en esta invención) hacia células COLO205 que expresan antígeno CanAg.



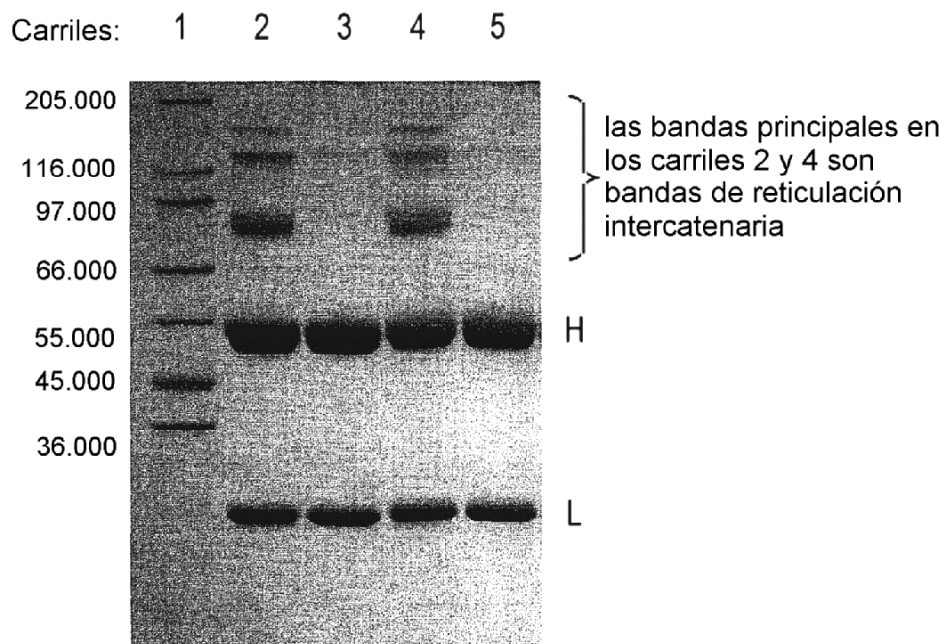
**FIG. 7**

Conjugación de anticuerpo con una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y enlazador de Maleimida-Sulfo-NHS



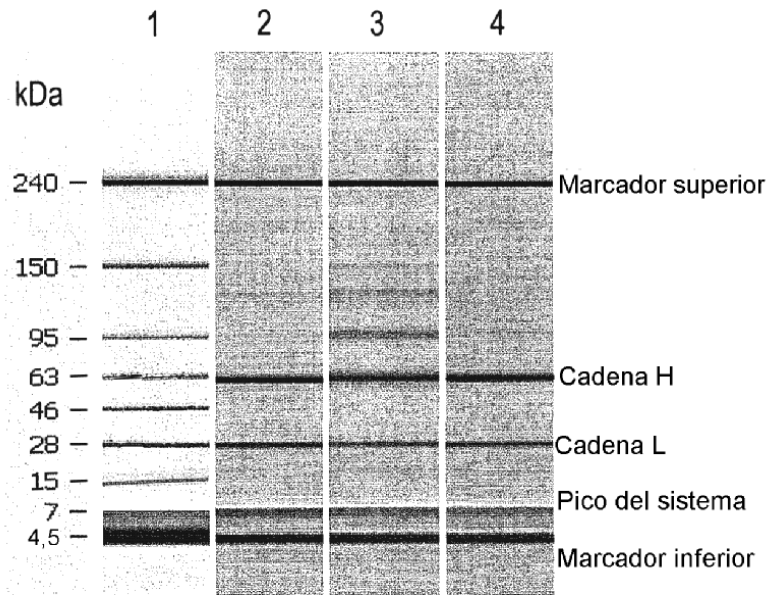
## FIG. 8

SDS-PAGE reductora de conjugados de Ac-(Sulfo-Mal)- DM1 preparados usando el método descrito en esta invención frente a conjugados preparados usando el método tradicional de 2 etapas



## FIG. 9A

Electroforesis LabChip de proteína del conjugado Ac-(Sulfo-Mal)-DM1 preparado usando el método descrito en esta invención frente al conjugado preparado usando el método tradicional de 2 etapas.

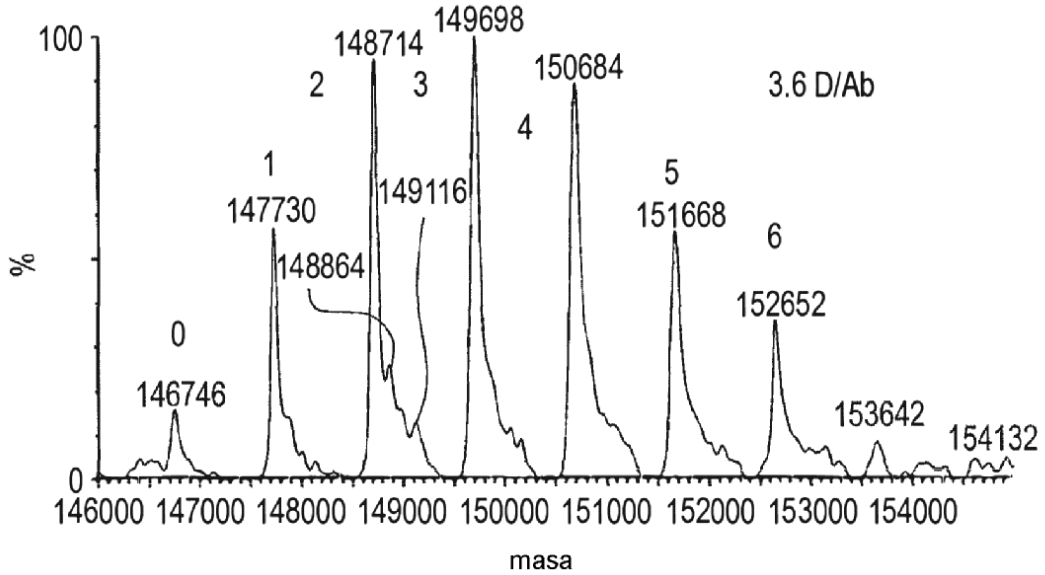


## FIG. 9B

	% de masa total de proteína cargada		
Banda de PM (kDa)	Ac no conjugado	Ac-PEG4-Mal-DM 1 Este método	Ac-PEG4-Mal-DM 1 2 etapas
18	-	-	1
<b>Cadena L</b>	<b>29</b>	<b>23</b>	<b>28</b>
<b>Cadena H</b>	<b>62</b>	<b>53</b>	<b>70</b>
99	-	15	1
130	1	7	1
152	-	3	-

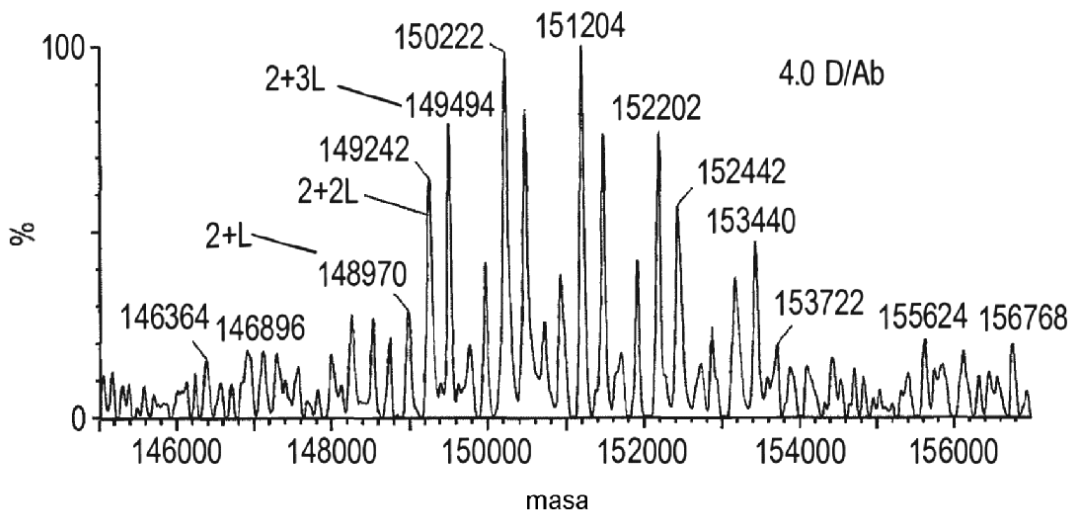
# FIG. 10A

Conjugado Ac-(3-Sulfo-Mal)-DM1 (3,6 D/Ac) preparado usando el método descrito en esta invención



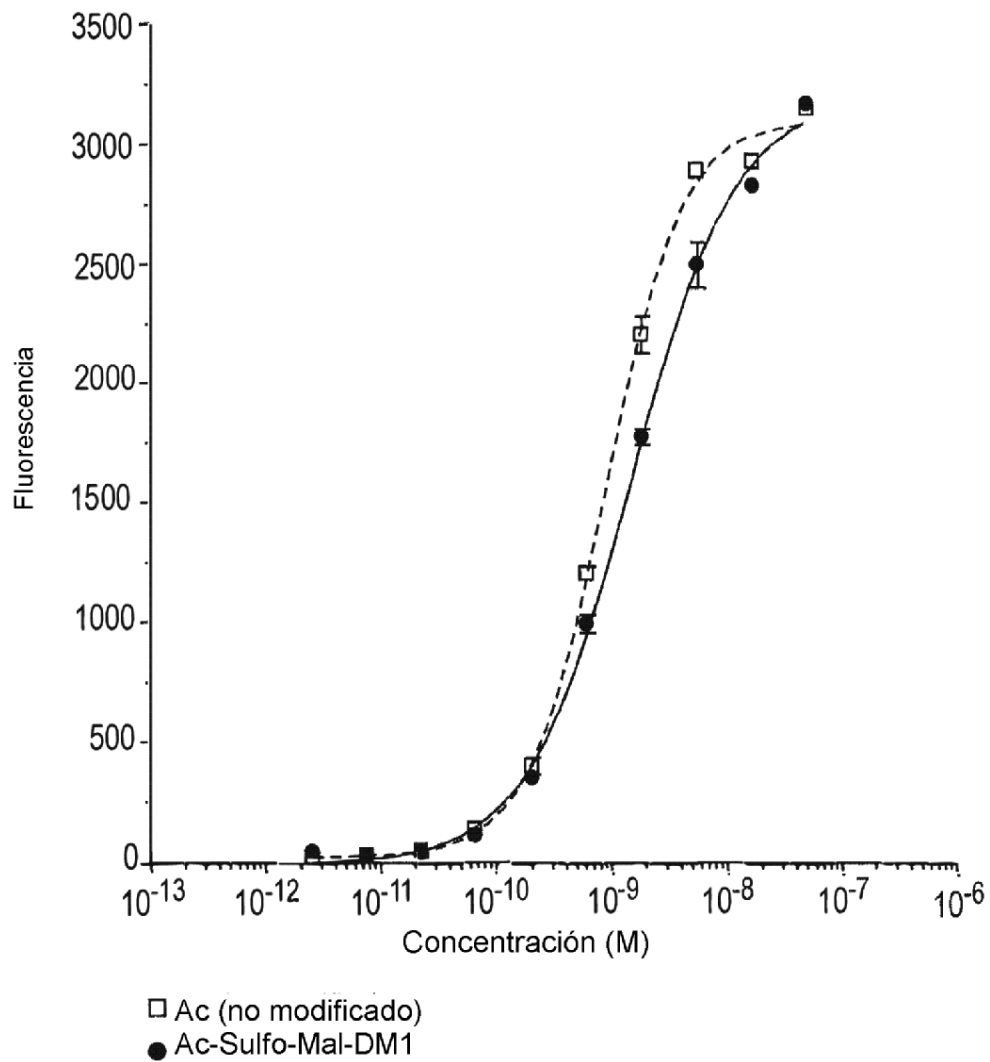
# FIG. 10B

Conjugado Ac-(3-Sulfo-Mal)-DM1 (4,0 D/Ac) método de conjugación tradicional de dos etapas



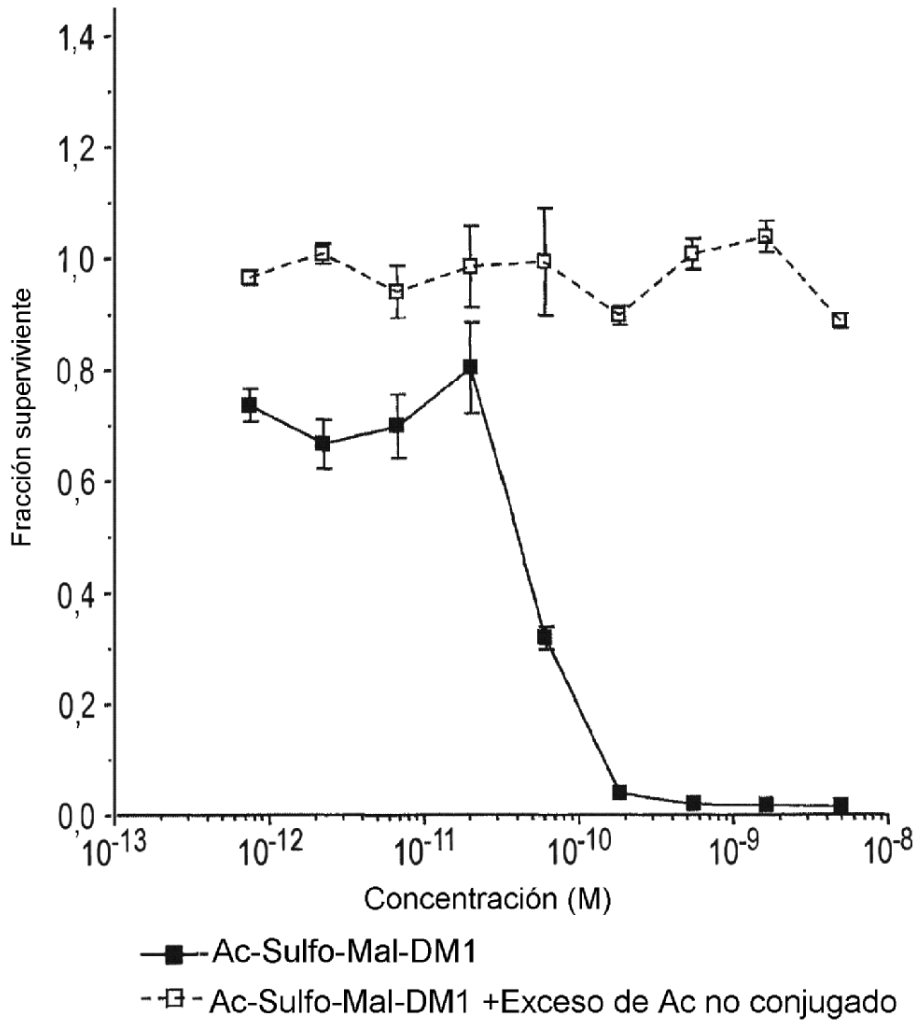
## FIG. 11

Unión de un conjugado de anticuerpo anti-CanAg-Sulfo-Mal-DM1 con 5,6 DM1 por anticuerpo (preparado usando el método descrito en esta invención) frente a la unión del anticuerpo no modificado hacia células COLO205 que expresan antígeno CanAg



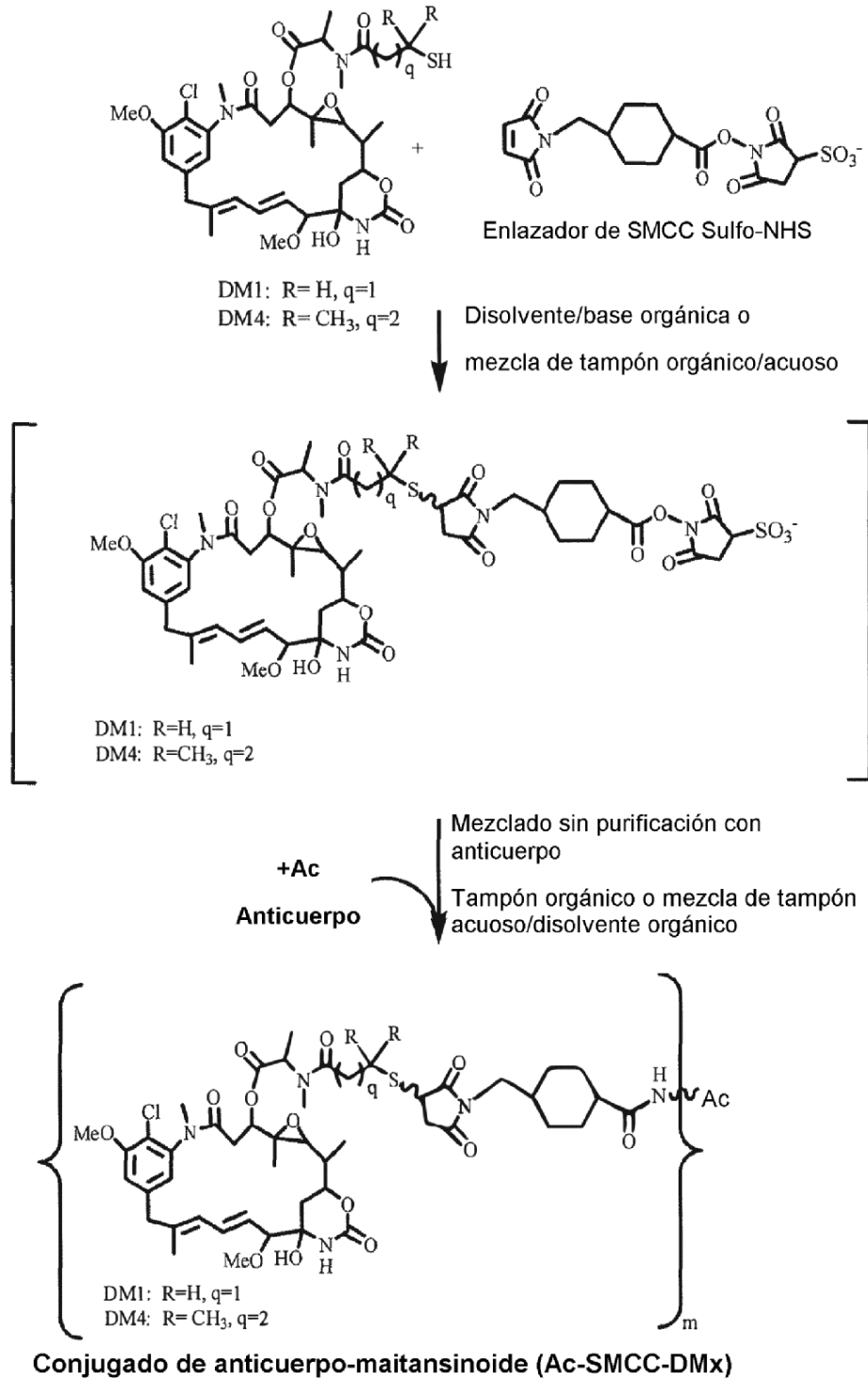
# FIG. 12

Citotoxicidad *in vitro* de un conjugado de anticuerpo anti-CanAg-Sulfo-Mal-DM1 con 5,6 DM1 por anticuerpo (preparado usando el método descrito en esta invención) hacia células COLO205 que expresan antígeno CanAg.



# FIG. 13

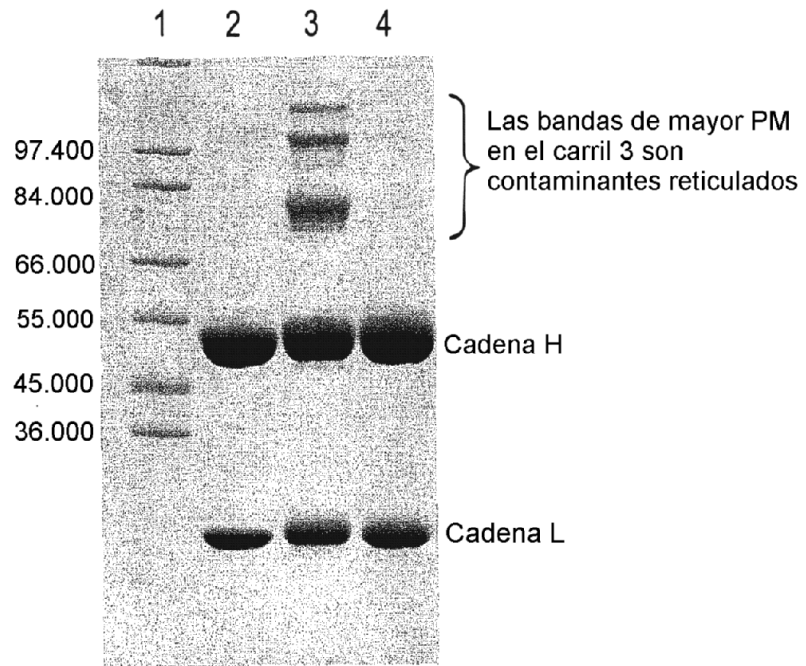
Conjugación de anticuerpo con una mezcla de reacción de  
DMI (o DM4) y enlazador de SNCC Sulfo-NHS





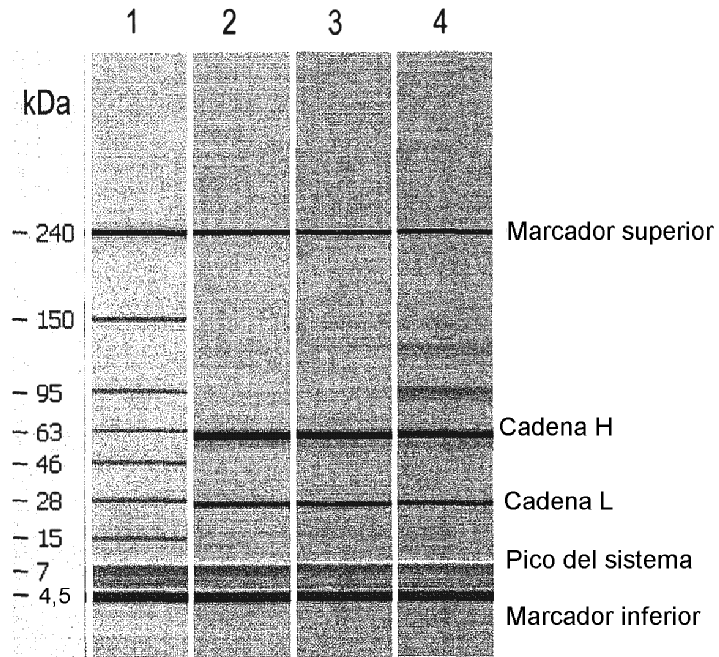
# FIG. 14

SDS-PAGE reductora de conjugados de Ac-(SMCC)-DM1 preparados usando el método descrito en esta invención frente a conjugados preparados usando el método tradicional de 2 etapas



### FIG. 15A

Electroforesis LabChip de proteína del conjugado Ac-(SMCC)-DM1 preparado usando el método descrito en esta invención frente al conjugado preparado usando el método tradicional de 2 etapas.

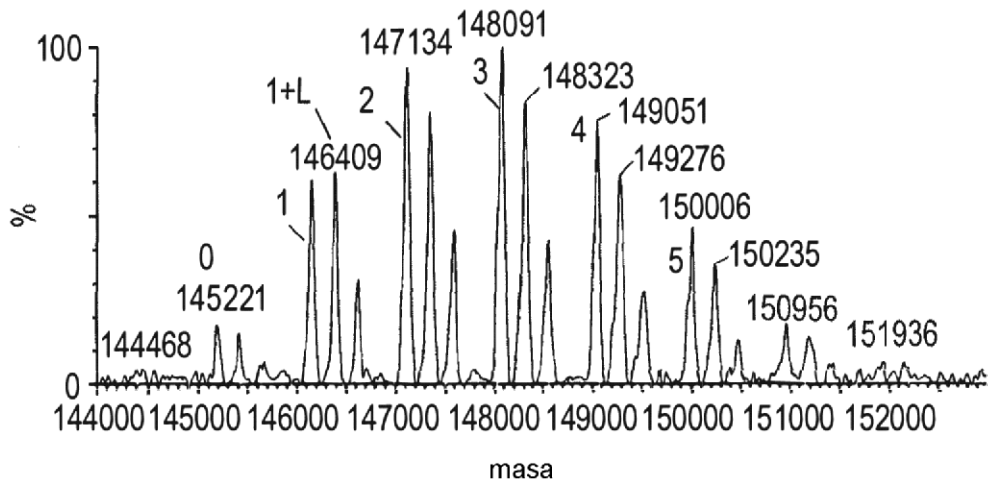


### FIG. 15B

		% de masa total de proteína cargada		
Banda de PM (kDa)		Ac-SMCC-DM1 Este método	Ac no conjugado	Ac-SMCC-DM1 2 etapas
Cadena L	<b>27</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>24</b>
	56	2	2	2
Cadena H	<b>61</b>	<b>67</b>	<b>68</b>	<b>54</b>
	96	1	-	12
	129	1	-	6
	148	-	-	2

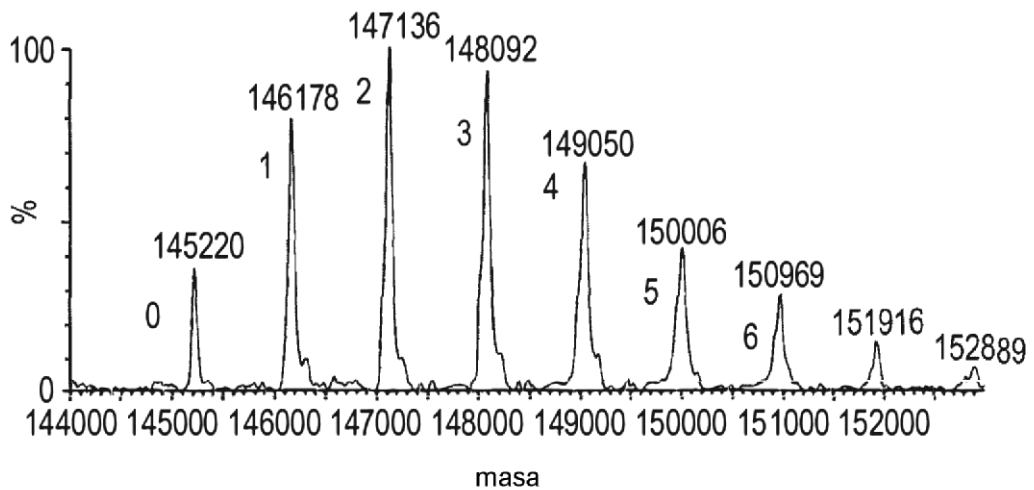
# FIG. 16A

Ac SMCC DM1, 3,1 D/Ac, preparado con el método de conjugación tradicional de 2 etapas



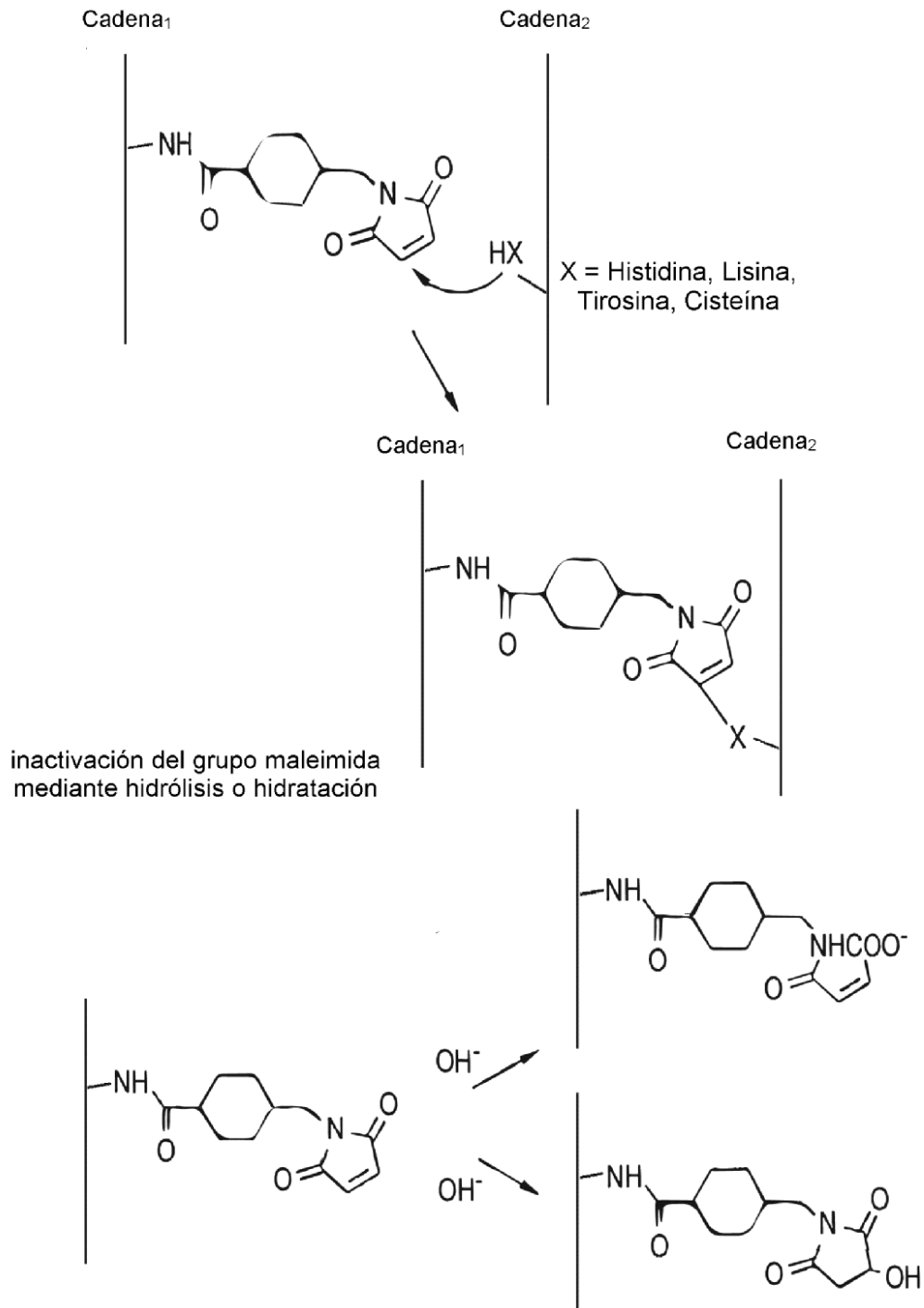
# FIG. 16B

Ac SMCC-DM1, 3,1 D/Ac, preparado usando el método descrito en esta invención



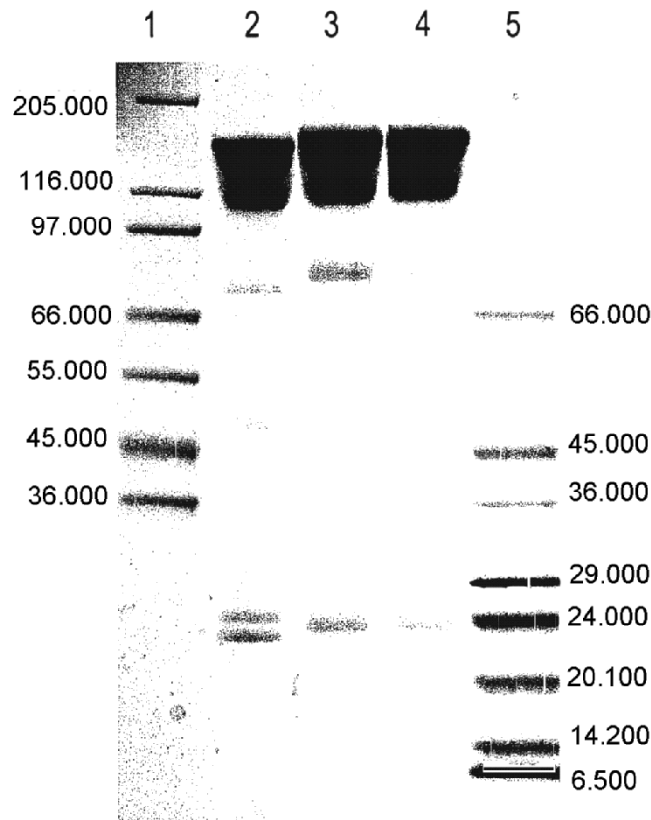
# FIG. 17

Mecanismo propuesto para la reticulación intercadena y la inactivación de la maleimida durante la conjugación mediante el método tradicional de 2 etapas



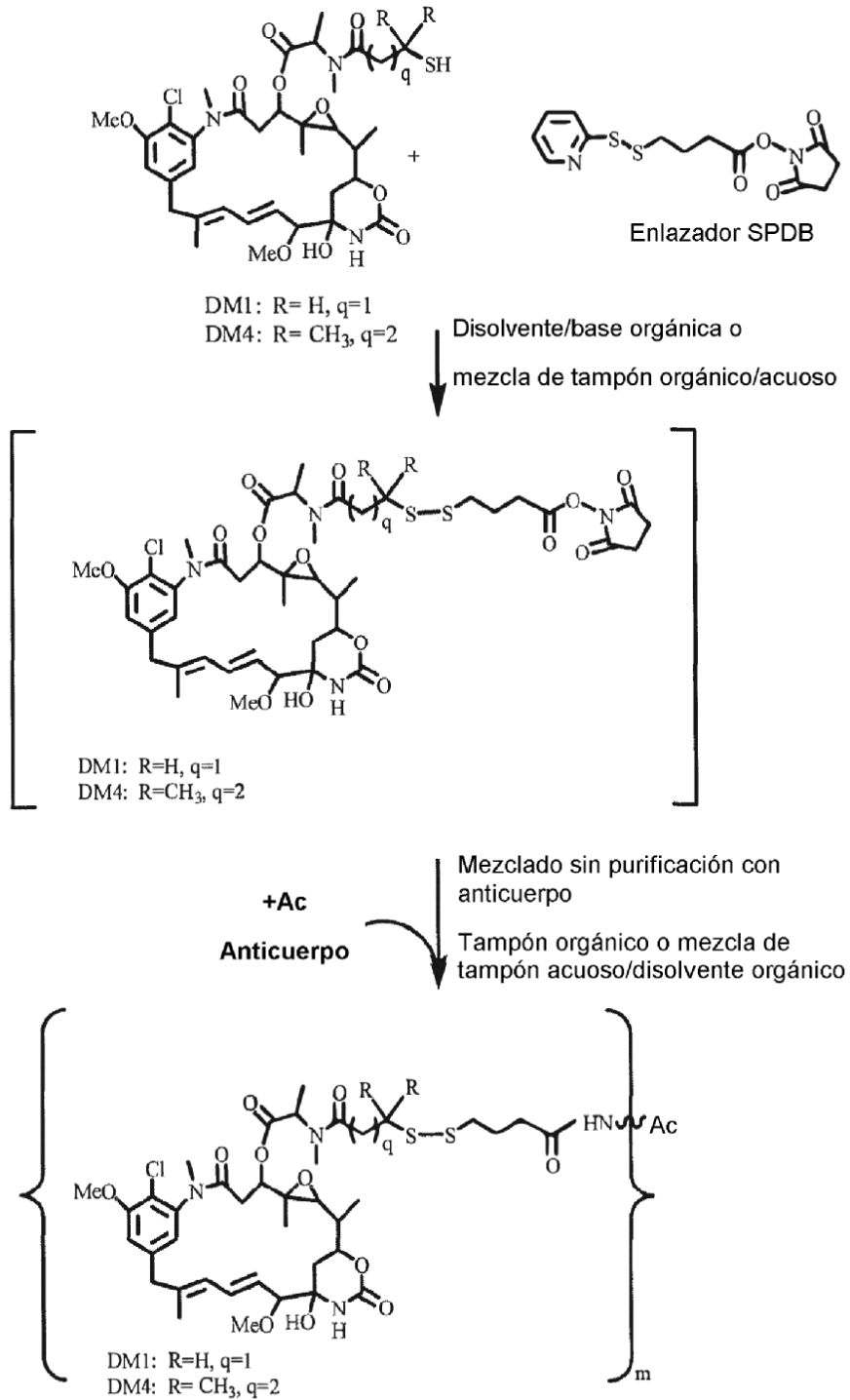
# FIG. 18

SDS-PAGE no reductora de Ac-(Sulfo-Mal)-DM4 preparado usando el método descrito en esta invención e inactivación del tiol de DM4 libre (después de la reacción de acoplamiento del reactivo heterobifuncional de DM4 + NHS-Sulfo-Mal) usando ácido 4-maleimidobutírico antes de la reacción de conjugación del anticuerpo



# FIG. 19

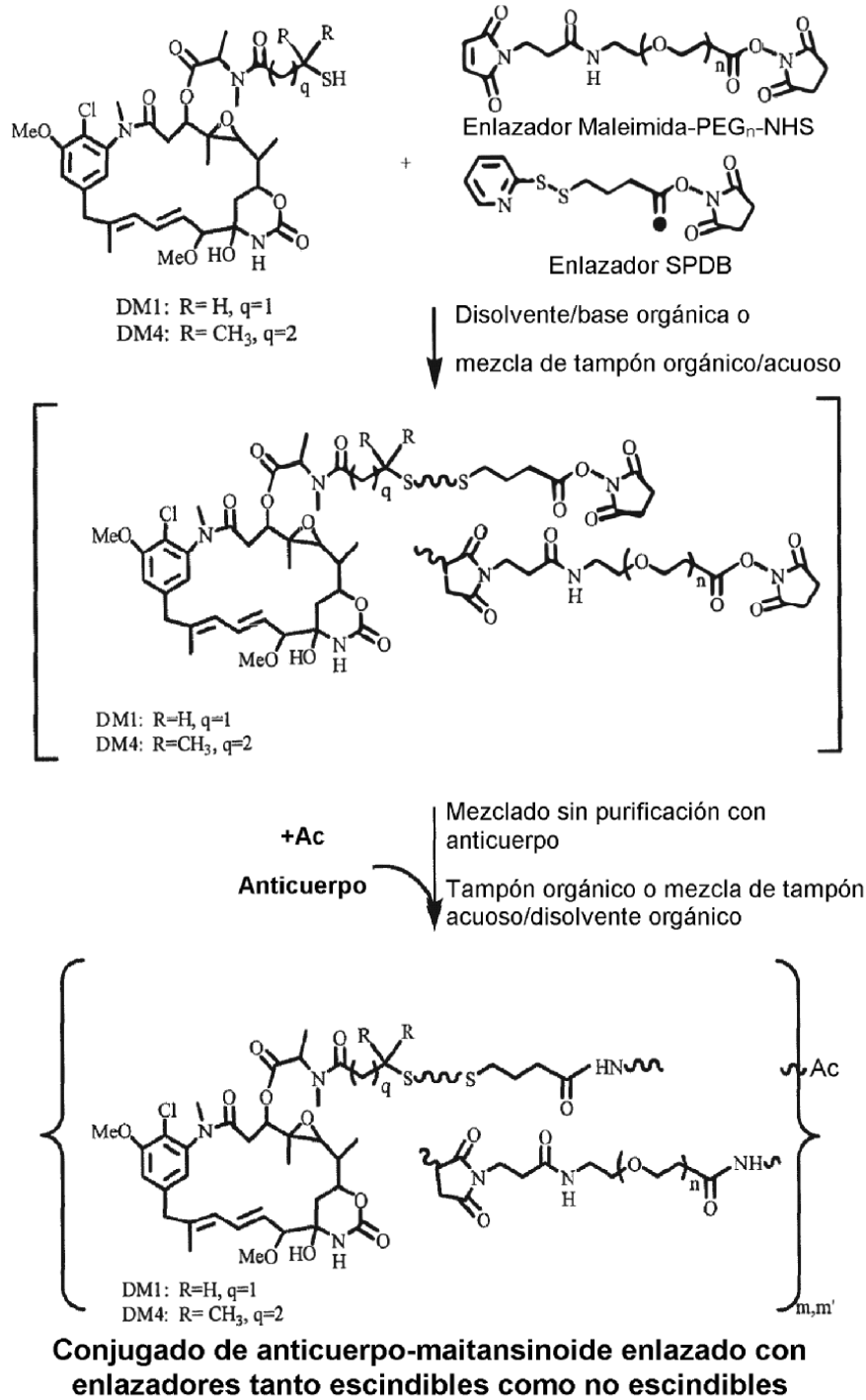
Preparación del conjugado unido por disulfuro de anticuerpo usando una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y enlazador SPDB



**Conjugado de anticuerpo-maitansinoide con disulfuro escindible**

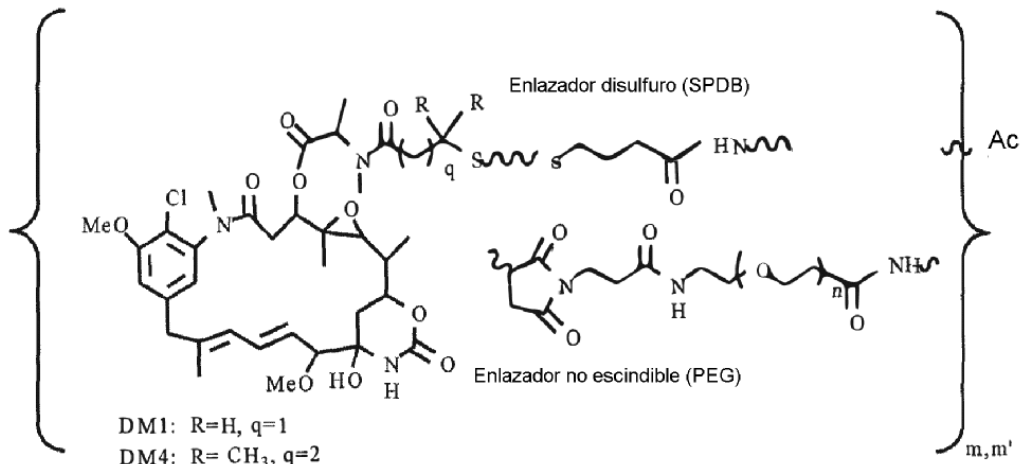
FIG. 20

Preparación de conjugado de anticuerpo-maitansinoide con enlaces tanto disulfuro como de PEG<sub>n</sub>-Mal no escindible mediante conjugación de anticuerpo con una mezcla de reacción no purificada de DM1 (o DM4) y enlaces tanto SPDB y NHS-PEG<sub>n</sub>-Mal

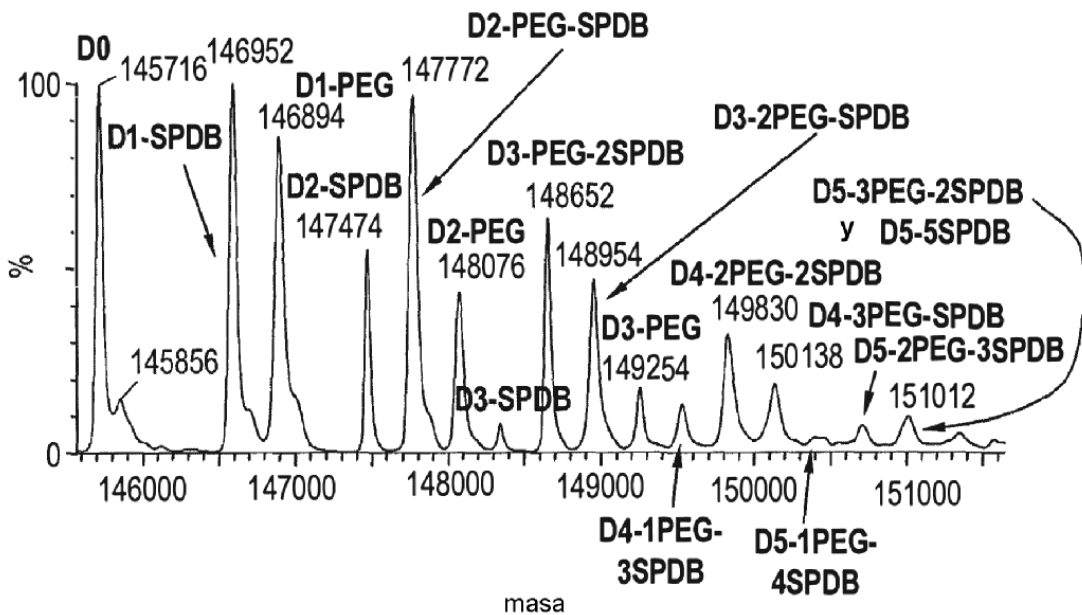


# FIG. 21

EM del conjugado anticuerpo-maitansinoide con enlaces tanto disulfuro como PEG4-Mal no escindibles (preparado mediante conjugación de anticuerpo con una mezcla de reacción no purificada de DM1 (o DM4) y enlaces tanto SPDB como NHS-PEG<sub>n</sub>-Mal). El conjugado tuvo una carga media de 3,5 moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo.



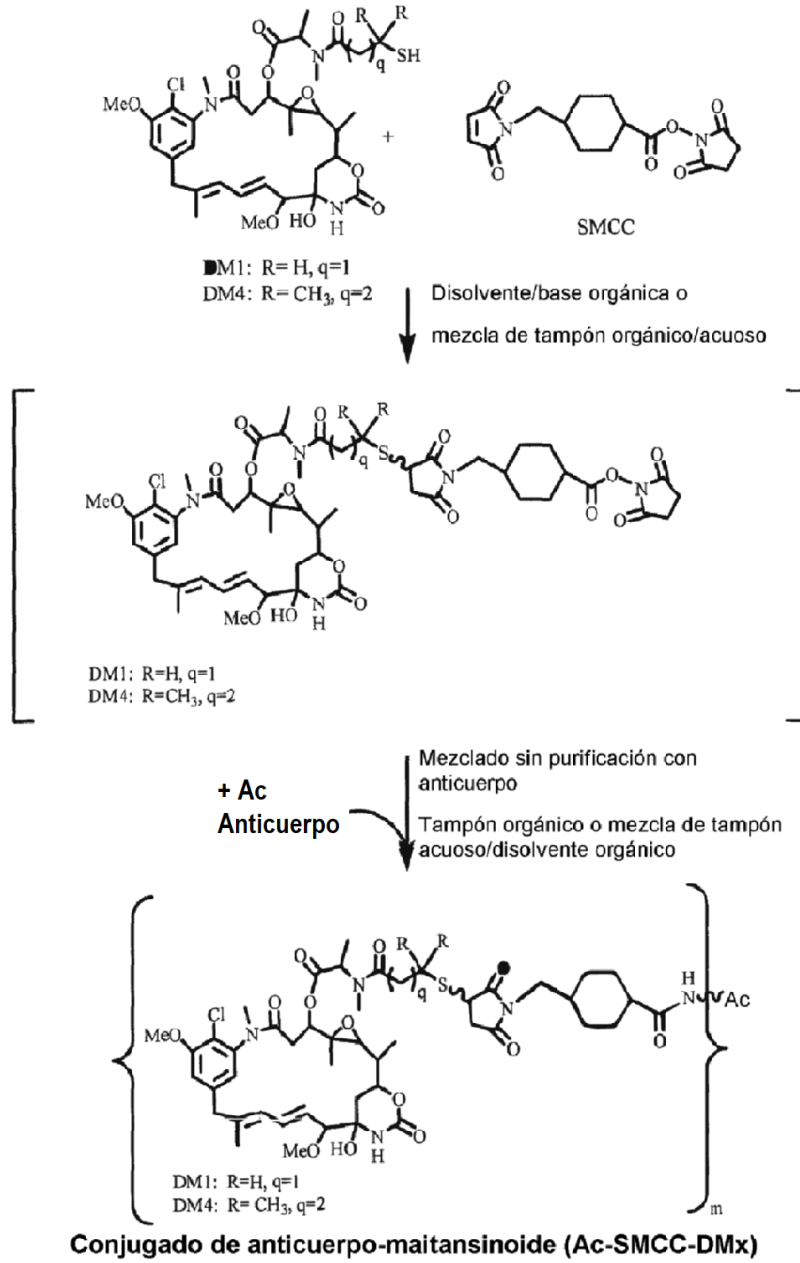
**Conjugado de anticuerpo-maitansinoide enlazado con enlaces tanto escindibles como no escindibles**





**FIG. 22**

Conjugación de anticuerpo con una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y enlazador SMCC



# FIG. 23

EM del conjugado de anticuerpo-SMCC-DM1 preparado usando SMCC mediante el método descrito en esta invención, que contiene de media 3,1 DM1 por anticuerpo

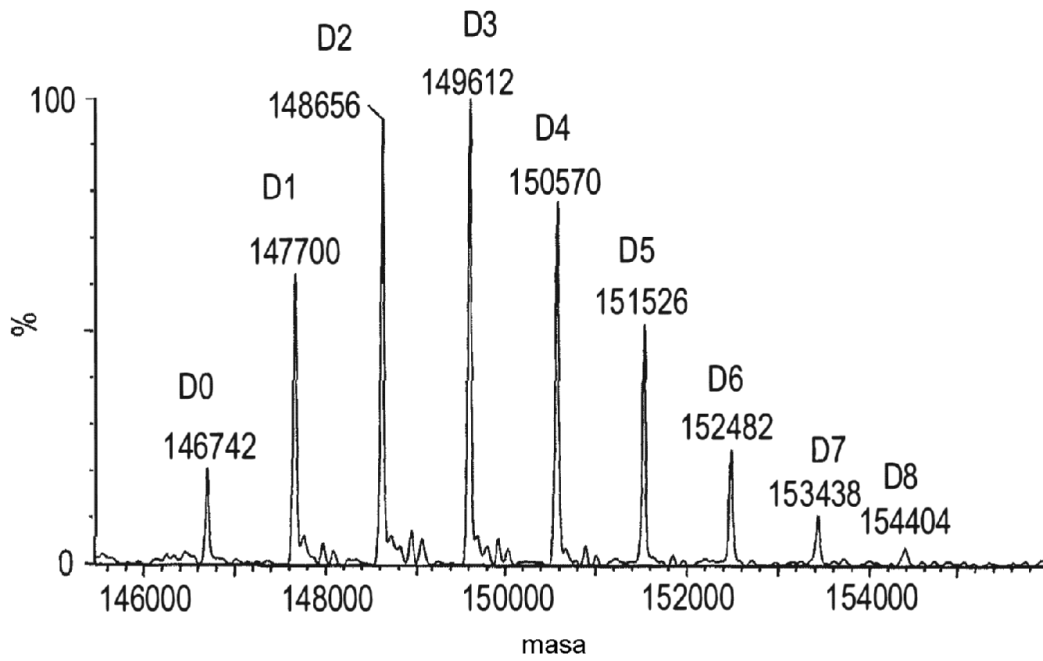
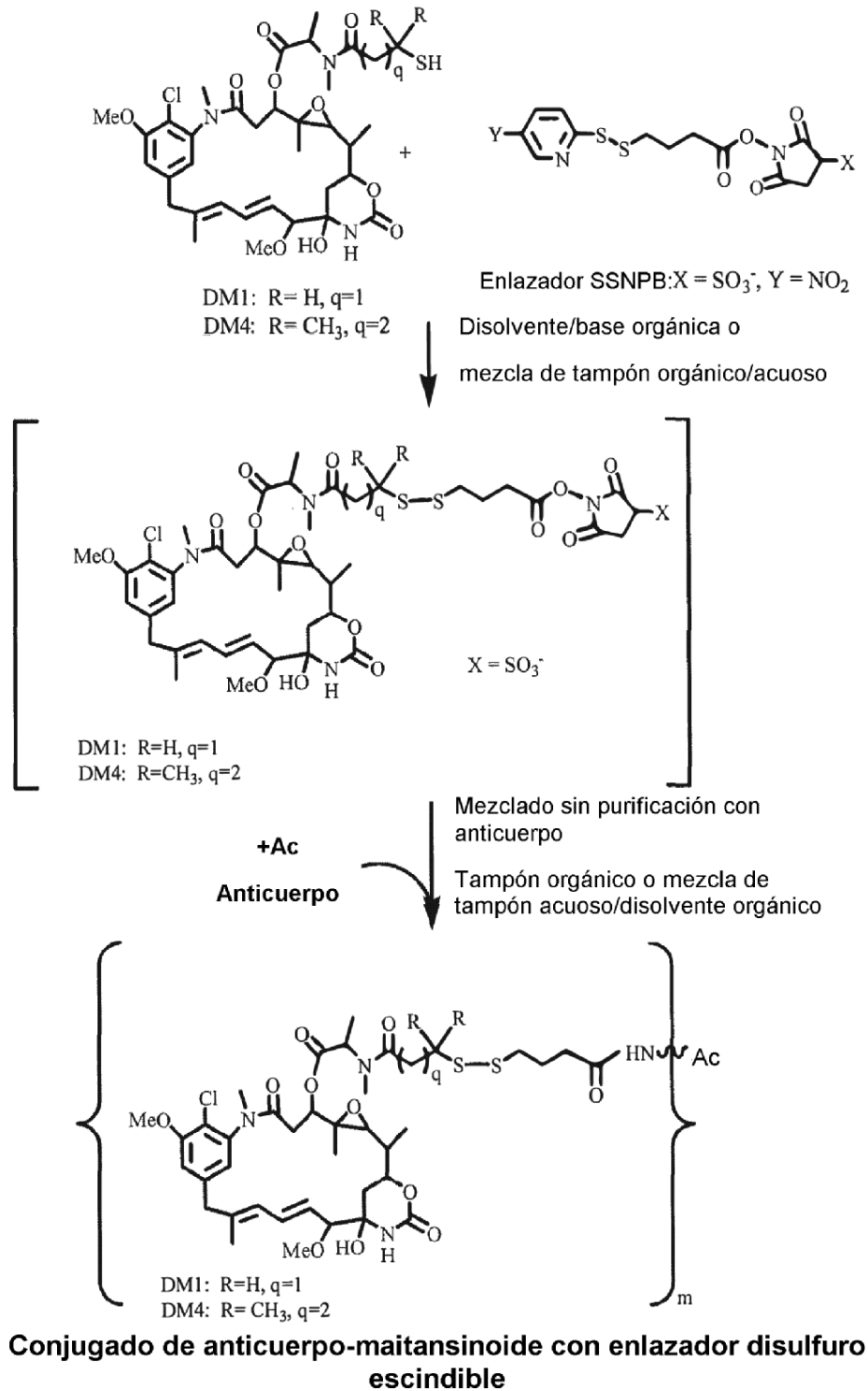


FIG. 24

Preparación de conjugado de anticuerpo enlazado por disulfuro usando una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y SSNPB



# FIG. 25

Conjugación de anticuerpo con una mezcla de reacción de DM1 (o DM4) y enlazador heterobifuncional con cadena de carbono lineal alifática

