

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES
2000-10

SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material ☒ XXX Modificación a una solicitud

SOLICITANTE Nombre: IMINOGEN, INC.
Dirección: 128 Sidney Street
E-mail:
Domicilio: Cambridge, Massachussets, Estados Unidos de América

REPRESENTANTE Nombre: HUMBERTO RUBIO CAMACHO IDENTIFICACIÓN
Dirección: Cra. 7 No. 74-64, Of. 506 C.C. X NIT
O APODERADO Teléfono: 3132408 Fax: 3131647 C.E. OTRO
E-mail: No. 17'192.062 TP. 50.007

Número de expediente:

06-027.260

TÍTULO:

"MÉTODO PARA ACTIVAR LAS RELACIONES DE CÉLULA ESPECÍFICAS UTILIZANDO CONJUGADOS MATEMÁTICOS DEL AGENTE DEL ENLACE CÉLULAR ENLAZADOS A TRAVÉS DE UN ENLAZADOR NO DIVISIBLE, DICHS. CONJUGADOS Y MÉTODOS PARA HACER DICHS. CONJUGADOS"

Descripción de la corrección o modificación solicitada.

Conforme a lo establecido en el Artículo 34 de la Decisión 486 de la comisión de la:

Comunidad Andina, solicito sean tenidas en cuenta para el estudio de la presente solicitud, las siguientes modificaciones: 1. Nuevo Capítulo Descriptivo; 2. nuevo capítulo de reivindicaciones; 3. Nuevos Dibujos. Para que la presente petición sea viable, se anexan los nuevos capítulos señalados anteriormente; así como los nuevos dibujos. Esta modificación no implica ningún cambio sustancial, ni ampliación de la protección de la solicitud presentada inicialmente.

Comprobante de pago No. 06-62,804 Fecha: 16 de agosto de 2.005

Anexos:

- ☒ X Comprobante de pago de la tasa
☐ Poderes, si fuere el caso.
☐ Certificado de Existencia y Representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

NOMBRE HUMBERTO RUBIO CAMACHO

Cópi.-

FIRMA

C.C. 17'192.062 de Bogotá T.P. 50.007

MODIFICACIÓN
Patente de invención: MÉTODO PARA ACTIVAR
LAS POBLACIONES DE CÉLULA ESPECÍFICAS
UTILIZANDO CONJUGADOS MITOCONDRIALES DEL
AGENTE DE ENLACE CELULAR ENLAZADOS A TRAVÉS
DE UN ENLAZADOR NO DIVISIBLE, DICHS
CONJUGADOS, Y MÉTODOS PARA HACER DICHS
CONJUGADOS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT 0001 6089-

RECIBO OFICIAL DE AJA : 06 62,804
FECHA AGOSTO 16 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-027280-00003-0000
Rec 2006-08-08 15:08:48 Dep 2000 NUECREACIONES
Tm 11 PATENTERO
En 370 FASENACIONAL
Act 329 COTRINFORMACION Folios 157

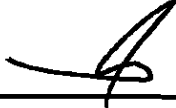
***** D E N O T A C I O N *****

DEPOS TARTE	IPD PAGO	BANCO	CUEN A	No PAGO	FECHA PGO	Jr PAGO
HUMBERTO RUBIO ABOGADOS	CONSISTENCIA	BANCO POPULAR	050 00110-6	464691	16/08/2006	647,000 00

***** D E N O T A C I O N *****

CANT	RENTISICO	CONCEPTO	TOTAL AL CONCEPTO
1	50005 01 03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIF CA	95,000 00
		2 MARCAS Y LEÑAS COMERCIALES	95,000 00
		TOTAL	95,000 00

SOM NOVENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CABA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

3.178

**MÉTODO PARA ACTIVAR LAS POBLACIONES DE CÉLULA ESPECÍFICAS
UTILIZAND CONJUGADOS MAITANSINOIDES DEL AGENTE DE ENLACE
CELULAR ENLAZADOS A TRAVÉS DE UN ENLAZADOR NO DIVISIBLE. DICHS
CONJUGADOS, Y MÉTODOS PARA HACER DICHS CONJUGADOS**

5

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 60/509,901, presentada el 10 de octubre del 2003, la descripción completa de la cual se incorpora aquí por referencia.

10

CAMPO DE LA INVENCIÓN

15

Un método consistente con la presente invención se refiere a la activación de poblaciones de célula específicas utilizando conjugados maitansinoides del agente de enlace celular enlazados a través un enlazador no divisible. Otro método consistente con la presente invención es un método para hacer el conjugado. Una composición consistente con la presente invención se refiere a conjugados maitansinoides del agente de enlace celular novedosos en donde el maitansinoide está enlazado a través de un enlazador no divisible al agente de enlace celular. Otra composición consiste con la presente invención se refiere a ésteres maitansinoides novedosos.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

25

Los maitansinoides son fármacos altamente citotóxicos. La maitansina fue aislada primero por Kupchan y otros, del arbusto Maytenus serrata del este de África y demostró que es de 100 a 1000 veces más citotóxico que los agentes quimioterapéuticos de cáncer convencionales de tipo metotrexato, daunorubicina, y vincristina (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 3,896,111). Subsecuentemente, se descubrió que algunos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3

maitansinol (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,151,042). Los ésteres C-3 sintéticos de maitansinol y los análogos de maitansinol también han sido reportados (Kupchan y otros, 21 J. Med. Chem. 31-37 (1978); Higashide y otros 270 Nature 721-722 (1977); Kawai y otros, 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984)). Ejemplos de análogos de maitansinol a partir de los cuales se han preparado ésteres C-3 incluyen maitansinol con modificaciones en el anillo aromático (por ejemplo decoloro) o en el C-9, C-14 (por ejemplo grupo metil hidroxilado), C-15, C-18, C-20 y C-4,5.

Los ésteres C-3 de existencia natural y sintéticos se pueden clasificar en dos grupos: (a) ésteres C-3 con ácidos carboxílicos simples (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,248,870; 4,265,814; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,317,821; 4,322,348; y 4,331,598), y

(b) Ésteres C-3 con derivados de N-metil-L-alanina (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,137,230 y 4,260, 608; y Kawai y otros , 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984)).

Se encontró que los ésteres del grupo (B) son mucho más citotóxicos que los ésteres del grupo (a).

La Maitansina es un inhibidor mitótico. Se ha reportado que el tratamiento con células L1210 *in vivo* con maitansina da como resultado que 67% de la células se acumulen en mitosis. Se ha reportado que las células de control no tratadas demuestran un índice mitótico en la escala de entre 3.2 a 5.8% (Sieber y otros, 43 Bibl. Haematol. 495-500 (1976)). Los experimentos con huevos de erizo de mar y huevos de almeja han sugerido que la maitansina inhibe la mitosis a través de la interferencia con la formación de microtúbulos a través de la inhibición de la polimerización de la proteína de microtúbulo, tubulina (Remillard y otros , 189 Science 1002-1005 (1975)).

Se ha encontrado que las suspensiones de célula leucémica de murino P388, L1210, y LY5178, *in vivo*, son inhibidas a través de maitansina a dosis de 10^{-3} a 10^{-1} µg/ml con la línea P388 siendo la más sensible. La Maitansina también ha demostrado que es un inhibidor activo del crecimiento *in vivo* de células de carcinoma nasofaríngeas

humanas, y la línea C.E.M de leucemia linfoblástica aguda humana se reportó como siendo inhibida a través de concentraciones tan bajas como 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ (Wolpert-DeFillippes y otros, 24 Biochem. Pharmacol. 1735-1738 (1975)).

La Maitansina también ha demostrado que es activa *in vivo*. El crecimiento de tumor en el sistema de leucemia linfocítica P388 demostró que se inhibe sobre un rango de dosis de 50 a 100 veces, lo que sugiere un índice terapéutico alto; también la actividad significativa inhibidora se podría demostrar con el sistema de leucemia de ratón L 1210, el sistema de carcinoma de pulmón de Lewis humano y el sistema de melanocarcinoma B-16 humano (Kupchan, 33 Ped. Proc. 2288-2295 (1974)).

Debido a que los maitansinoides son altamente citotóxicos, se espera que sean de uso en el tratamiento de muchas enfermedades tal como cáncer. Esta expectativa aún no se ha logrado. Las pruebas clínicas con maitansina no fueron favorables debido a un número de efectos laterales ((Issel y otros, 5 Cancer Treat. Rev. 199-207 (1978)). Los efectos adversos para el sistema nervioso central y los síntomas gastrointestinales fueron responsables de que algunos pacientes rechazaran la terapia adicional, (Issel en 204), y parece que la maitansina estuvo asociada con neuropatías periféricas que podrían acumularse (Issel en 207).

Por consiguiente, se emplearon las técnicas de activación para selectivamente suministrar fármacos a la célula objetivo. Se han investigado ambos, los enlazadores divisibles y los no divisibles para varios fármacos, pero en la mayoría de los casos, incluyendo el caso de maitansinoides las pruebas de citotoxicidad *in vitro* ha revelado que los conjugados de anticuerpo-fármaco logran la misma potencia citotóxica que los fármacos no conjugados libres. De esta forma, se ha aceptado en general que el suministro activado de maitansinoides para que sea efectivo, el enlace entre el maitansinoide y el agente de enlace celular debe ser divisible.

Además, en el área de la inmunotoxinas, los conjugados que contienen enlazadores con puentes de disulfuro entre los anticuerpos monoclonales y las toxinas de proteína catalíticamente activas demostraron que son más citotóxicas que los conjugados

que contienen otros enlazadores. Ver, Lambert y otros, 260 J. Biol. Chem. 12035-12041 (1985); Lambert y otros, en Immunotoxins 175-209 (A. Frankel, ed. 1988), y Ghetie y otros, 48 Cancer Res. 2610-2617 (1988). Esto se atribuyó a la alta concentración intracelular de glutatona que contribuye a la división eficiente del enlace de disulfuro entre una molécula del anticuerpo y una toxina. Más recientemente, un conjugado de maitansinoides enlazado al anticuerpo TA.1 de cáncer de pecho anti-Her2 a través de un enlazador SMCC no divisible demostró que es 200 veces más potente que un conjugado de maitansinoides enlazado a TA.1 a través de un enlazador que tiene un enlace de disulfuro divisible (Chari y otros, 52 Cancer Res. 127-133 (1992)).

De esta forma, se han buscado los conjugados citotóxicos enlazados a través de enlazadores divisibles que contiene disulfuro. Shen y otros describieron la conversión de metotrexato dentro de un derivado de mercaptoetilamida seguido por la conjugación con poli-D-lisina a través de un enlace de disulfuro (260 J. Biol. Chem. 10905-10908 (1985)). La preparación de un conjugado del fármaco tóxico calicqueamicina que contiene trisulfuro con un anticuerpo también se describió (Menendez y otros, Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer, San Diego, Abstract 81(1989)).

Las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,208,020 y 5,416,064, las descripciones completas de las cuales están expresamente incorporadas aquí por referencia, describen los conjugados citotóxicos que comprenden agentes de enlace de célula enlazados a derivados maitansinoides específicos a través de enlazadores divisibles, tales como los enlazadores que contienen grupos de disulfuro, enlazadores que contienen grupos de ácido inestables, enlazadores que contiene grupos foto inestables, enlazadores que contiene grupos de esterasa inestables.

La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,333,410 B1, la descripción completa de la cual expresamente se incorpora aquí por referencia, describe un proceso para preparar y purificar maitansinoides que contiene tiol para enlazar los agentes de enlace a la célula, y la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No.

6,441, 63 B1, la descripción completa de la cual expresamente se incorpora aquí por referencia, describe un método de un solo paso para preparar conjugados citotóxicos de maitansinoides y agentes de enlace a la célula, en donde el enlazador es un enlazador divisible que contiene disulfuro.

Además, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,208, enseña conjugados de anticuerpo-maitansinoide con enlazadores no divisibles, en donde el enlazador comprende un grupo maleimido. Sin embargo, la referencia no contiene datos experimentales que demuestran que dichos conjugados son efectivos para tratar enfermedades.

Se ha encontrado, inesperadamente que los conjugados citotóxicos de maitansinoides y agentes de enlace a la célula a través de enlazadores no divisibles son extremadamente potentes, y en muchos casos tienen ventajas inesperadas sobre los conjugados de maitansinoides y agentes de enlace a la célula con enlazadores divisibles.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Las modalidades no limitantes, ilustrativas de la presente invención descritas a continuación superan las desventajas anteriores y otras desventajas no descritas anteriormente. También, la presente invención no es requerida para superar las desventajas descritas anteriormente, y una modalidad no limitante, ilustrativa de la presente invención descrita a continuación puede no superar ninguno de los problemas anteriormente descritos.

Un aspecto de la presente invención es un método para activar un maitansinoide para una población de células específica comprendiendo poner en contacto una población de células o tejido que se sospecha que contiene células de dicha población de células seleccionada con un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular, en donde uno o más de los maitansinoides están enlazados al agente enlazador celular a través de un enlazador no divisible.

Otro aspecto de la presente invención es un método para tratar tumores,

enfermedades autoinmunes, rechazos a injerto, enfermedad de injerto contra huésped, infecciones virales, infecciones por parásito, y otras enfermedades que se pueden tratar a través de terapia de activación en donde el agente para la activación es un agente enlazador celular, dicho método comprende administrar a un sujeto en la necesidad del tratamiento una cantidad efectiva de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular, en donde uno o más de los maitansinoides está enlazado al agente enlazador celular, o una formulación farmacéuticamente aceptable o solvato de dicho conjugado.

Otro aspecto de la presente invención es un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular, en donde uno o más maitansinoides están enlazados al agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible.

Otro aspecto de la presente invención es una composición que comprende el conjugado anteriormente descrito.

Otro aspecto de la presente invención es un método par hacer el conjugado anteriormente descrito.

Otro aspecto de la presente invención son ésteres maitansinoides novedosos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la estructura de SMCC.

La Figura 2 muestra la estructura de DM1.

La Figura 3 muestra gráficamente los resultados de un ensayo de enlace FACS comparando el anticuerpo huC242 con el conjugado de anticuerpo-maitansinoide huC242-SMCC-DM1.

La Figura 4 muestra gráficamente la citotoxicidad de huC242-SMCC-DM1.

La Figura 5 muestra la cromatografía de exclusión de tamaño para huC242-SMCC-DM1.

La Figura 6A-C y la Figura 7 muestran gráficamente la citotoxicidad de huC242-SMCC-DM1 comparada con los conjugados preparados con enlazadores que contienen

disulfuro.

La Figura 8A-D muestra gráficamente la citotoxicidad de los conjugados SMCC-DM1 enlazados a varios agentes enlazadores de la células.

La Figura 9 muestra gráficamente la citotoxicidad del conjugado del anticuerpo-maitansinoide huC242-SIAB-DM1.

La Figura 10A muestra gráficamente la actividad anti-tumor de huC242-SMCC-DM1 contra xenoinjertos de colon humanos COLO205 en ratones.

La Figura 10B muestra gráficamente la actividad anti-tumor de huC242-SMCC-DM1 contra los xenoinjertos humanos SNU16 en ratones.

La Figura 10C muestra gráficamente la eficacia anti-tumor de trastuzumab-SMCC-DM1 contra xenoinjertos MCF7 humanos en ratones SCID.

La Figura 11 muestra gráficamente grados de eliminación de plasma de huC242-SMCC-DM1 comparado con enlazadores que contiene disulfuro.

Las Figuras 12A-C muestran gráficamente los resultados de los estudios de toxicidad aguda de huC242-SMCC-DM1 comparado con conjugados preparados con enlazadores que contienen disulfuro.

La Figura 13 muestra la durabilidad del arresto del ciclo de la célula y la actividad destructora de la célula a través de huC242-SMCC-DM1 comparado con conjugados preparados con enlazadores que contiene disulfuro.

Las Figuras 14A-C- muestran la actividad del efecto espectador mínimo de huC242-SMCC-DM1 comparado con conjugados preparados con enlazadores que contiene disulfuro.

La Figura 15 muestra estructuras representativas de agentes de entrelazados basados en maleimido.

La Figura 16 muestra estructuras representativas de agentes entrelazadores con base en haloacetilo.

La Figura 17 muestra la estructura de los conjugados de anticuerpo-SMCC-DM1.

La Figura 18 muestra la estructura de los conjugados anticuerpo-SIAB-DM1.

La Figura 19 muestra la estructura de los conjugados anticuerpo-SMCC-DM4.

La Figura 20 muestra la estructura de los conjugados anticuerpo-SIAB-DM4.

La Figura 21 muestra la síntesis de un conjugado de agente enlazador maitansinoide enlazado a través de un enlazador no divisible que no contiene S.

La Figura 22 muestra gráficamente la citotoxicidad de un enlazador DM no divisible que no contiene S huC242.

La Figura 23 muestra gráficamente los resultados de un ensayo de enlace FACS del enlazador DM1 no divisible que no contiene S huC242.

La Figura 24 muestra gráficamente los resultados de un ensayo de enlace de placa HER2 ECD comparando el anticuerpo trastuzumab con el conjugado de anticuerpo-maitansinoide trastuzumab-SMCC-DM1.

La Figura 25 muestra gráficamente la citotoxicidad y la especificidad de trastuzumab-SMCC-DM1.

La Figura 26 muestra la cromatografía de exclusión de tamaño para trastuzumab-SMCC-DM1.

La Figura 27 muestra gráficamente los resultados de un ensayo de enlace de placa HER2 ECD comparando el anticuerpo trastuzumab con el conjugado de anticuerpo-maitansinoide trastuzumab-SIAB-DM1.

La Figura 28 muestra gráficamente la citotoxicidad y especificidad de trastuzumab-SIAB-DM1.

La Figura 29 muestra la cromatografía de exclusión de tamaño para trastuzumab-SIAB-DM1.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS MODALIDADES ILUSTRATIVAS DE LA

INVENCION

La técnica revela que es extremadamente difícil para modificar los fármacos existentes sin disminuir su potencial citotóxico. Sin embargo, las Patentes de los Estados

Unidos de Norteamérica Nos. 6,441,163 B1, 6,333,410 B1, 5,416,064, y 5,208,020 demuestran que los agentes citotóxicos potentes se pueden crear a través de enlace de maitansinoides con los agentes de enlace apropiados a través de enlazadores apropiados, especialmente enlazadores divisibles que contiene grupos de disulfuro. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular permite la completa medición de la acción citotóxica del maitansinoide que se va a aplicar en una forma activada contra células no deseadas solamente, por lo tanto evitando los efectos laterales debido al daño de células sanas no activadas.

Los inventores de la presente han descubierto de manera inesperada que los maitansinoides enlazados a agentes enlazadores celulares a través de enlazadores no divisibles son superiores en varios aspectos importantes a los maitansinoides enlazados a través de enlazadores divisibles. En particular, cuando se compara con conjugados que contiene enlazadores divisibles, los conjugados con enlazadores no divisibles muestran una actividad anti-tumor equivalente tanto *in vitro* como *in vivo*, pero demuestran una disminución marcada en el grado de eliminación de plasma y en toxicidad.

De esta forma, esta invención provee un método mejorado para activar células, especialmente células que van a ser destruidas, tales como las células de tumor (particularmente células de tumor sólido), células infectadas con virus, células infectadas con microorganismos, células infectadas con parásitos, células autoinmunes (células que producen anticuerpos), células activadas (aquellas involucradas en el rechazo de injerto o la enfermedad de huésped contra injerto), o cualquier otro tipo de célula de células enfermas o anormales, mientras exhiben un mínimo de efectos laterales.

El conjugado utilizado en el método de la invención tiene uno o más maitansinoides enlazados a un agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible. En un método para hacer el conjugado, un agente enlazador celular, por ejemplo un anticuerpo, primero se modifica con un reactivo de entrelazamiento tal como SMCC. En un segundo paso, un maitansinoide reactivo que tiene un grupo tiol, tal como DM1, se hace reaccionar con el anticuerpo modificado para producir conjugados anticuerpo-

12
183

maitansinoide. Alternativamente, el maitansinoide se puede modificar con un reactivo de entrelazamiento con un agente enlazador celular. Ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,441,163 B1.

5 Maitansinoides Adecuados

Los maitansinoides adecuados para uso en la presente invención son bien conocidos en la técnica, y se pueden aislar de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos, producidos utilizando técnicas de ingeniería genética (ver Yu y otros, 99 PNAS 7988-7973 (2002)), o preparados sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos.

Ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen análogos de maitansinol. Ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

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

(1) C-19-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,256,746) (preparado a través de reducción LAH de anasamitocina P2);

(2) C-20-hidroxi (o C-20-demetil)+/-C-19-decloro (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,381,650 y 4,307, 016) (preparado a través de la desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o desclorinación utilizando LAH); y

3) C-20-demetoxi, C-20-aciloxi(-OCOR), +/-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,294,757) (preparado a través de acilación utilizando cloruros de acilo).

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

(1) C-9-SH (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,424,219) (preparado a través de la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₈);

(2) C-14-alcoximetil(demetoxi/CH₂OR) (Patente de los Estados Unidos de

Norteamérica No. 4,331,598);

(3) C-14-hidroximetil o aciloximetil(CH_2OH o CH_2OAc) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,450,254) (preparado de Nocardia);

(4) C-15-hidroxi/aciloxi (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,364,866) (preparado a través de la conversión de maitansinol a través de *Streptomyces*);

(5) C-15-metoxi (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,313,946 y 4,315,929) (aislado de *Trewia nudiflora*);

(6) C-18-N-demetil (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,362,663 y 4,322,348) (preparado a través de la desmetilación de maitansinol a través de *Streptomyces*); y

(7) 4,5-deoxi (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,371,533) (preparado a través de tricloruro de titanio/reducción LAH de maitansinol).

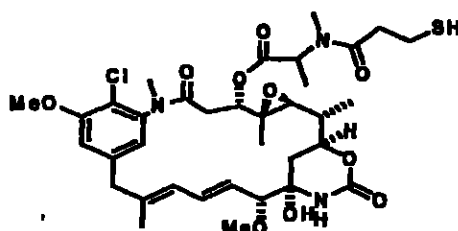
Muchas posiciones en maitansinol se sabe que son útiles como la posición de enlace, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, para formar un enlace de éster, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo, todas son adecuadas. Sin embargo, la posición C-3 es preferida y la posición C-3 de maitansinol es especialmente preferida.

De acuerdo con la presente invención, un maitansinoide preferido tiene un grupo tiol libre. Los maitansinoides particularmente preferidos comprenden un grupo tiol libre que contiene ésteres que incluyen N-metil-alanina y ésteres que contienen N-metil-cisteína de maitansinol son ésteres C-3 de maitansinol y sus análogos. Los ésteres preferidos incluyen ésteres que incluyen ésteres que contienen N-metil-alanina y ésteres que contienen N-metil-cisteína. La síntesis de los ésteres de maitansinol que tienen un grupo tiol libre has sido previamente descritos por ejemplo en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,208,020, Chari y otros, 52 Cancer Res., 127-131 (1992), y Liu y otros, 93 Proc. Natl. Acad. Sci., 8618-8623 (1996). Además, la Patente de los

14/109

Estados Unidos de Norteamérica No. 6,333,410 B1, la descripción completa de la cual se incorporan aquí por referencia, provee un proceso mejorado para la preparación y purificación de maitansinoides que contiene tiol adecuados para enlaces con el agente enlazador de la células.

Muchos de los conjugados de la presente invención ejemplificados más adelante utilizan el maitansinoide DM1 que contiene tiol, formalmente denominado N²-deacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina. DM1 se representa a través de la siguiente formula estructural:



DM1

La síntesis del maitansinoide DM1 que contiene tiol ha sido previamente descrita (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,208,020).

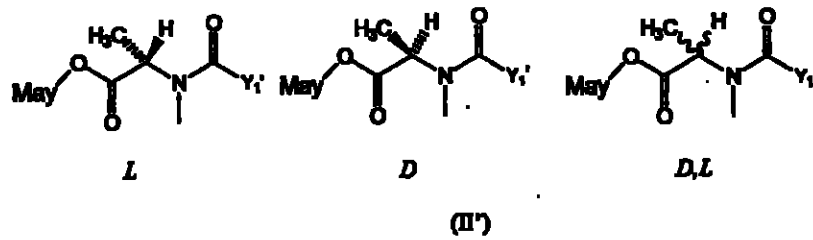
La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 10/849,136, la descripción total de la cual se incorpora aquí por referencia, describe los maitansinoides que contiene tiol estéricamente inhibido que lleva uno o dos substituyentes alquilo en el carbono a llevando la funcionalidad tiol. Además, el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido acilado del maitansinoide llevando el grupo sulfhidrido posee una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre el grupo carbonilo de la amida y el átomo de azufre. Estos maitansinoides novedosos son adecuados para uso en la presente invención.

La síntesis de maitansinoides que tienen un grupo tiol estéricamente inhibido se pueden describir a través de la referencia a la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 10/849,136, especial mente la Figura 3 ahí.

En un aspecto de la invención, el maitansinoide contiene un grupo tiol

15
192

estéricamente inhibido y se representa a través de la fórmula (II'-L), (II'-D), o (II'-D,L):



Y_1' representa

$(CR_7CR_8)_k(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qA_o(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SH.$

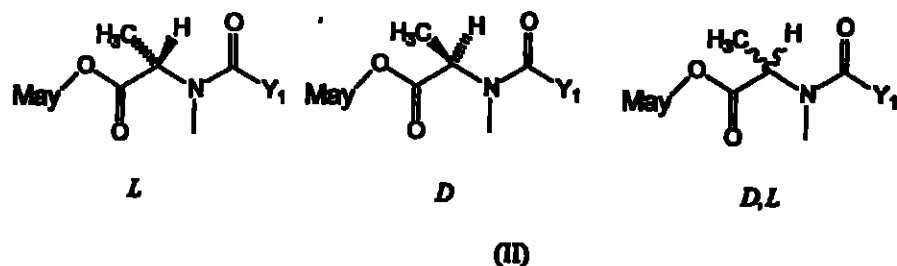
A, B, y D, cada una independientemente es alquilo cíclico, o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

De R_1 a R_{12} cada uno es independientemente alquilo lineal o alquenilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo cíclico o ramificado, o alquenilo que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_{12} pueden ser H.

$l, m, n, o, p, q, r, s, t,$ y u cada uno independientemente es 0 o un entero de 1 a 5, siempre que por lo menos dos de $l, m, n, o, p, q, r, s, t$ y u ambos no sean cero.

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

Otro Maitansinoide útil en la invención se representa por la fórmula (II-L), (II-D), o (II-D,L):



16
1a1

En la fórmula (II)

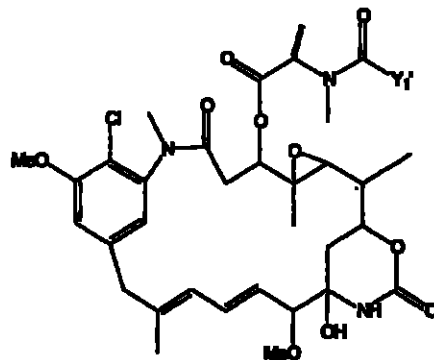
Y_1 representa $(CR_7CR_8)_l(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SH$.

R_1 a R_8 son cada uno independientemente alquilo lineal, o alquenilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico, o alquenilo que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_8 pueden ser H.

l , m y n con cada uno independientemente un entero de 1 a 5, y además n puede ser 0.

May representa un maitansinol que lleva hidroxilo C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15 o desmetilo C-20.

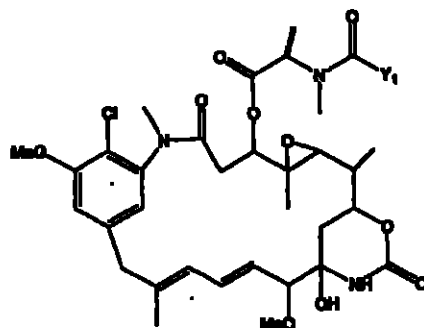
Otro maitansinoide útil se representa por la fórmula $4_1'$:



$4_1'$

en donde los sustituyentes se definen por la fórmulas (II') anterior.

Otro maitansinoide útil se representa a través de la fórmula 4_1 :



4_1

17
192

en donde los sustituyentes son como se definieron en la fórmula (II) anterior.

5 Los preferidos son cualquiera de los compuestos anteriormente descritos en donde R_1 es H y R_2 es metilo o R_1 y R_2 son metilo.

Especialmente preferidos son cualquier compuesto anteriormente descrito en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_3 , R_6 , R_7 y R_8 cada uno es H, l y m cada uno es 1, y n es 0; y aquellos en donde R_1 y R_2 son metilo, R_3 , R_6 , R_7 , R_8 cada uno es H, l y n son 1, y n es 0.

Además, el estereoisómero L-aminoácido es preferido.

10 Ejemplos de alquilos lineales o alquénilos que tienen de 1 a 10 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, propenilo, butenilo y hexenilo.

15 Ejemplos de alquilos ramificados o alquénilos que tienen de 3 a 10 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, ter-butilo, isopentilo, 1-etilo-propilo, isobutenilo e isopentenilo.

Ejemplos de alquilos cíclicos o alquénilos que tienen de 3 a 10 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclopentenilo, y ciclohexenilo.

20 Los arios simples incluyen arios que tienen de 6 a 10 átomos de carbono, y los arios sustituidos incluyen arios que tiene de 6 a 10 átomos de carbono llevando por lo menos un sustituyente alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono, o sustituyentes alcoxi tal como metoxi, etoxi, o un sustituyente halógeno o un sustituyente nitro.

25 Ejemplos de arios simples que contienen de 6 a 10 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, fenilo y naftilo.

Ejemplos de arilo sustituido incluyen, pero no se limitan a, nitrofenilo, dinitrofenilo.

Los radicales aromáticos heterocíclicos incluyen grupos que tienen un anillo de de 3 a 10 miembros que contiene uno o dos átomos heterogéneos seleccionados de N, O o

18
193

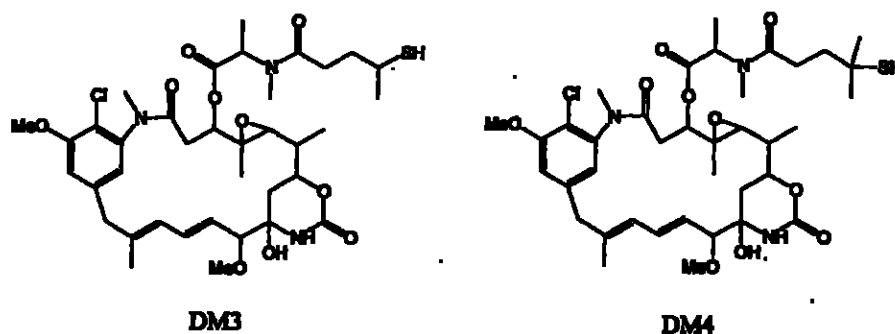
S.

Ejemplos de radicales aromáticos heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, piridilo, nitro-piridilo, pirrolilo, oxazolilo, tienilo, tiazolilo, y furilo.

Los radicales heterocicloalquilo incluyen compuestos cíclicos, que comprenden sistemas de anillo de 3 a 10 miembros, que contiene uno o dos átomos heterogéneos, seleccionados de N, O o S.

Los Ejemplos de radicales de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, dihidrofurilo, tetrahidrofurilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, y morfolino.

Los maitansinoides particularmente preferidos que incluyen una cadena lateral que contiene un enlace tiol estéricamente inhibido son maitansinoides N²-deacetil-N²-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitarisina (denominado DM3) y N²-deacetil-N²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominado DM4). DM3 y DM4 se representan a través de la siguiente fórmula estructural:



Agentes enlazadores de célula

La efectividad de los compuestos de la invención como agentes terapéuticos depende de la cuidadosa selección de un agente enlazador apropiado de la célula. Los agentes enlace a la célula pueden ser de cualquier clase actualmente conocida, o que se vuelven conocidos e incluyen péptidos y no péptidos. Generalmente, estos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas para el transporte de nutrientes (tales como

transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia enlazadora de célula que específicamente enlace un objetivo.

Los ejemplos más específicos de agentes de enlace a la célula que se pueden utilizar incluyen:

5 anticuerpos policlonales y monoclonales, incluyendo anticuerpos completamente humanos;

anticuerpos de cadena individual (policlonal y monoclonal); fragmentos de anticuerpo (policlonal y monoclonal) tales como Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv (Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983); Spring y otros, 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff y otros, 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1980));

anticuerpos quiméricos y fragmentos enlazadores de antígeno de los mismos;

anticuerpos de dominio (dAbs) y fragmentos enlazadores de antígeno de los mismos, incluyendo anticuerpos camelid (Desmyter y otros, 3 Nature Struct. Biol, 752, 1996);

15 anticuerpos tiburón llamados nuevos receptores de antígeno (IgNAR) (Greenberg y otros, 374 Nature, 168, 1995; Stanfield y otros 305 Science 1770-1773, 2004);

interferones (por ejemplo alfa, beta, gama);

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

20 hormonas tales como insulina, TRH (hormona que libera tirotrópina), MSH (hormona que estimula melanocito), hormonas esteroides, tales como andrógenos y estrógenos;

factores de crecimiento y factores estimuladores de colonia tales como EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF y GM-CSF (Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984));

25 transferrina (O'Keefe y otros, 260 J. Biol. Chem. 932-937 (1985)); y

vitaminas, tal como folato.

Las técnicas de los anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes enlazadores de célula extremadamente específicos en la forma de anticuerpos

20
195

monoclonales específicos. Particularmente bien conocidas en la técnica son las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos a través de la inmunización de ratas, hámsteres, o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés, tal como la célula objetivo intacta, antígenos aislados de la célula objetivo, el virus completo, el virus completo atenuado, y proteínas virales tales como las proteínas de capa viral. Las células humanas sensibilizadas también se pueden utilizar. Otro método para crear anticuerpos monoclonales es el uso de colecciones de fago de scFv (región variable de cadena individual), scFv específicamente humano (ver, por ejemplo, Griffiths y otros, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,885,793 y 5,989,108; McCafferty y otros, WO 92/01047; Liming y otros, WO 99/06587). Además, anticuerpos que volvieron a salir a la superficie descritos en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,639,641 también se pueden utilizar, como los anticuerpos humanizados may.

La selección del agente enlazador de la célula apropiado es un tema favorito que depende de la población de célula particular que se va a activar; pero en general los anticuerpos monoclonales humanos son preferidos si uno apropiado está disponible.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal J5 es un anticuerpo IgG2a de murino que es específico para el Antígeno de Leucemia Linfoblástico Agudo Común (CALLA) (Ritz y otros, 283 Nature 583-585 (1980)) y se puede utilizar si la células objetivo expresan CALLA tal como en la enfermedad de leucemia linfoblástica aguda.

El anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG₁ de murino que se enlaza específicamente al antígeno CD33 (J. D. Griffin y otros, Leukemia Res., 521 (1984)) y se puede utilizar si las células objetivo expresan CD33 con en la enfermedad de leucemia mielaginososa aguda (AML).

Similarmente, el anticuerpo monoclonal anti-B4 intercambiable también llamado B4, es un IgG₁ que se enlaza al antígeno CD19 en células B (Nadler y otros, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)) y se puede utilizar si las células objetivo son células B o células enfermas que expresan este antígeno tal como en el linfoma no de Hodgkin o leucemia linfoblástica crónica.

Además, el anticuerpo monoclonal C242 que se enlaza al antígeno CanAg (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,552,293) se puede utilizar para tratar tumores expresando CanAg, tal como cáncer colorectal, pancreático, de pulmón de célula no pequeña, y gástrico. HuC242 es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal C242 que se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,552,293 y para el cual el hibridoma se deposita con el Número de Identificación ECACC 90012801. Una forma humanizada se puede preparar a través de ya sea aplicando la metodología de injerto CDR (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,585,089; 5,693,761; y 5,693,762) o la metodología para volver a la superficie (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,639, 641). HuC242 también se puede utilizar para tratar tumores que expresan CanAg, tales como cáncer colorectal, pancreático, de pulmón de célula pequeña y gástrico.

Además, el anticuerpo trastuzumab se puede utilizar para tratar cánceres de pecho y otros cánceres, tales como cánceres de próstata y ovárico que expresan el antígeno Her2.

Los anticuerpos anti-IGF-IR que se enlazan al receptor de factor de crecimiento de insulina también son útiles.

El cáncer ovárico y de próstata puede ser exitosamente activado con, por ejemplo, un anticuerpo anti-MUC1, tal como anti-HMFG-2 (Taylor-Papadimitriou y otros, 28 Int. J. Cancer 17-21, 1981) o hCTM01 (56 Cancer Res. 5179-5185, 1996) y un anti-PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), tal como J591 (Liu y otros, 57 Cancer Res. 3629-3634, 1997) respectivamente.

Las moléculas no de anticuerpo también se pueden utilizar para activar poblaciones de célula específicas. Por ejemplo GM-CSF, que se enlaza a células mieloides, se puede utilizar como un agente enlazador celular para activar las células enfermas de leucemia mielaginoso aguda. Además, IL-2, que se enlaza a las células T activadas, se puede utilizar para la prevención del rechazo a transplante de injerto, para terapia y prevención de la enfermedad de huésped contra injerto, y para el tratamiento de

leucemia de célula T aguda. MSH, que se enlaza a melanocitos, se puede utilizar para el tratamiento de melanoma. El ácido fólico se puede utilizar para activar el receptor de folato expresado en tumores ovárico y otros tumores. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) se puede utilizar para activar cánceres escamosos objetivo tal como de pulmón y cabeza y cuello. La somatostatina se puede utilizar para activar neuroblastomas y otros tipos de tumor. Los cánceres de pecho y testículos pueden ser exitosamente activados con estrógeno (o análogos de estrógeno) o andrógeno (o análogos de andrógenos) respectivamente como el agente enlazador de la células.

10 Reactivos de Entrelazamiento

El maitansinoide está enlazado al agente enlazador de la célula a través de medios de un reactivo de entrelazamiento que, cuando reacciona forma un enlazador no divisible entre el maitansinoide y el agente enlazador de la célula.

Como se utiliza aquí, un "enlazador" es cualquier porción química que enlaza un agente enlazador de la célula covalentemente a un maitansinoide. En algunas instancias, parte del enlazador se provee a través de un maitansinoide. Por ejemplo, DM1, un maitansinoide que contiene tlo (Figura 2), es un derivado del maitansinoide natural, maitansina, y provee parte del enlazador. La cadena lateral en el grupo hidroxilo C-1 de maitansina termina en $-\text{CO}-\text{CH}_3$, y la cadena lateral de DM1 termina en $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$. Por consiguiente el enlazador final se ensambla con dos piezas, el reactivo de entrelazamiento introducido dentro del agente enlazador de la célula y la cadena lateral de DM1.

Los enlazadores divisibles son enlazadores que se pueden dividir bajo condiciones moderadas, es decir condiciones bajo las cuales la actividad del fármaco maitansinoide no está afectada. Muchos enlazadores conocidos se ubican en esta categoría y se describen más adelante.

Los enlazadores que contienen disulfuro son enlazadores divisibles a través del

intercambio de disulfuro, que puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas.

Los enlazadores inestables de ácido son enlazadores divisibles en el pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimientos moleculares, tales como endosomas y lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5), y proveen condiciones adecuadas para dividir enlazadores inestables de ácido.

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

Algunos enlazadores se pueden dividir a través de peptidasas. Solamente ciertos péptidos son fácilmente divisibles dentro y fuera de las células, ver por ejemplo Trouet y otros, 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 628-629 (1982) y Umemoto y otros 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Además, los péptidos están compuestos de α -aminoácidos y enlaces peptídicos, los cuales químicamente son enlaces de amida entre el carboxilato de un aminoácido y el grupo α -amino de un segundo aminoácido. Otros enlaces de amida, tal como el enlace entre un carboxilato y el grupo ϵ -amino de lisina, se entiende que no son enlaces peptídicos y se consideran no divisibles.

Algunos enlazadores se pueden dividir a través de esterases. Otra vez solamente ciertos ésteres se pueden dividir a través de las esterases presentes dentro o fuera de las células. Los ésteres se forman a través de la condensación de un ácido carboxílico y un alcohol. Los ésteres simples son ésteres producidos con alcoholes simples, tales como alcoholes alifáticos, y alcoholes cíclicos pequeños y aromáticos pequeños. Por ejemplo, los presentes inventores no encontraron esterasa que dividiera el éster en C-3 de maitansina, ya que el componente alcohol del éster, maitansinol, es muy grande y complejo.

Un enlazador no divisibles es cualquier porción química que es capaz de enlazar un maitansinoide a un agente enlazador de la célula en una forma covalente, estable y no cae bajo la categoría listada anteriormente de enlazadores divisibles. De esta forma los enlazadores no divisibles son substancialmente resistentes a la división inducida por

ácido, división inducida por luz, división inducida por peptidasa, división inducida por esterases, y división del enlace de disulfuro.

"Substancialmente resistente" a la división significa que el enlace químico en el enlazador o que se adhiere al enlazador es por lo menos un 80%, preferiblemente por lo menos 85%, más preferiblemente por lo menos 90%, aún más preferiblemente por lo menos 95%, y de preferencia por lo menos 99% de la población del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular permanece no divisible a través de un ácido, un agente foto-inestable, una peptidasa, una esterasa, o un compuesto químico o fisiológico que divide el enlace químico (tal como un enlace de disulfuro) en un enlazador divisible, durante dentro de unas cuantas horas a varios días de tratamiento con cualquiera de los agentes anteriormente descritos.

Además, "no divisibles" se refiere a la habilidad del enlace químico en el enlazador o adhesión al enlazador de soportar la división inducida por un ácido, un agente de división foto-inestable, una peptidasa, una esterasa o un compuesto químico o fisiológico que divide un enlace de disulfuro, a condiciones bajo las cuales el maitansinoide o el agente de enlace de la célula no pierde su actividad.

Una persona con experiencia ordinaria en la técnica fácilmente distinguirá los enlazadores no divisibles de los divisibles.

Un ejemplo de un control apropiado para probar si un enlazador es substancialmente resistente a la división es un enlazador con un enlace químico, tal como un enlace de disulfuro, que es aceptable para la división a través de cualquiera de los agentes anteriormente descritos. Se puede probar si un enlazador es substancialmente resistente a la división a través de la medición de la estabilidad de los conjugados a través de ELISA, HPLC, u otros medios adecuados, durante un período de tiempo que se extiende de entre unas cuantas horas a varios días, típicamente de 4 horas a 5 días. Los ensayos ELISA se pueden utilizar para medir el nivel del conjugado estable en la concentración de plasma.

Los enlazadores no divisibles también se caracterizan en que la vida media *in vivo*

de los conjugados que comprenden los enlazadores no divisibles es generalmente de alrededor de 20% más alta que la de los conjugados que comprenden enlazadores divisibles. En ratones, la vida media *in vivo* de conjugados IgG-maitansínoídes enlazados a través de los enlazadores no divisibles es de por lo menos 4 días.

5 Los reactivos de entrelazamiento adecuados que forman los enlazadores no divisibles entre el maitansinoide y el agente enlazador de la célula son bien conocidos en la técnica, y pueden formar los enlazadores no divisibles que comprenden un átomo de azufre (tal como SMCC) o que están sin el átomo de azufre.

10 Los reactivos de entrelazamiento preferidos que forman los enlazadores no divisibles entre el maitansinoide y el agente enlazador de la célula comprenden una porción basada en maleimido o haloacetilo. De acuerdo con la presente invención, dichos enlazadores no divisibles se dice que se derivan de la porción basada en maleimido o haloacetilo. Los reactivos de entrelazamiento que comprenden una porción basada en maleimido incluyen 4- (maleimidometil)ciclohexancarboxilato de N-succinimidilo (SMCC),
 15 N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproato), el cual es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), éster N-succinimidílico de ácido K-maleimidoundecanoico (KMUA), éster N-succinimidílico de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster N-hidroxisuccinimídico de ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster N-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida [AMAS],
 20 succinimidil-6-((3-maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), y N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI) (ver Figura 15 para estructuras representativas de reactivos de entrelazamiento basados en maleimido. Estos reactivos de entrelazamiento forman los enlazadores no divisibles derivados de porciones basadas en maleimido.

25 Los reactivos de entrelazamiento que comprenden una porción basada en haloacetilo incluyen N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA) y N-succinimidilo de 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP) (ver Figura 16 para las estructuras representativas

2/6
221

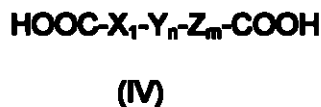
de reactivos de entrelazamiento basados de haloacetilo. Estos reactivos de entrelazamiento forman los enlazadores no divisibles derivados de porciones basadas en haloacetilo.

Ya que los ésteres activos descritos en las Figuras 15 y 16 están comprendidos de ésteres de N-succinimidilo y sulfosuccinimidilo, otros ésteres activos, tales como los ésteres de N-hidroxi ftalimidilo, ésteres de N-hidroxi sulfoftalimidilo, ésteres de orto-nitrofenilo, ésteres de para-nitrofenilo, ésteres de 2,4-dinitrofenilo, ésteres de 3-sulfonil-4-nitrofenilo, ésteres de 3-carboxi-4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorfenilo, y ésteres de sulfoniltetrafluorfenilo también se pueden utilizar.

Los reactivos de entrelazamiento particularmente preferidos forman los enlazadores no divisibles que no contienen un átomo de azufre. La Figura 21 muestra una molécula maitansinoide derivatizada con un agente de entrelazamiento que se deriva de un ácido α,ω -dicarboxílico (un ácido dioicio de alcano o alqueno en donde el alcano o alqueno tiene de 3 a 24 átomos de carbono). Cuando se hace reaccionar con el agente enlazador de la célula, el reactivo de entrelazamiento formará un enlazador no divisible que no contiene azufre (enlazador no divisible que no contiene S).

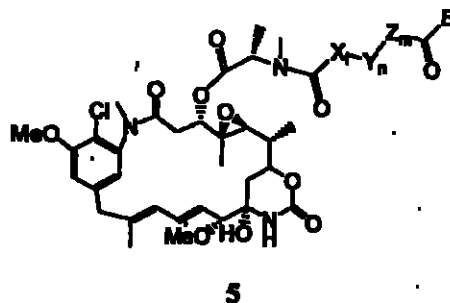
La molécula maitansinoide de la Figura 21 se hace como sigue. Primero un monoéster de ácido adípico (también conocido como ácido hexanodioico o ácido 1,6-hexandicarboxílico) se prepara a través del tratamiento con un equivalente de 2-trimetilsililetanol en presencia de dicitclohexilcarbodiimida. La activación del grupo de ácido carboxílico restante con cloroformato de isobutilo, seguido por la reacción con N-metil-L-alanina, provee la N-metil-L-alanina acilada. La reacción con maitansinol en la presencia de dicitclohexilcarbodiimida y cloruro de zinc, seguido por la remoción del grupo protector de trimetilsililo con fluoruro de tetrabutilamonio, provee el éster maitansinoide llevando un grupo carboxi libre. La esterificación del grupo carboxilo a través de la reacción con sulfo N-hidroxisuccinimida en la presencia de dicitclohexilcarbodiimida provee el éster activo de maitansinol que puede reaccionar con un agente enlazador de la célula para dar el conjugado no divisible que no contiene un átomo de azufre.

Los enlazadores no divisibles que no contienen un átomo de azufre también se pueden derivar de otras porciones basadas en ácido dicarboxílico utilizando el método descrito anteriormente. Otras porciones basadas en ácido dicarboxílico adecuadas incluyen, pero no se limitan a, ácidos dicarboxílicos de la fórmula general (IV):



En la fórmula (IV), X es un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado que tiene de 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo llevando de 3 a 10 átomos de carbono, y Z es un grupo aromático sustituido o no sustituido llevando de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y en donde l, m o n son cada uno 0 o 1, siempre que todos no sean 0 al mismo tiempo.

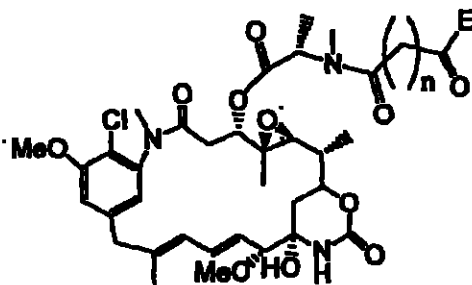
Los maitansinoides se derivatizan para contener un éster activo que puede directamente reaccionarse con un agente enlazador de la célula para formar un conjugado que tiene un enlazador no divisibles que no contiene S que puede representarse a través de la fórmula 5:



en donde X, Y, Z, l, m y n todos se definen como para la fórmula (IV) anterior, y además en donde E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como N-hidroxi succinimidilo o ésteres de sulfosuccinimidilo, éster N-hidroxi de ftalimidilo, éster de N-hidroxi sulfoftalimidilo o éster de orto-nitrofenilo, éster de para-nitrofenilo, éster de 2,4-

dinitrofenilo, éster de 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster de 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, y éster de sulfonil tetrafluorofenilo.

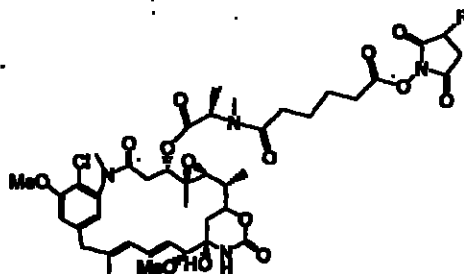
El preferido es un maitansinoide derivatizado representado por la fórmula 6:



6

en donde n representa un entero de 3 a 24, y E tiene la misma definición que para el maitansinoide de la fórmula 5.

Una modalidad más preferida es el maitansinoide derivatizado representado por la fórmula 7:



7

en donde R es H o $\text{SO}_3\text{-Na}^+$.

Los compuestos de la fórmula 5, 6, y 7 son maitansinoides novedosos.

Los Ejemplos de grupos alquilo, alquenoilo o alquinilo lineales que tienen de 2 a 20 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, propenilo, butenilo, y hexenilo.

Los ejemplos de grupos alquilo, alquenoilo o alquinilo ramificados que tienen de 2 a 20 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, ter-butilo, isopentilo, 1-etil-propilo, isobutenilo, isopentenilo, etinilo, propinilo (propargilo), 1-

butinilo, 2-butinilo, y 1- hexinilo.

Los ejemplos de los grupos cicloalquilo o cicloalquenilo que tienen de 3 a 6 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, y cicloheptadienilo.

5 Los ejemplos de grupos aromáticos que contiene de 6 a 10 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, fenilo y naftilo.

Los ejemplos de grupos aromáticos sustituidos incluyen, pero no se limitan a, nitrofenilo y dinitrofenilo.

10 Los grupos aromáticos heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, grupos que tienen un anillo de 3 a 10 miembros que contiene uno o dos átomos heterogéneos seleccionados de N, O o S.



Los ejemplos de grupos aromáticos heterocíclicos sustituidos o no sustituidos incluyen, pero no se limitan a, piridilo, nitro-piridilo, pirrolilo, oxazolilo, tienilo, tiazolilo, y furilo.

15 Los radicales de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, compuestos cíclicos, que comprenden sistemas de anillo de 3 a 10 miembros que contiene uno o dos átomos heterogéneos, seleccionados de N, O o S.

Los ejemplos de radicales de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, dihidrofurilo, tetrahydrofurilo, tetrahidropirrolilo, piperidinilo, piperazinilo, y morfolino.

20 Los ejemplos de ácidos α,ω -dicarboxílicos de la formula general $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$ incluyen, pero no se limitan a, ácido alípico, ácido glutárico, ácido pimélico, ácido hexen-1,6-dioico, ácido penten-1,5-dioico, ácido ciclohexan-dioico, y ácido ciclohexen-dioico.



25 **Síntesis de Conjugados Citotóxicos**

Los conjugados de los agentes de enlace a la célula y maitansinoides se pueden formar utilizando técnicas actualmente conocidas o últimamente desarrolladas.

30
29

Los métodos de conjugación de agentes de enlace a la célula con maitansinoides generalmente involucran dos pasos de reacción. En un método, descrito la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,208,020, un agente enlazador de la célula, tal como un anticuerpo, se puede modificar con un reactivo de entrelazamiento para introducir uno o más, usualmente de 1 a 10 grupos reactivos. El agente enlazador de la célula modificada entonces se hace reaccionar con uno o más maitansinoides que contiene tiol para producir un conjugado.

Alternativamente, como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,441,163 B1, un maitansinoide que contiene tiol primero se puede modificar con un reactivo de entrelazamiento, seguido por la reacción del maitansinoide modificado con un agente enlazador de la célula. Por ejemplo el maitansinoide que contiene tiol se puede reaccionar con los compuestos de maleimido descritos en la Figura 15 o con compuestos de haloacetilo descritos en la Figura 16, para dar un tioéter maitansinoide llevando un éster de succinimidilo o sulfosuccinimidilo activado. La reacción de estos maitansinoides que contiene una porción enlazadora activada con un agente enlazador de la célula provee un método para producir un conjugado de maitansinoide de agente de enlace no divisible.

En otro aspecto de la invención, como se describió anteriormente, un maitansinoide que no contiene un átomo de azufre primero se puede derivatizar a través de un reactivo de entrelazamiento basado en ácido dicarboxílico, seguido por la reacción de agente enlazador de la célula, para formar un conjugado en el cual el maitansinoide está enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible que no contiene S.

Típicamente, un promedio de 1 a 10 maitansinoides por anticuerpo se enlaza. El conjugado puede purificarse a través de una columna Sephadex G-25.

Las descripciones completas de las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,208,020 y 6,441,163 B1 se incorporan expresamente aquí por referencia.

31
206

Los conjugados figurativos de la invención son derivados de anticuerpo-maitansinoide, derivados de fragmento de anticuerpo-maitansinoide, conjugados de factor de crecimiento-maitansinoide, tales como derivados del factor de crecimiento epidérmico (EGF)-maitansinoide, conjugados de hormona-maitansinoide, tales como los derivados de hormona estimuladora de melanocito (MSH)-maitansinoide, derivados de hormona estimuladora de tiroides (TSH) -maitansinoide, derivados de estrógeno-maitansinoide, derivados de análogos de estrógeno-maitansinoide, derivados de andrógeno-maitansinoide, derivados de análogos de andrógeno- maitansinoide, y conjugados de vitamina-maitansinoide, tales como el maitansinoide de folato.

Los conjugados de maitansinoide de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, hormonas de proteína, factores de crecimiento de proteína, y otras proteínas se hacen en la misma forma. Por ejemplo, los péptidos y anticuerpos se pueden modificar con los reactivos de entrelazamiento no divisibles mencionados anteriormente. Una solución de un anticuerpo en un regulador de pH acuoso se puede incubar con un exceso molar de un reactivo de entrelazamiento que modifica el anticuerpo tal como 4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1- carboxilato de succinimidilo (SMCC), sulfo-SMCC, éster -maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), sulfo-MBS, succinimidil-yodoacetato, o N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(β-amidocaproato), el cual es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), sulfo-LC-SMCC, éster N- succinimidílico de ácido κ-maleimidoundecanoico (KMUA), sulfo-KMUA, éster N- succinimidílico de ácido γ-maleimidobutírico (GMBS), sulfo-GMBS, éster de N-hidrosuccinimida de ácido maleimidcaproico (EMCS), sulfo-EMCS, éster N-(α-maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), sulfo-AMAS, hexanoato de succinimidil-6-((3-maleimidopropionamido) (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de sulfo-SMPH, N-succinimidil (SMPB), sulfo-SMPH, isocianato N-(p-maleimidofenil) (PMPI), N-succinimidil-4- (yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), N-succinimidil yodoacetato(SIA), N-succinimidil bromoacetato (SBA) y 3-(bromoacetamido) propionato de N-succinimidilo (SBAP), como se describe en la literatura. Ver, Yoshitake y otros, 101 Eur. J. Biochem.

395-399 (1979); Hashida y otros, J. Applied Biochem. 58-63 (1984); y Liu y otros, 18 690-697 (1979); Uto y otros, 138 J. Immunol. Meth. 87-94 (1991); Rich y otros 18 J. Med. Chem. 1004-1010 (1975); Kitagawa y Aikawa, 79 J. Biochem. (Tohyo) 233-236 (1976); Tanimori y otros, 62 J. Immunol. Meth. 123-128 (1983); Hashida y otros, 6 J. Appl. Biochem. 58-63 (1984); Thorpe y otros, 140 Eur. J. Biochem. 63-71 (1984), Chrissey y otros 24 Nucl. Acid Res. 3031-3039 (1996), Annunziato y otros, 4 Bioconjugate Chem. 212-218 (1993), Rector y otros, 24 J. Immunol. Meth. 321-336 (1978), e Inman y otros 2 Bioconjugate. Chem. 458-463 (1991).

El anticuerpo modificado entonces se trata con el maitansinoide que contiene tiol (1.25 equivalente molar/maleimido o grupo yodoacetilo) para producir un conjugado. Las mezclas se incubaron durante la noche a alrededor de 4°C. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se purificaron a través de filtración a través de una columna Sephadex G-25. El número de moléculas de maitansinoide enlazadas por molécula de anticuerpo se puede determinar a través de la medición espectrofotométricamente de la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. Típicamente, se enlazó un promedio de 1-10 maitansinoides por anticuerpo.

Un método preferido es para modificar anticuerpos con 4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) para introducir grupos maleimido seguido por la reacción del anticuerpo modificado con un maitansinoide que contiene tiol para dar un conjugado enlazado a tioéter. Otra vez, resultaron conjugados con de 1 a 10 moléculas del fármaco por molécula de anticuerpo. Ejemplos de conjugados de anticuerpo-maitansinoide se muestra en las Figuras 17-20.

De manera similar, por ejemplo, los agentes de estrógeno y andrógeno de enlace a la célula tales como estradiol y androestradiol se pueden esterificar en el grupo hidroxilo C-17 a través de la reacción con un cloruro de ácido carboxílico que contiene tio apropiadamente protegido tal como cloruro de 3-S-acetilpropanoilo. También se pueden emplear otros métodos de esterificación como se describe en la literatura (Haslam, 36 Tetrahedron 2400-2433 (1980)). El andrógeno o estrógeno que no contiene tiol protegido o

libre entonces se pueden hacer reaccionar con un maitansinoide que contiene tior para producir conjugados. Los conjugados se pueden purificar a través de cromatografía de columna sobre gel de sílice o través de HPLC.

Un método particularmente preferido es para modificar maitansinol con un reactivo de entrelazamiento que da como resultado el enlace que no contiene ningún átomo de azufre, seguido por la reacción del maitansinoide modificado con un anticuerpo para producir conjugados.

Eficacia terapéutica de los conjugados citotóxicos de la invención

El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de la invención se puede evaluar para su habilidad para suprimir la proliferación de varias líneas de célula *in vitro*. Por ejemplo, las líneas de célula tales como la línea de carcinoma de colon humano COLO205, la línea de célula de melanoma humano A375, la línea de célula de leucemia mieloide humana HL60, la línea de carcinoma de pecho humana SKBR3, la línea de célula de carcinoma epidemoide humana KB, se pueden utilizar para evaluar la citotoxicidad de estos conjugados. Las células que se van a evaluar se pueden exponer a los compuestos durante 24 horas y las fracciones sobrevivientes de las células se miden en ensayos directos a través de métodos conocidos. (Ver, por ejemplo Goldmacher y otros, 135 J. Immunol. 3648-3651 (1985), y Goldmacher y otros, 102 J. Cell Biol. 1312-1319 (1986)). Los valores IC_{50} entonces se pueden calcular a partir de los resultados de los ensayos.

La alta citotoxicidad se puede definir como la exhibición de una toxicidad que tiene un IC_{50} (la concentración de inhibición de una sustancia tóxica que deja una fracción sobreviviente de 0.5) de alrededor de 10^{-6} M o menor cuando se mide *in vitro* con células SKBR3 durante un tiempo de exposición de 24 horas al fármaco.

La potencia *in vitro* y la especificidad objetivo de los conjugados de anticuerpo-maitansinoide de la presente invención se muestran en la Figura 4. Los conjugados de huC242 con DM1 utilizando el reactivo de entrelazamiento SMCC son altamente potentes

en la destrucción de las células SKBR3 positivas de antígeno, con un valor IC_{50} de 3.5×10^{-12} M. En contraste, las células A375 negativas de antígeno son de alrededor de 800 veces menos sensibles, demostrando que los conjugados de maitansinoide de la presente invención son altamente potentes y específicos.

5 El conjugado huC242-SMCC-DM1 fue de igual o mayor potencia cuando se comparó con los conjugados preparados con enlazadores que contiene disulfuro en ensayos de citotoxicidad clonogénicos (Figura, 6A-C) e indirectos (Figura 7). Estos resultados fueron inesperados, con base en los datos previamente publicados que demostraron que un conjugado de anticuerpo anti-Her2 para maitansinoides a través de SMCC no mostraron una actividad específica (Chari y otros, 52 Cancer Res. 127-133 (1992).

10 La actividad de los conjugados preparados con el enlazador no divisible SMCC no está restringida para los conjugados huC242. La actividad específica *in vitro* también se observó con los conjugados SMCC-DM1 de trastuzumab, un anticuerpo anti-Her2; My9-6, un anticuerpo anti-CD33; KS77, un anticuerpo anti-EGFR; y N901, un anticuerpo anti-CD56 (Figuras 8A-D y 25).

15 Además, los conjugados con los enlazadores no divisibles que muestran la actividad específica *in vitro* no están restringidos para el enlazador SMCC. Un conjugado huC242 de DM1 sintetizado con el enlazador no divisible SIAB mostró una citotoxicidad potente y específica de antígeno en ensayos clonogénicos *in vitro* (Figura 9). Además, un conjugado trastuzumab de DM1 sintetizado con SIAB también fue citotóxico en ensayos clonogénicos (Figura 28). Además, un conjugado de enlazador no divisible que no contiene S huC242 también demostró una citotoxicidad potente y específica de antígeno en ensayos clonogénicos *in vitro* (Figura 22).

20 Los conjugados de anticuerpo con DM1 utilizando el enlazador SMCC mostraron una eficacia anti-tumor contra xenoinjertos de tumor humanos en ratones (Figura 10A-C). Primero, como se muestra en la Fig. 10^a, la inhibición marcada del crecimiento de tumor se observó en el tratamiento a COLO 205 colon, con xenoinjertos de tumor con huC242-

35-
212

SMCC-DM1, en este experimento un grupo de cinco animales poseedores de tumores subcutáneos establecidos, fueron tratados con huC242-SMCC-DMI en una dosis de 150µg/kg de DMI conjugado. Los tamaños de los tumores fueron medidos periódicamente y sus resultados fueron ingresados en una grafica que muestra el tiempo y el tamaño del tumor después de la inoculación. Todos los cinco animales tratados tuvieron un remision completa, y aunque tres animales recayeron en diferentes puntos del experimento, dos animales permanecieron libres de tumores hasta la terminación el experimento (Fig. 10A). En adicon como se demuestra en la Fig. 10B, esta actividad anti-tumor se observó en dosis de conjugado que no tienen efecto sobre el peso del cuerpo del ratón, una medida de la toxicidad del fármaco. En este experimento, tres grupos de cinco animales cada uno poseedores de tumores subcutáneos establecidos SNU, fueron tratados con huC242-SMCC-DM1 en una dosis de 150µg/kg, 30µg/kg, y 60µg/kg de DMI conjugado respectivamente. Los tamaños de los tumores fueron medidos periódicamente y sus resultados fueron ingresados en una grafica que muestra el tiempo y el tamaño el tumor después de la inoculación. El huC242-SMCC-DM1 mostro un efecto de dosis-dependencia antitumoral. Los resultados muestran que el tratamiento de los ratones llevando xenoinjertos de tumor de carcinoma de colon COLO205 dio como resultado una regresión completa de tumores, con algunos ratones permaneciendo libres de tumores detectables durante 2 meses después del tratamiento (Figura 10B). Otra vez, esta actividad se obtuvo a una concentración de conjugado que no mostró ningún efecto en el peso del cuerpo del ratón. Un conjugado de trastuzumab-SMCC-DM1 también mostró una regresión de tumor significativa, en un modelo de xenoinjerto de tumor de ratón con la línea de células de carcinoma de pecho MCF-7 carcinoma (Figura 10C).

La eliminación de plasma del conjugado de anticuerpo-maitansinolde sintetizado con un enlazador no divisible SMCC es muy lenta y comparable con la eliminación del anticuerpo solo. Esto está en un contraste marcado con la eliminación de plasma de conjugados preparados con enlaces de disulfuro relativamente inestables tales como huC242-SPP-DM1. Por ejemplo, la vida media de la eliminación del conjugado SMCC es

de aproximadamente 320 horas, mientras que la vida media del conjugado SPP está en el rango de 40-50 horas (Figura 11). Sin embargo, la eliminación del componente del anticuerpo para cada tipo de conjugado es idéntica, sugiriendo que la diferencia en la medición del grado de eliminación del conjugado se debe a la pérdida de maitansinoide del conjugado del anticuerpo en el caso del conjugado SPP-DM1. El enlazador SMCC no divisible es por consiguiente mucho más resistente a las actividades de división del enlazador maitansinoide presente *in vivo* que el conjugado SPP-DM1. Además el grado de eliminación disminuido para los conjugados enlazados SMCC, comparada con los conjugados SPP-DM1, conduce a un incremento de casi 5 veces sobre la exposición global del maitansinoide el animal según medido por el área por debajo de la curva (AUC). Esta exposición incrementada tiene un impacto substancial en la eficacia del fármaco en algunos casos.

Los conjugados de maitansinoide preparados con los enlazadores no divisibles tales como SMCC muestran una tolerabilidad incrementada no esperada en ratones comparados con conjugados preparados con enlazadores de disulfuro divisibles. Se llevó a cabo una prueba de toxicidad aguda con una sola dosis intravenosa en ratones CD-1 hembra. Se condujo una comparación de la tolerabilidad de un conjugado huC242-SMCC-DM1 (no divisible) con conjugados huC242 preparados con enlazadores que contiene enlaces de disulfuro divisible a través del monitoreo de la muerte de los ratones (Figura 12A y B) y los signos de toxicidad (Figura 12C y D) sobre una serie de cuatro dosis escaladas de cada conjugado. Las dosis máxima tolerada (MTD) para el conjugado SMCC-DM1 fue mayor la dosis más alta probada (150 mg/kg), mientras que el MTD para el conjugado enlazado con disulfuro SPP-DM1 estuvo en la escala de 45-90 mg/kg. A 150mg/kg, todos los ratones en el grupo tratado SMCC-DM1 sobrevivieron, mientras que la toxicidad total se observó para todos los ratones en el grupo tratado SPP-DM1 mediante 96 horas después del tratamiento.

Se considera que los conjugados de maitansinoide imparten su actividad de destrucción de la célula a través de la inhibición de polimerización de microtúbulo. Esta

Inhibición de polimerización de microtúbulo conduce a un arresto del ciclo de la célula principalmente en G2/M. El arresto dependiente del antígeno de células a G2/M a través de conjugados de anticuerpo-maitansinoide se puede monitorear a través del análisis de citometría de flujo (Figura 13). El tratamiento de células COLO205 con el conjugado huC242-SPP-DM1 o huC242-SMCC-DM1 da como resultado un arresto G2/M completo durante 6-10 horas. 30 horas después del tratamiento, sin embargo, algunas de las células arrestadas a través del tratamiento con el conjugado huC242-SPP-DM1 enlazado a disulfuro escaparon del ciclo de la célula y reiniciaron la división de células. Sorprendentemente, las células tratadas con el conjugado no divisible no escaparon del bloque del ciclo de la célula en este último punto del tiempo. La diferencia en la durabilidad de la actividad de estas células en el punto en el tiempo de 30 horas, se juzgó a través de un ensayo de exclusión de tinte utilizando azul de tripano. Estos resultados demuestran una durabilidad inesperadas de los eventos moleculares inducidos por el tratamiento con los conjugados del enlazador SMCC no divisible.

Un aspecto adicional de los conjugados preparados con los enlazadores no divisibles comparado con los conjugados que tienen enlazadores de disulfuro divisibles es la ausencia de actividad hacia las células negativas del antígeno cuando están en una cercanía próxima a las células positivas del antígeno, denominado aquí el efecto del espectador. Es decir, los conjugados preparados con los enlazadores no divisibles tienen una actividad de espectador mínima. Ambos conjugados huC242-SPP-DM1 (divisible) y huC242-SMCC (no divisible) mostraron una actividad destructora de la célula potente hacia la línea de célula negativa del antígeno, Namalwa, cuando se cultivan separadamente (Figura 14A-C). Sin embargo, el tratamiento con co-cultivos de células COLO205 y Namalwa con huC242-SPP-DM1 revelaron una actividad destructora de célula dramática del conjugado hacia aún las células Namalwa negativas del antígeno. En contraste, el conjugado huC242-SMCC-DM1 no demuestra ninguna actividad espectadora bajo estas condiciones. No se observó ninguna actividad destructora de célula contra células Namalwa con el conjugado huC242-SMCC-DM1, aún cuando se co-cultivaron con

las células COLO205 positivas del antígeno. Esta actividad espectadora mínima del conjugado no divisible, según medida en este ensayo *in vitro*, puede construir a la tolerabilidad en aumento del conjugado con los enlazadores no divisibles observados en estudios de toxicidad aguda.

5 Los resultados de los experimentos anteriores demuestran que los conjugados de maitansinoide con los enlazadores no divisibles de la presente invención poseen actividad anti-tumor bastante mejorada comparada con el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular anterior.

10 Métodos de uso



15 Los conjugados anteriormente descritos se pueden utilizar en un método para la activación de maitansinoides para una población de célula seleccionada, el método comprende poner en contacto una población de células o tejido que se sospecha que contiene la población de células seleccionada con un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular, en donde uno o más maitansinoides están covalentemente enlazados al agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible y el agente enlazador de la célula se enlaza a las células de la población de células seleccionadas.



20 Los conjugados anteriormente descritos también se pueden utilizar en un método para destruir células, el método comprende poner en contacto las células con un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular, en donde uno o más maitansinoides covalentemente enlazados al agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible y el agente enlazador de la célula se une a las células.

25 Los conjugados anteriormente descritos también se pueden utilizar en un método para el tratamiento de afecciones incluyendo, pero no limitándose a, tumores malignos, enfermedades autoinmunes, infecciones por microorganismo, e infecciones por parásito, el método comprende administrar a un sujeto en la necesidad del tratamiento una cantidad efectiva de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular, en donde

uno o más maitansinoides están covalentemente enlazados al agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible y el agente enlazador de la célula se une a las células enfermas o infectadas de la afección.

Ejemplos de condiciones médicas que se pueden tratar de acuerdo con los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, malignidad de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón, pecho, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario, y órganos linfáticos; enfermedades autoinmunes, tal como lupus sistémico, artritis reumatoide, y esclerosis múltiple; rechazos a injerto, rechazo a trasplante de pulmón; enfermedad de huésped contra injerto; infecciones virales, tales como infección CMV, infección VIH, SIDA, etc.; e infecciones por parásito, tales como giardiasis, amibiasis, esquistosomiasis, y otras según determinadas por uno con experiencia en la técnica.

Los métodos se pueden practicar *in vitro* o *in vivo*.

Los conjugados anteriormente descritos se pueden utilizar en un método de uso *in vivo* para tratar, por ejemplo, células de médula espinal autólogas antes de su trasplante dentro del mismo paciente con el fin de destruir células enfermas o malignas; las células de médula espinal u otros tejidos antes de su trasplante con el fin de destruir células T y otras células linfoides y prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD); los cultivos de célula con el fin de destruir todas las células excepto para las variantes deseadas que no expresan el antígeno objetivo; o cultivos de célula con el fin de destruir células variantes que expresan el antígeno indeseado; el método comprende tratar las células con una cantidad efectiva de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular, en donde uno o más maitansinoides covalentemente enlazados al agente enlazador de la célula a través de un agente enlazador celular no divisible y el agente enlazador de la célula enlaza las células que se van a destruir.

Las condiciones del uso *in vitro* clínico y no clínico se determinan rápidamente a través de alguien con experiencia en la técnica.

Por ejemplo, el tratamiento se puede llevar a cabo como sigue. Se puede cosechar médula espinal del paciente u otro individuo y después incubarse en medio que contiene

suero que tiene adicionado el agente citotóxico de la invención, en concentraciones en el rango de aproximadamente 10 pM a 1 nM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a alrededor de 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis puede fácilmente determinarse a través de uno con experiencia en la técnica. Después de la incubación las células de médula espinal se pueden lavar con medio que contiene suero y regresarlas al paciente intravenosamente de acuerdo con métodos conocidos. En circunstancias en donde el paciente recibe otro tratamiento, tal como un curso de quimioterapia ablativo o erradicación total del cuerpo entre el tiempo de la cosecha de la médula espinal y la reinfusión de las células tratadas, las células de médula espinal tratadas se pueden almacenar congeladas en nitrógeno líquido, utilizando el equipo médico estándar.

Para uso clínico *in vivo*, el agente citotóxico se pueden suministrar como una solución o un polvo liofilizado que se probó para esterilidad y para niveles de endotoxina. Ejemplos de protocolos adecuados para la administración de conjugados son como siguen. Los conjugados se pueden dar semanalmente durante 4 semanas como un bolo intravenoso cada semana. Las dosis de bolos se pueden dar en 50 a 500 ml de salina normal al cual se pueden agregar de 5 a 10 ml de albúmina de suero humano. Las dosis serán de 10 mg a 2000 mg por administración, intravenosamente (en el rango de 100 ng a 20 mg/kg por día). Después de 4 semanas de tratamiento, el paciente pueden continuar recibiendo el tratamiento sobre bases semanales.

Los protocolos específicos clínicos *in vivo* con respecto a la ruta de administración, excipientes, diluyentes, dosis, tiempos, etc., se pueden determinar a través de uno con experiencia en la técnica según la situación clínica lo garantice.

Si se desea, otros agentes activos, tales como otros agentes anti-tumor se pueden administrar junto con los conjugados.

Conjugados Novedosos, Composiciones y Métodos para Hacer los Conjugados

Mientras algunos conjugados de anticuerpos y maitansinoides enlazados a través

47
216

de un enlazador no divisible son bien conocidos, otros son nuevos. Por consiguiente se provee un conjugado de maitansinoide del agente enlazador celular que tiene un maitansinoide enlazado a un agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible, siempre que el enlazador no comprenda un grupo derivado de un agente de entrelazamiento seleccionado del grupo que consiste de: 4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1- carboxilato succinimidilo (SMCC), sulfo-SMCC, éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), sulfo-MBS, y succinimidil-yodoacetato cuando el agente enlazador de la célula sea un anticuerpo.

Los conjugados nuevos se pueden hacer y utilizar como se describió anteriormente.

La composición comprende el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular y un potador.

El portador puede ser un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los portadores, diluyentes, y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y se pueden determinar a través de aquellos con experiencia en la técnica como las garantías de la situación clínica.

Ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes incluyen: (1) salina regulada en su pH de fosfato Dulbecco, pH de alrededor de 7.4, que contiene o que no contiene alrededor de 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) 0.9% de solución salina (0.9% p/v de NaCl), y (3) 5% (p/v) de dextrosa; y también puede contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizador tal como Tween 20.

Para estos nuevos conjugados, se proporcionan también los métodos para la síntesis.

Uno de los procesos para hacer el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular comprende:

(a) proveer el agente enlazador celular

(b) modificar el agente enlazador de la célula con un agente de entrelazamiento, y

42
212

(c) conjugar el agente enlazador modificado de la célula con un maitansinoide o un maitansinoide que contiene tiol, por lo tanto proveyendo el enlazador no divisible entre el agente enlazador de la célula y el maitansinoide o maitansinoide que contiene tiol para producir el conjugado.

5 Otro proceso para hacer el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular comprende:

(a) proveer el maitansinoide o un maitansinoide que contiene tiol,

(b) modificar el maitansinoide o maitansinoide que contiene tiol con un agente de entrelazamiento, por lo tanto formando un enlazador no divisible, y

10 (c) conjugar el maitansinoide modificado o maitansinoide que contiene tiol con el agente enlazador de la célula, por lo tanto proveyendo el enlazador no divisible entre el agente enlazador de la célula y el maitansinoide o maitansinoide que contiene tiol para producir el conjugado.

15 Un proceso adicional para hacer el conjugado de maitansinoide del agente enlazador celular comprende:

(a) proveer el maitansinoide,

b) modificar el maitansinoide para proveer un maitansinol que no contiene azufre que tiene un éster activo, y

20 (c) conjugar el maitansinoide modificado con el agente enlazador de la célula, por lo tanto proveyendo un enlazador no divisible que no contiene S entre agente enlazador de la célula y el maitansinol para producir el conjugado. Estos métodos se describen con detalle más adelante y en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica citadas en la presente y expresamente incorporadas a la misma mediante referencia.

25 EJEMPLOS

Se ilustrará ahora la invención a través de la referencia de ejemplos no limitantes. A menos que se estipule otra cosa, los porcentajes, relaciones, partes, etc., están en peso.

43
219

Los reguladores de pH utilizados en los siguientes experimentos fueron: 50 mM de fosfato de potasio (KPi)/50 mM de cloruro de sodio (NaCl)/2 mM ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), pH 6.5 (Buffer A); 1x de salina regulada fosfato (PBS), pH 6.5 (Buffer B); y 0.1 M de regulador KPi buffer/2 mM de EDTA a un pH de 7.5 (Regulador de pH de ensayo).

El SMCC (Producto No. 22360, M. W. 334.33 g/moles) y el SIAB (Producto No. 22329, M. W. 402. 15 g/moles) se adquirieron con Pierce. El anticuerpo huC242 es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal C242, descrito en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,552,293, para el cual el hibridoma se deposita con el Número de Identificación ECACC 90012601). El anticuerpo trastuzumab se obtuvo de Genentech. DM1 (forma libre de tiol; M.W. 737.5 g/moles) se preparó como se describió previamente en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,208,020 y 6,333,410 B1.

La cromatografía se llevó a cabo utilizando columnas de cromatografía adquiridas de Amersham Biosciences (columnas preempacadas Sephadex G25 NAP-25 (Amersham 17-0852-02); 3 columnas de desalinización conectadas en serie HiPrep 26/10, Sephadex G25 de resina fina, (Amersham 17-5087-01)). También se utilizaron columnas de cromatografía TSK-GEL G3000SWXL (TOSOH Bioscience, 08541), con la columna TSK GuardSWxl (TOSOH Bioscience 08543).

Los solventes utilizados en los siguientes experimentos fueron sulfóxido de dimetilo (DMSO), dimetilacetamida (DMA), etanol (EtOH), y 100 mM del Reactivo de Ellman (DTNB, disponible en Cayman Chemical) en DMSO.

EJEMPLO 1A

Preparación de Conjugado huC242-SMCC-DM1

a. Preparación y Medición del Conjugado huC242-SMCC-DM1

44/219

La concentración del anticuerpo se midió utilizando un coeficiente de extinción de $1.48(\text{mg/ml})^{-1}$ a 280 nm y un peso molecular de 147,000 g/moles.

5 **b. Preparación y Medición de la Solución Concentrada SMCC**

Una solución de 20 mM de SMCC (6.69 mg/ml) se preparó en sulfóxido de dimetilo (DMSO). La solución se diluyó 1/40 en Regulador de pH de Ensayo y la absorbancia de las muestras se midió a 302 nm. La concentración de la solución concentrada se calculó utilizando un coeficiente de extinción de $602 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

10 **c. Preparación y Medición de la Solución Concentrada DM1**

Una solución de 10 mM de DM1 (forma libre de tior) se preparó en dimetilacetamida (DMA) (7.37 mg/ml) (Figura 2). La absorbancia de las diluciones de la solución concentrada en etanol (EtOH) se midió a 280 nm. La concentración del DM1 concentrada se calculó utilizando un coeficiente de extinción de 5700 M^{-1} a 280 nm. La concentración de los grupos sulfhidrilo y tio libres (-SH) en la preparación de DM1 concentrada se midió utilizando el reactivo de Ellman (DTNB). Las diluciones de la solución concentrada se prepararon en regulador de pH de Ensayo hecho de 3% (v/v) de DMA, después se agregaron 100 mM de DTNB en DMSO (1/100 volumen). El incremento en la absorbancia a 412 nm se midió contra un reactivo en blanco y la concentración se calculó utilizando un coeficiente de extinción de $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La concentración de -SH resultante del ensayo de Ellman se utilizó para representar la concentración del concentrado de DM1 en cálculos para las condiciones de conjugación.

20 **d. Modificación de huC242 con el entrelazador SMCC**

25

450
220

El anticuerpo se dividió en dos muestras; una se modificó utilizando un exceso molar de 7.5 veces del entrelazador SMCC, la otra con un exceso molar de 8.5 veces del entrelazador SMCC. Las muestras se hicieron reaccionar a 8 mg/ml del anticuerpo. Las reacciones se llevaron a cabo en Regulador de pH A (95% v/v) con DMSO (5% v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.

e. Cromatografía G25 para remover SMCC en exceso

Las mezclas de reacción de huC242-SMCC se filtraron con gel a través de columnas pre-empacadas de 1.5 x 4.9 cm de de resina Sephadex G25 equilibradas en Regulador de pH A. Los volúmenes de la carga y la elución fueron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las eluciones del anticuerpo modificado se ensayaron para determinar la concentración del anticuerpo utilizando el coeficiente de extinción descrito anteriormente. El rendimiento del anticuerpo modificado fue de 74.6% para la reacción SMCC de exceso molar de 7.5 veces y de 81.6% para la reacción SMCC de exceso molar de 8.5 veces.

f. Conjugación de huC242-SMCC con DM1

Las muestras del anticuerpo modificadas se hicieron reaccionar con un exceso de 1.7 veces de DM1 sobre el enlazador (asumiendo 5 enlazadores por anticuerpo). Las reacciones se llevaron a cabo en 2.5 mg/ml de concentración de anticuerpo en Regulador de pH A (95% v/v) con DMA (3% v/v). Después de la adición de DM1, las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 horas con agitación.

g. Purificación de la Conjugación a través de Cromatografía G25

Las mezclas de reacción de conjugación se filtraron con gel a través de columnas

46
221

pre-empacadas de 1.5 x 4.9 cm de resina Sephadex G25 equilibradas en Regulador de pH B. Los volúmenes de la carga y la elución fueron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El número de moléculas DM1 enlazadas por mole de huC242 se determinó midiendo la absorbancia del material eluido en ambos, 252 nm y 280 nm. La relación de DM1/anticuerpo para la muestra SMCC de exceso molar de 7.5 veces se encontró que es 3.54 y la relación para la muestra SMCC de exceso molar de 8.5 se encontró que es de 3.65. El rendimiento del paso de conjugación fue de 83.7% y 75.4%, respectivamente. Ambos se conjugaron juntos, se filtraron de manera estéril, y se re-ensayaron para concentraciones de fármaco y anticuerpo. La muestra sondeada se asignó como Lote # 1713-48C y se analizo para el enlace, citotoxicidad, especificidad, extensión de la agregación y contenido libre de fármaco.

CUADRO I Características de huC242-SMCC-DM1

Número de referencia	Conc. de la Proteína Final (mg/ml)	Conc. de DM1 Final (ug/ml)	DM1/Ab
1713-148C	1.77	28.98	3.05

EJEMPLO 1B

Comprobación *in vitro* de huC242-SMCC-DM1

a. Enlace

Las afinidades de enlace del anticuerpo huC242 y huC242-SMCC-DM1 se compararon utilizando un método indirecto en células COLO 205, donde, 5 x 10³ células por pozo fueron usadas, con una incubación preliminar de tres horas en hielo. Los resultados se muestran en la Figura 3. El anticuerpo desnudo se enlazó con un KD de

47
222

5.1x10⁻¹ M y la versión del conjugado se enlazó con un KD de 5.52 x 10⁻¹ M. De esta forma, la conjugación con DM1 parece que no altera la afinidad de enlace de huC242.

b. Citotoxicidad y Especificidad

5

La citotoxicidad y especificidad del conjugado huC242-SMCC-DM1 se evaluó utilizando un ensayo clonogénico de exposición continua. Los resultados de muestran en la Figura 4.

10



HuC242-SMCC-DM1 fue efectivo en la destrucción de células SKBR3 positivas de antígeno (IC₅₀ = 3.5 x 10⁻¹² M). La especificidad se demostró a través de la comparación del valor IC₅₀ de las células SKBR3 objetivo a aquel de la línea de células negativas del antígeno, A375, en donde el IC₅₀ del conjugado fue mayor de 3.0 x 10⁻⁹ M.

c. Análisis de Cromatografía de Exclusión de Tamaño

15

El conjugado se analizó utilizando una columna de exclusión de tamaño TSK3000 (Fig. 5). La pico 4 representa la fracción del monómero del conjugado mientras las picos previas representan el multimer y las picos posteriores representan un fragmento. El area bajo cada curva dividido por el total del area de las picos representa la contribución de la pico a la muestra. La muestra del conjugado se encontró siendo de 98.0% de monómero.

20



d. Fármaco Libre

25

El porcentaje de fármaco libre se midió a través de ELISA y se encontró siendo de 4.4%.

EJEMPLO 2A

48
223

Preparación del Conjugado Trastuzumab-SMCC-DM1

El anticuerpo Trastuzumab se obtuvo de Genentech para la conjugación con DM1 utilizando el reactivo heterobifuncional no divisible de entrelazamiento SMCC. El anticuerpo se intercambió con regulador de pH de 50 mM fosfato de potasio /2 mM de EDTA, pH 6.0 en 50 mM de fosfato de potasio/50 mM de cloruro de sodio/2 mM de EDTA, pH 6.5 (Regulador de pH A). El anticuerpo después se hizo reaccionar con el enlazador SMCC con exceso molar de 7.5 veces y se purificó con resina Sephadex G25 antes de conjugarse con DM1. El conjugado final otra vez se purificó con resina Sephadex G25. El conjugado resultante contuvo 3.2 moles de DM1 por mole de anticuerpo.

a. Preparación y Medición del Anticuerpo Trastuzumab

El anticuerpo Trastuzumab en 50 mM de fosfato de potasio /2 mM de EDTA, regulador de pH 6.0 se pasó sobre una columna Sephadex G25 equilibrada con Regulador de pH A y se eluyó con Regulador de pH A. Todos los reguladores de pH utilizados en este experimento se comprobaron como estando libres de endotoxina utilizando un método (Cambrex) de lisato de amebocito Limulus (LAL). La concentración del anticuerpo se midió utilizando un coeficiente de extinción de $1.45 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm y un peso molecular de 145,423 g.

b. Preparación y Medición de Solución Concentrada SMCC

Se prepararon 20 mM de solución de SMCC (6.69 mg/ml) en DMSO. La solución se diluyó 1/40 en Regulador de pH de Ensayo y la absorbancia de las muestras se midió a 302 nm. La concentración de la solución concentrada se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de $602 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

49
224**c. Preparación y Medición de Solución Concentrada DM1**

Se preparó una solución de 10 mM de DM1 (forma libre de tior) en DMA (7.37 mg/ml) (Figura 2). La absorbancia de las diluciones de la solución concentrada en EtOH se midió a 280 nm. La concentración de DM1 concentrada se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de $5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 280 nm. La concentración de SH libre en la preparación de DM1 concentrada se midió utilizando el reactivo de Ellman (DTNB). Las diluciones de la solución concentrada se prepararon en regulador de pH de Ensayo hecho para 3% (v/v) de DMA, y después se agregaron 100 mM de DTNB en DMSO (1/100 volumen). El incremento en la absorbancia a 412 nm se midió contra un reactivo en blanco y la concentración se calculó utilizando un coeficiente de extinción de $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La concentración de -SH resultante del ensayo de Ellman se utilizó para representar la concentración de DM1 concentrada en cálculos para las condiciones de conjugación.

d. Modificación de Trastuzumab con el entrelazador SMCC

El anticuerpo se modificó utilizando un exceso molar de 7.5 veces de SMCC a 20 mg/ml del anticuerpo. La reacción se llevó a cabo en Regulador de pH A (95% v/v) con DMSO (5% v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.

e. Cromatografía G25 para remover el SMCC en exceso

La mezcla de reacción de trastuzumab-SMCC se filtró con gel a través de una columna pre-empacada de 1.5 x 4.9 cm de resina Sephadex G25 equilibrada en Regulador de pH A. Los volúmenes de carga y elución fueron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences). La concentración de la solución del anticuerpo modificado se ensayó espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción descrito anteriormente. El rendimiento del anticuerpo modificado fue de 88% con

50
225

base en la concentración de proteína.

f. Conjugación de Trastuzumab-SMCC con DM1

El anticuerpo modificado se hizo reaccionar con DM1 en exceso de 1.7 veces sobre el enlazador (asumiendo 5 enlazadores por anticuerpo). La reacción se llevó a cabo a una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml en Regulador de pH A (94% v/v) con DMA (8% v/v). Después de la adición de DM1, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 16.5 horas con agitación.

g. Purificación de la Conjugación a través de Cromatografía G25

La mezcla de reacción de conjugación se filtró con gel a través de una columna pre-empacada de 1.5 a 4.9 cm de resina Sephadex G25 equilibrada en Regulador de pH B. Los volúmenes de carga y elución fueron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences). El número de moléculas enlazadas por mole de trastuzumab se determinó a través de la medición de la absorbancia en ambos, 252 nm y 280nm del material eluido. La relación de DM1/anticuerpo se encontró siendo 3.13 y el rendimiento del paso de conjugación fue de 95.7%. El rendimiento global del conjugado trastuzumab fue 84% con base en el anticuerpo de partida. El conjugado resultante se analizó para enlace, citotoxicidad, especificidad, extensión de la agregación y contenido libre de fármaco.

CUADRO II

Características de Trastuzumab-SMCC-DM1

Número de referencia	Conc. de proteína final (mg/ml)	Conc. de DM1 Final (ug/ml)	DM1/Ab
1762.14	6.71	106	3.13

EJEMPLO 2B**Comprobación *in vivo* de Trastuzumab-SMCC-DM1**

5

Los estudios de enlace mostraron que la conjugación del anticuerpo a DM1 no afectan el K_D aparente; ambos, el anticuerpo trastuzumab desnudo y el conjugado trastuzumab-SMCC-DM1 tuvieron la misma afinidad de enlace a las placas ECD (5.5×10^{-11} M). la evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de las muestra mostró que el conjugado trastuzumab-SMCC-DM1 es ambos, altamente tóxico (IC_{50} 3.6×10^{-12} M en la línea de células positivas del antígeno y específico (IC_{50} mayor de 3.0×10^{-9} M en la línea de células negativas del antígeno).

10

**a. Enlace**

15

La afinidad de enlace del anticuerpo trastuzumab y trastuzumab-SMCC-DM1 se comparó utilizando en ensayo de enlace de placa HER2 ECD provisto por Genentech. Los resultados se muestran en la Figura 24. Ambos, el anticuerpo desnudo y el enlace de la versión del conjugado con un K_D aparente de 5.5×10^{-11} M. De esta forma, la conjugación con DM1 no altera la afinidad de enlace de trastuzumab.

20

**b. Citotoxicidad y Especificidad**

25

La citotoxicidad y especificidad *in vitro* del conjugado trastuzumab-SMCC-DM1 se evaluó utilizando un ensayo clonogénico de exposición continua. Los resultados se muestran en la Figura 25. Trastuzumab-SMCC-DM1 fue efectivo en la destrucción de células SKBR3 positivas de antígeno (IC_{50} $= 1.6 \times 10^{-12}$ M). La especificidad se mostró cuando se comparó el IC_{50} de las células SKBR3 objetivo con la línea de células negativas

✓2
22x

del antígeno, A375, en donde el IC_{50} del conjugado fue mayor de 3.0×10^{-8} .

c. Análisis de Cromatografía de Exclusión de Tamaño

El conjugado se analizó utilizando una columna de exclusión de tamaño TSK3000 (Fig. 26). El pico 1 representa el multimer, pico 2 representa el atenuador y el pico 3 representa el monómero. El área bajo cada curva dividido por el total del área de los picos representa la contribución de los picos a la muestra. La muestra del conjugado se encontró siendo el 95.3% de monómero.

d. Análisis de Fármaco Libre

El porcentaje de fármaco libre se midió a través de ELISA y se encontró siendo 3.4%.

e. Nivel de Endotoxina

El conjugado se comprobó utilizando una prueba LAL cromatográfica y se encontró que contiene 0.03 EU/mg.

EJEMPLO 3A

Preparación del Conjugado Trastuzumab-SIAB-DM1

El anticuerpo Trastuzumab se obtuvo de Genentech para la conjugación de DM1 utilizando el entrelazador heterobifuncional no divisible SIAB. El anticuerpo se hizo reaccionar con el enlazador SIAB con exceso molar de 7.0 veces a un pH de 6.5 y se purificó a través de resina Sephadex G25F. El anticuerpo que contiene las fracciones se sondeó y se hizo reaccionar con DM1 durante la noche a condiciones de conjugación

estándares de pH 6.5 y temperatura ambiente pero en la oscuridad., Se removió una alícuota del matraz de reacción y se analizó para determinar la incorporación de DM1. La alícuota se midió después de una filtración NAP 5 para tener solamente 1.4 de fármacos/Ab. Se agregó SIAB con un exceso de 8 veces adicional a la reacción durante 2 horas y después el pH se incrementó a 8 justo antes de la adición de DM1/SIAB con un exceso de 1.5 veces. La reacción se dejó proceder y se purificó utilizando resina Sephadex G25F. El conjugado resultante contuvo 3.42 moles de DM1 por mole de anticuerpo.

10 **a. Medición del Anticuerpo Trastuzumab**



La concentración del anticuerpo se midió utilizando un coeficiente de extinción de $1.45 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm y un peso molecular de 145,423 g.

15 **b. Preparación y Medición de Solución Concentrada de SIAB**

Se prepararon 18 mM de solución de SIAB (7.2 mg/ml) en DMSO. Una exploración de longitud de onda de la solución diluida con regulador de pH 4 se registro para propósitos de información solamente.

20



c. Preparación y Medición de Solución Concentrada de DM1

25

Se prepararon aproximadamente 30 mM de solución de DM1 (forma de tiol libre) en DMA. La concentración de -SH libre en el preparación de DM1 concentrada se midió utilizando el reactivo de Ellman (DTNB). Las diluciones de la solución concentrada se prepararon en regulador de pH de Ensayo hecha para 3% (v/v) de DMA, y después se agregaron 100 mM de DTNB en DMSO (1/100 volumen). El incremento en la absorbancia a 412 nm se midió contra un reactivo en blanco y la concentración se calculó utilizando un

✓
24
229

coeficiente de extinción molar de $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La concentración del -SH resultante del ensayo de Ellman se utilizó para representar la concentración del DM1 concentrada en cálculos para las condiciones de la conjugación.

5 **d. Modificación de Trastuzumab con el entrelazador SIAB**

El anticuerpo se modificó utilizando un exceso molar de 7.0 veces de SIAB a 20 mg/ml del anticuerpo. La reacción se llevó a cabo en Regulador de pH A (95% v/v) con DMSO (5% v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación en la oscuridad.

10

e. Cromatografía G25 para remover el SIAB en exceso

La mezcla de reacción de Trastuzumab-SIAB se filtro con gel a través de Columnas de Desalinización HiPrep 26/10 equilibradas con Regulador de pH A. Parece que hay interferencia a 280 nm a partir del reactivo SIAB, por lo que se asumió que el rendimiento del anticuerpo modificado es de 100% y se asumió una modificación de 5 enlazadores/anticuerpo para la determinación de la cantidad de DM1 en la reacción de la conjugación.

15

20 **f. Conjugación de Trastuzumab-SIAB con DM1**

El anticuerpo modificado se hizo reaccionar con un exceso de 1.7 veces de DM1 sobre el enlazador asumiendo un 100% de rendimiento y 5 entrelazadores/anticuerpo como se manifestó anteriormente. La concentración del anticuerpo en la reacción se estimó como siendo 12.5 mg/ml y la reacción se llevó a cabo en Regulador de pH A (97% v/v) con DMA (3% v/v). Después de la dilución de DM1, la reacción se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 16.5 horas con agitación.

25

✓✓
239

g. Análisis de la Reacción de la Conjugación

Se removieron 0.25 ml de la alícuota de la mezcla de reacción y se filtraron con gel sobre una columna pre-empacada de G25 Sephadex equilibrada en Regulador de pH B. El número de moléculas de DM1 por mole de trastuzumab se determinó a través de la medición de la absorbancia a ambos, 252 nm y 280 nm del material eluido. La relación de DM1/anticuerpo ratio fue solamente de 1.4.

h. Reacción de Modificación/Conjugación Adicional

Un exceso molar de 8 veces de SIAB adicional se agregó y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se agregó un exceso molar de 1.5 veces de DM1 sobre SIAB y el pH de la reacción se incrementó a 8 con 1N de NaOH. La reacción se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad y se filtró con gel sobre una columna de resina G25F equilibrada con Regulador de pH B.

i. Agrupación y Caracterización del conjugado

Las fracciones que contiene la proteína se agrupar, filtraron y midieron a través de la absorbancia a 252 y 280 nm. Las muestras del conjugado se comprobaron para el nivel de endotoxina, el enlace, y citotoxicidad específica y no específica, el % de monómero y nivel de fármaco libre.

CUADRO III Características de Trastuzumab-SIAB-DM1

Número de referencia	Conc. Proteína Final (mg/ml)	Conc. de DM1 Final (ug/ml)	DM1/Ab
1806-32	5.62	97.3	3.42

EJEMPLO 3B**Comprobación de Trastuzumab-SIAB-DM1 *in vitro***

5 Los estudios de enlace mostraron que la conjugación del anticuerpo a DM1 no afecta el K_D aparente; ambos, el trastuzumab desnudo y el trastuzumab-SIAB-DM1 tuvieron afinidades de enlace similares (conjugado K_D aparente 1.2×10^{-10} M Ab y 1.9×10^{-10} M). La evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de la muestra mostró que el conjugado

10 trastuzumab-SIAB-DM1 en ambos, altamente tóxico (IC_{50} 5×10^{-12} M en la línea de células positivas del antígeno SKBR3) y específico (IC_{50} mayor de 3.0×10^{-9} M en la línea de células negativas del antígeno, A375).

a. Enlace

15 La afinidad de enlace del anticuerpo trastuzumab y trastuzumab-SIAB-DM1 se comparó utilizando en ensayo de enlace de placa HER2 ECD provisto por Genentech. Los resultados se muestran en la Figura 27. Ambos, el trastuzumab desnudo y trastuzumab-SIAB-DM1 tuvieron afinidades de enlace similares (1.2×10^{-10} M para el anticuerpo y 1.9×10^{-10} de K_D aparente para el conjugado).

b. Citotoxicidad y Especificidad

20 La evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de la muestra mostró que el conjugado trastuzumab-SIAB-DM1 es ambos, altamente tóxico ($IC_{50} = 5 \times 10^{-12}$ M en la línea de células positivas del antígeno, SKBR3) y específico (IC_{50} mayor de 3.0×10^{-9} M en la línea de células negativas del antígeno, A375). Ver Figura 28.

25

c. Análisis de Cromatografía de Exclusión de Tamaño

D7
23²

El conjugado se analizó utilizando una columna de exclusión de tamaño TSK3000 (Fig. 29). El pico 1 representa el atenuador y el pico 2 representa el monómero. El área bajo cada curva dividido por el total del área de los picos representa la contribución de los picos a la muestra. La muestra del conjugado se encontró siendo 98.4% de monómero.

d. Fármaco Libre

El porcentaje de fármaco libre se midió a través de ELISA y se encontró que es de 0.35%.

e. Nivel de Endotoxina

El conjugado se comprobó utilizando una prueba LAL cromatográfica y se encontró que contiene <0.04 EU/mg.

EJEMPLO 4

Conjugación de huC242 Con un Reactivo de Entrelazamiento Que Forma un Enlazador No Divisible Que No Contiene S

Una solución concentrada del reactivo de entrelazamiento (ver Figura 21 para estructuras) se hizo en DMA, el precipitado insoluble se hizo girar, y la concentración de la solución restante se determinó utilizando un coeficiente de extinción de $280 = 5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ el cual es la extinción para DM1 a esta longitud de onda. Ya que el coeficiente de extinción real para este material no ha sido medido, esto es solamente un estimado de la concentración. Se deberá observar que la relación $\epsilon^{282}/\epsilon^{280}$ para DM1 es 4.7 (en ETOH) mientras que $\epsilon^{282}/\epsilon^{280}$ para esta solución del reactivo de entrelazamiento (en regulador de

58
233

pH 7.5) se midió como 1.42, sugiriendo ya sea diferentes extinciones o impurezas

La reacción de la conjugación se llevó a cabo en una un escala de 2 mg utilizando 2.8 mg/ml del anticuerpo huC242 en 16% de DMA en Regulador de pH E, pH 7.5 (Regulador de pH = 50 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, 10 mM de EDTA). Con base en la concentración de reactivo estimado de entrelazamiento de la solución concentrada, se utilizaron 30 equivalentes de entrelazador/anticuerpo (un experimento anterior utilizando 10 equivalentes de entrelazador/anticuerpo produjo un conjugado con solamente 0.9 DM1/anticuerpo). La reacción se dejó ir durante 3 horas y después el conjugado se purificó a través de un pasaje sobre una columna Nap 10 (G25). Después de la filtración (filtro Millex GV, 0.2 μ m de tamaño de poro), el conjugado tuvo 2.58 DM1/anticuerpo (Lot #num; 1749-119A, recuperación del anticuerpo = 78%). Una alícuota del conjugado se examinó a través de HPLC (columna HiPrep) DM1| libre y para un pico de DM1 cuantioso se observó a 12.09'. La muestra por consiguiente se dializó en Regulador de pH B para deshacerse de este pico y después volverse a ensayar:

La muestra del conjugado final (Lot #num; 1749-124A) no tuvo DM1 libre a través de HPLC y tuvo 1.84 de DM1/anticuerpo. La SEC HPLC se llevó a cabo en un conjugado para mostrar que fue 97% del anticuerpo monomérico.

b. Citotoxicidad y Enlace

Los inventores llevaron a cabo enlaces y estudios de citotoxicidad en el conjugado DM1 del enlazador no divisible que no contiene S huC242. Primero, la afinidad de enlace del anticuerpo huC242, huC242 SMNP-DM3, y huC242 que no contiene-S- de enlazadores no divisibles-DM1 fueron comparadas usando un metodo indirecto en celulas COLO 205. Celulas 5×10^3 por pozo fueron usadas con una incubación preliminar de tres horas en hielo. Los resultados son mostrados en la Fig. 23, que demuestra que el huC242-sin contener S de enlazadores no divisibles-DM1 el conjugado tuvo alrededor de dos veces una constante de disociación aparente más alta que el anticuerpo libre (ver

Figura 23). En adición, el huC242-sin contener S de enlazadores no divisibles-DM1 tuvo una citotoxicidad *in vitro* comparable con huC242-SMNP-DM3 (IC_{50} del conjugado de enlazador no divisible que no contiene S = 7.0×10^{-12} M) (ver Figura 22).

En tanto que se ha descrito la invención en detalle y con referencia a modalidades específicas de la misma, será evidente para alguien con experiencia en la técnica que se pueden hacer varios cambios y modificación sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Todas las patentes, publicaciones y otras referencias citadas aquí están expresamente incorporadas por referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un método para activar maitansinoides para una población de células seleccionadas, el método comprende poner en contacto una población de células o tejidos que se sospecha que contienen la población de células seleccionadas con un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular, en donde uno o más de los maitansinoides covalentemente enlazados al agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible y el agente enlazador de la célula se enlaza a las células de la población de células seleccionadas.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el enlazador no divisible es substancialmente resistente a la división inducida por ácido, división inducida por luz, división inducida por peptidasa, división inducida por esterasa, o división del enlace de disulfuro.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el enlazador no divisible no tiene un átomo de azufre.

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el enlazador se deriva de una porción basada en ácido dicarboxílico.

5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el enlazador se deriva de una porción basada de ácido α,ω -dicarboxílico, en donde el ácido α,ω -dicarboxílico tiene la fórmula general $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$, en donde X es un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado, llevando de 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo llevando de 3 a 10 átomos de carbono y Z es un grupo aromático sustituido o no sustituido llevando de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y en donde l, m o n son cada uno 0 o 1, siempre que todos no sean 0 al mismo tiempo.

6. El método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el ácido α,ω -dicarboxílico es ácido atípico, ácido glutárico, ácido pimélico, hexen-1, ácido 6-diolico,

67
236

ácido penten-1,5-dioico, ácido ciclohexan-dioico, o ácido ciclohexen-dioico.

7. El método de conformidad con la reivindicación, caracterizado porque el enlazador no divisible tiene un átomo de azufre.

8. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en maleimido

9. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en maleimido seleccionada del grupo que consiste de 4- (maleimidometil)ciclohexancarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproato), (LC-SMCC), éster N-succinimidílico de ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), éster N-succinimidílico de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster N-hidroxisuccinimídico de ácido ϵ -maleimidocaprolico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster N-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida [AMAS], succinimidil-6-((3-maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), y N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI).

10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de SMCC.

11. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción pasada den haloacetilo.

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada de haloacetilo seleccionada del grupo que consiste de N-succinimidil-4- (yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA), y 3- (bromoacetamido) propionato de N-succinimidilo (SBAP).

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de SIAB.

14. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el enlazador es cualquiera de uno de un grupo hidroxilo C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-

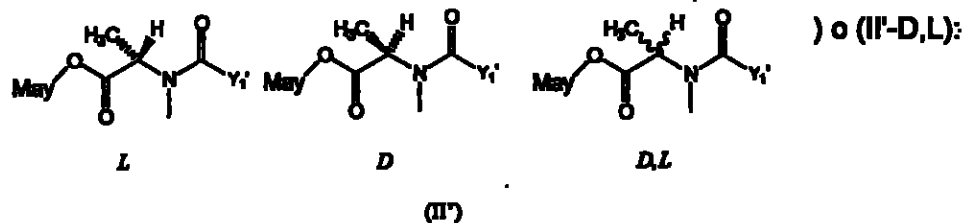
62
237

15 o desmetilo C-20 en por lo menos un maitansinoide.

15. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es un éster de maitansinol que contiene N-metil-alanina.

16. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es un éster de maitansinol que contiene N-metil-cisteína.

17. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque por lo menos



en donde:

Y_1' representa

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qA_o(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sB_1(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$,

en donde:

R_1 a R_{12} cada uno es independientemente alquilo lineal o alqueno que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo cíclico o ramificado, o alqueno que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_{12} pueden ser H.

A, B, y D, cada una independientemente es alquilo cíclico, o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

l, m, n, o, p, q, r, s, t, y u cada uno independientemente es 0 o un entero de 1 a 5, siempre que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u ambos no sean cero.

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

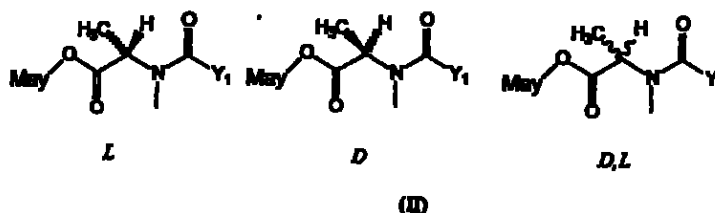
18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

19. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque R_1 es

63
238

metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 cada uno es H, l y m son 1, y n es 0.

20. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II-L), (II-D), o (II-D,L);



10 en donde:

Y_1 representa $(CR_7R_8)_l(CR_6R_4)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SH$.

R_1 a R_8 son cada uno independientemente alquilo lineal, o alquenilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico, o alquenilo que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_8 pueden ser H.

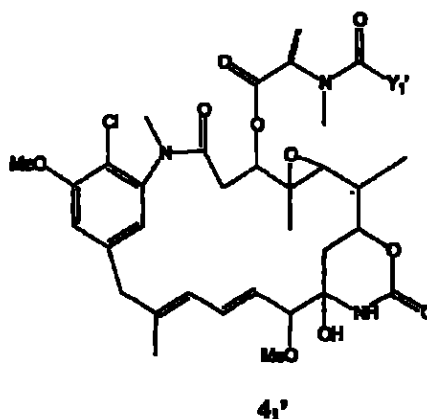
l , m y n con cada uno independientemente un entero de 1 a 5, y además n puede ser 0.

May representa un maitansinol que lleva hidroxilo C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15 o desmetilo C-20.

20 21. El método de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

22. El método de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son H, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

25 23. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula 41':



en donde:

Y_1 representa



en donde:

R_1 a R_{12} son cada uno independientemente alquilo o alquenilo lineal que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además, R_2 a R_{12} pueden ser H;

A, B, y D, cada una independientemente es alquilo cíclico, o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, anillo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

l, m, n, o, p, q, r, s, t, y u cada uno independientemente es 0 o un entero de 1 a 5, siempre que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u ambos no sean cero.

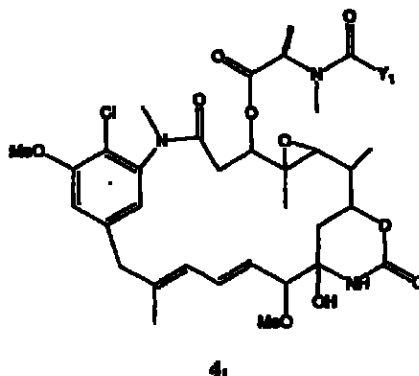
24. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

25. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5, R_6, R_7, R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

26. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula 41:

62
249

5



10

en donde:

Y_1 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$,

en donde:

R_1 a R_8 cada uno independientemente es alquilo o alquenilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además, R_2 a R_8 pueden ser H; y

15

l , m y n son cada uno independientemente un entero de 1 a 5, y además n puede ser 0.

20

27. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

28. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 cada uno es H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

25

29. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es DM1.

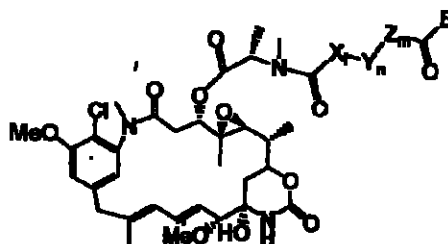
30. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el por lo menos un maitansinoide es DM3.

31. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el por

6/6
24/1

lo menos un maltansinoide es DM4.

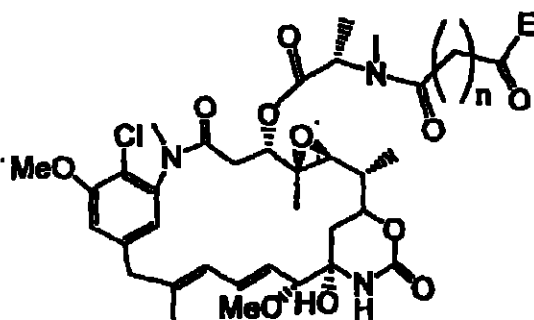
32. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el maltansinoide se modifica con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 5:



5

en donde X es grupo alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado llevando de 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo llevando de 3 a 10 átomos de carbono, Z es un grupo aromático sustituido o no sustituido llevando de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico llevando de 6 a 10 átomos de carbono en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y l, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que todos no sean 0 al mismo tiempo, y E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como N-hidroxi succinimidilo o ésteres de sulfosuccinimidilo, éster N-hidroxi de ftalimidilo, éster de N-hidroxi de orto-nitrofenilo, éster de para-nitrofenilo, éster de 2,4-dinitrofenilo, éster de 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster de 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, y éster de sulfonil tetrafluorofenilo.

33. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el maltansinoide se modifica con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 6:

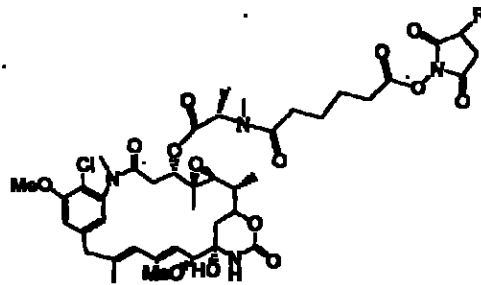


6

67
242

en donde n representa un entero de 3 a 24, y E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como N-hidroxi succinimidilo y ésteres de sulfosuccinimidilo, éster N-hidroxi ftalimidilo, éster N-hidroxi orto-nitrofenilo, éster de para-nitrofenilo, éster de 2,4-dinitrofenilo, éster 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster pentafluorfenilo, y éster sulfonil tetrafluorfenilo.

34. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 7:



7

en donde R es H o SO_3Na^+ .

35. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula se une a células de tumor, células infectadas con virus, células infectadas con microorganismos, células infectadas con parásitos, células autoinmunes, células activadas, células mieloides, células T activadas, células B, o melanocitos; células que expresan CD33, CD33, CD19, CanAg, CALLA, o antígenos Her-2; o células que expresan receptor del factor de crecimiento de insulina, el receptor del factor de crecimiento, epidérmico o el receptor de folato.

36. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula se une a las células seleccionadas del grupo que consiste de células de cáncer de pecho, células de cáncer de próstata, células de cáncer ovárico, células de cáncer colorectal, células de cáncer gástrico, células de cáncer escamoso, células pequeñas de cáncer de pulmón, células de cáncer testicular, y células de neuroblastoma.

37. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena individual, un fragmento de anticuerpo que específicamente se une a una célula objetivo, un anticuerpo monoclonal anticuerpo, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a una célula objetivo, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que específicamente se une a una célula objetivo, una linfoquina, una hormona, una vitamina, un factor de crecimiento, un factor estimulador de colonia, o una molécula para el transporte de nutrientes.

38. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un interferón, IL2, IL3, IL4, IL6, insulina, hormona de liberación de tiotropina, hormona estimuladora de melanocito, una hormona esteroide, somatostatina, EGF, TGF- α , FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF, ácido fólico, transferina, estrógeno, análogos de estrógeno, andrógeno, o análogos de andrógeno.

39. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo que específicamente se une a una célula objetivo.

40. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a una célula objetivo.

41. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo humanizado, o un fragmento de anticuerpo humanizado que específicamente se une a una célula objetivo.

42. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es a anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a una célula objetivo.

43. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, o un fragmento de

69
244

anticuerpo monoclonal recubierto, que específicamente se une a una célula objetivo.

44. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a una célula objetivo.

45. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico, un anticuerpo de dominio, o un fragmento anticuerpo de dominio que específicamente se une a una célula objetivo.

46. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es a anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a células de tumor.

47. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto, que específicamente se une a células de tumor.

48. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es una anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de tumor.

49. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo quimérico, o un fragmento de anticuerpo quimérico, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que específicamente se une a células de tumor.

50. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es a anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une

a células colorectales o células de cáncer de pecho.

51. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

52. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

53. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto que específicamente se une a células de cáncer de pecho.

54. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de cáncer de pecho.

55. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CALLA, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-IGF-IR, o un anticuerpo anti-Her2.

56. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo My9-8, KS77, o N901 recubierto.

57. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es el anticuerpo trastuzumab,

anticuerpo B4, o anticuerpo huC242.

58. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es el anticuerpo huC242.

59. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es el anticuerpo trastuzumab.

60. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es menos tóxico que un conjugado del agente enlazador de la célula maitansinoide que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

61. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular tiene una eliminación de plasma más o menos igual que la del anticuerpo solo.

62. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la dosis máxima tolerada del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular comprende el enlazador no divisible que es mayor que aquel para el conjugado maitansinoide del agente enlazador de la célula que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

63. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la durabilidad de la actividad biológica del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular comprende el enlazador no divisible que es mayor que aquel de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

64. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la actividad hacia las células negativas del antígeno del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es menor que un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide

72
247

enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

65. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular exhibe una actividad de espectador mínima.

5 66. Un método para eliminar células, el método comprende poner en contacto células con un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular, en donde uno o más maitansinoides están covalentemente enlazados al agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible y el agente enlazador de la célula se une a las células.

10 67. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el enlazador no divisible es substancialmente resistente a la división inducida por ácido, la división inducida por luz, división inducida por peptidasa, división inducida por esterase, o división del enlace de disulfuro.

68. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el enlazador no divisible no tiene un átomo de azufre.

15 69. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el enlazador se deriva de una porción basada en ácido dicarboxílico.

20 70. El método de conformidad con la reivindicación 69, caracterizado porque el enlazador se deriva de una porción basada en ácido α,ω -dicarboxílico, en donde la porción basada en ácido α,ω -dicarboxílico tiene la fórmula general $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$, en donde X es a grupo alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado que lleva de 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo que lleva de 3 a 10 átomos de carbono, Z es un grupo aromático sustituido o no sustituido que lleva de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y l, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que todos éstos no sean 0 al mismo tiempo.

25

71. El método de conformidad con la reivindicación 70, caracterizado porque el ácido α,ω -dicarboxílico es ácido atípico, ácido glutárico, ácido pimélico, ácido hexan-1,6-dioico, ácido pentan-1,5-dioico, ácido ciclohexan-dioico, o ácido ciclohexen-dioico.

73
249

72. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el enlazador no divisible tiene un átomo de azufre.

73. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en maleimido.

5 74. El método de conformidad con la reivindicación 73, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en maleimido seleccionada del grupo que consiste de 4-(maleimidometil) ciclohexancarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), éster N-succinimidílico de ácido K-maleimidoundecanoico (KMUA), N-succinimidílico de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster N-hidroxisuccinimidílico de ácido ϵ -maleimidcaproico (EMCS), éster N-hidroxisuccinimidílico de ácido m-maleimidobenzoilo (MBS), éster de N-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), hexanoato de succinimidil-8-((3-maleimidopropionamido) (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de (N-succinimidilo (SMPB), y isocianato de N-(p-maleimidofenilo) (PMPI).

15 75. El método de conformidad con la reivindicación 74, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de SMCC.

76. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en haloacetilo.

20 77. El método de conformidad con la reivindicación 76, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de a una porción basada en haloacetilo seleccionada del grupo que consiste de N-succinimidil-4- (yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA), y 3-(bromoacetamido) propionato de N-succinimidilo (SBAP).

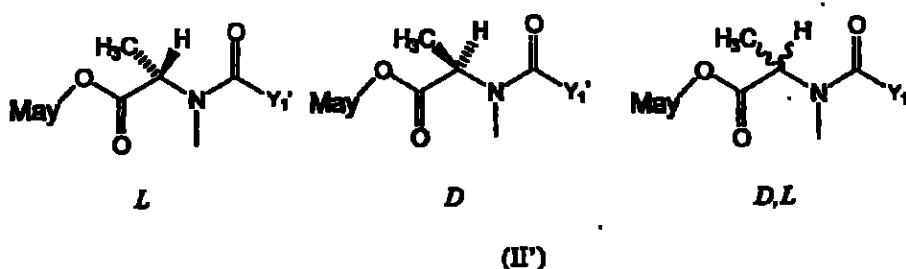
25 78. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de SIAB.

79. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el enlazador está en cualquiera de los grupos hidroxilo C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15 o desmetilo C-20 de por lo menos un maitansinólido.

80. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es un éster de maitansinol que contiene N-metil-alanina.

81. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es un éster de maitansinol que contiene N-metil-cisteína.

82. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II'-L), (II'-D) o (II'-D,L):



Y₁ representa



en donde:

R₁ a R₁₂ son cada uno independientemente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R₂ a R₁₂ pueden ser H;

A, B, y D, cada uno independientemente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, anillo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno independientemente 0 o un entero de 1 a 5, siempre que por lo menos uno de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u ambos no sean cero; y

May representa un maitansinoide que lleva una cadena lateral en el hidroxilo C-3, Hidroximetilo C-14, Hidroxilo C-15 o desmetilo C-20.

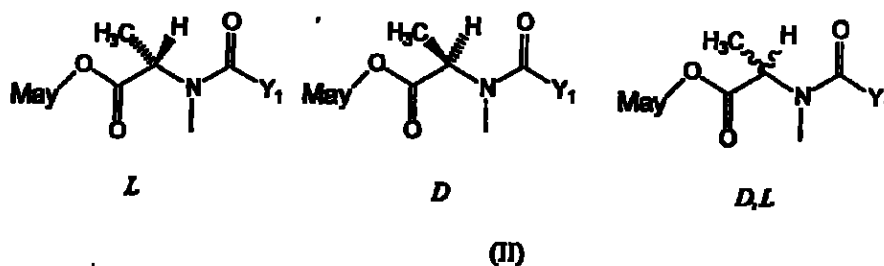
83. El método de conformidad con la reivindicación 82, caracterizado porque R₁ es metilo y R₂ es H o R₁ y R₂ son metilo.

84. El método de conformidad con la reivindicación 82, caracterizado porque R₁ es

75
25

metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

85. El método de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque el por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II-L), (II-D), o (II-D,L):



en donde:

Y_1 representa

$(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$, en donde:

R_1 a R_8 son cada uno independientemente, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_8 pueden ser H;

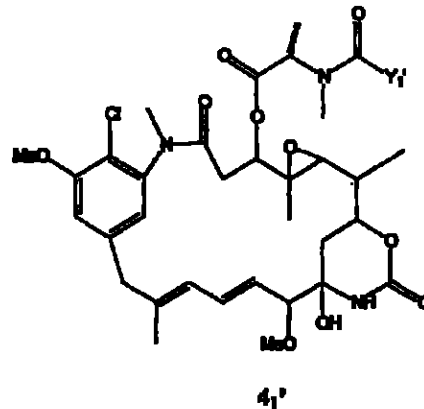
l , m y n son cada uno independientemente un entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

86. El método de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

87. El método de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

88. El método de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula 41':



en donde:

Y_1' representa



en donde:

R_1 a R_2 son cada uno Independientemente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_{12} pueden ser H;

A, B, y D, cada uno Independientemente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono ariilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo; y l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno independientemente 0 o un entero de 1 a 5, siempre que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u ambos no sean cero.

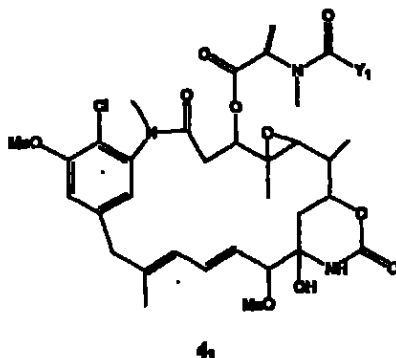
89. El método de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

90. El método de conformidad con la reivindicación 89, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en

77.
252

donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

91. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el por lo menos un maltansinoide está representado por la fórmula 41:



en donde:

Y_1 representa

$(CR_7R_8)_l(CR_6R_8)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$, en donde:

R_1 a R_8 son cada uno independientemente, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_8 pueden ser H; y l, m y n son cada uno independientemente un entero de 1 a 5, y además n puede ser 0.

92. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

93. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

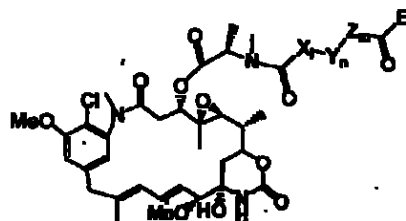
94. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque por lo menos un maltansinoide es DM1.

95. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque por lo menos un maltansinoide es DM3.

96. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque por lo

menos un maitansinoide es DM4.

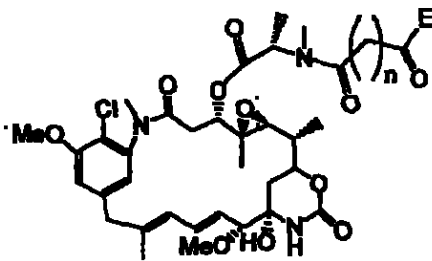
97. El método de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 5



5

en donde X es a grupo alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado que lleva de 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo que lleva de 3 a 10 átomos de carbono, Z es a grupo aromático sustituido o no sustituido que lleva de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y l, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que todos éstos no sean 0 al mismo tiempo, y E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como N-hidroxi succinimidilo y ésteres de sulfosuccinimidilo, éster N-hidroxi ftalimidilo, éster N-hidroxi orto-nitrofenilo, éster de para-nitrofenilo, éster 2,4-dinitrofenilo, éster 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster pentafluorfenilo, y éster sulfonil tetrafluorfenilo.

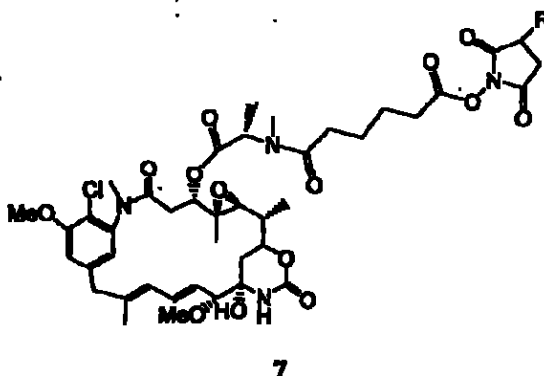
98. El método de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 6:



6

en donde n representa un entero de 3 a 24, y E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como éster de N-hidroxi succinimidilo y sulfosuccinimidilos, éster N-hidroxi ftalamidilo, éster N-hidroxi orto-nitrofenilo, éster para-nitrofenilo, éster 2,4-dinitrofenilo, éster 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster pentafluorofenilo, y éster sulfonil tetrafluorofenilo.

99. El método de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado porque el maitansinolde está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 7:



en donde R es H o SO_3^-Na^+ .

100. El método de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado porque el agente enlazador de la célula se une a las células seleccionadas del grupo que consiste de células de cáncer de pecho, células de cáncer de próstata, células de cáncer ovárico, células de cáncer colorectal, células de cáncer gástrico, células de cáncer escamoso, células pequeñas de cáncer de pulmón, células de cáncer testicular, y células de neuroblastoma.

101. El método de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena individual, un fragmento de anticuerpo que específicamente se une a una célula objetivo, a anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, un fragmento de anticuerpo

monoclonal que específicamente se une a una célula objetivo, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico que específicamente se une a una célula objetivo, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que específicamente se une a una célula objetivo, una linfocina, una hormona, una vitamina, un factor de crecimiento, un factor estimulador de colonia, o una molécula para el transporte del nutriente.

102. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un interferón, IL2, IL3, IL4, IL6, insulina, hormona para la liberación de tiotropina, hormona para la estimulación de melanocito, hormona esteroide, somatostatina, EGF, TGF- α , FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF, ácido fólico, transferina, estrógeno, análogos de estrógeno, andrógeno, o análogos de andrógeno.

103. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo que específicamente se une a una célula objetivo.

104. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo recubierto, un anticuerpo de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a una célula objetivo.

105. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo humanizado que específicamente se une a una célula objetivo.

106. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a una célula objetivo.

107. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo

8/256

monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a una célula objetivo.

108. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a una célula objetivo.

109. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo quimérico, o un fragmento de anticuerpo quimérico, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que específicamente se une a una célula objetivo.

110. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es a anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a células de tumor.

111. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a células de tumor.

112. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es una anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de tumor.

113. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que específicamente se une a células de tumor.

114. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es a anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de

82
25x

cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

115. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

116. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

117. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a células de cáncer de pecho.

118. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de cáncer de pecho.

119. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 66 a 99, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CALLA, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-IGF-IR, o un anticuerpo anti-Her2.

120. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 66 a 99, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo My9-8, KS77, o N901 recubierto.

121. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 66 a 99, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es el anticuerpo trastuzumab,

83
258

anticuerpo B4, o anticuerpo huC242.

122. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 66 a 99, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es el anticuerpo huC242.

123. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 66 a 99, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es el anticuerpo C242recubierto.

124. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible que es menos tóxico que un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

125. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular tiene una eliminación de plasma aproximadamente igual a aquella del anticuerpo solo.

126. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque la dosis máxima tolerada del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es mayor que aquel del conjugado del agente maitansinoide del agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

127. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque la durabilidad de la actividad biológica del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es mayor que la de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

128. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque la actividad hacia las células negativas del antígeno del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es menor que aquella de conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

84
259

129. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular exhibe una actividad de espectador mínima.

130. Un método de tratamiento de afecciones seleccionada del grupo que consiste de tumores, enfermedades autoinmunes, rechazos a injerto, enfermedad de huésped contra injerto, infecciones virales, e infección por parásito, el método comprende administrar a un sujeto en la necesidad del tratamiento una cantidad efectiva de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular, en donde el uno o más maitansinoides están covalentemente enlazados al agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible y el agente enlazador de la célula se une a células enfermas o células infectadas de la afección.

131. El método de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque se seleccionan del grupo que consiste de cáncer de pecho, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario y órganos linfáticos.

132. El método de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque las enfermedades autoinmunes se seleccionan del grupo que consiste de lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

133. El método de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque los rechazos a injerto se seleccionan del grupo que consiste de rechazo al trasplante renal, rechazo al trasplante cardíaco, y rechazo al trasplante de médula espinal.

134. El método de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque las infecciones virales se seleccionan del grupo que consiste de CMV, VIH y SIDA.

135. El método de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque las infecciones por parásito se seleccionan del grupo que consiste de giardiasis, amibiasis y esquistosomiasis.

136. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el enlazador no divisible es substancialmente resistente a la división inducida por ácido, división inducida por luz, división inducida por peptidasa, la división

Inducida por esterasa, o división del enlace de disulfuro.

137. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el enlazador no divisible no tiene un átomo de azufre.

138. El método de conformidad con la reivindicación 137, caracterizado porque el enlazador se deriva de una porción basada en ácido dicarboxílico.

139. El método de conformidad con la reivindicación 138, caracterizado porque el enlazador se deriva de una porción de ácido α,ω -dicarboxílico, en donde el ácido dicarboxílico tiene la fórmula general $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$, en donde X es a grupo alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado que lleva de 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo que lleva de 3 a 10 átomos de carbono, Z es un grupo aromático sustituido o no sustituido que lleva de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y l, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que todos éstos no sean 0 al mismo tiempo.

140. El método de conformidad con la reivindicación 139, caracterizado porque el ácido α,ω -dicarboxílico es ácido adípico, ácido glutárico, ácido pimélico, ácido hexen-1,6-dioico, pentan-1, ácido 5-dioico, ácido ciclohexan-dioico o ácido ciclohexen-dioico.

141. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el enlazador no divisible tiene un átomo de azufre.

142. El método de conformidad con la reivindicación 141, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en maleimido.

143. El método de conformidad con la reivindicación 142, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en maleimido seleccionada del grupo que consiste de 4-(maleimidometil) ciclohexancarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(8-amidocaproato) (LC-SMCC), éster N-succinimidílico de ácido K-maleimidoundecanoico (KMUA), y éster N-succinimidílico de ácido-maleimido-butírico (GMBS), éster N-hidroxisuccinimídico de ácido s-maleimidcaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzol-N- hldroxisuccinimida (MBS),

26
261

éster de N-(α-maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(p-maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), y N-(p-maleimidofenil) isocianato (PMPI).

144. El método de conformidad con la reivindicación 143, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de SMCC.

145. El método de conformidad con la reivindicación 141, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de a una porción basada en haloacetilo.

146. El método de conformidad con la reivindicación 145, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de a una porción basada en haloacetilo seleccionada del grupo que consiste de N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA), y 3- (bromoacetamido) propionato de N-succinimidilo (SBAP).

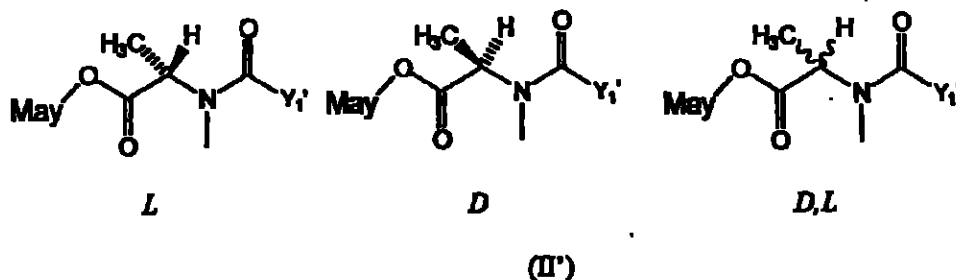
147. El método de conformidad con la reivindicación 146, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de SIAB.

148. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el enlazador está en cualquiera de los grupos Hidroxilo C-3, Hidroximetilo C-14, Hidroxilo C-15 o desmetilo C-20 de por lo menos un maitansinoide.

149. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es un éster que contiene N-metilo-alanina de maitansinol.

150. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es un éster que contiene N-metil-cisteina de maitansinol.

151. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II'-L), (II'-D) o (II'-D,L):



5 en donde:

Y_1 representa



donde:

10 R_1 a R_{12} son cada uno independientemente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además, R_2 a R_{12} pueden ser H;

15 A, B, y D, cada uno independientemente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono aro simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

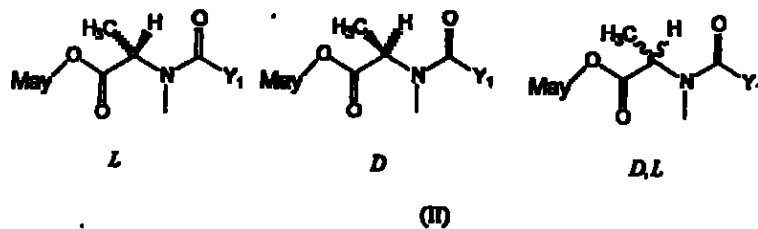
l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno independientemente 0 o un entero de 1 a 5, siempre que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u ambos no sean cero; y

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

20 152. El método de conformidad con la reivindicación 151, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

153. El método de conformidad con la reivindicación 151, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

25 154. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II-L), (II-D), o (II-D,L):



en donde:

Y_1 representa

$(CR_7R_8)_l(CR_6R_8)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$,

en donde:

R_1 a R_8 son cada uno independientemente, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_8 pueden ser H;

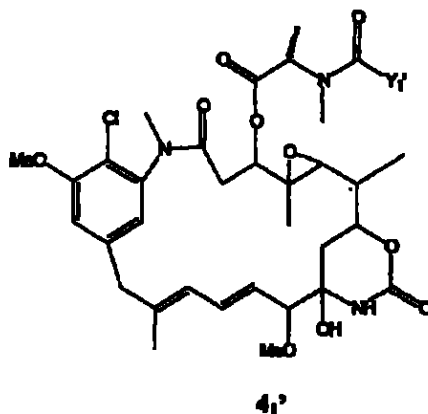
l , m y n son cada uno independientemente un entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

155. El método de conformidad con la reivindicación 154, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

156. El método de conformidad con la reivindicación 154, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_6 , R_8 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_6 , R_8 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

157. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula 41':



en donde:

Y_1' representa



en donde:

R_1 a R_{12} son cada uno independientemente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_{12} pueden ser H;

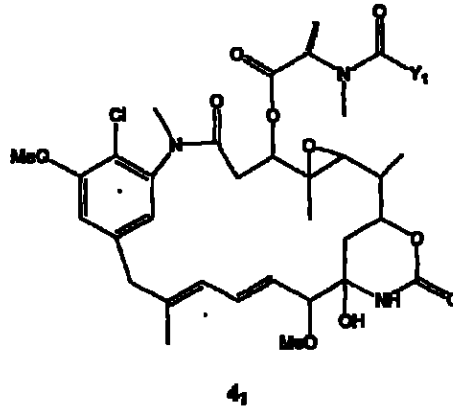
A, B, y D, cada uno independientemente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono anillo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo; y

l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno independientemente 0 o un entero de 1 a 5, siempre que por lo menos uno de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u ambos no sean cero.

158. El método de conformidad con la reivindicación 157, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

159. El método de conformidad con la reivindicación 157, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

160. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque por lo menos un maltansinoide está representado por la fórmula 41:



en donde.

Y_1 representa

$(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$, en donde:

R_1 a R_8 son cada uno independientemente, alquilo o alquenilo lineal que tienen 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_8 pueden ser H; y

l , m y n son cada uno independientemente un entero de 1 a 5, y además n puede ser 0.

161. El método de conformidad con la reivindicación 160, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

162. El método de conformidad con la reivindicación 160, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

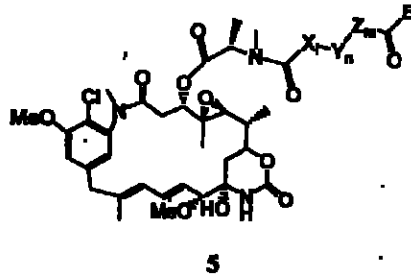
163. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es DM1.

164. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es DM3.

165. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es DM4.

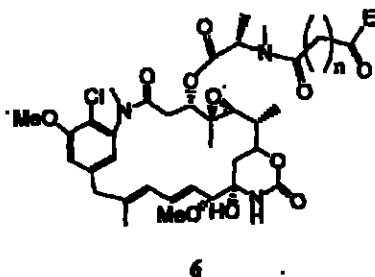
166. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135,

caracterizado porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 5:



en donde X es a grupo alquilo, alquenoilo o alquínilo lineal o ramificado que lleva de 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenoilo que lleva de 3 a 10 átomos de carbono, Z es a grupo aromático sustituido o no sustituido que lleva de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y l, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que todos éstos no sean 0 al mismo tiempo, y E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como ésteres de N-hidroxi succinimidilo y sulfosuccinimidilo, éster N-hidroxi ftalamidilo, éster de N-hidroxi orto-nitrofenilo, éster de para-nitrofenilo, éster de 2,4-dinitrofenilo, éster de 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster de 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, y éster de sulfonil tetrafluorofenilo.

167. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 6:

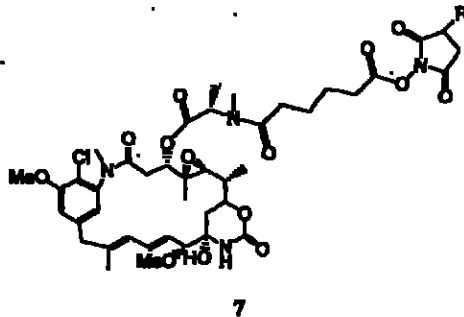


en donde n representa un entero de 3 a 24, y E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como Ésteres de N-hidroxi succinimidilo y sulfosuccinimidio, éster N-

9/2
263

hidroxi ftalamidilo, éster N-hidroxi orto-nitrofenilo, éster para-nitrofenilo, éster 2,4-dinitrofenilo, éster 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster pentafluorofenilo, y éster sulfonil tetrafluorofenilo.

168. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 7:



en donde R es H o SO_3^-Na^+ .

169. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo que específicamente se une a células enfermas o infectadas de la afección.

170. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo recubierto, un anticuerpo de cadena individual recubiertos, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a células enfermas o infectadas de la afección.

171. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo humanizado que específicamente se une a células enfermas o infectadas de la afección.

172. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es a anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal

que específicamente se une a células enfermas o infectadas de la afección.

173. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a células enfermas o infectadas de la afección.

174. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 130 a 135, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células enfermas o infectadas de la afección

175. El método de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CALLA, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-CD56, anticuerpo anti-IGF-IR, o un anticuerpo anti-Her2.

176. El método de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo My9-6, KS77, o N901 recubierto.

177. El método de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo trastuzumab, anticuerpo B4, o anticuerpo huC242.

178. El método de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo huC242.

179. El método de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo C242 recubierto.

180. Un método para uso *in vitro* para tratar: células de médula espinal autólogas antes de su trasplante dentro del mismo sujeto con el fin de eliminar las células enfermas o de tumor, células de médula espinal antes de su trasplante con el fin de eliminar células T competentes y prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD); cultivos de

células con el fin de eliminar todas las células excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno objetivo; o cultivos de células con el fin de eliminar células variables que expresan el antígeno indeseado; el método comprende tratar las células con una cantidad efectiva de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular, en donde uno o más maitansinoides covalentemente enlazados al agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible y el agente enlazador de la célula se unen las células que se van a eliminar.

181. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el enlazador no divisible es substancialmente resistente a la división inducida por ácido, división inducida por luz, división inducida por peptidasa, división inducida por esterasa, o división del enlace de disulfuro.

182. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el enlazador no divisible no tiene un átomo de azufre.

183. El método de conformidad con la reivindicación 182, caracterizado porque el enlazador se deriva de una porción basada en ácido dicarboxílico.

184. El método de conformidad con la reivindicación 183, caracterizado porque el enlazador se deriva de una porción basada en ácido α,ω -dicarboxílico que tiene la fórmula general $\text{HOOC-X}_l\text{-Y}_m\text{-Z}_n\text{-COOH}$, en donde X es a grupo alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado que lleva de 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo que lleva de 3 a 10 átomos de carbono, Z es un grupo aromático sustituido o no sustituido que lleva de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y l, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que todos éstos no sean 0 al mismo tiempo.

185. El método de conformidad con la reivindicación 184, caracterizado porque el ácido α,ω -dicarboxílico es ácido adípico, ácido pimélico, ácido glutárico, ácido pimélico, ácido hexan-1,6-dioico, ácido pentan-1,5-dioico, ácido ciclohexan-dioico o ácido ciclohexan-dioico.

186. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el

95-
270

enlazador no divisible tiene un átomo de azufre.

187. El método de conformidad con la reivindicación 186, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en maleimido.

188. El método de conformidad con la reivindicación 187, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en maleimido seleccionada del grupo que consiste de 4- (maleimidometil) ciclohexancarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), éster de N-succinimidílico de ácido K-maleimidbundecanoico (KMUA), éster de N-succinimidílico de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster de N-hidroxisuccinimidílico de ácido s-maleimidcaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoi-N- hidroxisuccinimida (MBS), éster N-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirado de N-succinimidilo (SMPB), y N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI).

189. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de SMCC.

190. El método de conformidad con la reivindicación 186, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en haloacetilo.

191. El método de conformidad con la reivindicación 190, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de a una porción basada en haloacetilo seleccionada del grupo que consiste de N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA), y 3-(bromoacetamido) propionato de N-succinimidilo (SBAP).

192. El método de conformidad con la reivindicación 191, caracterizado porque el enlazador no divisible se deriva de SIAB.

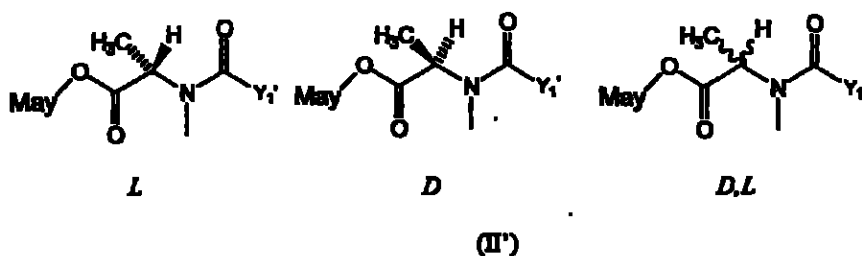
193. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el enlazador es cualquiera de un grupo C-3 hidroxilo, hidroximetil C-14, Hidroxilo C-15 o desmetilo C-20 de por lo menos un maitansinoide.

194. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el

por lo menos un maitansinoide es un éster que contiene N-metil-alanina de maitansinol.

195. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es un éster que contiene N-metil-cisteina de maitansinol.

196. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II'-L), (II'-D) o (II'-D,L):



en donde:

Y₁' representa



en donde:

R₁ a R₁₂ son cada uno independientemente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R₂ a R₁₂ pueden ser H;

A, B, y D, cada uno independientemente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono aro simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno independientemente 0 o un entero de 1 a 5, siempre que por lo menos uno de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u ambos no sean cero; y

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

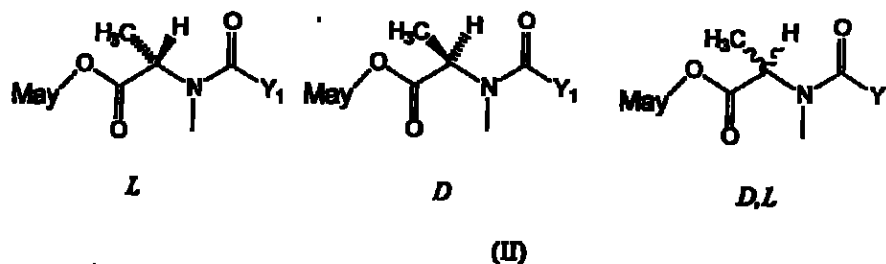
197. El método de conformidad con la reivindicación 196, caracterizado porque R₁ es metilo y R₂ es H o R₁ y R₂ son metilo.

198. El método de conformidad con la reivindicación 196, caracterizado porque R₁

97
222

es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

199. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II-L), (II-D), o (II-D,L):



en donde:

Y_1 representa

$(CR_7R_8)(CR_6R_8)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$, en donde:

R_1 a R_8 son cada uno independientemente, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_8 pueden ser H;

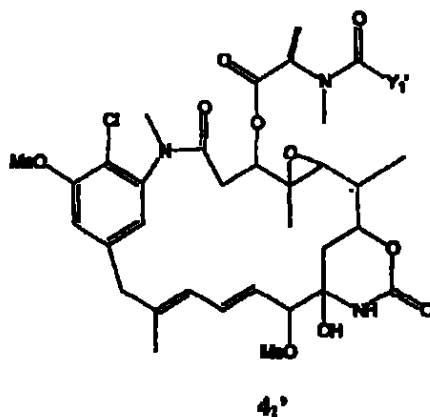
l, m y n son cada uno independientemente un entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

200. El método de conformidad con la reivindicación 199, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

201. El método de conformidad con la reivindicación 199, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son e1, y n es 0.

202. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula 41':



en donde:

Y_1' representa

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qA_o(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_uB_1(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$

en donde:

R_1 a R_2 son cada uno independientemente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_{12} pueden ser H;

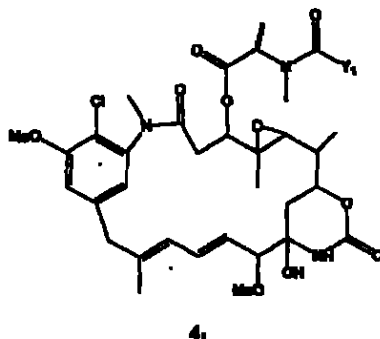
A, B, y D, cada uno independientemente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo; y

l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno independientemente 0 o un entero de 1 a 5, siempre que por lo menos uno de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u ambos no sean cero.

203. El método de conformidad con la reivindicación 202, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

204. El método de conformidad con la reivindicación 202, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

205. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque por lo menos un maltansinoide está representado por la fórmula 41:



en donde:

Y_1 representa

$(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$, en donde:

10 R_1 a R_8 son cada uno independientemente, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_8 pueden ser H;

15 l, m y n son cada uno independientemente un entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

206. El método de conformidad con la reivindicación 205, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

20 207. El método de conformidad con la reivindicación 205, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

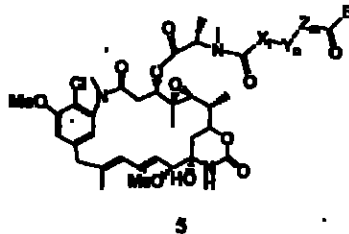
208. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es DM1.

25 209. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es DM3.

210. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque por lo menos un maitansinoide es DM4.

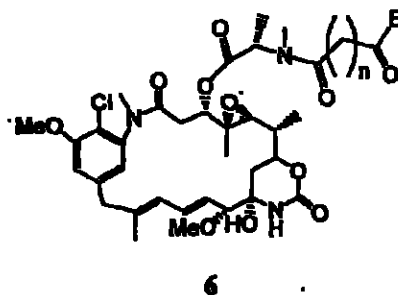
100
225

211. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 5:



en donde X es a grupo alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado que lleva de 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo que lleva de 3 a 10 átomos de carbono, Z es a grupo aromático sustituido o no sustituido que lleva de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y l, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que todos éstos no sean 0 al mismo tiempo, y E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como ésteres de N-hidroxi succinimidilo y sulfosuccinimidio, éster de N-hidroxi ftalamidilo, éster de N-hidroxi orto-nitrofenilo, éster de para-nitrofenilo, éster de 2,4-dinitrofenilo, éster de 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster de 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, y éster de sulfonil tetrafluorofenilo.

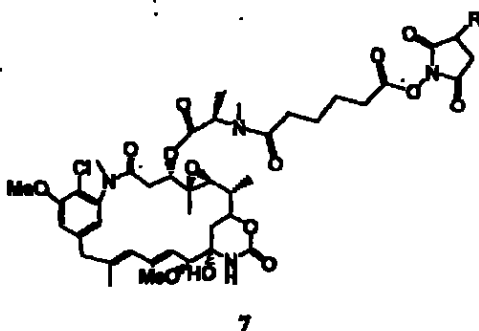
212. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 6:



en donde n representa un entero de 3 a 24, y E junto con el grupo carbonilo forma

un éster activo tal como ésteres de N-hidroxi succinimidilo y sulfosuccinimidio, éster N-hidroxi ftalamidilo, éster N-hidroxi orto-nitrofenilo, éster para-nitrofenilo, éster 2,4-dinitrofenilo, éster 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster pentafluorofenilo, y éster sulfonil tetrafluorofenilo.

- 5 213. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 7:



en donde R es H o SO_3^-Na^+ .

- 15 214. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo que específicamente se une a las células que van a ser eliminadas.

- 20 215. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo recubierto, un anticuerpo de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a las células que van a ser eliminadas.

- 25 216. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo humanizado que específicamente se une a las células que van a ser eliminadas.

217. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de

102
27x

cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a las células que van a ser eliminadas.

218. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a las células que van a ser eliminadas.

219. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a las células que van a ser eliminadas.

220. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es menos tóxico que un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

221. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular tiene una eliminación de plasma aproximadamente igual a aquella del anticuerpo solo.

222. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque la dosis máxima tolerada del conjugado maitansinoide del agente enlazador de la célula comprende el enlazador no divisible que es mayor que aquel del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

223. El método de conformidad con la reivindicación 180, caracterizado porque la durabilidad de la actividad biológica del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es mayor que aquel de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

274. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a células de tumor.

275. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de tumor.

276. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que específicamente se une a células de tumor.

277. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

278. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

279. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

280. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un

anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

281. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de cáncer de pecho.

282. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CALLA, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-IGF-IR, o un anticuerpo anti-Her2.

283. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 282, caracterizado porque el maitansinoide es DM1, DM2, o DM3.

284. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo My9-6, KS77, o N901recubierto.

285. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 284, caracterizado porque el maitansinoide es DM1, DM2, o DM3.

286. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es en anticuerpo trastuzumab, anticuerpo B4, o anticuerpo huC242.

287. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 286, caracterizado porque el maitansinoide es DM1, DM2, o DM3.

288. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo huC242.

289. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo C242 recubierto.

101-
289

290. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226 o 227, caracterizado porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es menos tóxico que un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

291. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226 o 227, caracterizado porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular tiene una eliminación de plasma aproximadamente igual a aquella del anticuerpo solo.

292. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226 o 227, caracterizado porque la dosis máxima tolerada del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular comprende el enlazador no divisible que es mayor que aquel para un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

293. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226 o 227, caracterizado porque la durabilidad de la actividad biológica del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular comprende el enlazador no divisible que es mayor que aquel de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

294. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226 o 227, caracterizado porque la actividad hacia las células negativas del antígeno del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular comprende el enlazador no divisible que es menor que aquel de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

295. El conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226 o 227, caracterizado porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular exhibe una actividad de espectador mínima.

296. Una composición que comprende el conjugado maltansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226, y un portador.

297. Una composición que comprende el conjugado maltansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 227, y un portador.

5 298. La composición de conformidad con la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el enlazador no divisible es substancialmente resistente a la división inducida por ácido, división inducida por luz, división inducida por peptidasa, la división inducida por esterasa, o división del enlace de disulfuro.

10 299. La composición de conformidad con la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el enlazador no divisible no tiene un átomo de azufre.

300. La composición de la reivindicación 299, caracterizada porque el enlazador se deriva de una porción basada en ácido dicarboxílico.

15 301. La composición de la reivindicación 300, caracterizada porque el enlazador se deriva de una porción basada de ácido α,ω -dicarboxílico, en donde el ácido α,ω -dicarboxílico tiene la fórmula general $\text{HOOC-X}_l\text{-Y}_m\text{-Z}_n\text{-COOH}$, en donde X es a grupo alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado llevando de 2 a 20 átomo, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo que lleva de 3 a 10 átomos de carbono, Z es un grupo aromático sustituido o no sustituido que lleva de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y l, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que todos éstos no sean 0 al mismo tiempo.

25 302. La composición de conformidad con la reivindicación 301, caracterizada porque el ácido α,ω -dicarboxílico es ácido adípico, ácido pimélico ácido glutárico, ácido pimélico, ácido hexen-1,6-dioico, ácido penten-1,5-dioico, ácido ciclohexan-dioico o ácido ciclohexan-dioico.

303. La composición de conformidad con la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el enlazador no divisible tiene un átomo de azufre.

304. La composición de conformidad con la reivindicación 303, caracterizada porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en maleimido.

30 305. La composición de conformidad con la reivindicación 304, caracterizada porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en maleimido

seleccionada del grupo que consiste de 4- (maleimidometil) ciclohexancarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), éster de N-succinimidílico de ácido K-maleimidoundecanoico (KMUA), éster de N-succinimidílico de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster de N-hidroxisuccinimidico de ácido ϵ -maleimidcaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-((3-maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH), 4-(p-maleimidofenilo)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), y isocianato de N-(p-maleimidofenilo) (PMPI).

306. La composición de la reivindicación 305, caracterizada porque el enlazador no divisible es SMCC.

307. La composición de la reivindicación 303, en donde el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en haloacetilo.

308. La composición de la reivindicación 307, caracterizada porque el enlazador no divisible se deriva de una porción basada en haloacetilo seleccionada del grupo que consiste de N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA), y 3-(bromoacetamido) propionato de N-succinimidilo (SBAP).

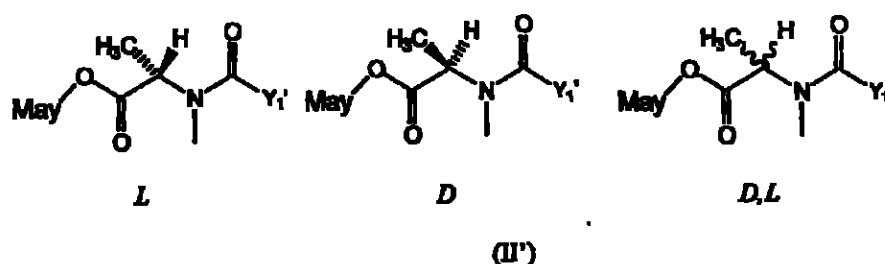
309. La composición de la reivindicación 308, caracterizada porque el enlazador no divisible se deriva de SIAB.

310. La composición de la reivindicación 296 o 297, en donde el enlazador está en cualquiera del grupo hidroxilo C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15 o desmetilo C-20 de por lo menos un maitansinoide.

311. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque por lo menos un maitansinoide es un éster de maitansinol que contiene N-metil-alanina.

312. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el por lo menos un maitansinoide es un éster de maitansinol que contiene N-metil-cisteína.

313. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II'-L), (II'-D) o (II'-D,L):



en donde:

Y_1 representa



$_2S-$, en donde:

R_1 a R_{12} son cada uno independientemente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_{12} pueden ser H;

A, B, y D, cada uno independientemente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

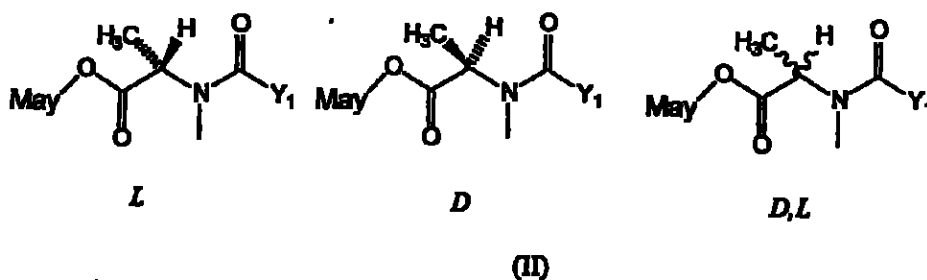
l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno independientemente 0 o un entero de 1 a 5, siempre que por lo menos uno de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u ambos no sean cero; y

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

314. La composición de la reivindicación 313, caracterizada porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

315. La composición de la reivindicación 313, caracterizada porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

316. La composición de la reivindicación 296 o 299, caracterizada porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II-L), (II-D), o (II-D,L):



R_1 a R_8 son cada uno independientemente, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1

a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_8 pueden ser H;

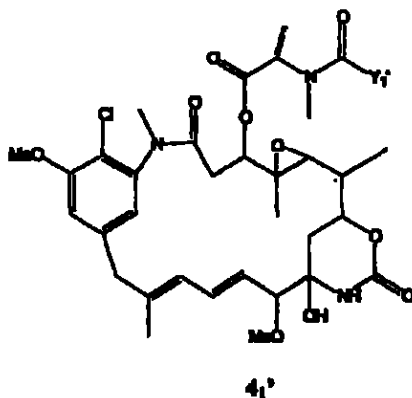
l, m y n son cada uno independientemente un entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

317. La composición de la reivindicación 316, caracterizada porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

318. La composición de la reivindicación 316, caracterizada porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

319. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula 41':



en donde:

Y_1' representa



$_2S$, en donde:

R_1 a R_{12} son cada uno independientemente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_{12} pueden ser H;

A, B, y D, cada uno independientemente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical aromático

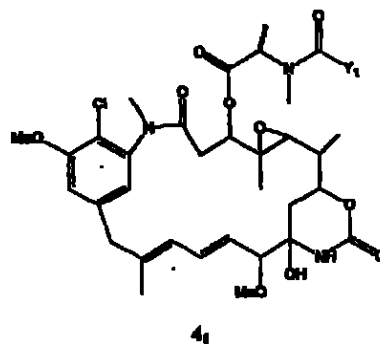
heterocíclico o heterocicloalquilo; y

l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno independientemente 0 o un entero de 1 a 5, siempre que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u ambos no sean cero.

320. La composición de la reivindicación 319, caracterizada porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

321. La composición de la reivindicación 319, caracterizada porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

322. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula 41:



en donde:

Y_1 representa $(CR_7CR_8)_l(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$, en donde:

R_1 a R_8 son cada uno independientemente, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 a R_8 pueden ser H; y

l, m y n son cada uno independientemente un entero de 2 a 5, y además n puede ser 0.

323. La composición de la reivindicación 323, caracterizada porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

324. La composición de la reivindicación 323, caracterizada porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

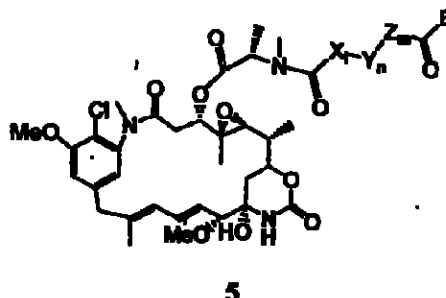
325. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque por lo menos un maitansinoide es DM1.

41
286

326. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque por lo menos un maitansinoide es DM3.

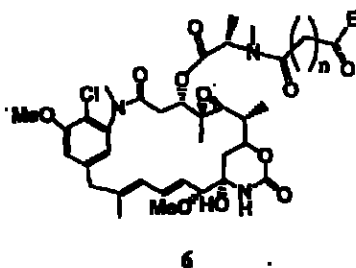
327. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque por lo menos un maitansinoide es DM4.

328. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 5:



en donde X es a grupo que lleva de 2 a 20 átomos de carbono, Y es a grupo que lleva de 3 a 10 átomos de carbono, Z es a grupo aromático sustituido o no sustituido que lleva de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y l, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que todos éstos no sean 0 al mismo tiempo, y E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como ésteres de N-hidroxi succinimidilo y sulfosuccinimidilo, éster de N-hidroxi ftalamidilo, éster de N-hidroxi sulfoftalimidilo, éster de orto-nitrofenilo, éster de para-nitrofenilo, éster de 2,4-dinitrofenilo, éster de 3-sulfonyl-4-nitrofenilo, éster de 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, y éster de sulfonyl tetrafluorofenilo.

329. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 6:

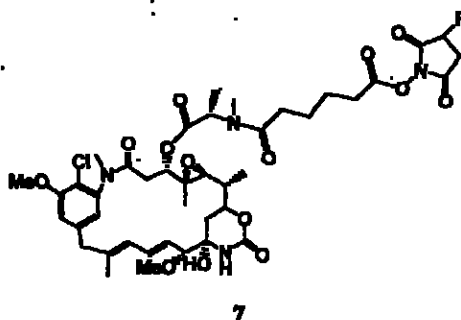


en donde n representa un entero de 3 de 24, y E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como ésteres de N-hidroxi succinimidilo y sulfosuccinimidilo,

112
287

éster de N-hidroxí ftalamidilo, éster de N-hidroxí sulfoftalimidilo, éster de orto-nitrofenilo, éster de para-nitrofenilo, éster de 2,4-dinitrofenilo, éster de 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster de 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, y éster sulfonil tetrafluorofenilo.

330. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el maitansinoide está modificado con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para dar un compuesto de la fórmula 7:



en donde R es H o SO_3Na^+ .

331. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el agente enlazador de la célula se une a células de tumor, células infectadas con virus, células infectadas con microorganismo, células infectadas con parásito, células autoinmunes, células activadas, células mieloides, células T activadas, células B, o melanocitos; células que expresan los antígenos CD33, CD19, CanAg, CALLA, o Her-2; o células que expresan el receptor de insulina del factor de crecimiento, el receptor epidérmico del factor de crecimiento o el receptor de folato.

332. La composición de la reivindicación 331, caracterizada porque el agente enlazador de la célula se une a células de tumor seleccionadas del grupo que consiste de células de cáncer de pecho, células de cáncer de próstata, células de cáncer ovárico, células de cáncer colorectal, células de cáncer gástrico, células de cáncer escamoso, células pequeñas de cáncer de pulmón, células de cáncer testicular, y células de neuroblastoma.

333. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena individual, un fragmento de anticuerpo que específicamente se une a una célula objetivo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a una célula objetivo, un anticuerpo quimérico,

un fragmento de anticuerpo quimérico que específicamente se une a una célula objetivo, un anticuerpo de dominio, un fragmento de anticuerpo de dominio que específicamente se une a una célula objetivo, una linfoquina, una hormona, una vitamina, un factor de crecimiento, un factor estimulador de colonia, o una molécula para el transporte del nutriente.

334. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es una linfoquina, una hormona, una vitamina, un factor de crecimiento, un factor estimulador de colonia, o una molécula para el transporte del nutriente.

335. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un interferón, IL2, IL3, IL4, IL6 insulina, hormona para la liberación de tirotrópina, hormona para la estimulación de melanocito, hormona esteroide, somatostatina, EGF, TGF- α , FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF, ácido fólico, transferina, estrógeno, análogos de estrógeno, andrógeno, o análogos de andrógeno.

336. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo que específicamente se une a una célula objetivo.

337. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo recubierto, un anticuerpo de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a una célula objetivo.

338. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo humanizado que específicamente se une a una célula objetivo.

339. La composición de conformidad con la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a una célula objetivo.

340. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal

de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a una célula objetivo.

341. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a una célula objetivo.

342. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que específicamente se une a una célula objetivo.

343. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a células de tumor.

344. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a células de tumor.

345. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de tumor.

346. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que específicamente se une a células de tumor.

347. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena individual, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

348. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente

enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

349. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

350. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena individual recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que específicamente se une a células de cáncer colorectal o células de cáncer de pecho.

351. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena individual humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que específicamente se une a células de cáncer de pecho.

352. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo anti-CarAg, un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CALLA, un anticuerpo anti- EGFR, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-IGF-IR, o un anticuerpo anti-Her2.

353. La composición de la reivindicación 352, caracterizada porque el maitansinoide es DM1, DM2, o DM3.

354. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo My9-6, KS77, o N901 recubierto.

355. La composición de la reivindicación 354, caracterizada porque el maitansinoide es DM1, DM2, o DM3.

356. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo trastuzumab, anticuerpo B4, o anticuerpo huC242.

357. La composición de la reivindicación 356, caracterizada porque el maitansinoide es DM1, DM2, o DM3.

358. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente

116
291

enlazador de la célula es un anticuerpo huC242.

359. La composición de la reivindicación 296, caracterizada porque el agente enlazador de la célula es un anticuerpo C242 recubierto.

360. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es menos tóxico que un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

361. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular tiene una eliminación de plasma aproximadamente igual a aquella del anticuerpo solo.

362. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque la dosis máxima tolerada del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es mayor que aquel para un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

363. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque la durabilidad de la actividad biológica del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es mayor que aquel de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

364. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque la actividad hacia células negativas de antígeno del conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende el enlazador no divisible es menor que aquel de un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente enlazador de la célula a través de un enlazador divisible.

365. La composición de la reivindicación 296 o 297, caracterizada porque el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular exhibe una actividad de espectador mínima.

366. Un proceso para hacer el conjugado maitansinoide del agente enlazador

celular de conformidad con la reivindicación 226 o 227, el proceso comprende:

- (a) proveer el agente enlazador de la célula
- (b) modificar el agente enlazador de la célula con un agente de entrelazamiento, y
- (c) conjugarse agente enlazador modificado de la célula con un maitansinoide o un maitansinoide que contiene tior por lo tanto proveyendo el enlazador no divisible entre el agente enlazador de la célula y el maitansinoide o maitansinoide que contiene tior para producir el conjugado.

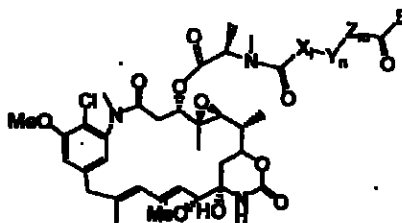
367. Un proceso para hacer el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226 o 227, el proceso comprende:

- (a) proveer el maitansinoide o un maitansinoide que contiene tior,
- (b) modificar el maitansinoide o maitansinoide que contiene tior con un agente de entrelazamiento para formar por lo tanto un enlazador no divisible, y
- (c) conjugarse el maitansinoide modificado o maitansinoide que contiene tior con el agente enlazador de la célula, por lo tanto proveyendo el enlazador no divisible entre el agente enlazador de la célula y el maitansinoide o maitansinoide que contiene tior para producir el conjugado.

368. Un proceso para hacer el conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de conformidad con la reivindicación 226 o 227, el proceso comprende:

- (a) proveer el maitansinoide,
- (b) modificar el maitansinoide con un agente de entrelazamiento que no contiene azufre para producir un éster maitansinoide, y
- (c) conjugarse el éster maitansinoide con el agente enlazador de la célula, por lo tanto proveyendo el enlazador no divisible entre el agente enlazador de la célula y el maitansinoide para producir el conjugado.

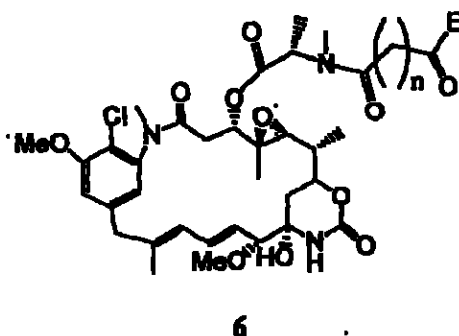
369. Un compuesto de la fórmula 5:



148
203

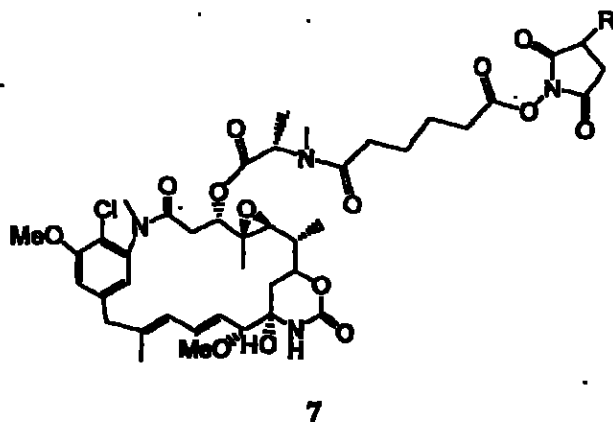
en donde X es a grupo alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado que lleva de 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo que lleva de 3 a 10 átomos de carbono, Z es a grupo aromático sustituido o no sustituido que lleva de 6 a 10 átomos de carbono o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el átomo heterogéneo se selecciona de N, O o S, y l, m y n son cada uno 0 o 1, siempre que todos éstos no sean 0 al mismo tiempo, y E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como ésteres de N-hidroxi succinimidilo y sulfosuccinimidilo, éster de N-hidroxi ftalamidilo, éster de N-hidroxi sulfoftalimidilo, éster de orto-nitrofenilo, éster de para-nitrofenilo, éster de 2,4-dinitrofenilo, éster de 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster de 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, y éster de sulfonil tetrafluorofenilo.

370. Un compuesto de la fórmula 6:



en donde n representa un entero de 3 a 24, y E junto con el grupo carbonilo forma un éster activo tal como ésteres de N-hidroxi succinimidilo y sulfosuccinimidilo, éster de N-hidroxi ftalamidilo, éster de N-hidroxi sulfoftalimidilo éster de orto-nitrofenilo, éster de para-nitrofenilo, éster de 2,4-dinitrofenilo, éster de 3-sulfonil-4-nitrofenilo, éster de 3-carboxi-4-nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, y éster de sulfonil tetrafluorofenilo.

371. Un compuesto de la fórmula 7:



en donde R es H o SO_3^-Na^+ .

372. Un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de la siguiente

fórmula: **trastuzumab-SMCC-maitansinoide.**

373. Un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de la siguiente

5 fórmula:

trastuzumab-SMCC-DM1.

374. Un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de la siguiente

fórmula:

huC242-SMCC-maitansinoide.

10 375. Un conjugado maitansinoide del agente enlazador celular de la siguiente

fórmula:

huC242-SMCC-DM1.

120
295**RESUMEN**

La presente invención describe un método para activar maitansinoides para una población de células seleccionada, el método comprende poner en contacto una población de células o tejido que se sospecha que contienen la población de células seleccionadas con un conjugado maitansinoide de agente enlazador de la célula, en donde uno o más maitansinoides están covalentemente enlazados al agente enlazador de la célula a través de un enlazador no divisible y el agente enlazador de la célula se enlaza a las células de la población de célula seleccionada.

FIG. 1

SMCC (Succinmidillo 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1carboxilato)

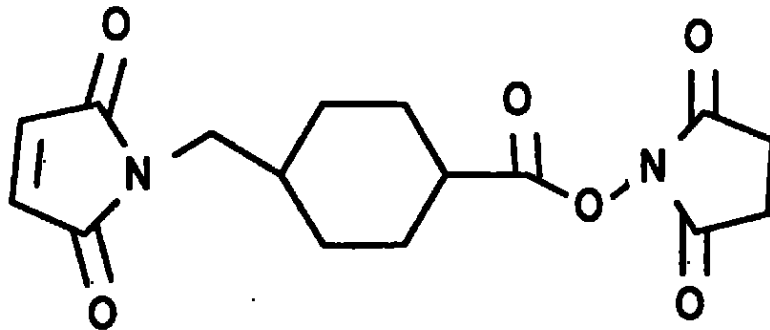
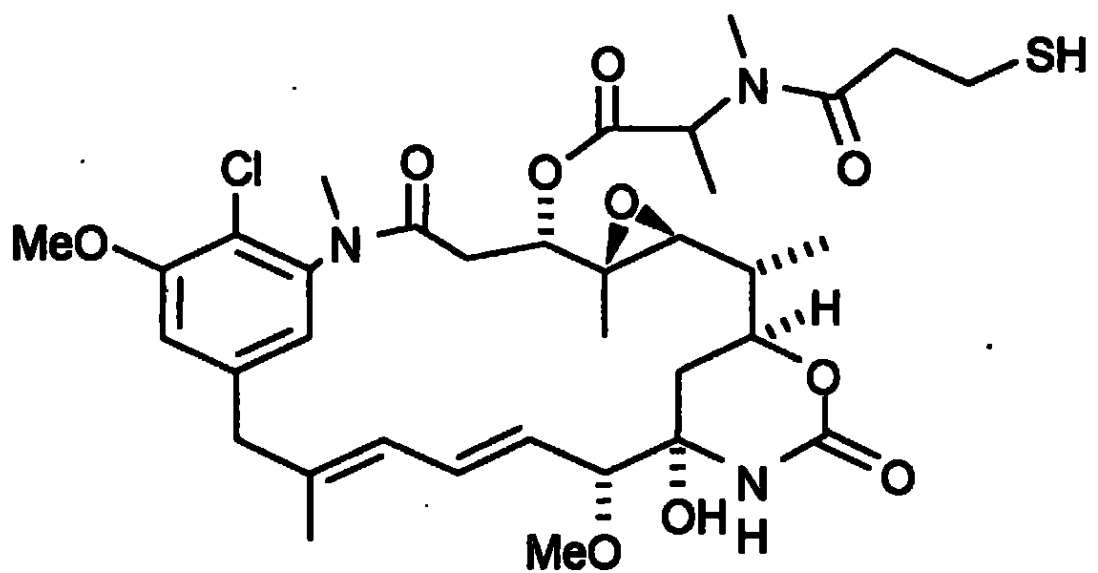


FIG. 2

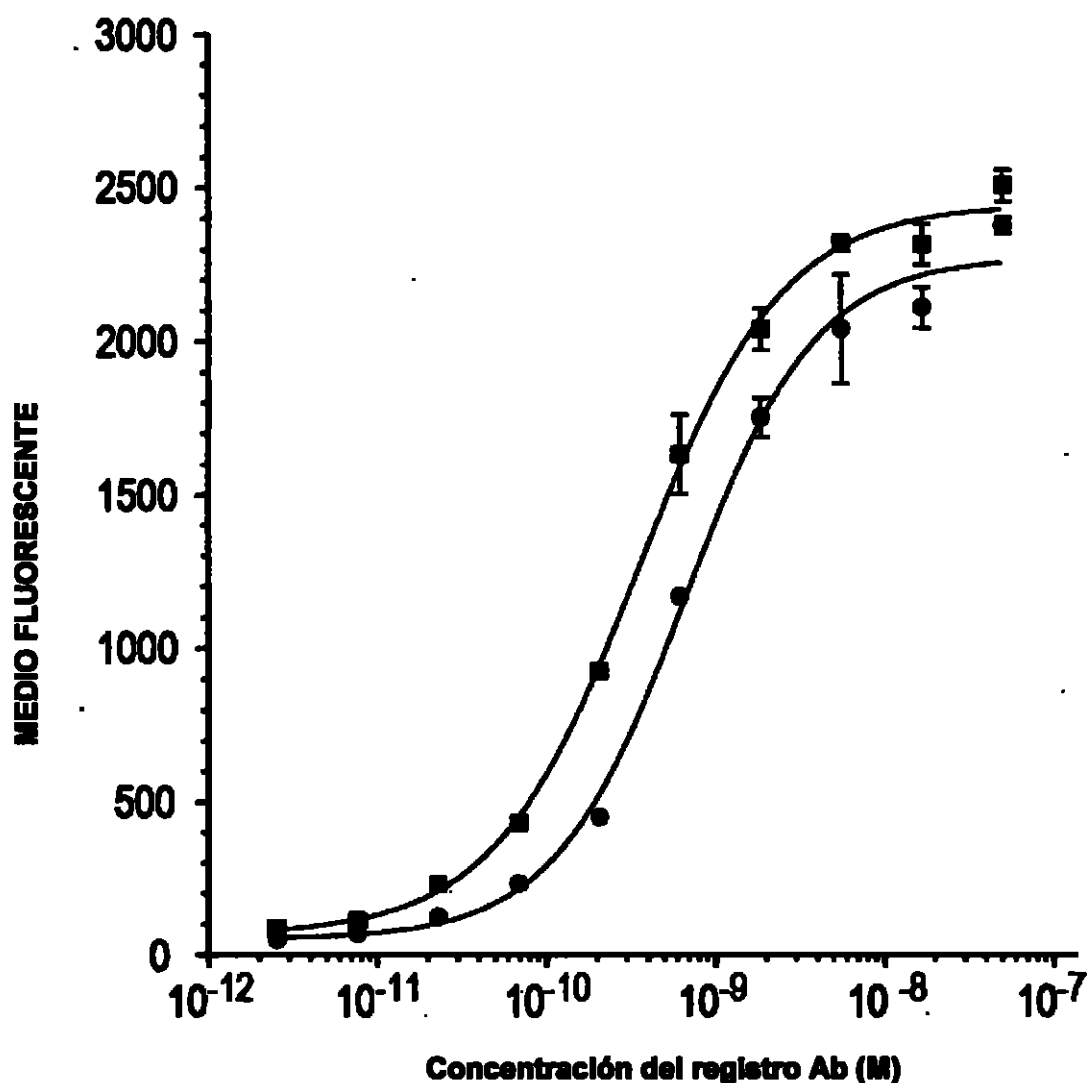
DM1 (Maltansinoide que contiene tior)



122
297

FIG. 3

Resultados del ensayo de enlace FACS comparando el anticuerpo huC242 con el conjugado de anticuerpo-maltansinide huC242-SMCC-DM1

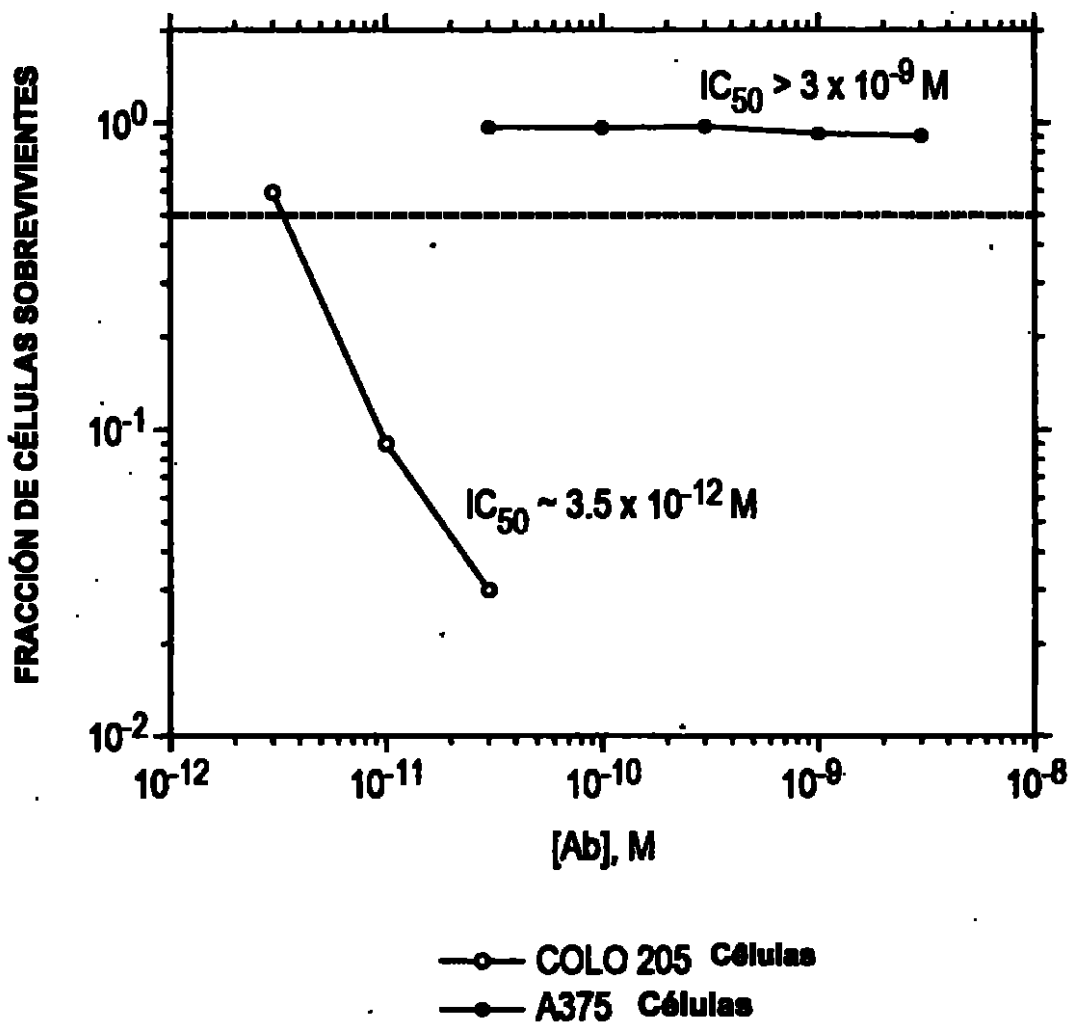


—■— huC242 Anticuerpo, $EC_{50} = 5.1 \times 10^{-10}$ M
—●— huC242-SMCC-DM1, $EC_{50} = 5.52 \times 10^{-10}$ M

123
298

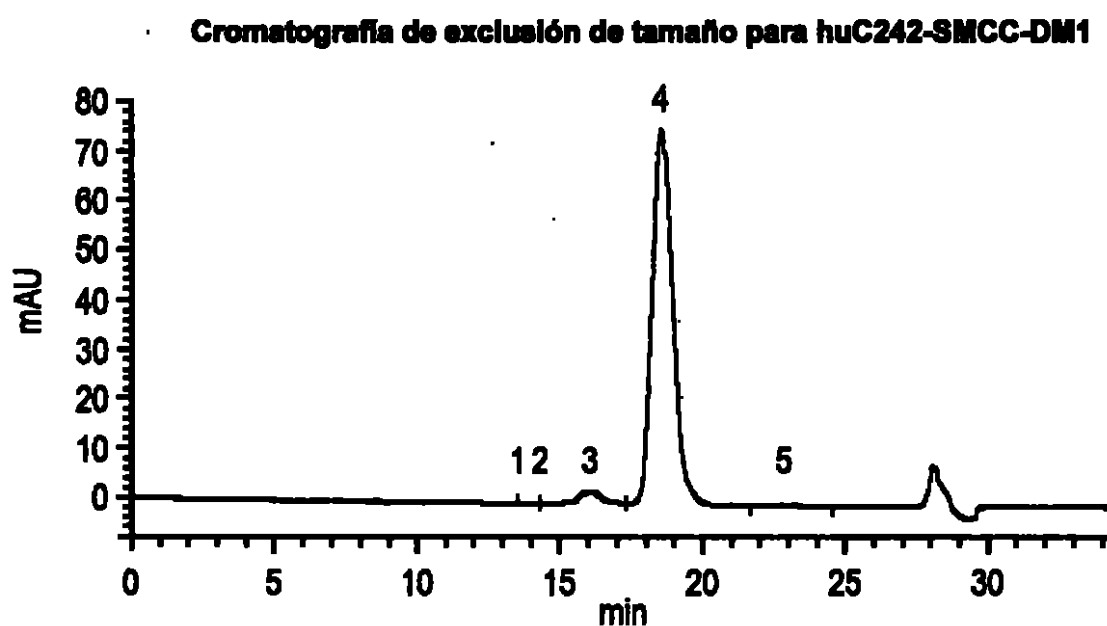
FIG. 4

Evaluación de potencia de huC242-SMCC-DM1
Análisis continuo de la exposición clonogénica



124
25/17

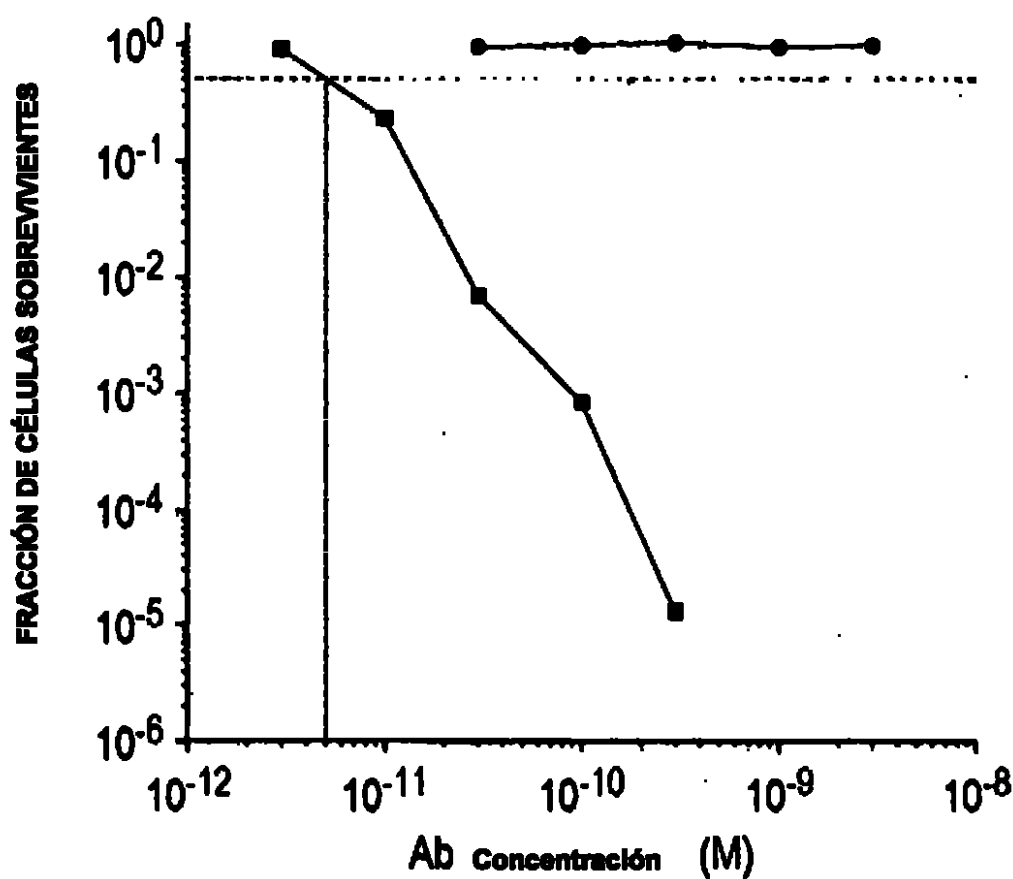
FIG. 5



125
309

FIG. 6A

Citotoxicidad de huC242-SMCC-DM1
vs. Colo 205(+) y A375(-)
Análisis continuo de la exposición clonogénica



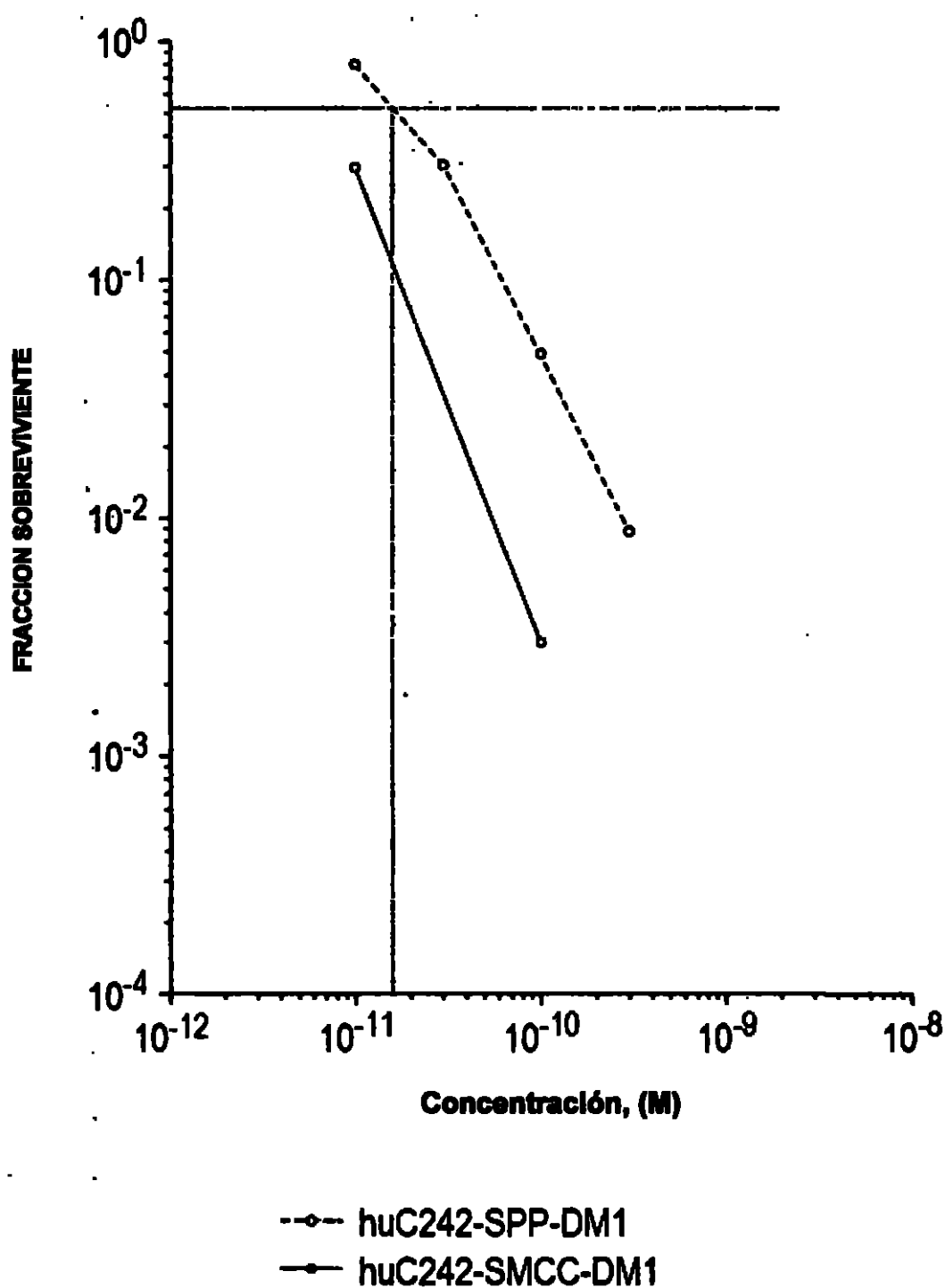
● A375

■ COLO 205
 $IC_{50} = 5 \times 10^{-12}$ M

126
301

FIG. 6B

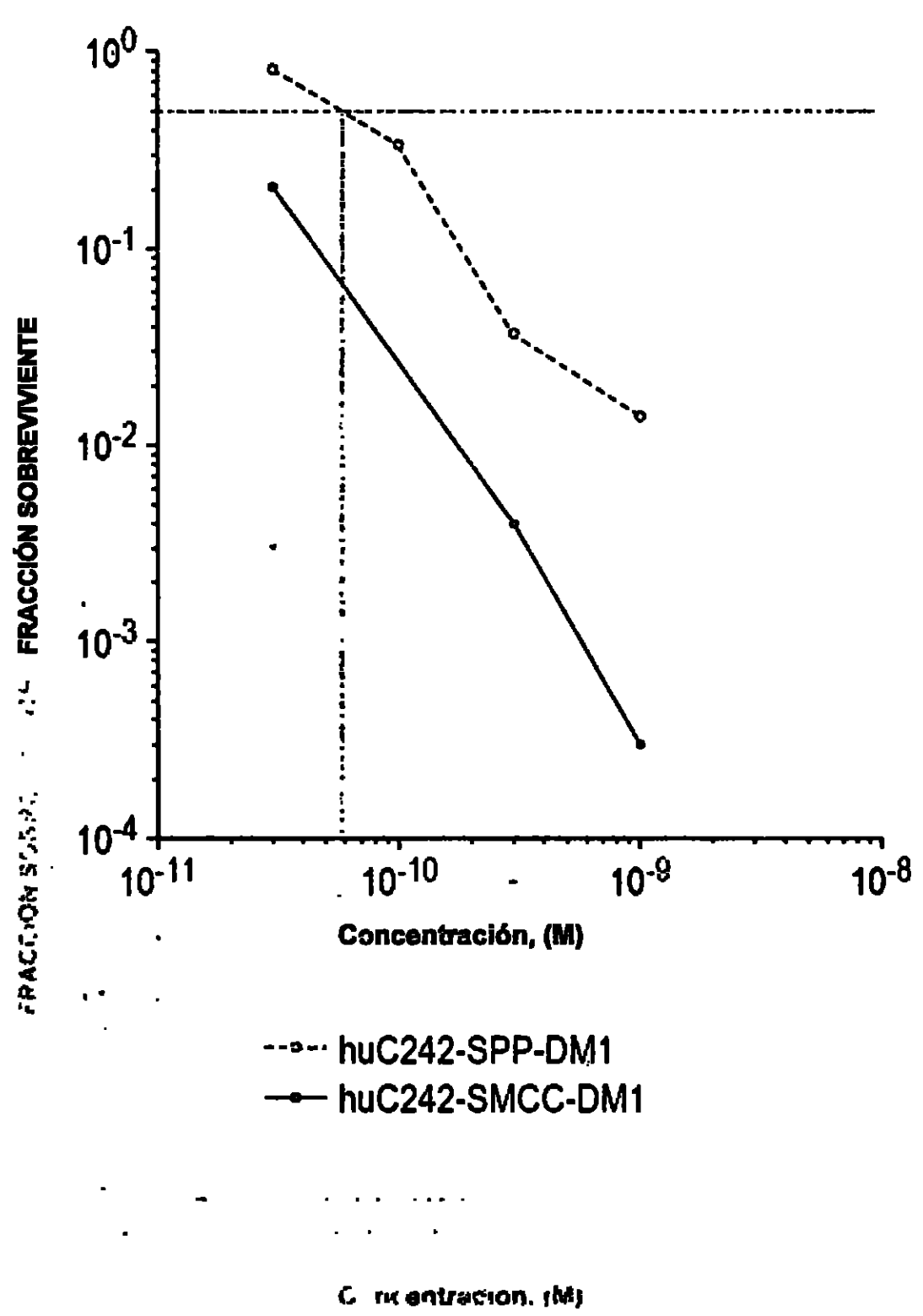
Citotoxicidad de huC242 conjugados vs. Células COLO 205
Análisis de la exposición clonogénica durante 24 horas



127
302

FIG. 6C

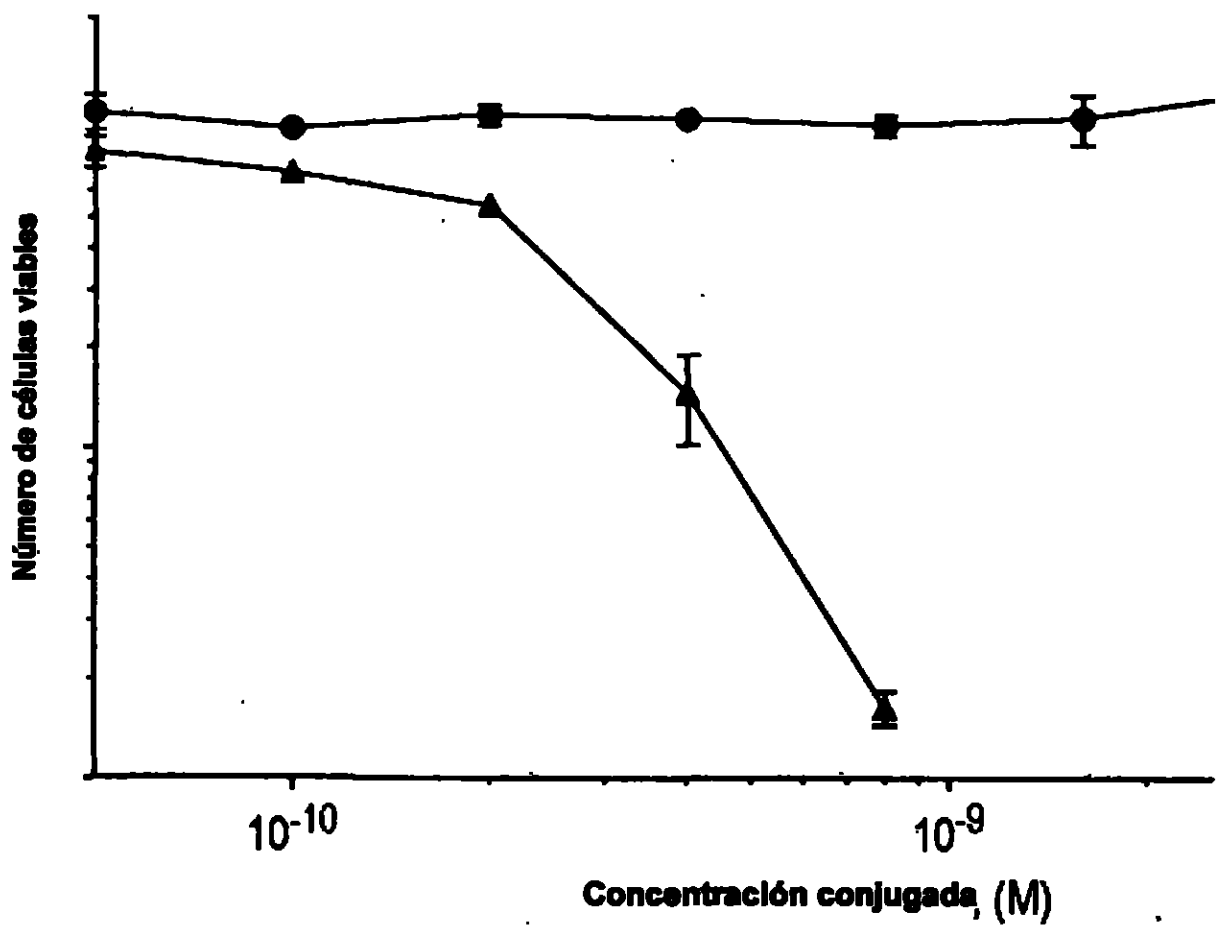
Citotoxicidad de huC242 conjugados vs. Células COLO 205
Análisis de la exposición clonogénica durante 4 horas



128
393

FIG. 7

Citotoxicidad In Vitro de huC242-SMCC-DM1
Conjugado vs. COLO 205(+) y células Namalwa (-)
Incubación de 5 días - Análisis MTT

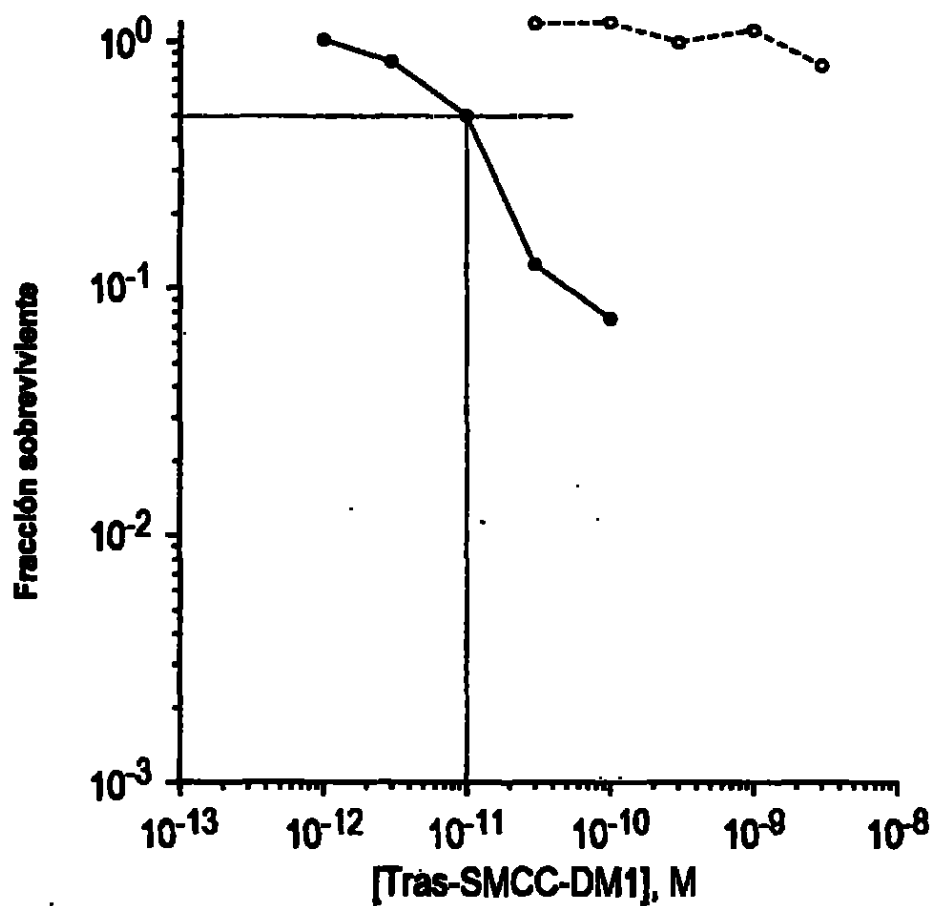


—▲— COLO 205 (+) Células
—●— Namalwa (-) Células

429
304

FIG. 8A

Citotoxicidad de Trastuzumab-SMCC-DM1,
vs. SKBR3 y células A375

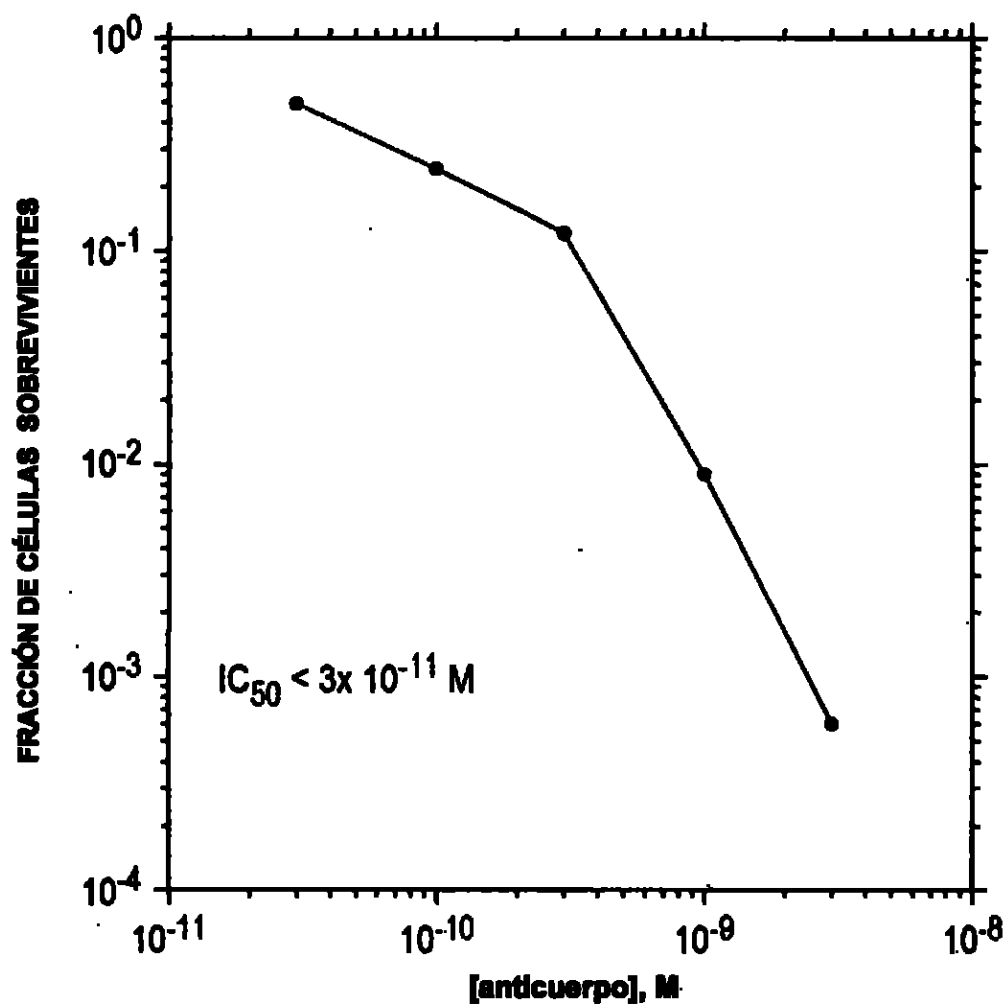


—●— SKBR3 células $IC_{50} = 1 \times 10^{-11}$ M
---○--- A375 Células

130
303

FIG. 8B

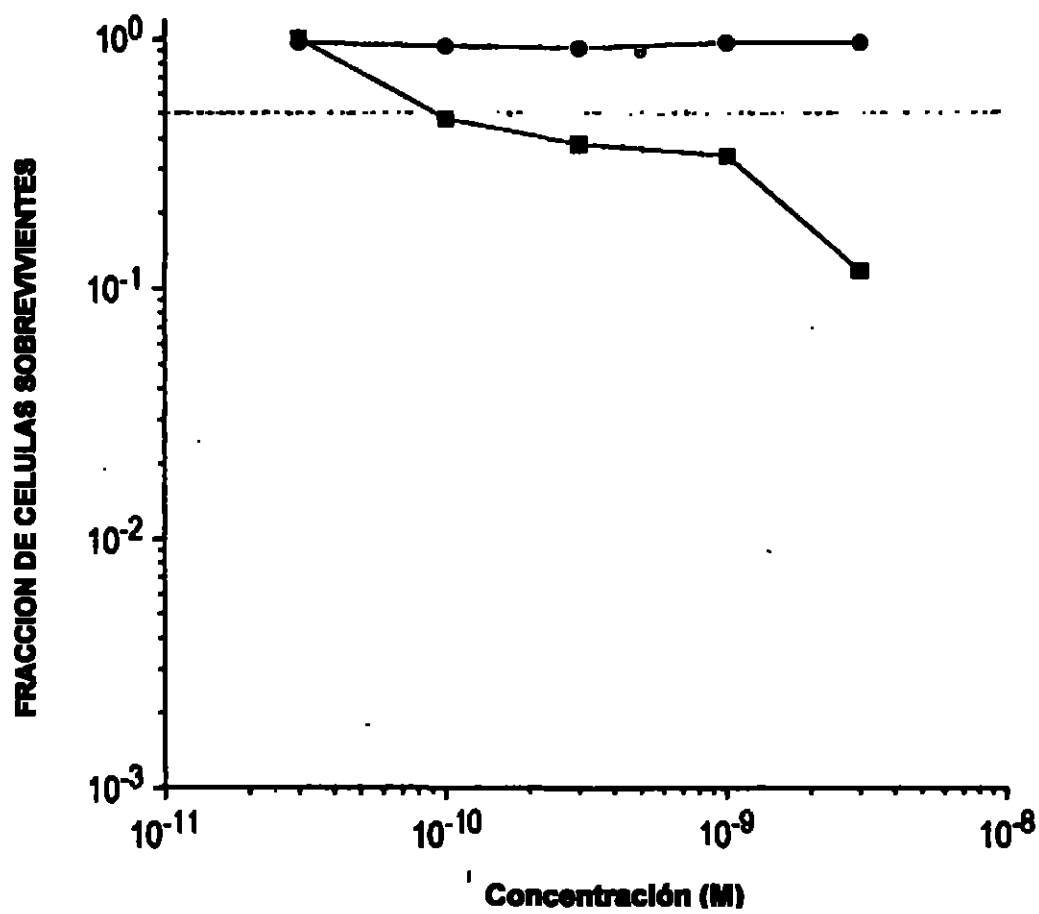
Evaluación de potencia de My9-6-SMCC-DM1, vs. Células THP-1
Análisis continuo de la exposición clonogénica



134
306

FIG. 8C

Citotoxicidad de KS77-SMCC-DM1 vs.
A431(+) y A375(-) células
Análisis continuo de la exposición clonogénica

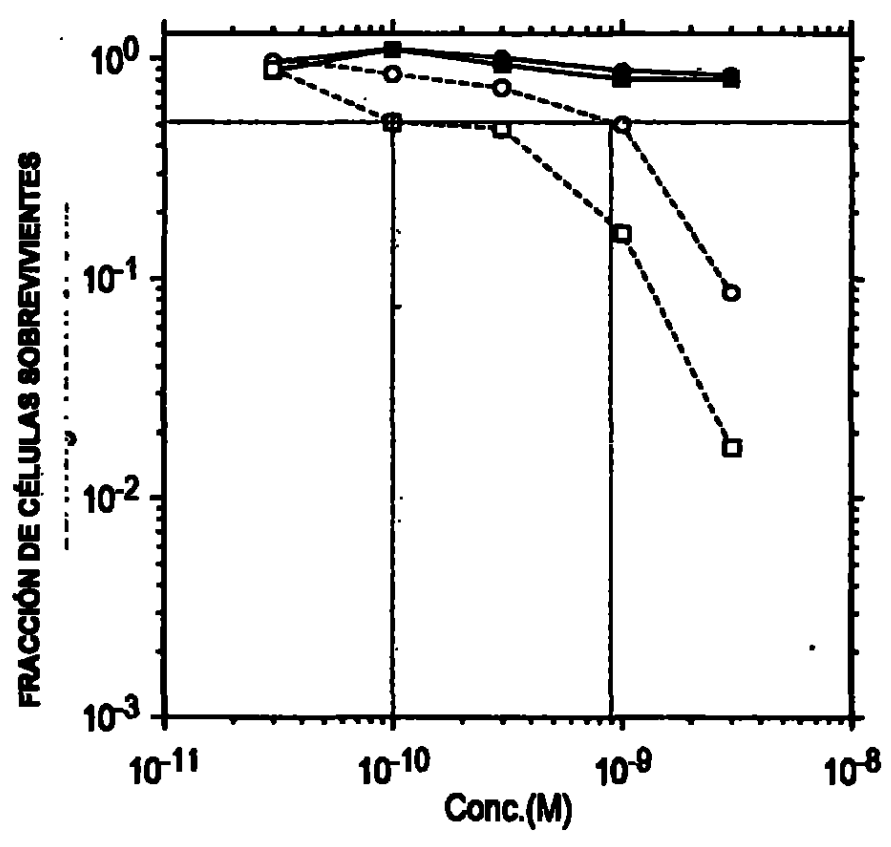


—■— A431
 $IC_{50} = 9 \times 10^{-11}$ M
—●— A375

132
307

FIG. 8D

Citotoxicidad de N901-SMCC-DM1 conjugados vs.
CHD-163(+) y A431(-)
Análisis continuo de la exposición clonogénica

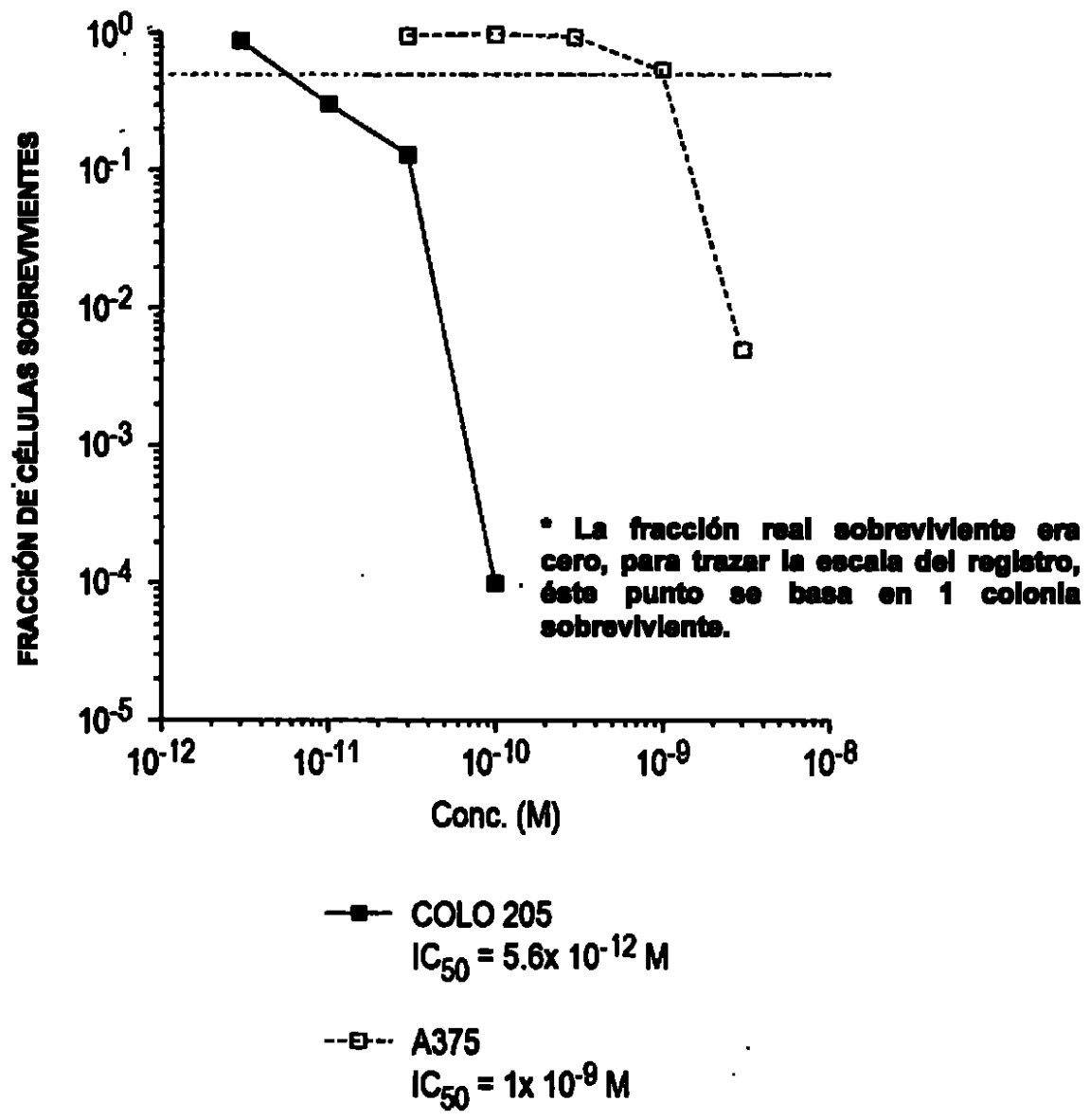


--□-- CHD-163 IC ₅₀ = 9.0x10 ⁻¹⁰ M	—■— A431 IC ₅₀ > 3.0x10 ⁻⁹ M
--○-- CHD-163 IC ₅₀ = 1.0x10 ⁻¹⁰ M	—●— A431 IC ₅₀ > 3.0x10 ⁻⁹ M

133
308

FIG. 9

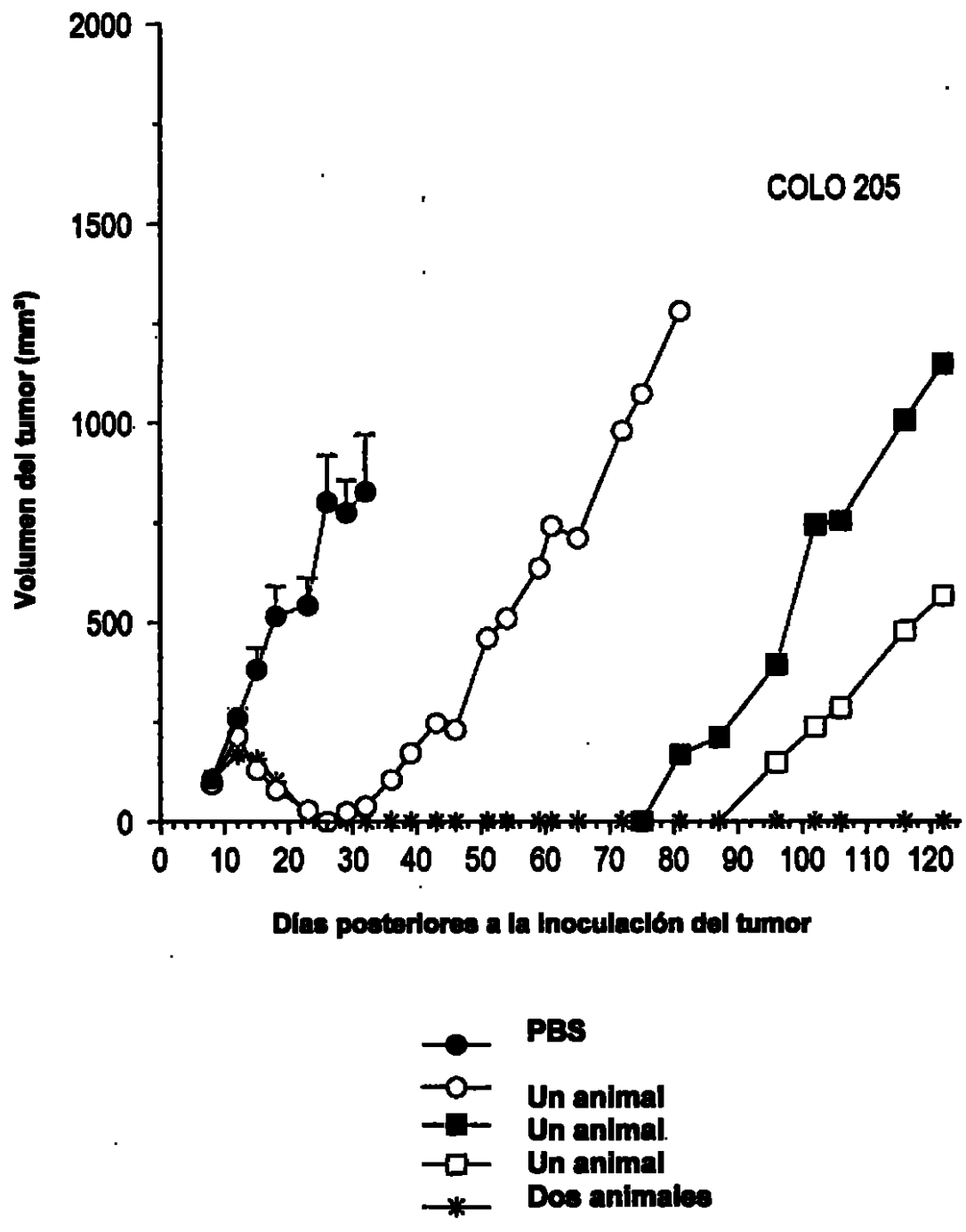
Evaluación de la potencia de huC242-SIAB-DM1, vs.
COLO 205(+) y A375 (-) células
Análisis continuo de la exposición clonogénica



L34
30A

FIG. 10A

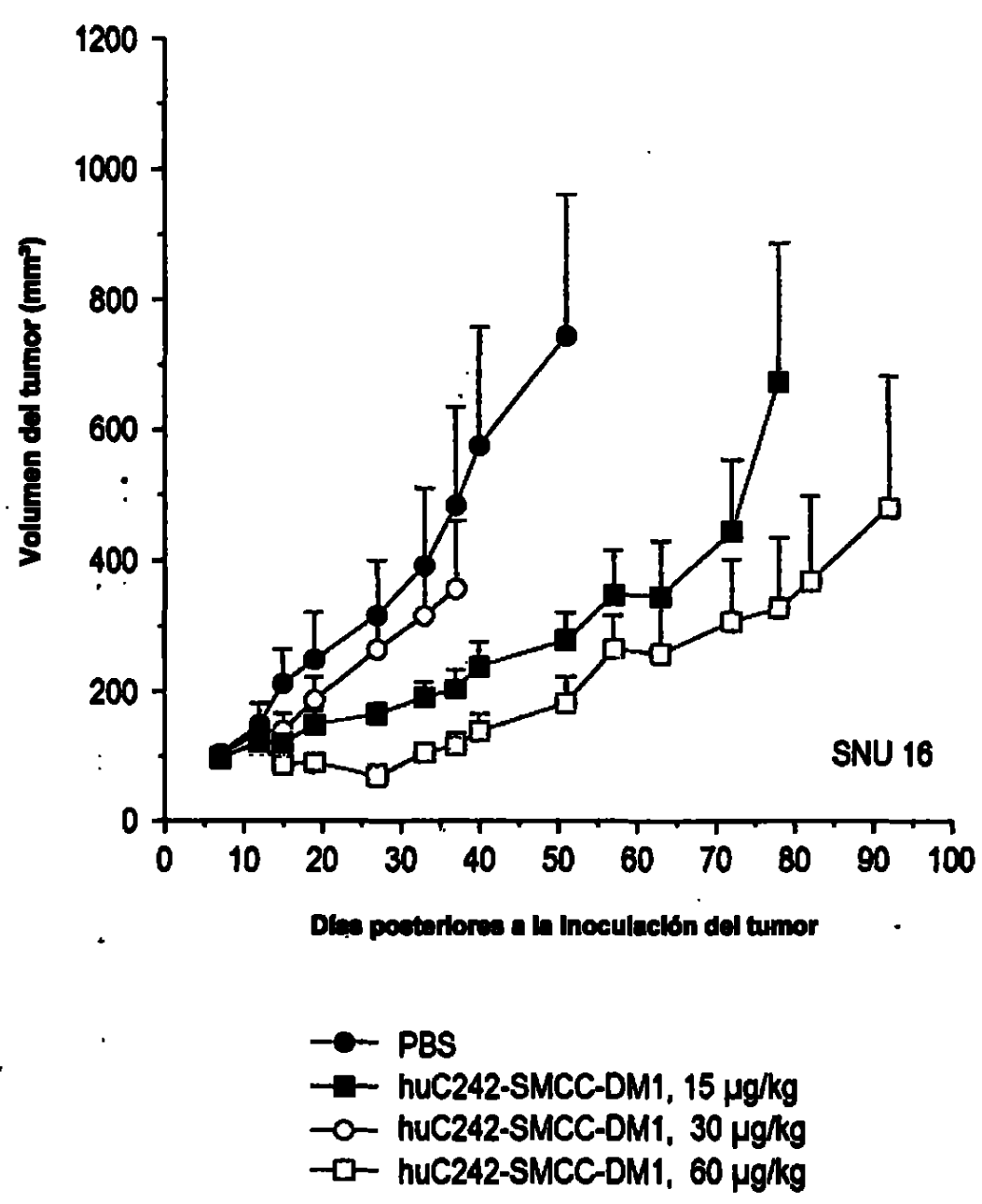
Actividad antitumor de huC242-SMCC-DM1
Contra el cáncer humano COLO 205 en xenografías
de ratones SCID



138
319

FIG. 10B

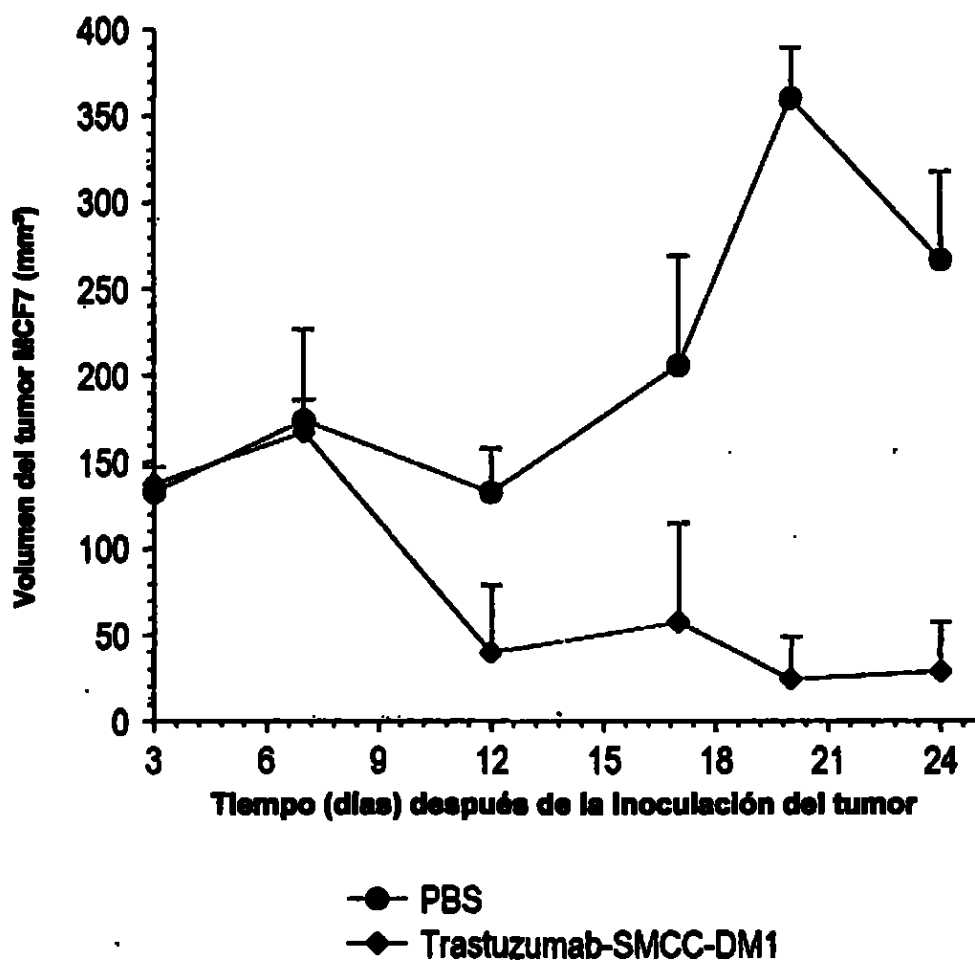
Actividad antitumor de huC242-SMCC-DM1
Contra el tumor gástrico humano SNU 16 en
xenografías de ratones SCID



L36
311

FIG. 10C

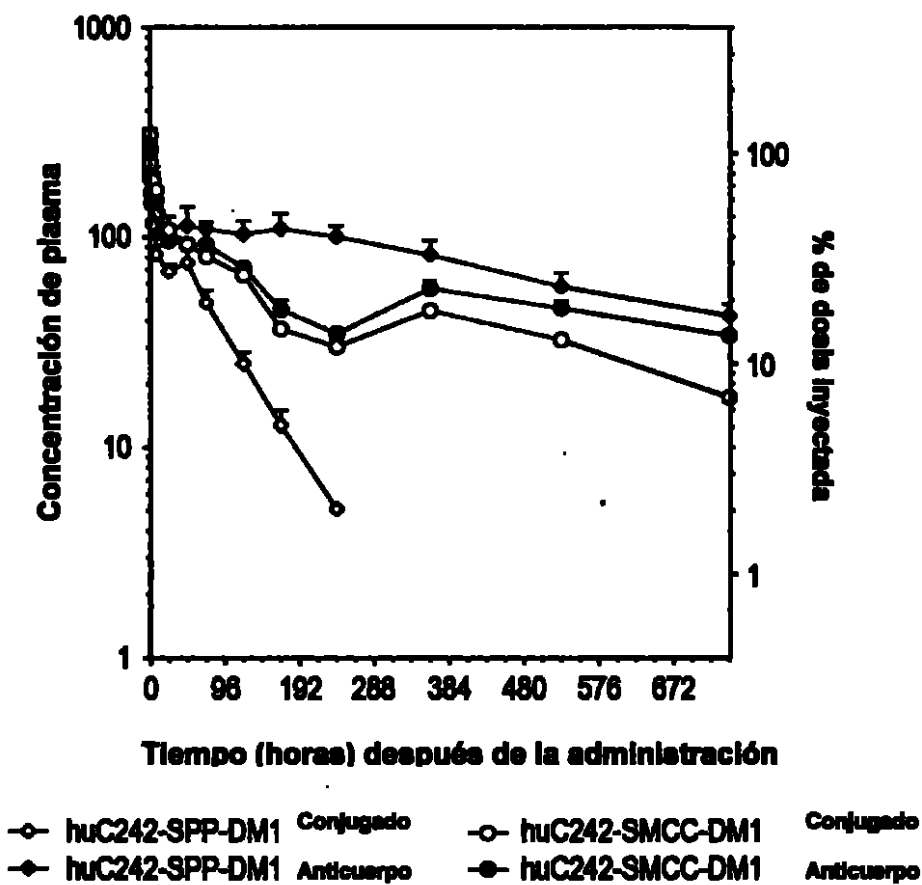
Actividad antitumor de Trastuzumab-SMCC-DM1
contra xenografías en ratones CB.17 SCID



137
312

FIG. 11

Estudios farmacocinéticos de huC242-SPP-DM1
y huC242-SMCC-DM1 conjugados en ratones CD-1
curvas de la separación de plasma y parámetros
farmacocinéticos



Inmunocombinados	DM1/AB	Cmax	t1/2	AUC	CL	Vas
		ug/ml	hora	Hora.ug/ml	ml/hora/kg	ml/kg
huC242-SMCC-DM1	3.17	312.2	318.3	40374.2	0.3	112.5
huC242-SMCC		282.8	533.7	65853.9	0.2	119.8
huC242-SPP-DM1	3.28	191.4	49.8	9208.7	1.1	92.8
huC242-SPP		212.5	499.2	89348.7	0.1	76.2

138
313

FIG. 12A

Supervivencia de los ratones CD-1
tratados con huC242-SPP-DM1

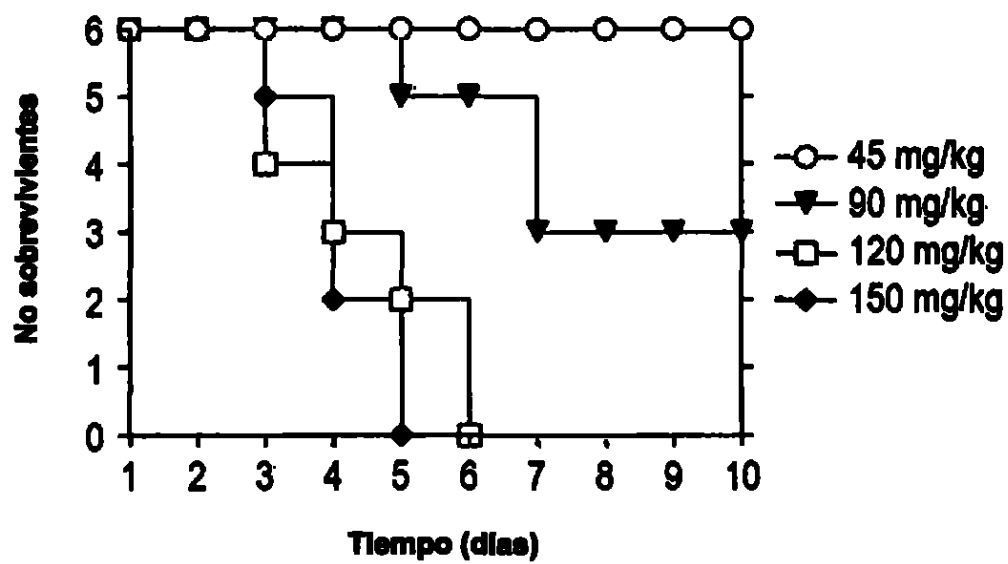
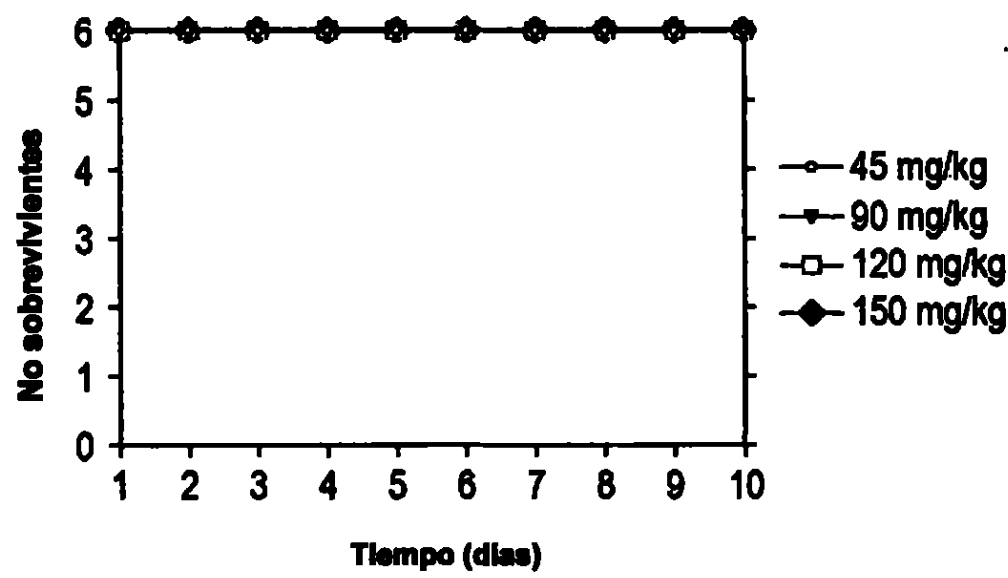


FIG. 12B

Supervivencia de los ratones CD-1
tratados con huC242-SPP-DM1



139
314

FIG. 12C

Peso corporal de los ratones CD-1
tratados con huC242-SPP-DM1

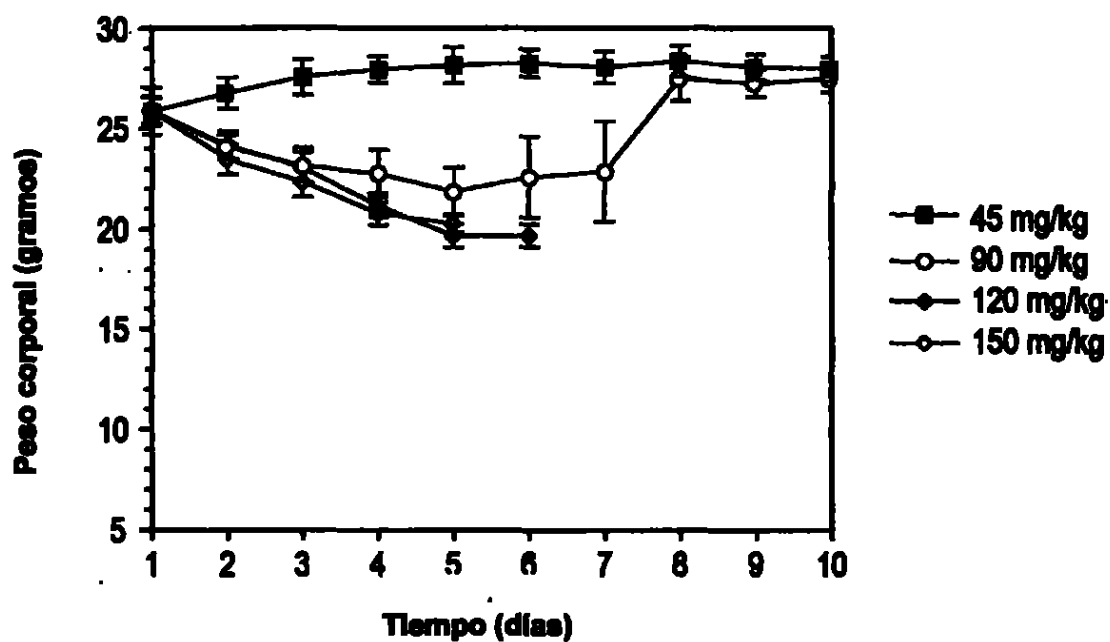
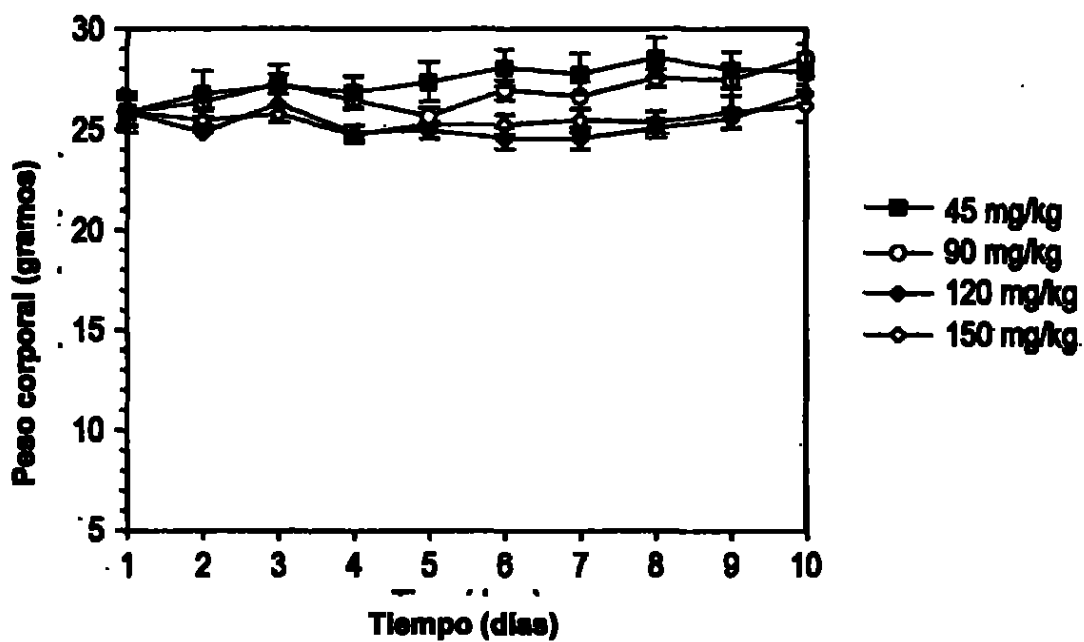


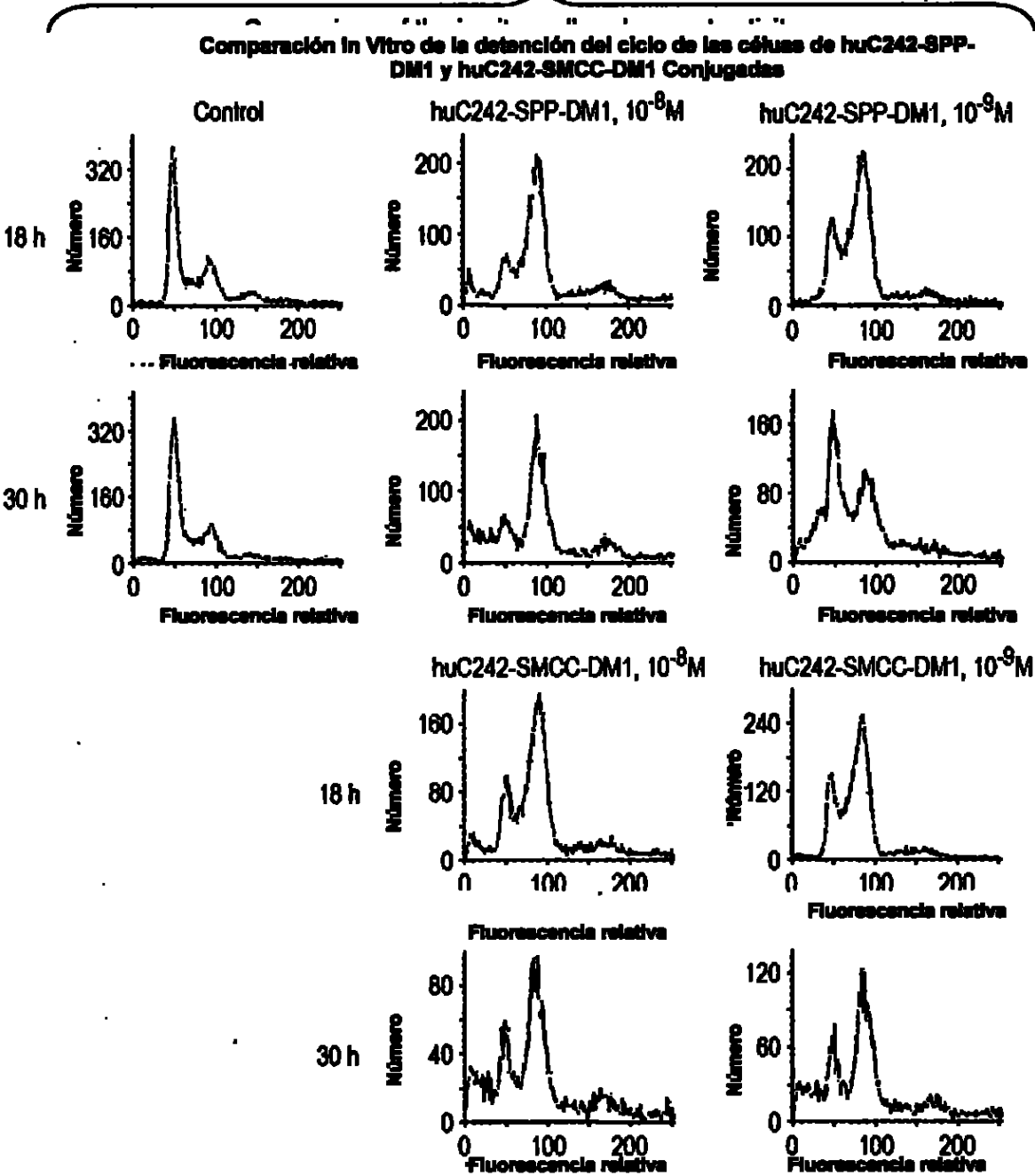
FIG. 12D

Peso corporal de los ratones CD-1
tratados con huC242-SPP-DM1



1540
315

FIG. 13



			Actividad de las células detenidas		Células muertas
Conjugar	Concentración	Línea de célula	18 horas	30 horas	30 horas
C242-SPP-DM1	1×10^{-8} M	Colo205	+++	+++	
	1×10^{-9} M	Colo205	+++	++	25%
C242-SMCC-DM1	1×10^{-8} M	Colo205	+++	+++	
	1×10^{-9} M	Colo205	+++	+++	33-37%

241
316

FIG. 14A

huC242-SPP-DM1 con COLO
205(Ag⁺) y células Namalwa (Ag⁻)

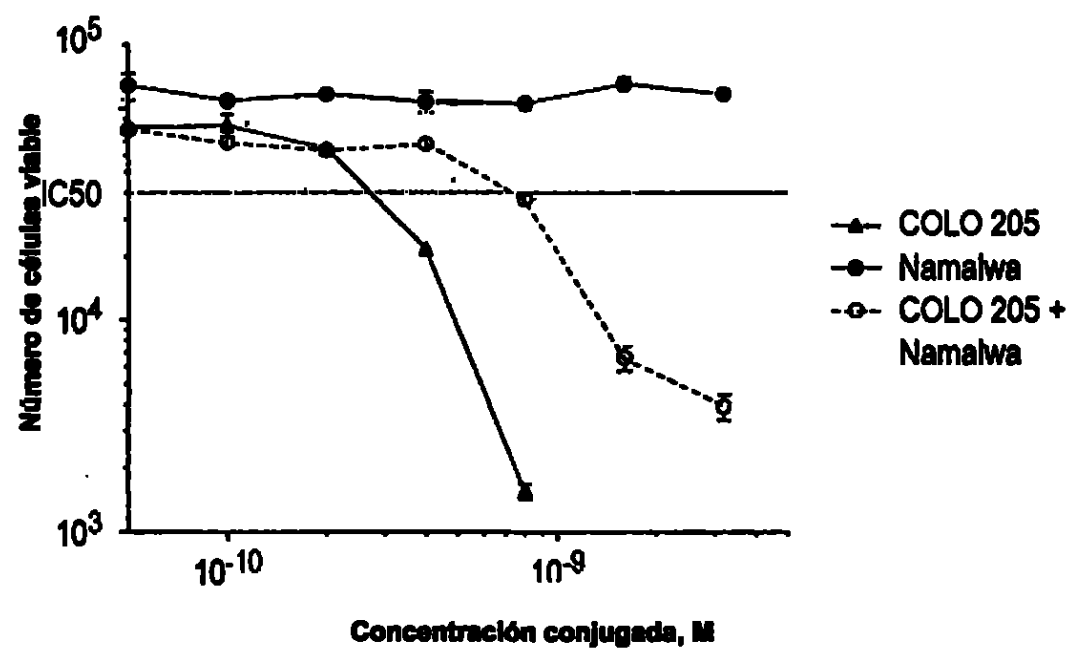
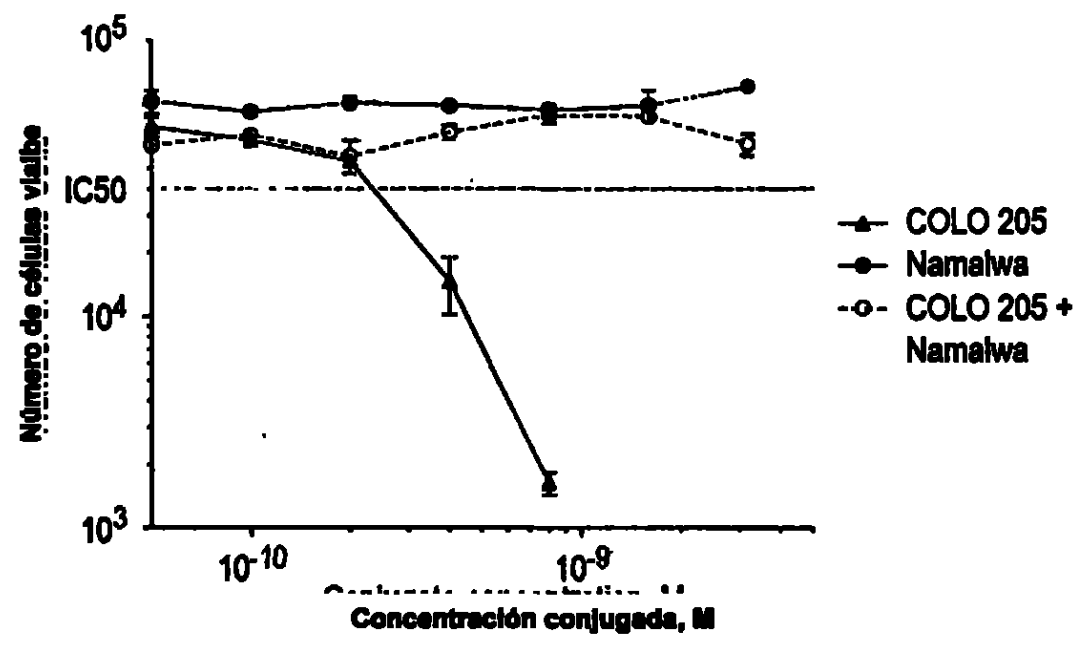


FIG. 14B

huC242-SPP-DM1 con COLO 205(Ag⁺) y
células Namalwa (Ag⁻)



142
317

FIG. 14C

Concentración de huC242 conjugados: 8×10^{-10} M

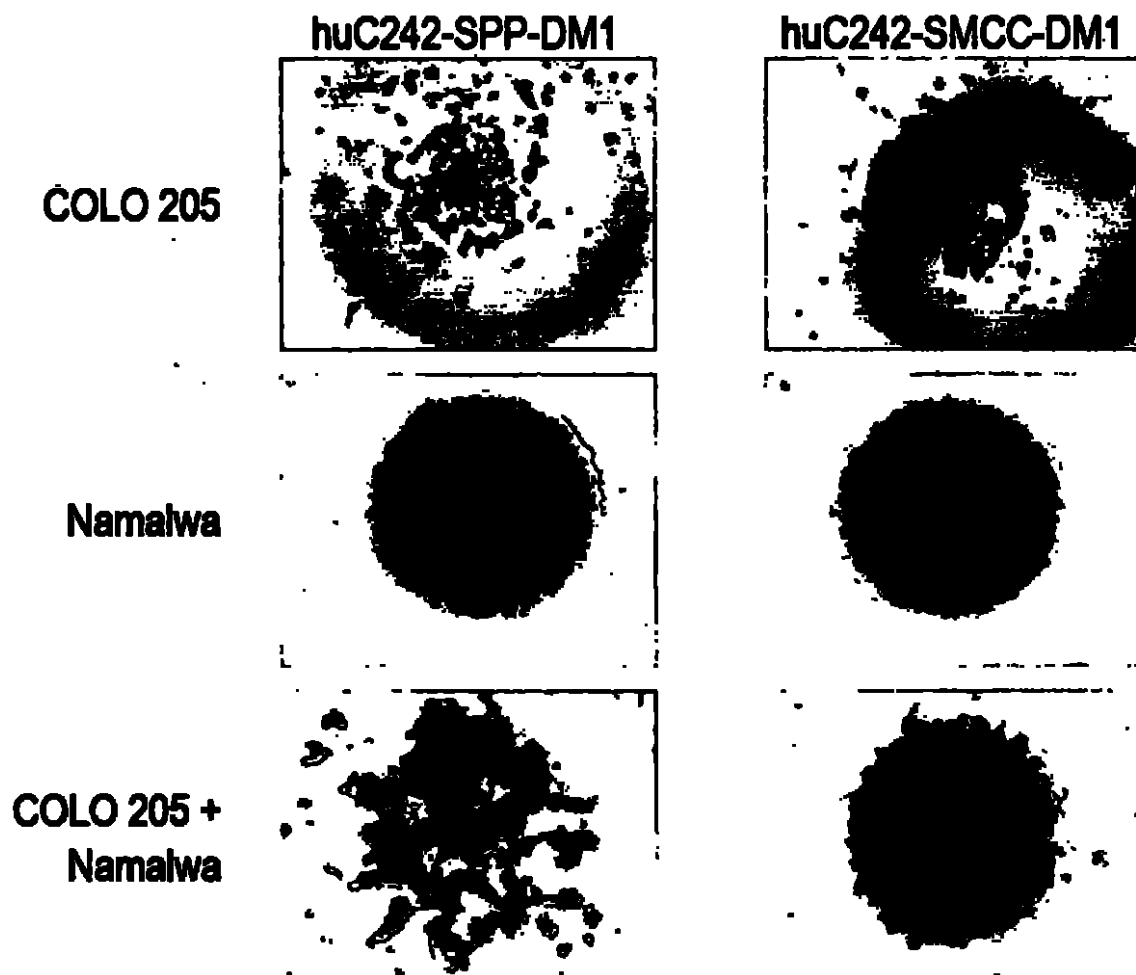
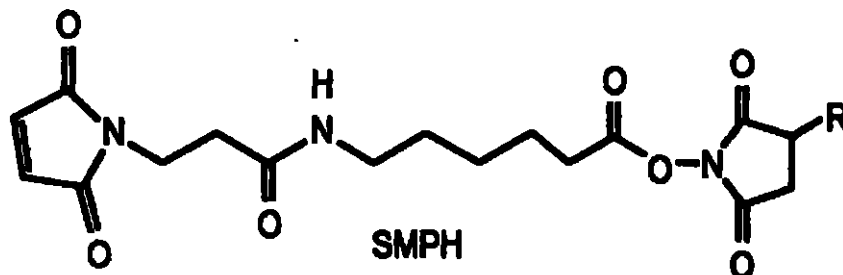
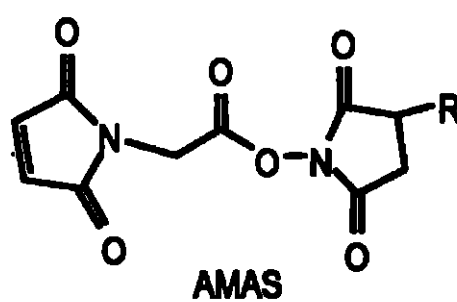
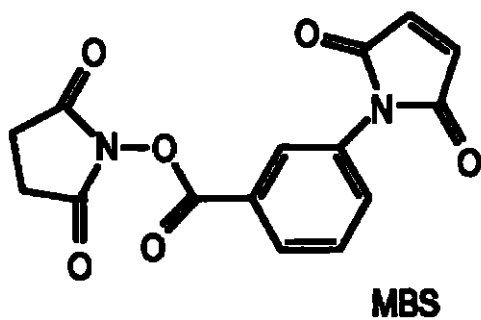
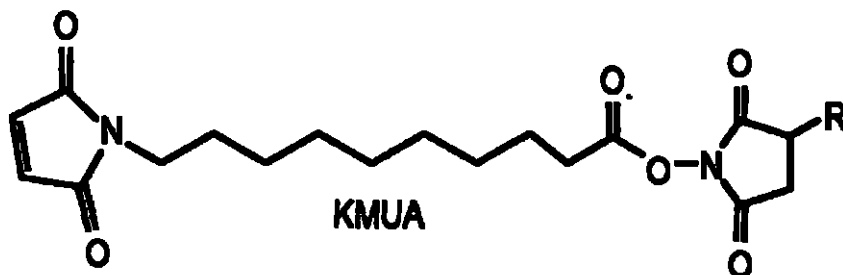
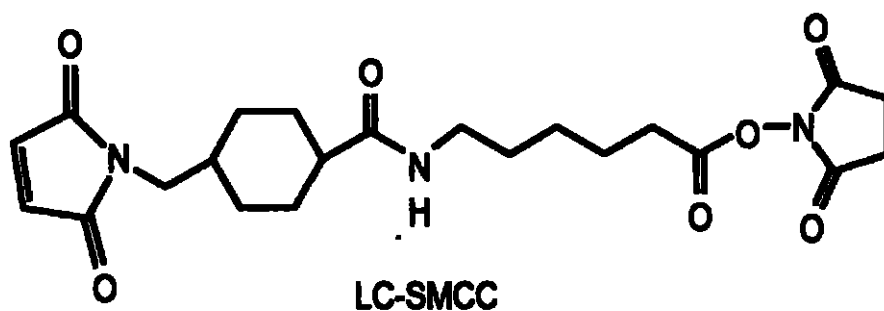
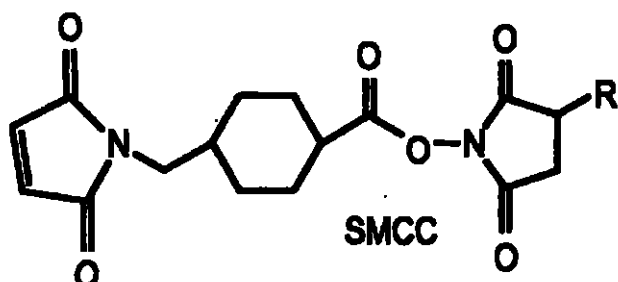


FIG. 15

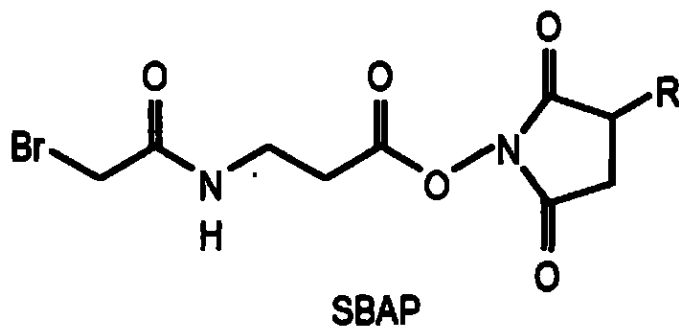
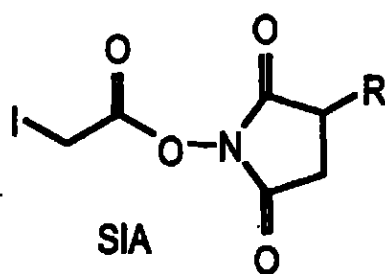
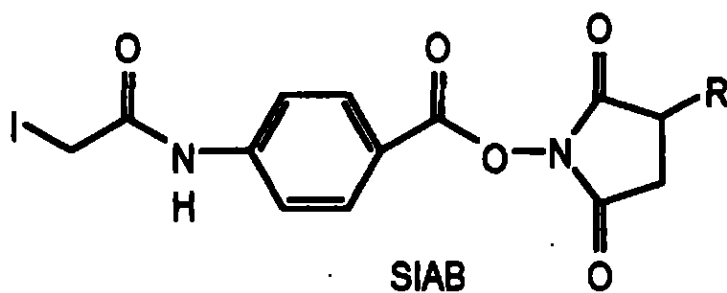
Estructuras representativas de los agentes maleimido basados en vínculos cruzados



En todos los casos R = H o SO₃⁻

FIG. 16

Estructuras representativas de los agentes haloacetil-basados en
vínculos cruzados

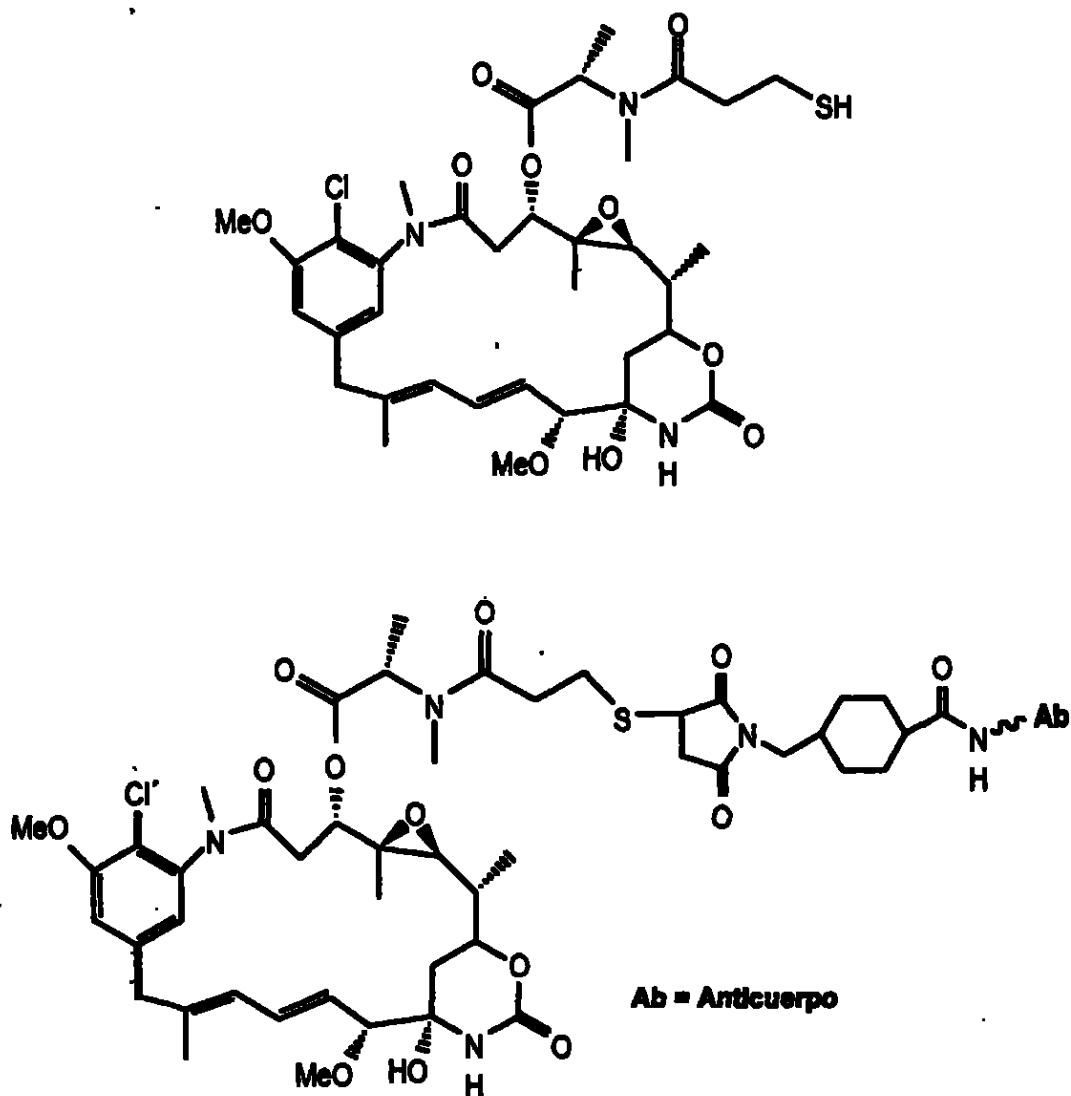


En todos los casos $\text{R} = \text{H}$ o SO_3^-

145
320

FIG. 17

Estructura de DM1 y anticuerpo-DM1,
conjugados desde anticuerpos maleimido-
derivatizados. Como un ejemplo fue utilizado el
reactivo en vínculos cruzados

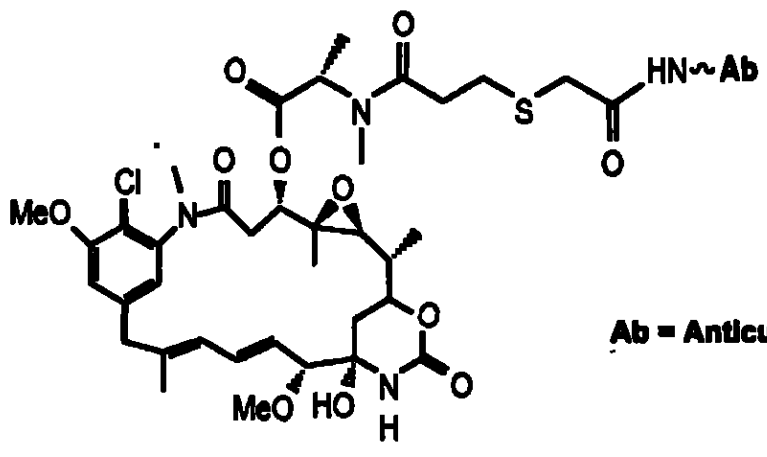
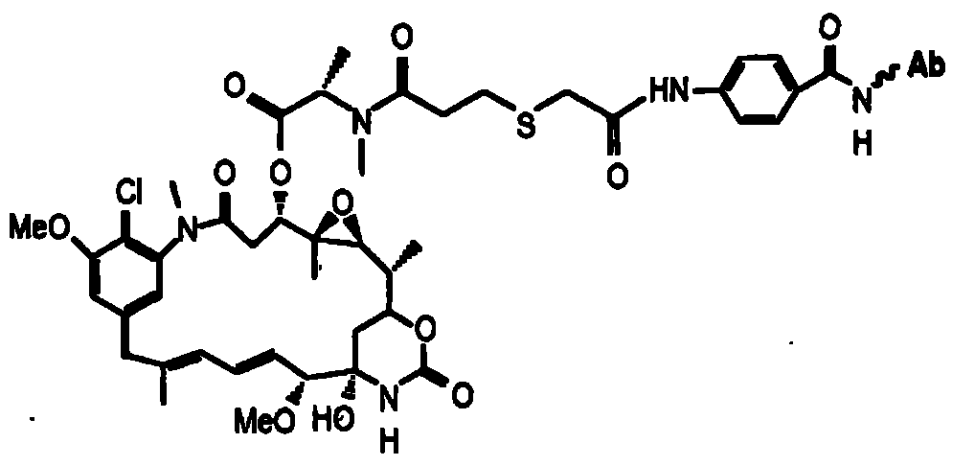


146
321

FIG. 18

Estructuras del anticuerpo-DM1 conjugados desde anticuerpos haloacetil-derivatizados.

Ejemplo utilizado del reactivo de vínculos cruzados de SIAB (Estructura superior) y el reactivo de SIA (Estructura inferior)

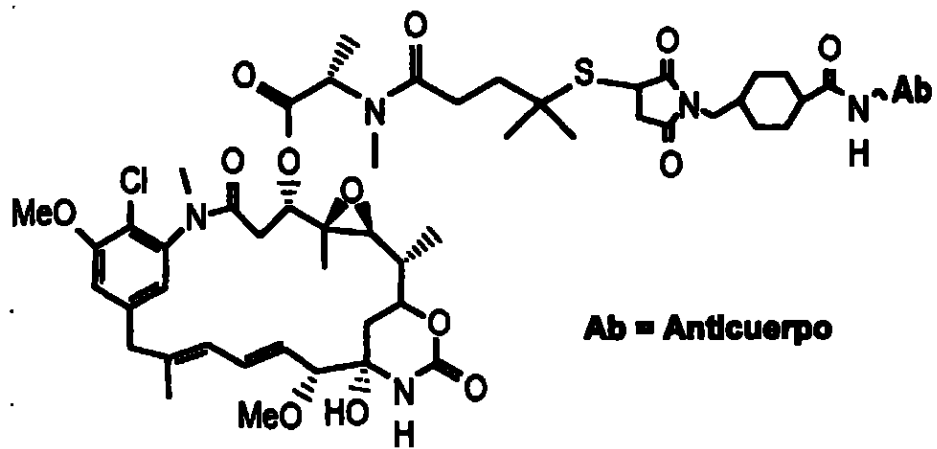
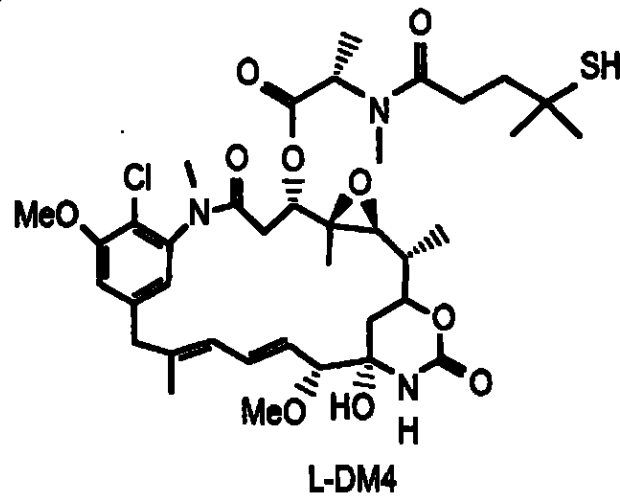


Ab = Anticuerpo

149
322

FIG. 19

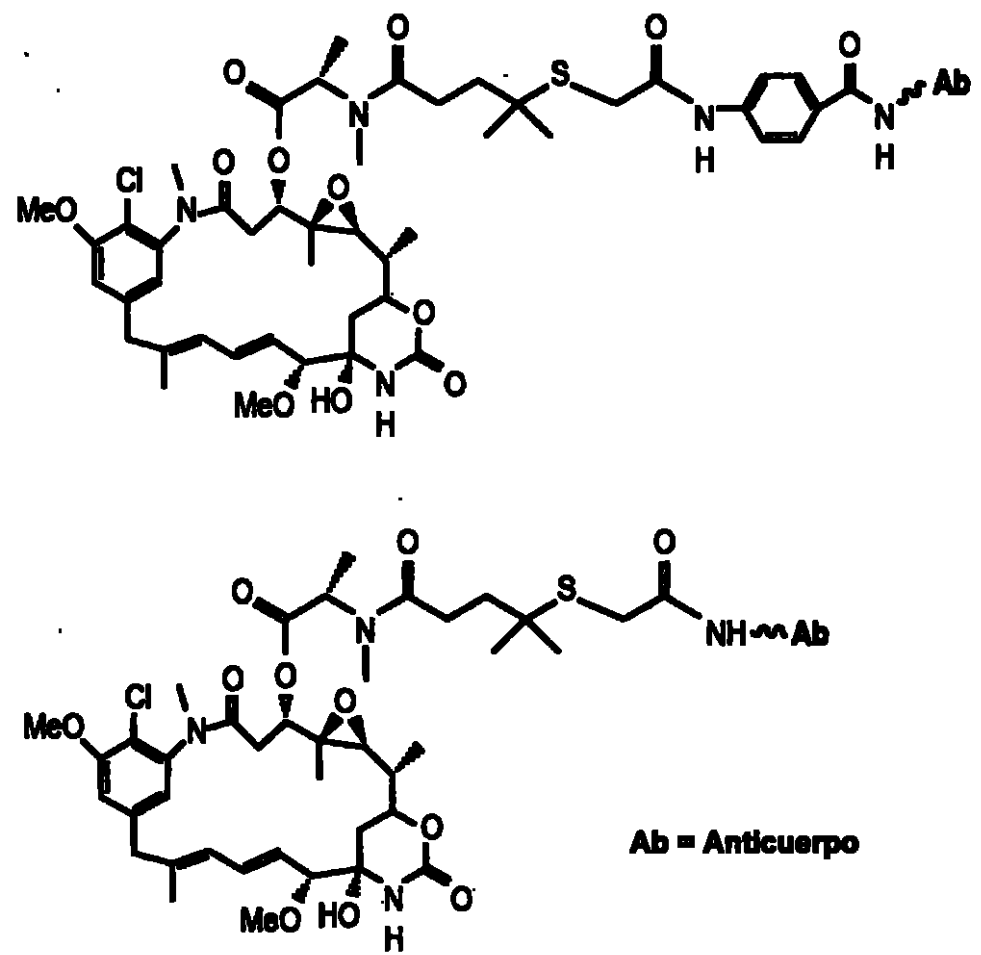
**Estructuras de DM4 y anticuerpo-DM4 conjugadas
derivadas desde anticuerpos maleimido-derivatizados.
Ejemplo Utilizado del reactivo de vínculos cruzados
SMCC**



Anticuerpo-DM4 Conjugado

FIG. 20

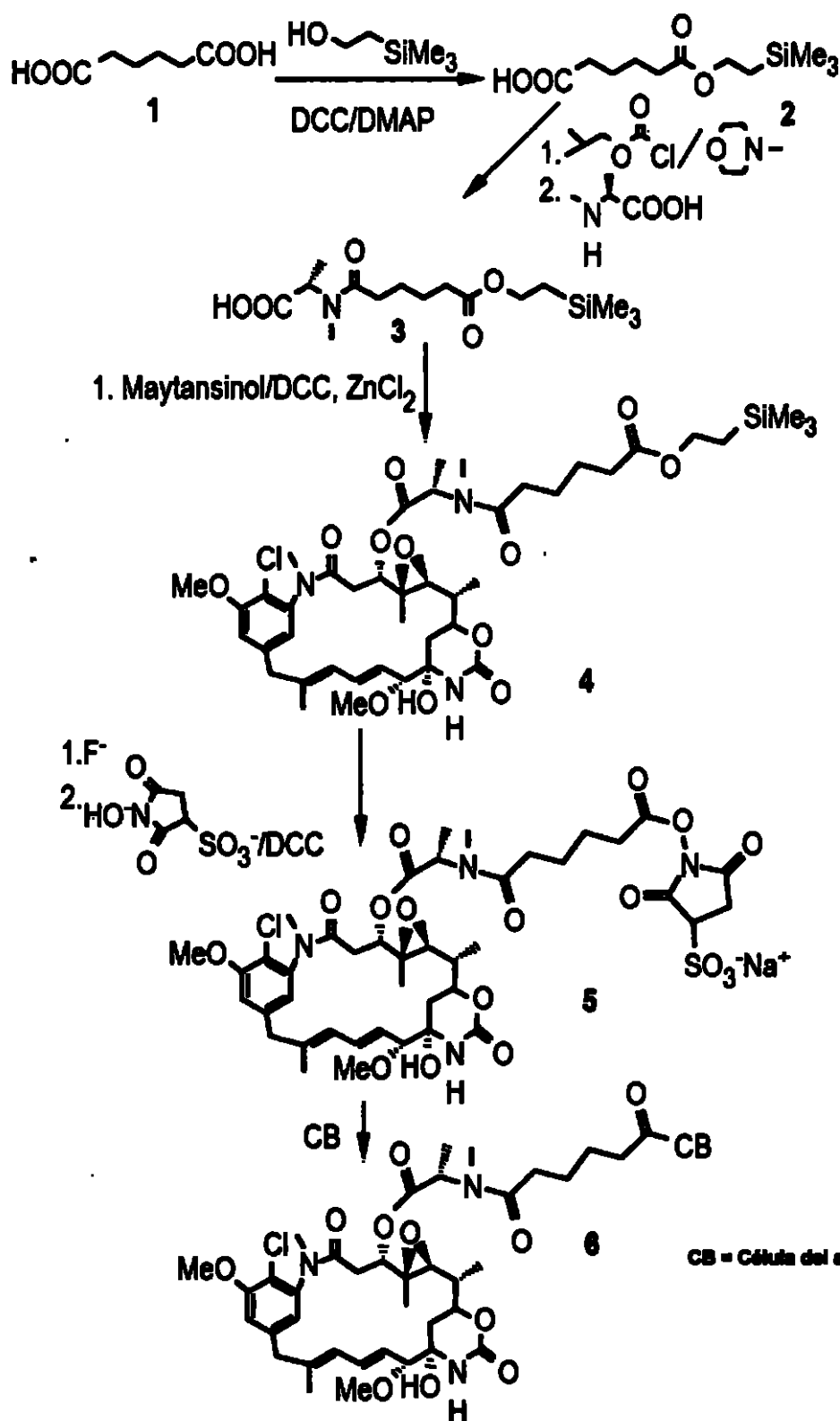
Estructuras del anticuerpo-DM4 conjugadas desde anticuerpos haloacetil-derivatizados.
Un ejemplo utilizado del reactivo de vínculos cruzados de SIAB (Estructura superior) y el reactivo de SIA (Estructura inferior)



49
324

FIG. 21

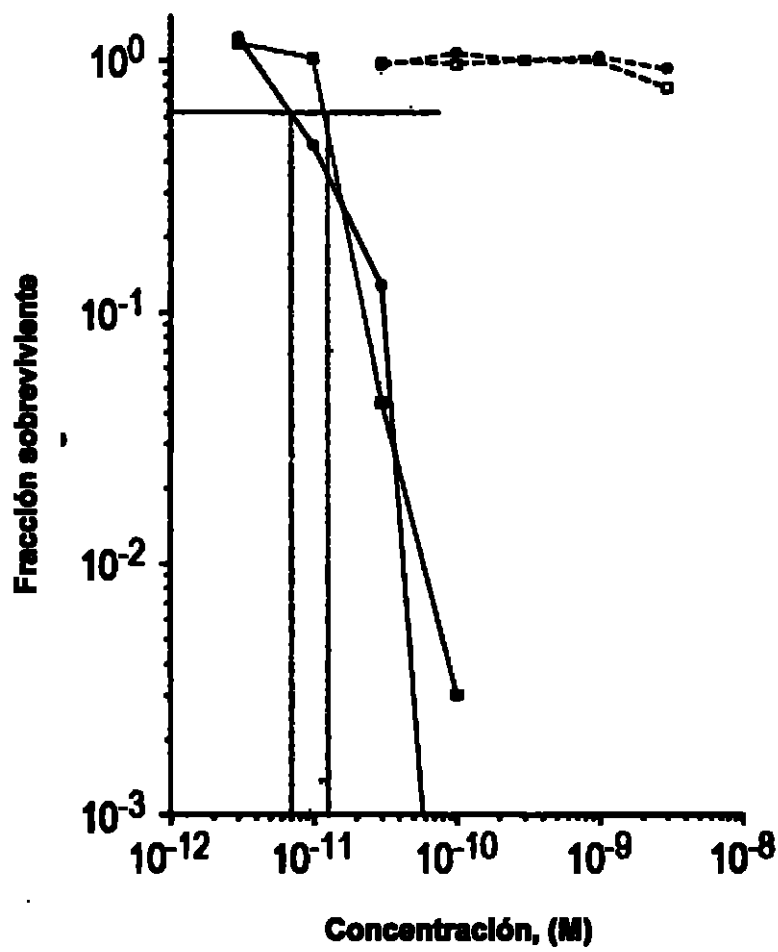
Enlazador no divisible de sulfuro



120
325

FIG. 22

Citotoxicidad de huC242 enlazador no divisible que no contiene S-DM1 y hC242-SMNP-DM3 vs. Células COLO 205 y análisis continuo de la exposición clonogénica

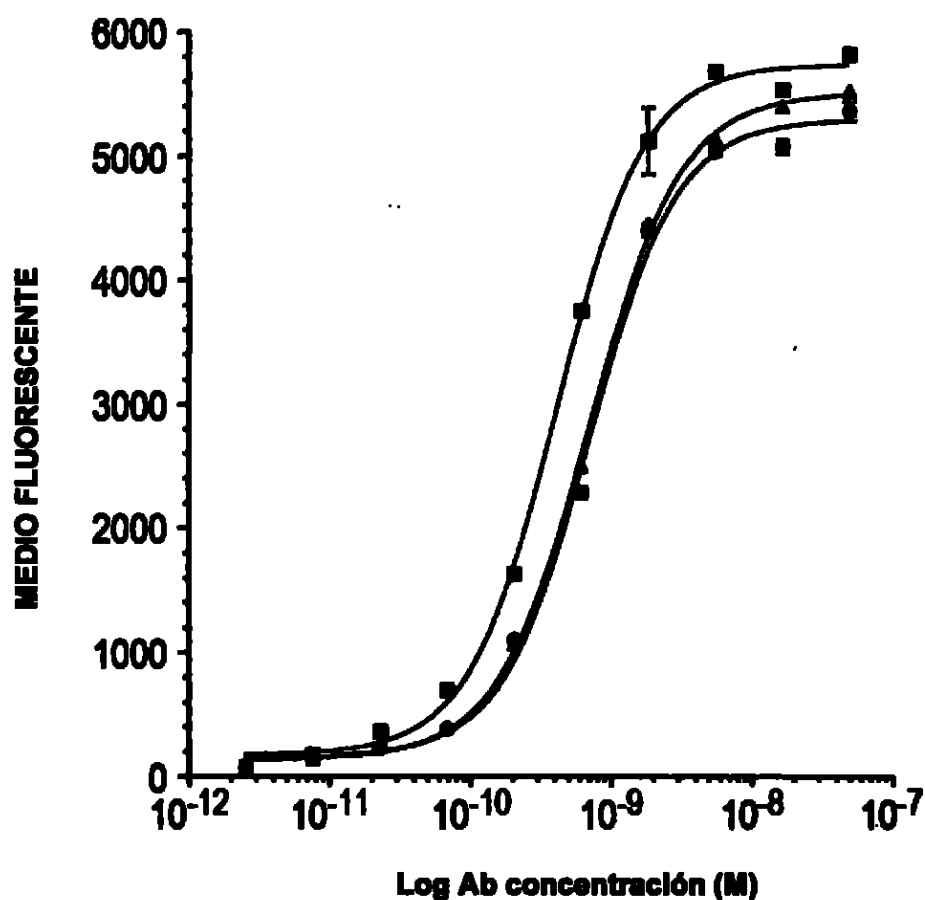


- huC242 no divisible que no contiene S-DM1 / COLO 205, $IC_{50} = 7.0 \times 10^{-12} \text{ M}$
- hC24-SMNP-DM3 / COLO 205, $IC_{50} = 1.3 \times 10^{-11} \text{ M}$
- huC242 no divisible que no contiene S-DM1/ A375, $IC_{50} > 3 \times 10^{-9} \text{ M}$
- hC24-SMNP-DM3 / A 375, $IC_{50} > 3 \times 10^{-9} \text{ M}$

101
326

FIG. 23

Ensayo del enlace FACS del enlazador DM1 no divisible que no contiene S y huC242-SMNP-DM3 a las células de COLO 205



—■— huC242
EC₅₀ = 4.12 x 10⁻¹⁰ M

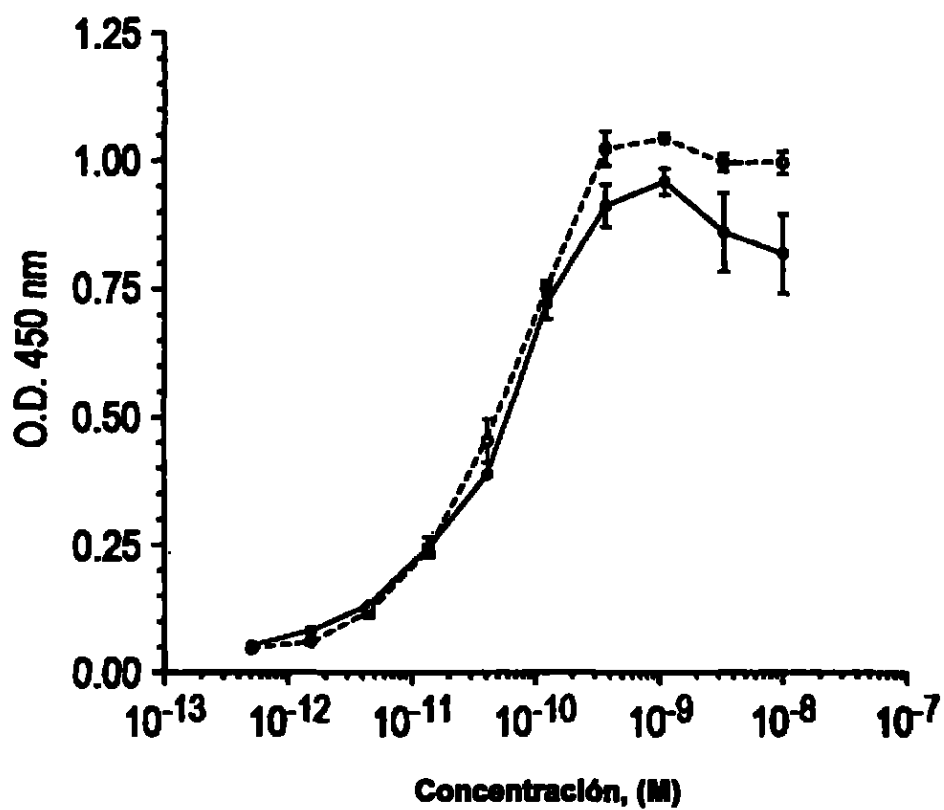
—▲— huC242 no divisible que no contiene S-DM1 EC₅₀ = 7.04 x 10⁻¹⁰ M

—●— huC242-SMNP-DM3
EC₅₀ = 7.08 x 10⁻¹⁰ M

122
32x

FIG. 24

ELISA: Enlace del anticuerpo
Trastuzumab-SMCC-DM1 y
Trastuzumab a las placas de ECD
revestidas de 0.3 ng/pozo



—●— Trastuzumab-DM1, $K_D = 5.5 \times 10^{-11}$ M
- -●- - Trastuzumab Ab, $K_D = 5.5 \times 10^{-11}$ M

FIG. 25

Citotoxicidad de Trastazumab-SMCC-DM1 vs. Células SKBR3 y A375
Análisis continuo de la exposición clonogénica

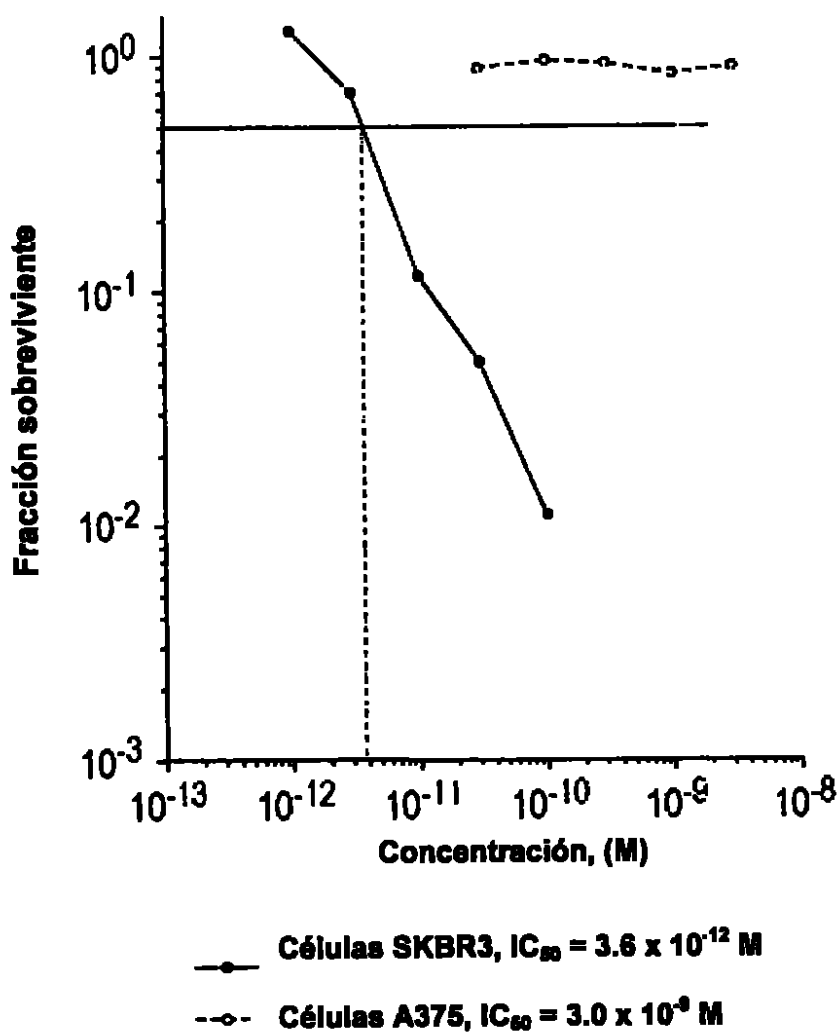


FIG. 26

Cromatografía de exclusión de tamaño para
Trastuzumab-SMCC-DM1

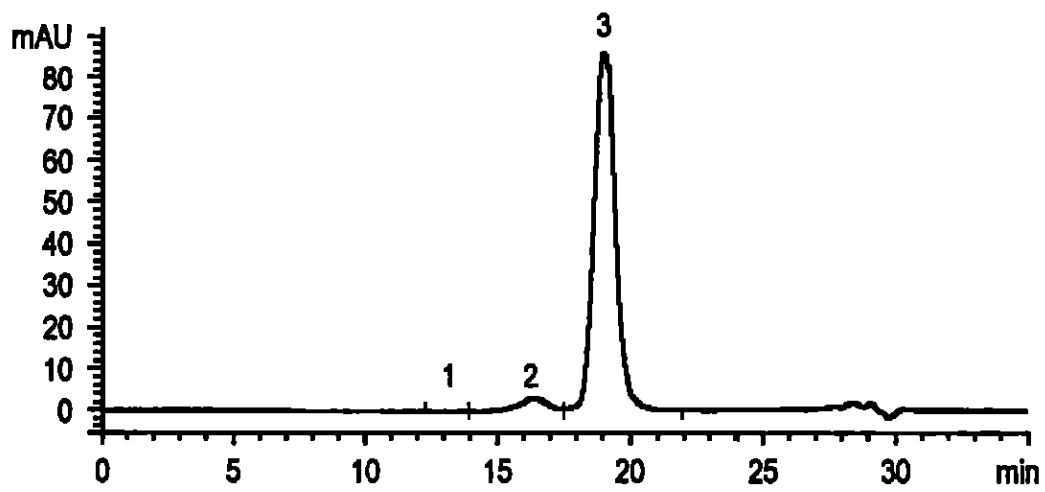
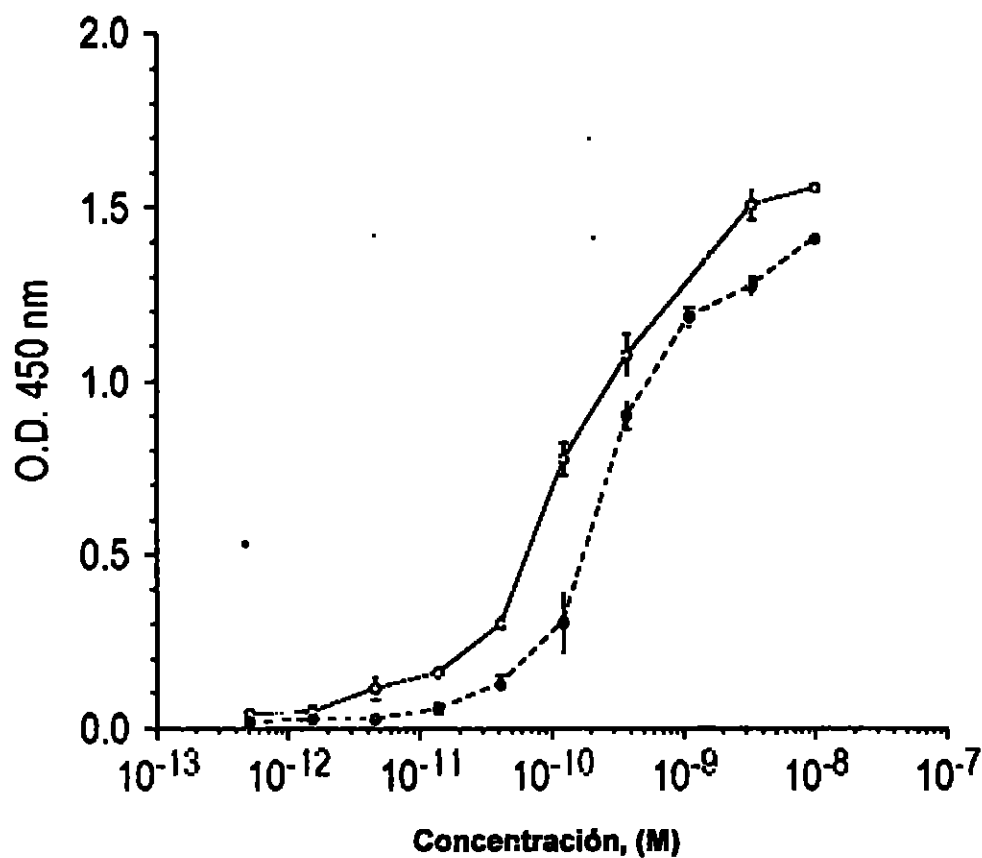


FIG. 27

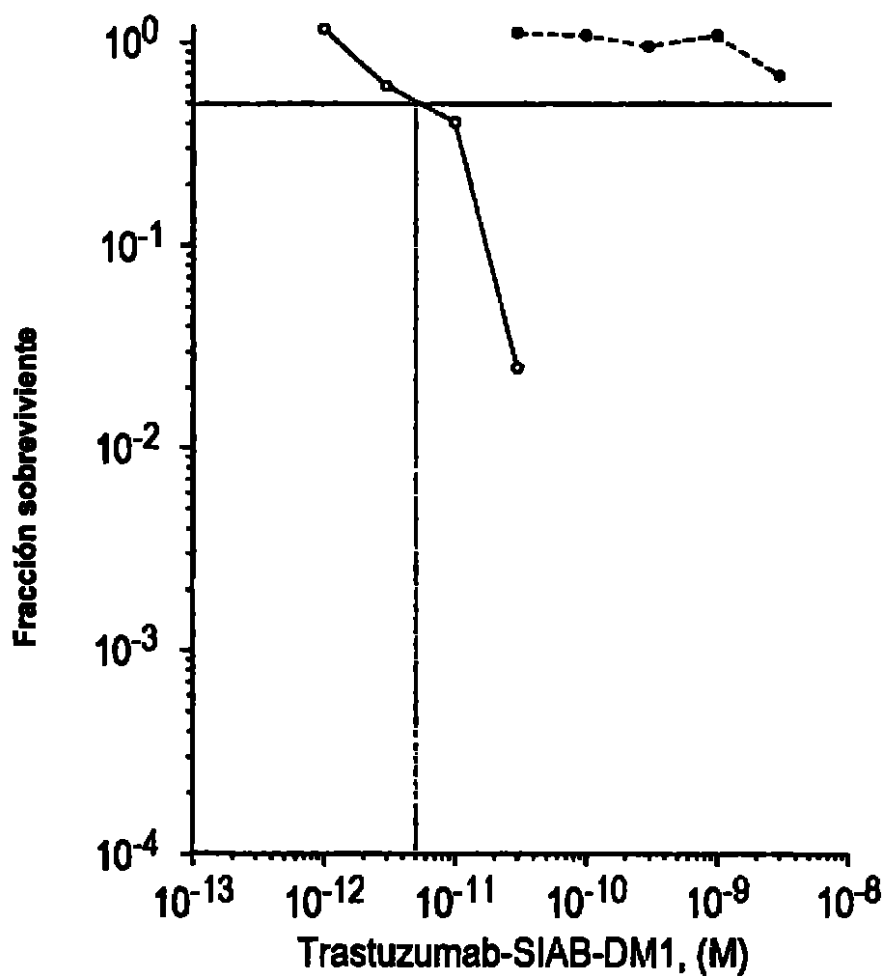
ELISA: Enlace del anticuerpo
Trastuzumab-SIAB-DM1 y
Trastuzumab a las placas de ECD
revestidas de 0.3 ng/pozo



••• Trastuzumab-SIAB-DM1, $K_D = 1.9 \times 10^{-10}$ M
—○— Trastuzumab Anticuerpo, $K_D = 1.2 \times 10^{-10}$ M

FIG. 28

Citotoxicidad de
Trastuzumab-SIAB-DM1 vs.
Células SKBR3 y A375
Análisis continuo de la
exposición clonogénica



—●— A375 células $IC_{50} = 5.0 \times 10^{-12}$ M
—○— SKBR3 células $IC_{50} = 3.0 \times 10^{-9}$ M

1.87
33A
332

FIG. 29

Cromatografía de la exclusión de tamaño para
Trastuzumab – SIAB-DM1

