

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-019768-B-00000-0000

Fecha: 2013-03-08 13:53:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 83

SOLICIT

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 08-019.768A

08-19768-B

54. TITULO: PROCESO PARA PREPARAR CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y MAYTANSINOIDE

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL A61K 47/48

71. SOLICITANTE: IMMUNOGEN, INC.

DOMICILIO: CAMBRIDGE, ESTADO DE MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. APODERADO DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.



**FORMULARIO ÚNICO DE S
PCT
ENTRADA EN FASE**

1) SOLICITUD I

☒ Patente de invención

☒ Capítulo I.

2) SOLICITANTE
(71)

Nombre: IMMUNOGEN, INC.

Dirección: 128 Sidney Street,
Cambridge, MA 02139 Estados
Unidos de América

Nacionalidad o domicilio:
Cambridge, MA, Estados Unidos de
América

Lugar de constitución: MA, Estados
Unidos de América

Teléfono: Fax:
E. Mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO Cual _____

3) REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6
Bogotá D.C.

Teléfono: 6181088 Fax: 6350824
E. Mail: info@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO: 41.654.882
TP: 20824 CSJ

4) INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER LISTA ADJUNTA
Dirección:
Nacionalidad o Domicilio:

5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/031653. Fecha: AGOSTO 14, 2006

Publicación Internacional No. WO2007/024536 A2 Fecha: Marzo 1, 2007

6) Título (54) PROCESO PARA PREPARAR CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y
MAYTANSINOIDE

7) Clasificación Internacional: A61K 47/48 // A61P 31/00

8) PRIORIDAD

33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de
Solicitud

SI ☒ NO ☐

Estados Unidos

Agosto 24, 2005

60/710,858

Estados Unidos

Mayo 4, 2006

60/797,713

9) Comprobante de pago N°. 08-12.362 de febrero 13 de 2008

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

PETI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-019768-00000-0000

Fecha: 2008-02-26 15:49:24 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 164

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-019768-B-00000-0000

Fecha: 2013-03-08 13:53:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 83

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión

- ☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

IMMUNOGEN, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal
Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139	CAMBRIDGE
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

RODRÍGUEZ D'ALEMAN DILIA MARÍA **C.C. 41.654.882** **20824 CSJ**
Apellidos y Nombre Documento de identificación Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia		Bogotá D.C.
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clarkemodet@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

000013

4. Datos del trámite

CONVERSION

Expediente _____

De: _____

A: _____

DIVISION

Expediente

08-019.768A

De: _____

A: _____

FUSION

Expediente _____

De: _____

A: _____

5. Comprobante de Pago No. **12-110877**Fecha **24 de Octubre de 2012**

6. Anexos



Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación

Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación

Número de documento que ordena la comisión o fusión o división

Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud

Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

Nombre y apellidos

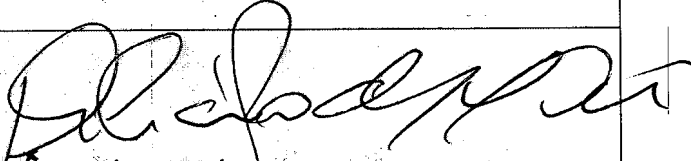
Firma

C.C. 41.654.882**Tarjeta Profesional 20824 CSJ**

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
--	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES 08-019.768A
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2006/031653	Fecha 14 de Agosto de 2006
Publicación Internacional No.		WO 2007/024536 A2	Fecha 1 de Marzo de 2007
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
Proceso para Preparar Conjugados de Anticuerpo y Maytansinoide			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61K 47/48		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
IMMUNOGEN, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139		No. TELÉFONO:	
CIUDAD: Cambridge		CORREO ELECTRONICO:	
PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estado de Massachusetts, Estados Unidos de América	
7	INVENTOR (ES) VER HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.			
2.			
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
1.			
2.			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
RODRÍGUEZ D'ALEMAN		DILIA MARÍA	C.C. 41.654.882 T.P.20824 CSJ
DIRECCIÓN	Carrera 11 No. 86-53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088
CIUDAD	Bogotá D.C.		CORREO ELECTRÓNICO clarkemodet@clarkemodet.com.co
PAÍS	Colombia		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1. Estados Unidos de América		US	60/710,858
2. Estados Unidos de América		US	60/797,713
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2005/08/24
			2006/05/04
			000015

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 12-110876 12-110882	Fecha 24/10/2012 24/10/2012
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DILÍA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción 2. ☒ Reivindicaciones 3. ☐ Dibujos y/o figuras 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.		9. ☐ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

ANEXO INVENTORES

- 1.) **YONG, Dai**
(15 Beechwood Circle, Northborough, Massachusetts 01532, Estados Unidos de América);
- 2.) **YONG, Wang**
(27 Pequot Road, Wayland, Massachusetts 01778, Estados Unidos de América);
- 3.) **SHENGJIN, Jin**
(415 Arlington Street, Acton, MA 01720, Estados Unidos de América);
- 4.) **DEBORAH H., Meshulam**
(32 James Street #6, Brookline, MA 02446, Estados Unidos de América);
- 5.) **GODFREY W., Amphlett**
(8 ½ Ash Street Place, Cambridge, MA 02138, Estados Unidos de América);

PROCESO PARA PREPARAR CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y
MAYTANSINOIDE

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] Esta invención pertenece a un proceso para preparar conjugados de sustancialmente alta pureza y estabilidad, en donde los conjugados comprenden un agente de enlace celular químicamente acoplado a un fármaco.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El tratamiento de cáncer ha progresado significativamente con el desarrollo de productos farmacéuticos que llegan más eficientemente a y matan a células cancerosas. Para este fin los investigadores han
15 tomado ventaja de receptores de superficie celular y antígenos expresados selectivamente por células de cáncer para desarrollar fármacos basados en anticuerpos que enlazan a antígenos específicos de tumor o asociados a tumor. A este respecto, moléculas citotóxicas tales como
20 bacterias y toxinas vegetales, radionucleótidos, y ciertos fármacos quimioterapéuticos han sido ligados químicamente a anticuerpos monoclonales que enlazan a antígenos de superficie celular asociados a tumor o específicos de tumor (ver, por ejemplo, las Solicitudes de Patentes
25 Internacionales WO 00/02587, WO 02/060955, y WO 02/092127, Patentes U. S. Nos. 5,475,092, 6,340,701, y 6,171,586, Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2003/0004210 A1, y Ghetie y colaboradores, J. Immunol. Methods, 112:267-

000017

277 (1988). Dichos compuestos son mencionados típicamente como toxina, radionucleótido, y "conjugados" de fármaco, respectivamente. A menudo también son mencionados como inmunoconjugados, radioinmunoconjugados, e inmunotoxinas.

5 La muerte de células tumorales tiene lugar a partir del enlace del conjugado de fármaco a una célula tumoral y liberación y/o activación de la actividad citotóxica del fármaco. La selectividad producida por conjugados de fármaco minimiza la toxicidad hacia células normales,
10 mejorando así la tolerancia del fármaco en el paciente.

[0003]Se han descrito previamente procesos para conjugar anticuerpos a agentes citotóxicos que contengan sulfhidrilo tales como maytansinoides (ver, por ejemplo las Patentes U.S. Nos 5,208,020, 5,416,064, y 6,441,163). Por
15 ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5,208,020 y 5,416,064 describen un proceso para fabricar conjugados de maytansinoide-anticuerpo en donde el anticuerpo es primero modificado con un reactivo heterobifuncional tal como se describe en las Patentes U.S. Nos. 4,149,003, 4,563,304 y
20 Publicación de Solicitud de Patente No. 2004/0241174 A1. Patentes U.S. 5,208,020 y 5,416,064 describen adicionalmente la conjugación de un anticuerpo modificado con un exceso de un agente citotóxico que contenga sulfhidrilo a pH de 7, seguido por purificación sobre
25 columnas para cromatografía Sephadex™ G25. La purificación de conjugados de anticuerpo-fármaco por cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) también se ha descrito (ver, por ejemplo, Liu y colaboradores, Procc. Natl. Acad. Sci.

000018

9
7

(USA), 93: 8618-8623 (1996), y Chari y colaboradores, Cancer Research, 52: 127-131 (1992)).

5 [0004] Los procesos que se han descrito previamente para la fabricación de los conjugados anticuerpo-fármaco son complejos porque están obstaculizados con etapas que son incómodas, para realizar o producir inmunoconjugados que son menos puros o menos estables que lo deseable óptimamente. Por ejemplo, la conjugación a un pH de entre 6.0 y 6.5 no es óptima para producir conjugados puros y 10 estables. Además, la reacción de conjugación bajo estas condiciones son generalmente lentas e ineficientes, conduciendo a un requerimiento de tiempo excesivo y consumo de material.

15 [0005] Sería deseable modificar o eliminar una o más etapas de fabricación sin comprometer la calidad del producto, tales como pureza y/o estabilidad. Sería deseable adicionalmente tener opciones de purificación adicional que las que han sido descritas hasta ahora en cuanto a algunas opciones serán más eficientes con ciertas combinaciones de 20 agentes de enlace celular, enlazadores, y fármacos, que con otros.

[0006] En vista de lo anterior, existe una necesidad en el arte para desarrollar métodos mejorados de preparar composiciones de conjugados de fármaco- agente de enlace 25 celular que son sustancialmente de alta pureza y al mismo tiempo tienen mayor estabilidad. La invención proporciona un método tal. Estas y otras ventajas de la invención, así como también aspectos adicionales de la invención, serán

000019

16
8

obvias a partir de la descripción de la invención proporcionada en la presente.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

5 [0007]La invención proporciona un proceso para
preparar un conjugado sustancialmente de alta pureza y
estabilidad que comprende un agente de enlace celular
químicamente acoplado a un fármaco. El proceso comprende
10 (a) poner en contacto un agente de enlace celular con un
reactivo de reticulación bifuncional para fijar
covalentemente un enlace al agente de enlace celular y
preparar así una primera mezcla que comprenda agentes de
enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos,
15 (b) someter la primera mezcla a filtración de flujo
tangencial, cromatografía por absorción, filtración por
adsorción, precipitación selectiva, o combinaciones de los
mismos, y preparar así una primera mezcla purificada de
agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a
éstos, (c)conjuguar un fármaco a los agentes de enlace
20 celular que tengan ligantes enlazados a éstos en la primera
mezcla purificada por reacción de los agentes de enlace
celular que tengan ligantes enlazados a los mismos con un
fármaco en una solución que tenga un pH de aproximadamente
4 a aproximadamente 9 para preparar una segunda mezcla que
25 comprenda (i)agente de enlace celular químicamente acoplado
a través del enlace al fármaco, (ii) sub-productos de
reacción, y (d) someter la segunda mezcla a filtración de
flujo tangencial, cromatografía de adsorción, filtración de

000000020

X
9

adsorción, precipitación selectiva, o combinaciones de los mismos para purificar los agentes de enlace celular químicamente acoplados a través de enlaces al fármaco desde otros componentes de la segunda mezcla y preparar así una
5 segunda mezcla purificada.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0008] La invención proporciona un proceso para preparar conjugados de fármaco-agente de enlace celular
10 sustancialmente de alta pureza y estabilidad. Dichas composiciones pueden ser usadas para tratar enfermedades a causa de la alta pureza y estabilidad de los conjugados. Composiciones que comprenden un agente de enlace celular, tal como un anticuerpo, químicamente acoplado a un fármaco,
15 tal como un maytansinóide, son descritos en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2004/0241174 A1. En este contexto, sustancialmente alta pureza se considera ser: (a) mayor que 90 %, preferiblemente mayor que 95 %, de especies conjugadas sean
20 monoméricas, y/o (b) el nivel de fármaco libre en la preparación del conjugado es de menos de 2 % (en relación al fármaco total).

[0009] A este respecto, el proceso de la invención comprende (a) modificar el agente de enlace celular con un
25 reactivo reticulador bifuncional para fijar covalentemente un ligante al agente de enlace celular y así preparar una primera mezcla que comprenda agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos, (b) someter la

000121

primera mezcla a filtración de flujo tangencial, cromatografía de adsorción, filtración de adsorción, precipitación selectiva, o combinaciones de los mismos, para purificar los agentes de enlace celular que tengan
5 ligantes enlazados a los mismos desde otros componentes de la primera mezcla y así preparar una primera mezcla purificada de agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos, (c)conjuguar un fármaco a los agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a
10 los mismos en la primera mezcla purificada haciendo reaccionar los agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos con el fármaco en una solución que tenga un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para preparar una segunda mezcla que
15 comprenda (i) agente de enlace celular químicamente acoplado a través del ligante al fármaco, (ii) fármaco libre, y (iii) sub-productos de reacción, y (d) someter la segunda mezcla a filtración de flujo tangencial, cromatografía de adsorción, filtración de adsorción,
20 precipitación selectiva, o combinación de los mismos, para remover los fármacos, reactantes y sub-productos no conjugados, así como también para obtener conjugados de fármaco - agente de enlace celular sustancialmente purificados. Opcionalmente, el proceso de la invención
25 comprende además detener la mezcla entre al menos uno de los pasos a-b, pasos b-c y/o los pasos c-d con el fin de liberar los ligantes enlazados inestablemente del agente de enlace celular.

000022

[0010] Preferiblemente, filtración de flujo tangencial (TFF, también conocido como filtración, ultrafiltración y diafiltración de flujo transversal), y/o resinas para cromatografía de adsorción son utilizados en las etapas de purificación. No obstante, cuando se usó TFF en la primera etapa de purificación (etapa b) en (etapa c), se usó una conjugación a pH de 6.0 - 6.5, y se utilizó una resina para cromatografía de adsorción en la segunda etapa de purificación (etapa d), se prefirió que la resina para cromatografía de adsorción no sea una resina de intercambio iónico. En otras modalidades preferidas, se utiliza TFF en ambas etapas de purificación, resinas para cromatografía de adsorción se utilizaron en ambas etapas de purificación. De manera alternativa, se utilizó una resina para cromatografía de adsorción en la primera etapa de purificación, y TFF se utilizó en la segunda etapa de purificación. Una combinación de TFF y de una resina para cromatografía de adsorción puede ser utilizada en la primera y/o en la segunda etapa de purificación también.

[0011] Pueden utilizarse cualquiera de los sistemas de TFF adecuados, incluyendo un sistema de tipo Pellicon (Millipore, Billerica, MA), un sistema de Cartucho Sartoclon (Sartorius AG, Edgewood, NY), y un sistema de tipo Centrasette (Pall Corp., East Hills, NY).

[0012] Puede utilizarse cualquier resina para cromatografía de adsorción. Las resinas para cromatografía de adsorción preferidas incluyen resinas para cromatografía de hidroxiapatita, cromatografía por inducción de carga

000023

hidrofóbica (HCIC), cromatografía por interacción
hidrofóbica (HIC), cromatografía por intercambio iónico,
cromatografía por intercambio iónico en modalidad de
mezcla, cromatografía por afinidad del metal inmovilizado
5 (IMAC), cromatografía de ligando teñido, cromatografía por
afinidad, cromatografía en fase inversa, y combinaciones de
las mismas. Ejemplos de resinas de hidroxapatita adecuadas
incluyen hidroxapatita cerámica (CHT de tipo I y de Tipo
II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), hidroxapatita HA
10 Ultragel (Pall Corp, East Hills, NY), y fluoroapatita
cerámica (CFT de Tipo I y de Tipo II (Bio-Rad Laboratories,
Hercules, CA). Un ejemplo de una resina de HCIC adecuada
es la resina MEP Hypercel (Pall Corp., East Hills, NY).
Ejemplos de resinas HIC adecuadas incluyen las resinas
15 Butyl-Sepharose, Hexyl-Sepharose, Phenyl-Sepharose, y Octyl
Sepharose (todas de GE HealthCare, Piscataway, NJ), así
como también las resinas Macro-Prep Methyl y Macro-Prep t-
Butyl (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Ejemplos de
resinas de intercambio iónico adecuadas incluyen resinas
20 SP-Sepharose, CM-Sepharose, y Q-Sepharose (todas de GE
HealthCare, Piscataway, NJ), y la resina Unosphere S (Bio-
Rad Laboratories, Hercules, CA). Ejemplos de
intercambiadores iónicos en la modalidad de mezcla
adecuadas incluyen la resina Bakerbond Abx (JT Baker,
25 Phillipsburg, NJ). Ejemplos de resinas IMAC adecuadas
incluyen la resina Chelating Sepharose (GE HealthCare,
Piscataway, NJ) y la resina Profinity IMAC (Bio-Rad
Laboratories, Hercules, CA). Ejemplos de resinas de ligando

000024

15
13

teñido adecuadas incluyen la resina Blue Sepharose (GE HealthCare, Piscataway, NJ) y la resina Affi-fel Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Ejemplos de resinas por afinidad adecuadas incluyen la resina Protein A Sepharose (por ejemplo, MabSelect, GE HealthCare, Piscataway, NJ), donde el agente de enlace celular es un anticuerpo, las resinas por afinidad de lectina, por ejemplo, la resina Lentil Lectin Sepharose (GE Health Care, Piscataway, NJ), donde el agente de enlace celular posee sitios de enlace de lectina apropiados. Alternativamente puede usarse un anticuerpo específico al agente de enlace celular. Un anticuerpo tal puede ser inmovilizado en, por ejemplo, la resina Sepharose 4 Fast Flow (GE HealthCare, Piscataway, NJ). Ejemplos de resinas para fase inversa adecuadas incluyen las resinas C4, C6, y C18 (Grace Vydac, Hesperia, CA).

[0013] De conformidad con el método de la invención, se produce una primera mezcla que comprenda un agente de enlace celular que tenga ligantes enlazados al mismo, así como también reactantes y otros sub-productos. La purificación del agente de enlace celular modificado a partir de reactantes y sub-productos se lleva a cabo sometiendo la primera mezcla a un proceso de purificación. A este respecto, la primera mezcla puede ser purificada usando filtración de flujo tangencial (TFF), por ejemplo proceso de filtración de flujo tangencial basado en membrana, cromatografía de adsorción, filtración por adsorción, o precipitación selectiva, o cualquier otro

000025
0000

14

proceso de purificación adecuado, así como también combinaciones de los mismos. Esta primera etapa de purificación proporciona una primera mezcla purificada, es decir una concentración creciente del agente de enlace celular que tenga ligantes enlazados al mismo y una cantidad decreciente del reactivo reticulador bifuncional sin enlazar, en comparación con la primera mezcla antes de purificación de conformidad con la invención.

[0014] Después de purificación de la primera mezcla para obtener una primera mezcla purificada de agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos, un fármaco es conjugado a los agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos en la primera mezcla purificada por reacción de los agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos con un fármaco en una solución que tenga un pH desde aproximadamente 4 a aproximadamente 9, después de lo cual se produce una segunda mezcla que comprende (i) el agente de enlace celular químicamente acoplado a través del ligante al fármaco, (ii) fármaco libre, y (iii) sub-productos de reacción. Mientras que la reacción de conjugación es efectuada a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9, la reacción se efectúa preferiblemente a un pH de aproximadamente 6 o menos o a pH de aproximadamente 6.5 o mayor, más preferiblemente a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 o a un pH de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9, y especialmente a un pH de 4 a menos de 6 o a un pH mayor que 6.5 a 9. Cuando la etapa de

000026

17
15

conjugación es efectuada a un pH de aproximadamente 6.5 o más, algunos fármacos que contienen sulfhidrilo pueden tener tendencia a dimerizar por medio de la formación de enlaces disulfuro. Puede requerirse, la remoción de huellas de metales y/o de oxígeno a partir de la mezcla de reacción, así como también adición opcional de antioxidantes o el uso de ligantes con más grupos desplazables reactivos, o adición de fármaco en más de una alícuota, para permitir la reacción eficiente en una situación tal.

[0015]Opcionalmente, la purificación del agente de enlace celular modificado puede ser omitida. En una situación tal, el fármaco puede ser añadido simultáneamente con el reactivo reticulador o al mismo tiempo, por ejemplo 1, 2, 3, o más horas después de adición del reactivo reticulador al agente de enlace celular.

[0016]El método de la invención puede incluir opcionalmente la adición de sacarosa en la etapa de conjugación, usada en el método de la invención para incrementar la solubilidad y la recuperación de conjugados de fármaco-agente de enlace celular. Deseablemente, la sacarosa es añadida a una concentración de aproximadamente 0.1 % (peso/volumen) a aproximadamente 20 % (peso/volumen) (por ejemplo, aproximadamente 0.1 % (peso/volumen), aproximadamente 5 % (peso/volumen) aproximadamente 10 % (peso/volumen) aproximadamente 15 % (peso/volumen), o aproximadamente 20 % (peso/volumen)). Preferiblemente, la sacarosa es añadida a una concentración de aproximadamente

000027

1 % (peso/volumen) a aproximadamente 10 % (peso/volumen) (por ejemplo, aproximadamente 2 % (peso/volumen), aproximadamente 4 % (peso/volumen), aproximadamente 6 % (peso/volumen) o aproximadamente 8 % (peso/volumen). Además
5 la reacción de conjugación también puede comprender la adición de un agente regulador. Cualquier agente regulador adecuado conocido en el arte puede ser usado. Los agentes reguladores adecuados incluyen, por ejemplo, un regulador de citrato, un regulador de acetato, un regulador de
10 succinato, y un regulador de fosfato.

[0017] Después de la etapa de conjugación, la segunda mezcla es sometida a una etapa de purificación. A este respecto, la segunda mezcla puede ser purificada usando filtración de flujo tangencial (TFF), por ejemplo un
15 proceso de filtración de flujo tangencial basado en membrana, cromatografía de adsorción, filtración de adsorción, precipitación selectiva, o cualquier otro proceso de purificación adecuado, así como también combinaciones de los mismos, los cuales se exponen en la
20 presente. Esta segunda etapa de purificación proporciona una segunda mezcla purificada, es decir, una concentración creciente del agente de enlace celular químicamente acoplado a través de los ligantes al fármaco y una cantidad decreciente de uno o más componentes diferentes de la
25 segunda mezcla, en comparación con la segunda mezcla antes de purificación de conformidad con la invención.

[0018] El proceso de la invención opcionalmente además comprende una etapa de detención después de la modificación

19
1x

del agente de enlace celular con un agente reticulante bifuncional. La etapa de detención comprenden mantener la solución a una temperatura adecuada por un periodo de tiempo para liberar los ligantes enlazados inestablemente del agente de enlace celular mientras que no se liberan sustancialmente los ligantes enlazados establemente del agente de enlace celular. De manera deseable, el paso de detención comprende mantener la solución a una temperatura de aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 8°C por un periodo de al menos alrededor de 12 horas por hasta 30 días o más. Alternativamente, la duración del paso de detención puede ser sustancialmente reducida mediante la realización del paso de detención a temperatura elevada, con la temperatura máxima limitada por la estabilidad del conjugado agente de enlace celular-fármaco. Por ejemplo, para un conjugado anticuerpo-fármaco, el paso de detención puede ser realizado en hasta aproximadamente 37°C por hasta aproximadamente cuatro semanas, de preferencia, entre dos a cuatro semanas, incluso más preferiblemente, entre una y dos semanas y más de preferencia por aproximadamente una semana o menos (por ejemplo, 2 horas hasta aproximadamente seis días). Los valores preferidos de pH para la etapa de detención oscilan desde aproximadamente 6 a 10. Valores de pH más preferidos se encuentran entre aproximadamente 6.5 y 8.5. De preferencia, el paso de detención comprende incubar la mezcla que comprende el agente de enlace celular modificado a 4°C a un pH de 6.5 por al menos aproximadamente 12 horas hasta 4 semanas. Más de

000029

preferencia, el paso de detención comprende incubar la mezcla que comprende el agente de enlace celular en un intervalo entre 20 y 30°C a un pH de aproximadamente 6.5 por aproximadamente 12 horas hasta alrededor de 1 semana.

5 El paso de detención puede ser realizado antes o después de que el agente de enlace celular es conjugado al fármaco. Preferiblemente, el paso de detención es realizado directamente después de la modificación del agente de enlace celular con el reactivo reticulante bifuncional.

10 [0019] En una modalidad, la duración del paso de detención puede ser sustancialmente reducida mediante la adición de nucleófilos. Los nucleófilos pueden ser agregados durante el paso de conjugación y el paso de detención puede ser realizado de manera simultánea con la

15 conjugación. En el contexto de la invención, los nucleófilos son partes químicas que pueden reaccionar con grupos éster e imidazolidas sobre los agentes de enlace celular en soluciones acuosas. Son conocidos en el arte adecuados nucleófilos e incluyen, por ejemplo, aminas

20 primarias, es decir, RNH_2 , donde R es un grupo alquilo o aromático; o aminas secundarias, es decir, $RR'NH$, donde R y R' son grupos alquilo o aromático. También las aminas pueden ser aminoácidos, péptidos que contienen aminoácidos de lisina, péptidos que contienen grupos alfa-amino o

25 grupos amino secundarios no naturales, o aminas solubles en agua. Los nucleófilos pueden estar en solución, in un estado polimérico, o en una forma inmovilizada como un reactivo en fase sólida. Ejemplos de nucleófilos

adecuados en solución incluyen, pero no están limitados a glicilglicina, glicina, taurina (2-aminoetansulfonato de sodio), etanolamina, dietanolamina, lisina, hidroxilamina, hidracina, imidazol, histidina, etilamina, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propan-diol y 4-amino-1-butanol. Las concentraciones adecuadas de nucleófilos solubles oscilan desde aproximadamente 0.1 mM hasta el límite de solubilidad para el nucleófilo particular. Ejemplos de nucleófilos en un estado polimérico, incluye pero no se limita a poli(etilenimina), poli-lisina y péptidos con aminoácidos de lisina y péptidos que contienen grupos alfa-amino o grupos amino secundarios no naturales. Ejemplos de nucleófilos en forma inmovilizada como un reactivo de fase sólida incluye, pero no se limita a aminas ligadas a fase sólida, tal como EAH Sefarosa 4B y perlas de aminometilpoliestireno. Para nucleófilos de fase sólida, la cantidad molar de amina en fase sólida debe estar en exceso sobre la cantidad del reticulante enlazado al agente de enlace celular.

20

[0020]El agente de enlace celular puede ser cualquier agente adecuado que enlace a una célula, típicamente y preferiblemente una célula animal (por ejemplo, una célula humana). El agente de enlace celular preferiblemente es un péptido o un polipéptido. Los agentes de enlace celular adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos), linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas

25

000931

22
10

de transporte de nutrientes (por ejemplo, transferrina), y cualquier otro agente o molécula que específicamente enlace a una molécula objetivo sobre la superficie de una célula.

5 [0021]El término "anticuerpo", como se usa en la presente, se refiere a cualquier inmunoglobulina, cualquier
fragmento de inmunoglobulina, tal como Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, diacuerpos, y triacuerpos, o inmunoglobulinas
quimeras, las cuales pueden enlazar a un antígeno sobre la
superficie de una célula (por ejemplo, que contenga una
10 región determinante de complementaridad (CDR)). Puede usarse cualquier anticuerpo adecuado como el agente de enlace celular. Un experto en el arte apreciará que la selección de un anticuerpo adecuado dependerá de la población celular a ser considerada. A este respecto, el
15 tipo y número de moléculas de superficie celular (es decir, antígenos) que son selectivamente expresados en una población celular particular (típica y preferiblemente una población celular enferma), gobernará la selección de un anticuerpo apropiado para uso en la composición de la
20 invención. Perfiles de expresión en superficie celular son conocidos para una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo tipos celulares tumorales, o, si no se sabe, puede ser determinado usando técnicas de biología molecular e histoquímica de rutina.

25 [0022]El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, pero más preferiblemente es un anticuerpo monoclonal. Como se usa en la presente, anticuerpos "policlonales", se refieren a poblaciones heterogéneas de moléculas de

000032

anticuerpos, típicamente contenidas en el suero de animales inmunizados. Anticuerpos "monoclonales", se refieren a poblaciones homogéneas de moléculas de anticuerpos que son específicas para un antígeno particular. Los anticuerpos monoclonales son producidos típicamente por medio de un solo clon de linfocitos B ("células B"). Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse usando una variedad de técnicas conocidas por los expertos en el arte, incluyendo la tecnología estándar del hibridoma (ver, por ejemplo, Khöler & Milstein, Eur J. Immunol., 5: 511-519 (1976), Harlow y Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CHS Press (1988), y C.A. Janeway y colaboradores (eds.), Immunobiology, 5ª. Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). En resumen, el método del hibridoma de producir anticuerpos monoclonales típicamente involucra inyectar a cualquier animal adecuado, típica y preferiblemente un ratón, con un antígeno (es decir, un inmunógeno). El animal es sacrificado subsecuentemente, y células B aisladas de su bazo son fusionadas con células de mieloma humano. Se produce una célula híbrida (es decir, un "hibridoma"), el cual prolifera indefinidamente y consecuentemente secreta títulos altos de un anticuerpo con la especificidad deseada *in vitro*. Puede usarse cualquier método adecuado conocido en el arte para identificar células hibridoma que producen un anticuerpo con la especificidad deseada. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, el ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), análisis por tinción Western, y radioinmunoensayo.

000033

24
22

La población de hibridomas es cribada para aislar clones individuales, cada uno de los cuales secreta una sola especie de anticuerpo al antígeno. Porque cada hibridoma es un clon derivado de la fusión con una sola célula B, todas las moléculas del anticuerpo producidas son idénticas en estructura, incluyendo su sitio de enlace antigénico e isotipo. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser generados usando otras técnicas adecuadas incluyendo la tecnología del hibridoma-EBV (ver, por ejemplo, Haskard y Archer, J. Immunol. Methods, 74(2):361-67 (1984), y Roder y colaboradores, Methods Enzymol., 121: 140-67 (1986)), sistemas de expresión en vector bacteriófago (ver, por ejemplo, Huse y colaboradores, Science, 246:1275-81 (1989)), o bibliotecas de exposición de fago que comprenden fragmentos de anticuerpo, tales como Fab y scFv (región variable de cadena única) (ver, por ejemplo, las Patentes U.S. 5,885,793 y 5,969,108, y las Solicitudes de Patentes Internacionales Nos. WO 92/01047 y WO 99/06587).

[0023] El anticuerpo monoclonal puede ser aislado a partir de o producido en cualquier animal adecuado, pero es preferiblemente producido en un mamífero, más preferiblemente un ratón o humano, y más preferiblemente un humano. Métodos para producir un anticuerpo en ratón son conocidos por los expertos en el arte y se describen en la presente. Con respecto a anticuerpos humanos, un experto en el arte apreciará que pueden aislarse anticuerpos policlonales del suero de sujetos humanos vacunados o inmunizados con un antígeno apropiado. Alternativamente,

000034

25
27

los anticuerpos humanos pueden ser generados adaptando técnicas conocidas para producir anticuerpos humanos en animales no humanos tales como ratones (ver, por ejemplo, las Patentes U.S. 5,545,806, 5,569,825, y 5,714,352, y la
5 Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2002/0197266 A1).

[0024]Mientras que sea la selección ideal para aplicaciones terapéuticas en humanos, anticuerpos humanos, particularmente anticuerpos monoclonales humanos,
10 típicamente son más difíciles de generar que anticuerpos monoclonales de ratón. Los anticuerpos monoclonales de ratón, no obstante, inducen una respuesta rápida del huésped cuando se administra a humanos, lo cual puede reducir el potencial terapéutico y de diagnóstico del
15 conjugado fármaco-anticuerpo. Para eliminar estas complicaciones, un anticuerpo monoclonal, preferiblemente no es reconocido como "extraño" por el sistema inmune humano.

[0025]Para este fin, puede usarse la exposición del
20 fago para generar el anticuerpo. A este respecto, bibliotecas de fago que codifican a dominios variables (V) de enlace antigénico de anticuerpos pueden ser generadas usando técnicas de ADN recombinante y de biología molecular estándar (ver, por ejemplo, Sambrook y colaboradores
25 (eds.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). El fago que codifica a una región variable con la especificidad deseada es seleccionado para enlace

000035

26
24

específico al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo humano completo, que comprende el dominio variable seleccionado. Secuencias de ácido nucleico que codifican al anticuerpo reconstituido son introducidas en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma usada para producción de hibridoma, de modo que anticuerpos humanos que tengan las características de anticuerpos monoclonales son secretadas por la célula (ver, por ejemplo, Janeway y colaboradores, supra, Huse y colaboradores, supra, y Patente U.S. No. 6,265,150). Alternativamente, anticuerpos monoclonales pueden ser generados a partir de ratones que son transgénicos para genes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada humanos específicos. Dichos métodos son conocidos en el arte y se describen en, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5,545,806 y 5,569,825 y Janeway y colaboradores, supra.

[0026] Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Como se usa en la presente, un anticuerpo "humanizado" es uno en el cual las regiones de complementaridad (CDR) de un anticuerpo monoclonal de ratón, que forman los circuitos de enlace antigénico del anticuerpo, son injertados sobre la estructura principal de una molécula de anticuerpo humano. Debido a la similaridad de las estructuras principales de anticuerpos humanos y de ratón, generalmente se acepta en el arte que este procedimiento produce un anticuerpo monoclonal que es antigénicamente idéntico a un anticuerpo humano pero enlaza al mismo antígeno que el anticuerpo monoclonal de ratón a

000036

partir del cual las secuencias de CDR se derivaron. Métodos para generar anticuerpos humanizados son bien conocidos en el arte y se describen con detalle en, por ejemplo, Janeway y colaboradores, supra, Patentes U.S. 5,225,539, 5,585,089 y 5,693,761, Patente Europea No. 0239400 B1, y patente del Reino Unido No. 2188638. Los anticuerpos humanizados pueden también ser generados usando la tecnología de resuperficie de anticuerpo descrita en la Patente U.S. 5,639,641 y Pedersen y colaboradores, J. Mol. Biol., 235: 959-973 (1994). Mientras que el anticuerpo empleado en el conjugado de la composición de la invención más preferiblemente es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal humano y un anticuerpo monoclonal de ratón, como se describieron anteriormente están en el alcance de la invención.

[0027] Fragmentos de anticuerpo que tienen al menos un sitio de enlace antigénico, y por consiguiente reconocen y enlazan a al menos un antígeno o receptor presente sobre la superficie de una célula diana, también están en el alcance de la invención. A este respecto, la fragmentación proteolítica de una molécula de anticuerpo intacto puede producir una variedad de fragmentos de anticuerpo que retienen la habilidad para reconocer y enlazar antígenos. Por ejemplo, la digestión limitada de una molécula de anticuerpo con la papaína proteasa típicamente produce tres fragmentos, dos de los cuales son idénticos y son mencionados como fragmentos Fab, cuando ellos retienen la actividad de enlace antigénico de la molécula de anticuerpo

28
26

precursora. La fragmentación de una molécula de anticuerpo con la pepsina enzimática normalmente produce dos fragmentos de anticuerpo, uno de los cuales retiene ambos ramales de enlace antigénico de la molécula de anticuerpo, y es por consiguiente mencionado como el fragmento $F(ab')_2$. La reducción de un fragmento $F(ab')_2$ con ditiotritol o mercaptoetilamina produce un fragmento mencionado como un fragmento Fab'. Un fragmento de anticuerpo de región variable de cadena única (sFv), que consiste de un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo ligado a un dominio V de una cadena ligera de anticuerpo vía un péptido sintético, puede ser generado usando las técnicas de tecnología de ADN recombinante de rutina (ver, por ejemplo, Janeway y colaboradores, supra). De manera similar, fragmentos de región variable estabilizadas con disulfuro (dsFv) pueden ser preparados por tecnología de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Protein Engineering, 7: 697-704 (1994)). Fragmentos de anticuerpo en el contexto de la invención, no obstante, no se limitan a estos tipos ejemplares de fragmentos de anticuerpos. Puede emplearse cualquier fragmento de anticuerpo que reconozca y enlace a un receptor de superficie celular o antígeno deseados. Adicionalmente, se describen fragmentos de anticuerpo en, por ejemplo, Parsham, J. Immunol., 131:2895-2902 (1983), Spring y colaboradores, J. Immunol., 113:470-478 (1974), y Nisonoff y colaboradores, Arch. Biochem Biophys., 89: 230-244 (1960). El enlace de antígeno-anticuerpo puede ser

000038

29
27

ensayado usando cualquier método conocido en el arte disponible, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, tinción Western, inmunoprecipitación, y ensayos de inhibición comparativos (ver, por ejemplo, Janeway y colaboradores, supra, y Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2002/0197266 A1).

[0028] Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o un fragmento de enlace antigénico del mismo. Por "quimérico" se quiere decir, que el anticuerpo comprende al menos dos inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, obtenidas o derivadas de al menos dos especies diferentes (por ejemplo, dos inmunoglobulinas diferentes, tales como la región constante de inmunoglobulina humana combinada con una región variable de inmunoglobulina de roedor). El anticuerpo también puede ser un anticuerpo de dominio (dAb) o un fragmento de enlace antigénico del mismo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo de camélido (ver, por ejemplo, Desmyter y colaboradores, Nature, Struct. Biol. 3: 752, (1996)), o un anticuerpo de tiburón, tal como, por ejemplo, un nuevo receptor antigénico (IgNAR) (ver, por ejemplo, Greenberg y colaboradores, Nature, 374: 168 (1995), y Stanfield y colaboradores, Science, 305: 1770-1773 (2004)).

[0029] Puede usarse cualquier anticuerpo adecuado en el contexto de la invención. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal J5 es un anticuerpo de IgG2a de roedor que es específico para el Antígeno de Leucemia Linfoblástica Aguda Común (CALLA, Commun Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen)

0000039

36
28

(Ritz y colaboradores, Nature, 283: 583-585 (1980), y puede ser usado en células objetivo que expresan a CALLA (por ejemplo, células de leucemia linfoblástica aguda). El anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo de IgG1 de roedor que enlaza específicamente al antígeno de CD33 (Griffin y colaboradores, Leukemia Res., 8: 521 (1984), y puede ser usado para células objetivo que expresan a CD33 por ejemplo, células mielógenas agudas (AML)).

[0030] De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 (también mencionado como B4) es un anticuerpo de IgG1 de roedor que enlaza al antígeno de CD19 en células B (Nadler y colaboradores, J. Immunol, 131: 244-250 (1983)), y puede ser usado en células B objetivo o células enfermas que expresan a CD19 (por ejemplo, células de linfoma diferente al de Hodgkin y células de leucemia linfoblástica crónica). N901 es un anticuerpo monoclonal de roedor que enlaza al antígeno de CD56 (molécula de adhesión celular neural) encontrado en células de origen neuroendocrino, incluyendo tumor de pulmón de células pequeñas, el cual puede ser usado en el conjugado para llegar a células de origen neuroendocrino. Los anticuerpos J5, MY9 y B4 preferiblemente son resuperficiados o humanizados antes de su uso como parte del conjugado. La resuperficiación o humanización de anticuerpos se describe en, por ejemplo, Roguska y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 969.73 (1994).

[0031] Además, el anticuerpo monoclonal C242 enlaza al antígeno CanAg (ver por ejemplo, , la Patente U.S.

000040

34
29

5,552,293), y puede ser usado para llegar al conjugado a CanAg que se expresan en tumores, tales como de cánceres colon rectal, pancreático, de pulmón de células no pequeñas, y pancreático. HuC242 es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal C242 (ver, por ejemplo, la Patente U.S. No. 5,552,293). Cuyo hibridoma HuC242 es depositado con el Número de identificación de ECACC 900112601. HuC242 puede ser preparado usando la metodología de injerto de CDR (ver, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5,585,089, 5,693,761, y 5,693,762) o la tecnología de resuperficiación (ver por ejemplo, la Patente U.S. No. 5,639,641). HuC242 puede ser usado para conjugar a células tumorales que expresan al antígeno de CanAg, tales como, por ejemplo, células de cáncer colonrectal, pancreático, de pulmón de células no pequeñas, y gástrico.

[[0032] Para terminar en células de cáncer de ovario y de cáncer de próstata, un anticuerpo anti-MUC1 puede ser usado como el agente de enlace celular en el conjugado. Los anticuerpos anti-MUC1 incluye, por ejemplo, anti-HMFG-2 (ver por ejemplo, Taylor- Papadimitriou y colaboradores, Int. J. Cancer, 28: 17- 21 (1981)), hCTM01 (ver, por ejemplo, van Hof y colaboradores, cancer Res., 56: 5179- 5185)), y D56. Células de cáncer de próstata también pueden ser atacadas con el conjugado usando un antígeno anti-membrana específico de próstata (PSMA) como el agente de enlace celular, tal como J591 (ver, por ejemplo, Liu y colaboradores, cancer Res. 57: 3629-3634 81997)). Además, células de cáncer que expresan al antígeno de Her2, tales

000041

32
30

como células de cánceres de seno, próstata y de ovario, pueden ser atacadas usando el trastuzumab del anticuerpo. Anticuerpos anti- IGF-IR que enlazan al receptor del factor de crecimiento de tipo insulina también pueden ser usadas en el conjugado.

[0033]Anticuerpos particularmente preferidos son anticuerpos monoclonales humanizados, ejemplos de los cuales incluyen huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituzumab (ver por ejemplo, las Patentes 5,639,641 y 5,665,357, Solicitud de Patente Provisional U.S. No. 60/242,332 (la cual está relacionada con la Publicación de Solicitud de Patente No. 2005/0118183 A1), Solicitud de Patente Internacional WO 02/16401, Pedersen y colaboradores, supra, Roguska y colaboradores, supra, Liu y colaboradores, supra, Nadler y colaboradores, supra, Colomer y colaboradores, Cancer Invest., 19: 49-56 (2001), Heider y colaboradores, Eur. J. Cancer, 31^a:2385-2391 (1995), Welt y colaboradores, J. Clin. Oncol., 12: 1193-1203 (1994), y Maloney y colaboradores, Blood, 90: 2188-2195 (1997)). Más preferiblemente, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal humanizado huN901 o el anticuerpo monoclonal humanizado huMy9-6. Otros anticuerpos preferidos incluyen CNT095, huDS6, huB4, y huC242. Se conocen en el arte otros anticuerpos monoclonales humanizados y pueden ser usados en conexión con la invención.

[0034]Mientras que el agente de enlace celular, es preferiblemente un anticuerpo, el agente de enlace celular también puede ser una molécula diferente de anticuerpo. Las

000042

00058

31

moléculas diferentes de anticuerpo adecuadas incluyen, por ejemplo, interferones (por ejemplo, interferon alfa, beta, o gama), linfoquinas (por ejemplo, interleuquina 2 (IL-2), IL-3, IL-4 o IL-6), hormonas (por ejemplo insulina), factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, TGF-alfa, FGF, y VEGF), factores estimuladores de colonias (por ejemplo, G-CSF, M-CSF, y GM-CSF (ver, por ejemplo, Burgess, Immunology Today, 5: 155-158 (1984)) somatostatina, y transferrina (ver, por ejemplo, O'Keefe y colaboradores, J. Biol. Chem., 260: 932-937 (1985)). Por ejemplo, GM-CSF, el cual enlaza a células mieloides, puede ser usado como un agente de enlace celular para llegar a células de leucemia mielógena agudas. Además, IL-2, que enlaza a células T activadas, puede ser usada para prevención de rechazo de injerto de trasplante, para terapia y prevención de enfermedades del huésped versus injerto, y para tratamiento de leucemia de células T aguda. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) puede ser usado para cánceres escamoso tales como cáncer de pulmón y cáncer de cabeza y cuello. La somatostatina puede ser usada para llegar a células de neuroblastoma y otros tipos de células tumorales.

[0035] El conjugado puede comprender cualquier fármaco adecuado, típicamente un agente citotóxico. Un "agente citotóxico", como se usa en la presente, se refiere a cualquier compuesto que da como resultado la muerte de una célula, induce la muerte celular, o disminuye la viabilidad celular. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, maytansinoides y análogos maytansinoides,

000043
000015

taxoides, análogos de CC-1065 y CC-1065, y dolastatina y análogos de dolastatina. En una modalidad preferida de la invención, el agente citotóxico es un maytansinoide, incluyendo maytansinol y análogos de maytansinol. Los maytansinoles son compuestos que inhiben la formación de microtúbulos y son muy tóxicos para células de mamíferos. Los ejemplos de análogos de maytansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maytansinoides se describen en, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 4,256,746, 4,294,757, 4,307,016, 4,313,946, 4,315,929, 4,322,348, 4,331,598, 4,361,650, 4,362,663, 4,364,866, 4,424,219, 4,371,533, 4,450,254, 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, y 6,333,410.

[0036] Ejemplos de análogos de maytansinoides que tengan un anillo aromático modificado incluyen: (1) descloro de 19 átomos de carbono (Patente U.S. No. 4,256,746) (preparado por reducción por LAH de ansamitosina P2), (C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/- C-19-descloro (Patentes U.S. Nos. 4,361,650 y 4,307, Streptomyces o Actinomyces 016) (preparado por desmetilación usando o descloración usando LAH), y (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/- descloro (Patente U.S. No. 4,294,757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo).

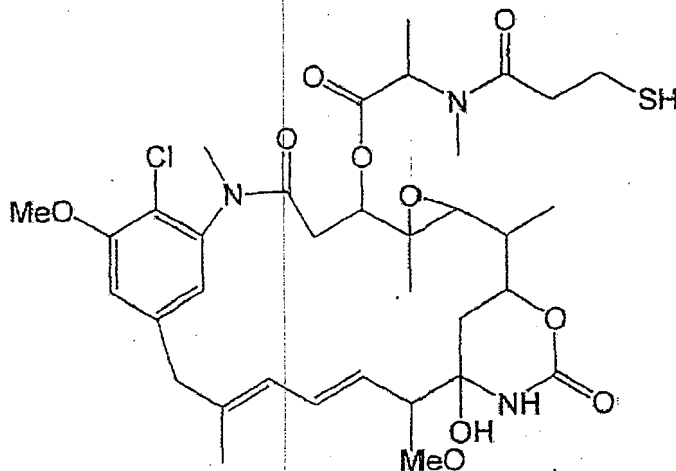
[0037] Ejemplos de análogos de maytansinol que tengan modificaciones de posiciones diferentes de un anillo aromático incluyen: (1) C-9-SH (Patente U.S. No. 4,424,219)

000044

35
33

(preparado por la reacción de maytansinol con H_2S o P_2S_5),
 (2) C-14-alcoximetilo (desmetoxi/ CH_2OR) (Patente U.S. No. 4,331,598), (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH_2OH o CH_2OAr) (Patente U.S. No. 4,450,254) (preparado a partir
 5 de *Nocardia*), (4) C-15-hidroxi/aciloxi (Patente U.S. No. 4,364,866) (preparado por medio de la conversión de maytansinol por medio de *Streptomyces*), (5) C-15-metoxi (Patente U.S. No. 4,313,946) (aislado a partir de *Trevia mediflora*), (6) C-18-N-desmetilo (Patentes U.S. Nos.
 10 4,362,663 y 4,322,348) (preparado por medio de la desmetilación de maytansinol por medio de *Streptomyces*), y (7) 4, 5- desoxi (patente U.S. No. 4,371,533) (preparado por medio de la reducción de maytansinol con tricloruro de titanio/LAH).

15 [0038] En una modalidad preferida de la invención, el conjugado utiliza el maytansinoide DM1 que contenía el tiol, también conocido como $N^{2'}$ -desacetil- $N^{2'}$ -(3-mercaptopropil)- maytansina, como el agente citotóxico. La estructura de DM1 está representada por la Fórmula (I).



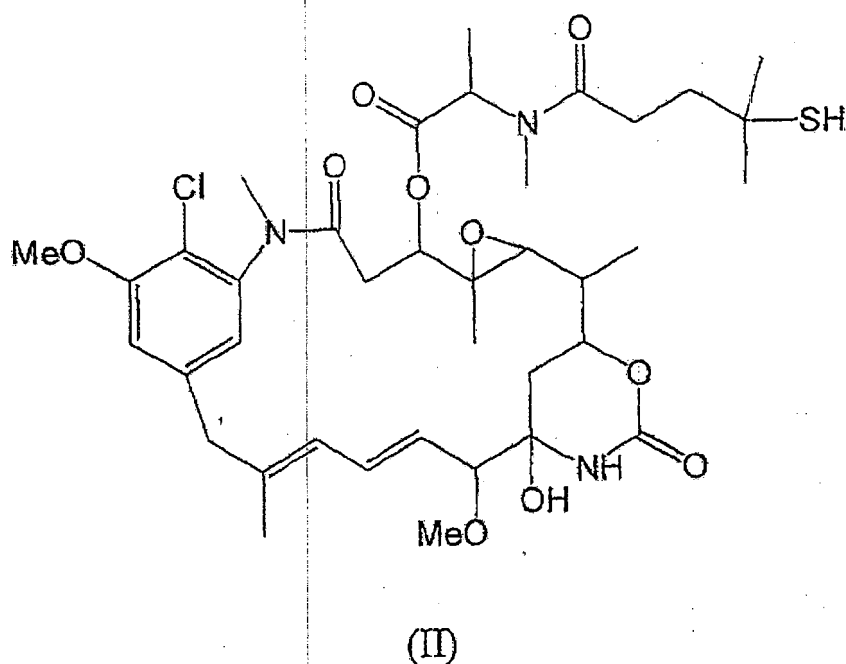
(I)

000045

000006

[0039] En otra modalidad preferida de la invención, el conjugado utiliza el maytansinoide DM4 que contenga tiol, también conocido como N^{2'}-desacetil-N^{2'}-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maytansina, como el agente

5 citotóxico. La estructura de DM4 está representada por la Fórmula (II):



[0040] Pueden usarse otras maytansinas en el contexto

20 de la invención, incluyendo, por ejemplo, maytansinoides que contengan tiol y disulfuro que posean una sustitución mono- o di- alquilo sobre el átomo de carbono que posea el átomo de azufre. Se prefiere de manera particular el maytansinoide que tenga en la posición C-3 (a) la

25 funcionalidad C-14-hidroximetilo, C-15-hidroxi, o C-20 desmetilo, y (b) una cadena lateral aminoácido acilado con un grupo acilo que posea un grupo sulfhidrilo interrumpido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que posea la

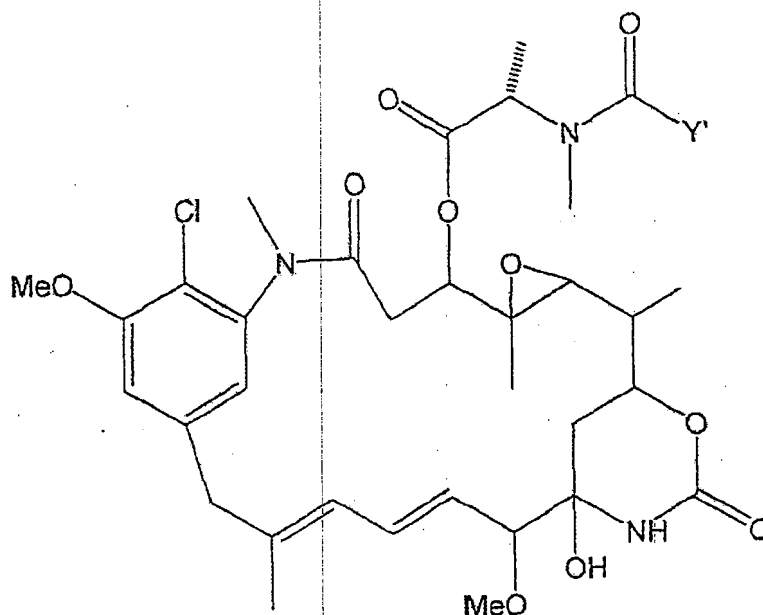
000046

25

37
35

funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes que sean CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde adicionalmente uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una extensión de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

[0041] Maytansinas adicionales para uso en el contexto de la invención incluyen compuestos representados por la Fórmula (III):



(III),

en donde Y' representa

$(\text{CR}_7\text{R}_8)_1 (\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p (\text{C}\equiv\text{C})_q \text{A}_o (\text{CR}_5\text{R}_6)_m \text{D}_u (\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r (\text{C}\equiv\text{C})_s \text{B}_t (\text{CR}_3\text{R}_4)_n - \text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$, en donde R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que

00006047

30

tengan desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico o ramificado que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R_2 también puede ser H,

en donde A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tengan 3 - 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

en donde $R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}$, y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico o ramificado que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático, o heterocicloalquilo,

en donde l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente cero o un entero desde 1 a 5, a condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s, y t no sean cero a la vez, y en donde Z es H, SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o lineal que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

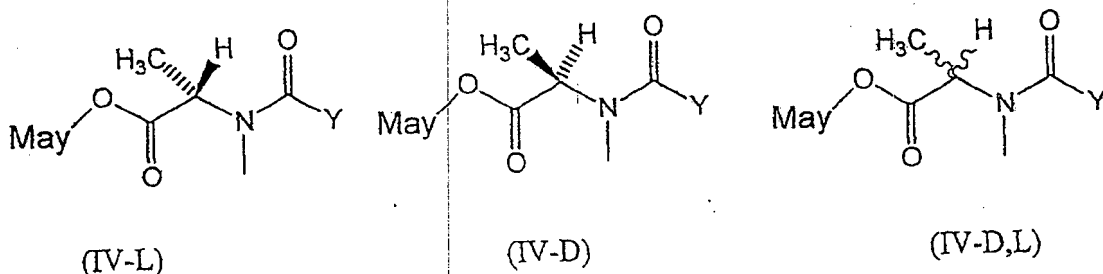
[0042] Modalidades preferidas de la Fórmula (III) incluyen compuestos de Fórmula (III) en donde (a) R_1 es H, R_2 es metilo y Z es H, (b) R_1 y R_2 son metilo y Z es H, (c)

0000148

39
37

R_1 es H, R_2 es metilo, y Z es $-\text{SCH}_3$, y (d) R_1 y R_2 son metilo, y Z es $-\text{SCH}_3$.

[0043] Dichas maytansinas adicionales también incluyen compuestos representados por las Fórmulas (IV-L), (IV-D), o (IV-D,L)



en donde Y representa $(\text{CR}_7\text{R}_8)_1(\text{CR}_5\text{R}_6)_m(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$,

en donde R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo lineal, o alquenilo que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono alquilo o alquenilo cíclico o ramificado que tengan desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R_2 también puede ser H,

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

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

en donde Z es H, SR, o COR en donde R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical

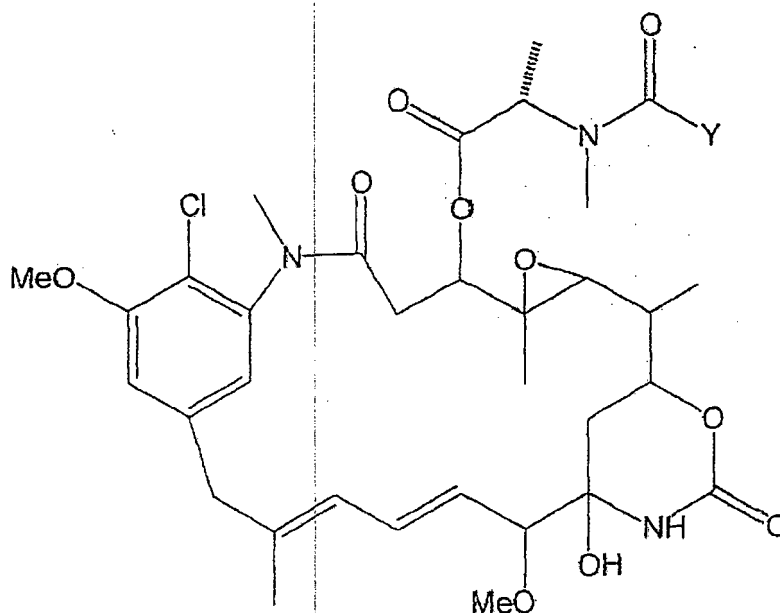
0000049

heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde May, representa un maytansinoide que posea la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo.

5 [0044] Modalidades preferidas de las Fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) incluyen compuestos de (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) en donde (a) R1 es H, R2 es metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H, (b) R1 y R2 son metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H, (c) R1 es H, R2 es metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH3, o (d) R1 y R2 son metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH3.

15 [0045] Preferiblemente, el agente citotóxico es representado por la Fórmula (IV-L).

 [0046] Las maytansinas adicionales preferidas también incluyen compuestos representados por la Fórmula (V):



(V)

000050

en donde Y representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo lineal, o alquenilo que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico o ramificado que tengan desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R_2 también puede ser H,

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

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

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

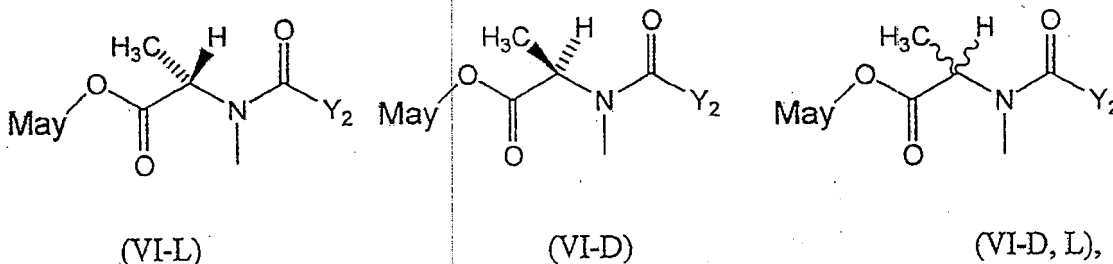
[0047] Modalidades preferidas de la Fórmula (V) incluyen compuestos de Fórmula (V) en donde (a) R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H, (b) R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H, (c) R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃, o (d) R_1 y R_2 son metilo, R_5 ,

006051

42
40

R6, R7, R8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH3.

[0048] Maytansinas preferidas aún adicionales incluyen compuestos representados por las Fórmulas (VI-L), (VI-D), o (VI-D,L):



en donde Y_2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico o ramificado que tengan desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R_2 también puede ser H,

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

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

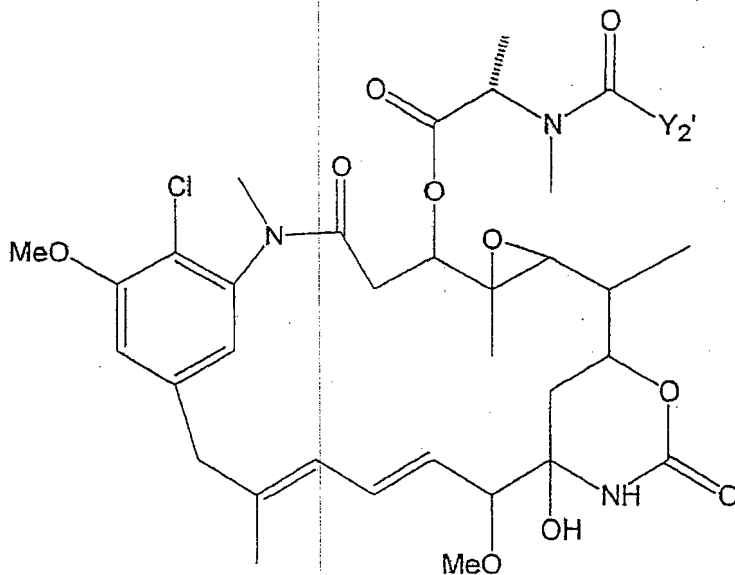
en donde Z_2 es SR, o COR en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico o ramificado que tenga desde 3

0000526

43
41

a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde May es un maytansinoide.

[0049] Maytansinas preferidas adicionales incluyen compuestos representados por la Fórmula (VII)



(VII),

en donde Y2' representa

$(CR_7R_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5R_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3R_4)_n - CR_1R_2SZ$, en donde R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tengan desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R_2 también puede ser H,

en donde A, B, D son cicloalquilo o cicloalqueno que tengan 3 - 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

000053

44
42

en donde $R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}$, y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenoilo lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenoilo cíclico o ramificado que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático, o heterocicloalquilo,

en donde l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente cero o un entero desde 1 a 5, a condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s, y t no sean cero a la vez, y en donde Z2 es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenoilo lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenoilo ramificado o cíclico que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

[0050] Modalidades preferidas de la Fórmula (VII) incluyen compuestos de Fórmula (VI) en donde R_1 es H y R_2 es metilo.

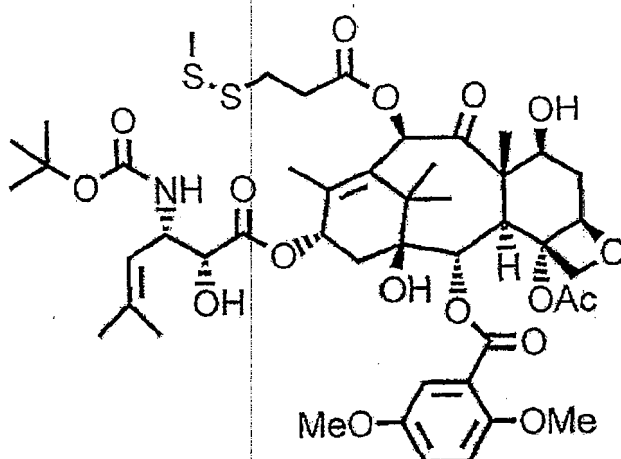
[0051] Además de maytansinoides, el agente citotóxico usado en el conjugado puede ser un taxano o un derivado del mismo. Los taxanos son una familia de compuestos que incluye el paclitaxel (Taxol®, un producto natural citotóxico, y docetaxel (Taxotere®), un derivado semi-sintético, ambos son usados ampliamente en el tratamiento del cáncer. Los taxanos son venenos aciculares mitóticos que inhiben la despolimerización de la tubulina, dando como resultado la muerte celular. Mientras que el docetaxel y el paclitaxel son agentes útiles en el tratamiento de

000054

45
43

cáncer, su actividad anti-tumoral es limitada a causa de su toxicidad no específica hacia células normales. Adicionalmente, compuestos como el paclitaxel y docetaxel por sí mismos no son suficientemente potentes para ser usados en conjugados de agentes de enlace celular.

[0052] Un taxano preferido para uso en la preparación de un conjugado citotóxico es el taxano de Fórmula (VIII):



[0053] Métodos para sintetizar taxanos que pueden ser usados en el contexto de la invención, junto con métodos para conjugar taxanos a agentes de enlace celular tales como anticuerpos, son descritos en detalle en las Patentes U.S. Nos. 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, 6,436,931, 6,596,757, 6,706,708, y 6,716,821, y la Publicación de Solicitud de patente U.S. No. 2004/0024049 A1.

[0054] El citotóxico también puede ser CC-1065 o un derivado del mismo. CC-1065 es un potente antibiótico anti-tumoral aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1000 veces más potente in vitro que fármacos anti-cáncer comúnmente usados, tales

000055

45
44

como doxorubicina, metotrexate, y vincristina (Bhuyan y colaboradores, Cancer Res. 42: 3532-3537 (1982)). CC-1065 y sus análogos se describen en las Patentes U.S. Nos. 5,585,499, 5,8846,545, 6,340,701 y 6,372,738. La potencia
5 citotóxica de CC-1065 ha sido correlacionada con su actividad alquilante y su actividad de enlazar ADN o de intercalar ADN. Estas dos actividades residen en partes separadas de la molécula. A este respecto, la actividad alquilante está contenida en la subunidad
10 ciclopropapirroloindol (CPI) y la actividad de enlace reside en las dos subunidades pirroloindol de CC-1065.

[0055] Varios análogos de CC-1065 son conocidos en el arte y también pueden ser usados como el agente citotóxico en el conjugado (ver, por ejemplo, Wapehoski y
15 colaboradores, J. Med. Chem. 31: 590-603 (1988)). Una serie de análogos de CC-1065 han sido desarrollados, en los cuales la porción CPI es reemplazada por una porción ciclopropabencindol (CBI) (Boger y colaboradores, J. Org. Chem. 55: 5823-5833 (1990), y Boger y colaboradores,
20 Bioorg. Med. Lett., 1: 115-120 (1991)). Estos análogos de CC-1065 mantienen la alta potencia in vitro del fármaco precursor, sin causar retardo de la toxicidad en ratones. Como CC-1065, estos compuestos son agentes alquilantes para enlazar covalentemente a la estría menor de ADN para causar
25 muerte celular.

[0056] La eficiencia terapéutica de análogos de CC-1065 puede ser grandemente mejorada cambiando la distribución in vivo a través de liberación acertada a un sitio tumoral,

0000056

4X
45

dando como resultado más baja toxicidad en tejidos no objetivos, y así, toxicidad generalizada más baja. Para este fin, se han generado conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con agentes de enlace celular que
5 aciertan específicamente a células tumorales (ver por ejemplo, las Patentes U.S. No. 5,475,092, 5,585,499, y 5,846,545). Estos conjugados típicamente presentan citotoxicidad específica de alta objetividad *in vitro*, y actividad anti-tumoral en modelos de xenoinjertos tumorales
10 humanos (ver por ejemplo, Chari y colaboradores, cancer Res., 55: 4079-4084 (1995)).

[0057] Se describen con detalle métodos para sintetizar análogos de CC-1065 en las Patentes U.S. Nos. 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, 6,534,660, 6,585,618, y 6,756,397 y
15 en la Publicación de Solicitud de patente No. 2003/0195365 A1.

[0058] Fármacos tales como el metotrexate, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalano, mitomicina C, clorambucil, calicheamicina,
20 tubulisina y análogos de tubulisina, duocarmicina y análogos de duocarmicina, dolostatina y análogos de dolostatina también pueden ser usados en el contexto de la invención. Compuestos de doxorubicina y daunorubicina (ver por ejemplo, patente U.S. No. 6,630,579) pueden también ser
25 usados como el fármaco.

[0059] Los fármacos conjugados pueden ser preparados por medio de métodos *in vitro*. A fin de enlazar a un fármaco o profármaco al anticuerpo, se usa un grupo

000057

48
46

ligante. Grupos ligantes adecuados son bien conocidos en el arte e incluyen grupos disulfuro, grupos ácidos lábiles, grupos fotolábiles, grupos peptidasa lábiles, y grupos estearasa lábiles. Grupos ligantes preferidos son los grupos disulfuro. Por ejemplo, los conjugados pueden ser contruidos usando una reacción de intercambio de disulfuro entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco. Las moléculas de fármaco también pueden ser enlazadas a un agente de enlace celular a través de una molécula portadora intermediaria tal como albúmina de suero.

[0060]De conformidad con la invención, el agente de enlace celular es modificado haciendo reaccionar un reactivo reticulador bifuncional con el agente de enlace celular, dando así como resultado la fijación covalente de una molécula ligante al agente de enlace celular. Como se usa en la presente, un reactivo reticulador bifuncional" es cualquier porción química que enlaza covalentemente a un agente de enlace celular a un fármaco, tal como los fármacos descritos en la presente. En una modalidad preferida de la invención, una porción de la porción ligante es proporcionada por el fármaco. A este respecto, el fármaco comprende una porción ligante que es parte de una molécula enlazadora más grande que es usada para juntar al agente de enlace celular al fármaco. Por ejemplo, para formar el maytansinoide DM1, la cadena lateral en el grupo hidroxilo en C-3 de la maytansina es modificada para tener un grupo sulfhidrilo (SH) libre . Esta forma tiolada de maytansina puede reaccionar con un agente de enlace celular

000058

65014

modificado para formar un conjugado. Por consiguiente, el enlace final es conjuntado a partir de dos componentes, uno de los cuales es proporcionado por el reactivo reticulador, mientras que el otro es proporcionado por la cadena lateral de DM1.

[0061] Puede usarse cualquier reactivo reticulador bifuncional adecuado en conexión con la invención, con tal de que el reactivo ligante se proporciona para retención de las características terapéuticas, por ejemplo citotoxicidad, y de objetividad del fármaco y el agente de enlace celular, respectivamente.

Preferiblemente, la molécula ligante une el fármaco al agente de enlace celular a través de ligantes químicos (como se describió anteriormente), de modo que el fármaco y el agente de enlace celular sean químicamente acoplados (por ejemplo, enlazados covalentemente) entre sí. Preferiblemente, el reactivo ligante es un ligante fragmentable. Más preferiblemente, el ligante es fragmentado bajo condiciones ligeras, es decir condiciones en una célula bajo las cuales la actividad del fármaco no es afectada. Ejemplos de ligantes fragmentables adecuados incluyen enlaces disulfuro, enlaces ácidos lábiles, enlaces fotolábiles, enlaces peptidasa lábiles, y enlaces estearasa lábiles. Enlaces que contengan disulfuro son enlaces fragmentables a través de intercambio disulfuro, el cual puede tener lugar bajo condiciones fisiológicas. Enlaces ácidos lábiles son enlaces fragmentables a pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimentos intracelulares, tales como

000059

50
48

endosomas y lisosomas, tienen un pH ácido (pH de 4-5), y proporcionan condiciones adecuadas para fragmentar enlaces ácidos lábiles. Enlaces foto lábiles son útiles en la superficie corporal y en muchas cavidades corporales que son accesibles a la luz. Además, los rayos infrarojos pueden penetrar el tejido. Enlaces peptidasa lábiles pueden ser usados para fragmentar ciertos péptidos en células interiores y exteriores (ver por ejemplo, Trouet y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 626-629 81982), Y Umemoto y colaboradores, Int. J. cancer, 43: 677-684 (1989)).

[0062] Preferiblemente, el fármaco es enlazado a un agente de enlace celular a través de un enlace disulfuro. La molécula ligante comprende un grupo químico reactivo que puede reaccionar con el agente de enlace celular. Grupos químicos reactivos preferidos para reacción con el agente de enlace celular son N- succimidil ésteres y N-sulfosuccinimidil ésteres. Adicionalmente la molécula ligante comprende un grupo químico reactivo, preferiblemente un grupo ditiopiridilo, que puede reaccionar con el fármaco para formar un enlace disulfuro. Moléculas de enlace particularmente preferidas incluyen, por ejemplo, N- succinimidil 3- (2- piridilditio) propionato (SPDP) (ver por ejemplo, Carlsson y colaboradores, Biochem. J. , 173: 723-737 (1978)), 4- (2- piridilditio) butanoato de N- succinimidilo (SPDB) (ver, por ejemplo, Patente U.S. 4,563,304), 4- (2- piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) (ver, por

000060

201-120

ejemplo, Número de Registro CAS 341498-08-6), y otros reticuladores reactivos que se describen en la patente U.S. No. 6,913,748, la cual es incorporada íntegramente a la presente como referencia.

5 [0063] Aunque ligantes fragmentables son usados preferiblemente en el método de la invención, un ligante no fragmentable también puede ser usado para generar el conjugado anteriormente descrito. Un ligante no fragmentable es cualquier porción química que es capaz de
10 enlazar a un fármaco, tal como un maytansinoide, un taxano, o un análogo de CC-1065, a un agente de enlace celular de una manera covalente estable. Por consiguiente, ligantes no fragmentables son sustancialmente resistentes a fragmentación inducida por ácido. Fragmentación inducida
15 por la luz, fragmentación inducida por peptidasa, fragmentación inducida por estearasa, y fragmentación de enlace disulfuro, en condiciones bajo las cuales el fármaco o el agente de enlace celular permanece activo.

 [0064] Reactivos reticuladores adecuados que forman
20 ligantes no fragmentables entre un fármaco y un agente de ligante fragmentable son bien conocidos en el arte. Ejemplos de ligantes no fragmentables incluyen ligantes que tienen un éster N- succinimidílico o porción éster succinimidílico para reacción con el agente de enlace
25 celular, así como también una porción basada en maleimido- o haloacetilo para reacción con el fármaco. Los reactivos reticuladores que comprenden una porción basada en maleimido- incluye 4- (maleimidometil)ciclohexancarboxilato

-000061

82
50

de N-succinimidilo (SMCC), 4- (N- maleimidometil)-
 ciclohexan- 1- carboxi- 1- carboxi- (6- amidocaproato) de
 N- succinimidilo, el cual es un análogo de "cadena larga"
 de SMCC (LC-SMCC), éster N-succinimidílico del ácido κ-
 maleimidoundecanoico (KMUA), éster N- succinimidílico del
 ácido γ- maleimidobutírico (GMBS), éster N-
 hidroxisuccinimida del ácido ε-maleimidocaproico (EMCS),
 éster m- maleimidobenzoil- N- hidroxisuccinimida (MBS),
 éster N. (α-maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), 6- (β-
 maleimidopropionamido)hexanoato de succinimidilo (SMPH), 4-
 (p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), e
 isocianato de N- (p- maleimidofenilo) (PMPI). Reactivos
 reticuladores que comprenden una porción basada en
 haloacetilo incluyen 4- (iodoacetil)- aminobenzoato de N-
 succinimidilo (SIAB), iodoacetato de N- succinimidilo
 (SIA), bromoacetato de N- succinimidilo (SBA), y 3-
 (bromoacetamido) propionato de N- succinimidilo (SBAP).

[0065]Otros reactivos reticuladores que carecen de un
 átomo de azufre que forma ligantes no fragmentables puede
 también usarse en el método de la invención. Dichos
 ligantes pueden ser derivados de porciones basadas en ácido
 dicarboxílico. Las porciones basadas en ácido dicarboxílico
 adecuadas incluyen, pero no se limitan a, ácidos α, ω-
 dicarboxílicos de la Fórmula General (IX):



en donde X es un grupo alquilo, alquénilo o alquínilo
 lineal o ramificado, que tenga 2 a 20 átomos de carbono, Y

000062
105000

35
51

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

[0066] Muchos de los ligantes no fragmentables descritos en la presente se describen en detalle en la Solicitud de Patente No. 10/960,602, que corresponde a la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2005/0169933 A1.

[0067] Alternativamente, como se describe en la Patente U.S. No. 6,441,163, B1, el fármaco puede ser primero modificado para introducir un éster reactivo adecuado para reaccionar con un agente de enlace celular. La reacción de estos maytansinoides que contengan una porción de enlace adecuada con un agente de enlace célula proporciona otro método de producir un conjugado de maytansinoide-agente de enlace celular fragmentable o no fragmentable.

[0068] Información adicional concerniente a maytansinoides, agentes citotóxicos que los comprendan, conjugados de fármacos, y métodos de preparación relacionados se describen en la Solicitud de Patente U.S. No. 11/352,121 y la Solicitud de Patente U.S. No. 10/849,136, que corresponde a la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2004/0235840 A1.

000063

ST
52

[0069] Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, no se construyeron como limitantes de su alcance en manera alguna.

EJEMPLO 1

5 [0070] Este ejemplo demuestra la purificación de un anticuerpo modificado con un reactivo de modificación heterobifuncional usando TFF.

10 [0071] El anticuerpo monoclonal huN901 (concentración final de 8 mg/ml) fue incubado con 4- (2- piridilditio) pentanoato) de N- succinimidilo (SPP, exceso molar de 5.6 veces) por aproximadamente 180 minutos a 20 °C en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 7.5) que contenga 50 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, y etanol al 5 %. En un primer grupo, la mezcla de reacción se purificó usando una columna

15 de resina Sephadex™ G25F equilibrada y eluida en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5) que contenga 50 mM de NaCl y 2 mM de EDTA. En un segundo grupo, la mezcla de reacción fue purificada usando un sistema Pellicon XL TFF (Millipore, Billerica, MA), y el anticuerpo fue

20 diafiltrado (5 volúmenes) en 50 mM de fosfato de potasio, 50 mM de NaCl (pH de 6.5), y 2 mM de EDTA usando una membrana de corte de peso molecular de 10,000 (membrana de celulosa regenerada Ultracel™, Millipore, Billerica, MA). Ambas muestras fueron conjugadas con DM1 (exceso molar de

25 1.7 veces sobre el enlazador sin enlazar) por 18 horas a pH de 6.5 en regulador de fosfato de potasio que contenía 50 mM de NaCl y una concentración final de DMA al 3 %.

000064

[0072] En ambos grupos, los rendimientos se determinaron espectrofotométricamente (longitud de onda de 280 nm) para las etapas de modificación y de purificación combinadas. Las proporciones del anticuerpo a ligante fueron también determinadas por tratamiento con ditiotritol para liberar piridina-2-tiona, la cual tuvo un coeficiente de extinción de $8,080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 343 nm. Las proporciones de fármaco/anticuerpo fueron determinadas espectrofotométricamente (longitudes de onda de 280 nm y 252 nm) para la etapa de conjugación. Además, la remoción de especies moleculares pequeñas relacionadas con SPP se midió por HPLC Hisep.

[0073] Los datos resultantes se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1. Métodos de Purificación para huN901

Modificado Usando G-25F versus TFF

		Resina Sephadex TM G25F	TFF
Etapa de Modificación	Rendimiento de la etapa (%)	94	98
	Proporción de Ligante/ Anticuerpo	4.9	4.9
	Moléculas pequeñas relacionadas con SPP (%)	0.2	0.2
Etapa de Conjugación	Proporción de Fármaco/ Anticuerpo	3.7	3.7

000065

56
54

[0074] Como se muestra en la Tabla 1, el uso de TFF produjo el fármaco conjugado producto de al menos calidad equivalente al proceso de cromatografía no adsorbente (G25), mientras que sea más conveniente y transportable a escala.

EJEMPLO 2

[0075] Este ejemplo demuestra la purificación de un anticuerpo modificado con un reactivo de modificación heterobifuncional usando cromatografía de absorción.

[0076] El anticuerpo huB4 fue modificado con 4- (2-piridilditio) butanoato de N- succinimidilo (SPDB, exceso molar de 5.4 veces) por 120 minutos a temperatura ambiente en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH. De 6.5) que contenía 50 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, y etanol al 5 %.

En un primer grupo, la mezcla de reacción fue purificada usando la resina Sephadex™ G25F como se describió en el Ejemplo 1. En un segundo grupo, la mezcla de reacción fue cargada sobre una columna de cerámica hidroxiapatita (CHT), Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), la cual fue equilibrada en 12.5 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5) y se eluyó con 80 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5).

[0077] En ambos grupos, los rendimientos y las proporciones de ligante/anticuerpo fueron determinadas como se describe en el Ejemplo 1. El primer grupo tuvo un rendimiento de 91 % y una proporción de ligante/anticuerpo de 4.2. El segundo grupo tuvo un rendimiento de 89 % y una proporción de ligante/anticuerpo de 4.2.

000066

SP
55

[0078] El anticuerpo CNT095 (concentración final de 10 mg/ml fue modificado con 4- (2- piridiltio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB, exceso molar de 4.5 veces) por 120 minutos a 20 °C en 10 mM de regulador de fosfato de sodio (pH de 7.5) que contenía 2.5 % de sacarosa y 5 % de etanol. En un primer grupo la mezcla de reacción fue purificada usando la resina SephadexTM G25F en 12.5 mM de regulador de fosfato de sodio (pH de 6.5) que contenía 12.5 mM de NaCl y 0.5 mM de EDTA. En un segundo grupo, la mezcla de reacción fue cargada en una columna de SP Sepharose Fast Flow (GE HealthCare, Piscataway, NJ), la cual fue equilibrada en 10 mM de regulador de fosfato de sodio (pH de 7.5) y eluyó con 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 7.5), que contenía 50 mM de NaCl.

[0079] En ambos grupos, los rendimientos y proporciones de ligante/anticuerpo fueron determinados como se describe en el Ejemplo 1. El primer grupo tuvo un rendimiento de 96 % y una proporción de ligante/anticuerpo de 4.0. El segundo grupo tuvo un rendimiento de 97 % y una proporción de ligante/anticuerpo de 4.1.

[0080] Los datos obtenidos en este ejemplo demuestran que puede usarse la cromatografía de adsorción para purificar un anticuerpo modificado con un reactivo de modificación heterobifuncional.

EJEMPLO 3

[0081] Este ejemplo demuestra los efectos benéficos de conjugar un anticuerpo modificado con un fármaco a pH de más 6.5.

000067

56

[0082] En un primer experimento, el anticuerpo CNT095 fue modificado y purificado como se describió en el Ejemplo 2. El anticuerpo modificado fue entonces dividido en dos grupos. En el primer grupo, la conjugación se efectuó en 12.5 mM de regulador de fosfato de potasio a pH de 6.5 que contenía 12.5 mM de NaCl, 0.5 mM de EDTA, 3 % de DMA, y un exceso molar de 1.7 veces de fármaco por ligante a 20 °C. En el segundo grupo, la reacción de conjugación fue a pH de 7.5. El anticuerpo conjugado fue purificado sobre las columnas NAP-10.

[0083] La proporción de fármaco/anticuerpo fue medida para ambos grupos. Los datos resultantes se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2. Proporción de fármaco/anticuerpo en Reacción de Conjugación de pH de 6.5 versus 7.5.

Tiempo de reacción (horas)	Proporción de fármaco/anticuerpo a pH de conjugación de 6.5	Proporción de fármaco/anticuerpo a pH de conjugación de 7.5
0.5	--	3.0
1	2.3	3.4
1.5	--	3.5
2	2.8	3.5
2.75	--	3.6
3.5	3.2	3.6
5	3.4	3.7

[0084] Como se muestra por los datos expuestos en la Tabla 2, la conjugación procede más rápido a pH de 7.5 que a pH de 6.5.

000068

59
5X

[0085] En un segundo experimento, el anticuerpo monoclonal humanizado huB4 fue modificado ya sea con (a) un exceso molar de 4.9 veces de SPDB en relación al anticuerpo, o (b) un exceso molar de 4.8 veces de SPDB en relación al anticuerpo. En ambas situaciones, la reacción fue en 50 mM de fosfato de potasio, 50 mM de cloruro de potasio, y 2 mM de EDTA (pH de 6.5) en 5 % de etanol por un total de 120 minutos a temperatura ambiente. La muestra (a) fue purificada sobre una columna de resina SephadexTM G25F equilibrada en 50 mM de fosfato de potasio, 50 mM de cloruro de sodio, y 2 mM de EDTA a pH de 6.5. La muestra (b) fue purificada equivalentemente excepto que el regulador de cromatografía fue ajustado a pH de 7.5. Ambas muestras fueron conjugadas con DM4 (exceso molar de 1.7 veces sobre el ligante enlazado) por 18 horas a temperatura ambiente en una concentración final de dimetilacetamida (DMA) de 3 %.

[0086] Por consiguiente, la muestra (a) fue conjugada a pH de 6.5, y la muestra (b) fue conjugada a pH de 7.5. Las muestras fueron entonces purificadas sobre una columna de resina SephadexTM G25F equilibrada en 9.6 mM de fosfato de potasio y 4.2 mM de cloruro de sodio a pH de 6.5. Ambas muestras fueron incubadas a 4 °C por hasta 7 meses y se sometieron a análisis de fármaco libre liberado a intervalos. Los datos resultantes se exponen en la Tabla 3.

000069

~~60~~
58

Tabla 3: Liberación de Fármaco libre durante el Tiempo
de Muestras Conjugadas a pH de 6.5 y de 7.5.

Tiempo (meses)	pH de conjugación de 6.5	pH de conjugación de 7.5
0.5	1.0	0.8
1.5	1.8	1.0
2.5	3.2	1.9
7	4.0	2.8

[0087] Como se muestra por los datos expuestos en la Tabla 3, la liberación de fármaco libre es sustancialmente más lenta que la muestra (b) que había sido conjugada a pH de 7.5 en relación a la muestra (a) que había sido conjugada a pH de 6.5. Por consiguiente, el producto de fármaco conjugado preparado a pH de 7.5 mostró ser estable con respecto a la liberación de fármaco libre durante el tiempo en comparación con el producto de fármaco conjugado preparado a pH de 6.5. La conjugación a pH de 7.5 también mostró una mejor incorporación de fármaco que a un pH de 6.5 requiriendo así el uso de menos fármaco.

EJEMPLO 4

[0088] Este ejemplo demuestra los efectos benéficos de conjugar un anticuerpo modificado con un fármaco a pH de menos de 6.0.

[0089] El anticuerpo monoclonal huN901 (concentración final de 8 mg/ml) fue incubado con 4- (2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP, exceso

000070

61
54

molar de 5.6 veces por aproximadamente 180 minutos a 20 °C en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 7.5) que contenía 50 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, y 5 % de etanol. En un primer grupo, la mezcla de reacción fue purificada usando una columna de resina Sephadex™ G25F equilibrada y eluida en 50 mM de regulador de citrato de sodio (pH de 5.0) que contenía 50 mM de NaCl y 2 mM de EDTA. En un segundo grupo la mezcla de reacción fue purificada usando un columna de resina Sephadex™ G25F equilibrada y eluida en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5) que contenía 50 mM de NaCl y 2 mM de EDTA. Ambas muestras fueron conjugadas con DM4 /exceso molar de 1.7 veces sobre el ligante enlazado) por 3, 19, 25, 48, y 120 horas a temperatura ambiente en una concentración final de dimetilacetamida (DMA) de 3 %.

[0090] Por consiguiente, el primer grupo de muestras fue conjugado en 50 mM de regulador de citrato de sodio (pH de 5.0) que contenía 50 mM de NaCl y 2 mM de EDTA, y el segundo grupo de muestras fue conjugado en 50 mM de regulador de fosfato de sodio (pH de 6.5), que contenía 50 mM de NaCl y 2 mM de EDTA. Las muestras fueron entonces purificadas usando una columna de resina Sephadex™ G25F equilibrada y eluida en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5) que contenía 50 mM de NaCl.

[0091] En ambos grupos, se determinaron las proporciones de enlazador (anticuerpo por tratamiento con ditiotreitól para liberar piridina-2-tiona, la cual tuvo un coeficiente de extinción de $8,00 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 343 nm. Se

000071

62
60

determinaron espectrofotométricamente las relaciones de fármaco/anticuerpo (longitudes de onda de 280 nm y 252 nm) para la etapa de conjugación.

[0092]El primer grupo tuvo una relación de enlazador/anticuerpo de 4.3. El segundo grupo tuvo una proporción de enlazador/anticuerpo de 4.2.

[0093]Las proporciones de fármaco/anticuerpo durante el tiempo para los dos grupos se exponen en la Tabla 4.

10 **Tabla 4. Velocidad de incorporación de DM1 en huN901 modificado con SPP como una Función del pH de Conjugación**

Tiempo de reacción (horas)	Proporción molar de Fármaco/Anticuerpo	
	pH de conjugación de 5.0	pH de conjugación de 6.5
3	2.43	2.97
19	3.38	3.28
25	3.41	N.T.

Tabla 4 (Continuación)

Tiempo de reacción (horas)	Proporción molar de Fármaco/Anticuerpo	
	pH de conjugación de 5.0	pH de conjugación de 6.5
48	3.46	3.17
120	3.44	2.85

[0094]Como es obvio de los datos expuestos en la Tabla 4, el conjugado que es elaborado conjugando el anticuerpo

000072

modificado con el fármaco a un pH de 5.0 alcanza un nivel más alto y más estable de fármaco enlazado durante el transcurso de la reacción de conjugación que el conjugado hecho a un pH de conjugación de 6.5. Además a estabilidad
5 creciente, los resultados indican que un nivel más alto de Fármaco/anticuerpo es logrado a partir de la conjugación a pH de 5.0 que cuando se usó la misma cantidad de fármaco a un pH de conjugación de 6.5, indicando así el uso más eficiente del fármaco a pH de 5.0.

10 [0095] En ambos grupos, las cantidades de monómero conjugado fueron determinadas durante el tiempo. Los datos resultantes se exponen en la Tabla 5.

15 **Tabla 5. Efecto del pH de Conjugación sobre el Nivel de Monómero Conjugado Durante la Conjugación de huN901 modificado con SPP con DM1.**

Tiempo de reacción (horas)	Monómero conjugado (%)	
	pH de conjugación de 5.0	pH de conjugación de 6.5
3	98.5	98.0
19	98.8	98.2
25	99.1	NT
48	99.2	98.3
120	99.2	97.8

000073

[0096] Como es obvio de los datos expuestos en la Tabla 5, el conjugado que es elaborado conjugando el anticuerpo modificado con el fármaco a pH de 5.0 tuvo un nivel más alto de monómero conjugado que el conjugado elaborado a un pH de conjugación de 6.5.

EJEMPLO 5

[0097] Este ejemplo demuestra adicionalmente los beneficios de conjugar un fármaco a un anticuerpo modificado a pH de menos de 6.

10 [0098] El anticuerpo BIWA 4 fue modificado con SPP (exceso molar de SPP como se muestra en la Tabla 6) por 120 - 140 minutos a temperatura ambiente en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5), 50 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, y 5 % de etanol. Se purificaron alícuotas del
15 anticuerpo modificado en columnas de separación NAP25 equilibradas en reguladores que tenían varios valores de pHs (pH de 4.6 a 6.5). Los reguladores de pHs de 4.6 a 5.9 se componían de 35 mM de citrato de sodio, 150 mM de cloruro de sodio, y 2 mM de EDTA. El regulador de pH de 6.5
20 fue PBS con 2 mM de EDTA.

[0099] El anticuerpo modificado de cada pH fue conjugado con DM1 (exceso molar de 1.7 veces sobre el enlazador) en dimetilacetamida (DMA, concentración final de 3 %). Después de incubación por 17 - 18 horas a temperatura
25 ambiente, se purificaron muestras del anticuerpo conjugado por cromatografía sobre columnas NAP 25 equilibradas en PBS (pH de 6.5). Las proporciones de enlazador/anticuerpo (L/A en la Tabla 6) fueron determinadas por tratamiento con

J000000074

ditiotreitol para librar piridin-2-tiona, la cual tuvo un
coeficiente de extinción estándar de $8,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 343
nM. Las proporciones de fármaco/anticuerpo fueron
determinadas espectrofotométricamente (longitudes de onda
de 280 nm y 252 nm) para la etapa de conjugación. El
monómero conjugado, especies de alto peso molecular, y
especies de bajo peso molecular fueron determinadas por SEC
_ HPLC usando una columna TSKG3000WXL equilibrada y
desarrollada en regulador de fosfato de potasio 0.2 M (pH.
De 7) que contenía cloruro de potasio 0.2 M e isopropanol
al 20 %.

[0100] Los resultados de estos análisis se exponen en
la Tabla 6.

Tabla 6. Características del Producto Conjugado de
Fármaco en Relación al pH.

A	B	C	D	E	F	G	H
4.6	4.7	3.8	3.6	97.5	2.2	0.4	74
5.1	4.4	4.7	3.6	97.6	1.9	0.6	75
5.6	5.0	4.9	3.6	97.7	1.5	0.8	85
5.9	5.5	5.3	3.7	96.4	2.3	1.4	76
6.5	6.6	6.4	3.7	95.1	2.8	1.9	71

A = pH del regulador

B = Exceso molar de SPP

C = L/A, proporción de ligante/anticuerpo

D = D/A, proporción de fármaco/anticuerpo

E = Monómero (%)

000075

66
64

F = Especies de peso molecular alto (%)

G = Especies de bajo peso molecular (%)

H = Rendimiento de la etapa de conjugación (%)

5 [0101] Los datos expuestos en la Tabla 6, demuestran
que la conjugación de BIWA modificado con SPP con DM1 fue
eficiente a pH inferior a 6.0, en comparación a la de pH de
4.5. Las cantidades de ligante y de fármaco,
específicamente ligante de SPP y DM1, requeridas para
alcanzar una proporción de fármaco/anticuerpo final
10 particular fueron reducidas a pH más bajo. Además, niveles
de monómero conjugado, especies de alto peso molecular, y
especies de bajo peso molecular fueron más óptimas, y los
rendimientos fueron mejorados, a pH más bajo.

EJEMPLO 6

15 [0102] Este ejemplo demuestra que la etapa de purificar
el anticuerpo modificado puede opcionalmente ser eliminada.
El fármaco puede ser añadido simultáneamente con el
reactivo modificador bifuncional o algún tiempo después.

[0103] En un ejemplo de adición de fármaco después del
20 reactivo modificador, el anticuerpo monoclonal humanizado
CNT095 fue modificado a una concentración de 20 mg/ml con
el reactivo modificador bifuncional SPDB a un exceso molar
de SPDB sobre el anticuerpo de 4.6 veces por 120 minutos a
20 °C. El regulador de modificación fue 44 mM de regulador
25 de fosfato (pH de 7.5) que contenía 5.3 % de sacarosa y 5 %
de etanol. Una alícuota del anticuerpo modificado fue
purificada sobre resina Sephadex™ G25F (proceso de cuatro
etapas estándar), equilibrada y eluida en 12.5 mM de

000076

87
65

regulador de fosfato de potasio (pH de 7.5) que contenía 12.5 mM de NaCl, y fue subsecuentemente conjugada con DM4 (exceso molar de 1.7 veces de fármaco sobre el ligante enlazado) a una concentración final de anticuerpo modificado de 10 mg/ml en 12.5 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 7.5) que contenía 12.5 mM de NaCl y 10 % de DMA por 20 horas a temperatura ambiente. Una segunda alícuota del anticuerpo modificado fue conjugada inmediatamente al final de la reacción de modificación de 120 minutos (proceso de tres etapas), sin que sea purificado adicionalmente.

[0104] Las concentraciones de regulador y de proteína de la mezcla de reacción de modificación fueron ajustadas para producir una concentración de proteína modificada de 10 mg/ml y una composición de regulador de 28 mM de fosfato de potasio (pH de 7.5) que contenía 5.9 mM de NaCl y 2.7 % de sacarosa. Se añadió entonces DM4 (exceso molar de 1.7 veces sobre el SPDB inicial), y el DMA se ajustó a una concentración final de 10 %. Después de 20 horas de incubación a temperatura ambiente, ambas alícuotas de anticuerpo conjugado fueron purificadas sobre resina Sephadex™ G25F equilibrada en 10 mM de histidina y 10 % de sacarosa a pH de 5.5.

[0105] Las proporciones de ligante/anticuerpo (L/A) fueron determinadas por tratamiento con ditiotreitól para liberar piridin-2-tiona, la cual tuvo un coeficiente de extinción estándar de $8,080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 343. nM. Las proporciones de fármaco/anticuerpo (D/A) y los rendimientos

CP 000077

68
66

fueron determinados espectrofotométricamente (longitudes de onda de 280 nm y 252 nm) para la etapa de conjugación. Los porcentajes de monómero fueron ensayados por SEC-HPLC. Los porcentajes de fármaco libre fueron ensayados por HPLC sobre una columna Hisep. Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 7.

Tabla 7. Eliminación Optima de Etapa de Purificación para el Anticuerpo Modificado

Parámetros	Proceso de 4 etapas	Proceso de 3 etapas
SPBD inicial	4.6 x	4.6 x
L/A	4.1	No determinado
D/A	3.9	4.0
Rendimiento	79 %	91 %
Monómero (%)	95.8	96.1
Fármaco libre (%)	2.4	1.1

L/A, proporción de ligante/anticuerpo

D/A, proporción de fármaco/anticuerpo

[0106] Como se demostró por los resultados expuestos en la Tabla 7, la etapa para purificar el anticuerpo modificado puede ser eliminada en el contexto de la invención.

EJEMPLO 7

[0107] Este ejemplo demuestra un medio mejorado de purificar el anticuerpo que ha sido modificado con un

0000078

69
67

reactivo de modificación bifuncional y luego conjugado con un maytansionide.

5 [0108] El anticuerpo huN901 modificado con SPP (exceso molar de 7 veces) y purificado sobre resina SephadexTM G25F, como se describió en el Ejemplo 1, fue conjugado con el maytansinoide DM1 (exceso molar de 1.7 veces sobre el ligante, disuelto en dimetilacetamida (DMA), concentración final de 3 %).

10 [0109] Una primera muestra de conjugado fue purificada por cromatografía estándar sobre resina SephadexTM G25F en solución salina regulada con fosfato (PBS, pH de 6.5).

[0110] Una segunda muestra de conjugado fue purificada por medio de un sistema Pellicon XL TFF (Millipore, Billerica, MA), como se describió en el Ejemplo 1.

15 [0111] Una tercera muestra de conjugado fue purificada usando una columna de resina MEP Hypercell equilibrada en 50 mM de Tris (pH de 8.0), y eluida con 50 mM de acetato de sodio (pH de 4.0).

20 [0112] Una cuarta muestra de conjugado fue purificado usando una columna de resina UNOsphere S equilibrada en 50 mM de fosfato de sodio (pH de 6.5) y eluida con NaCl 0.2 M y 50 mM de fosfato de sodio (pH de 6.5).

25 [0113] Una quinta muestra de conjugado fue purificada usando una columna de resina CHT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) equilibrada en 50 mM de fosfato de sodio (pH de 6.5) y se eluyó con NaCl 0.3 M y 50 mM de fosfato de sodio (pH de 6.5).

0006079

70
68

5 [0114] Una sexta muestra de conjugado fue purificada usando una columna de SP Sepharose equilibrada en 35 mM de citrato de sodio, 10 mM de cloruro de sodio (pH de 5.0), y fue eluida con 0.25 mM de NaCl, 35 mM de citrato de sodio (pH de 5.0).

10 [0115] Se determinó el monómero conjugado por SEC - HPCL usando una columna de resina TSKG3000SW_{XL} equilibrada y desarrollada en regulador de fosfato de potasio 0.2 M a pH de 7.0, que contenía cloruro de potasio 0.2 M e isopropanol al 20 %. Se determinó el rendimiento de la etapa de conjugación dividiendo el rendimiento del anticuerpo conjugado entre la cantidad de anticuerpo modificado que fue conjugado (determinado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 289 nm).

15 [0116] Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 8.

Tabla 8: Comparación de la Etapa de Purificación Conjugación

Muestra de conjugado	Etapa de purificación conjugación	Monómero conjugado (%)	Rendimiento de la etapa (%)
1 (control)	Resina G25F	93.2	85
2 (invención)	TFF	92.8	85
3 (invención)	Resina MEP Hypercell	94.5	74
4 (invención)	Resina UNOsphere	96.3	81
5 (invención)	Resina CHT	97.9	72
6 (invención)	Resina SP Sepharose	95.1	81

000080

31
69

[0117] Los resultados de la Tabla 8 muestra que todos los métodos de purificación de la invención investigados (grupos 2 - 6) dieron rendimientos similares a los obtenidos con el proceso control (grupo 1). Cada método cromatográfico de la invención produjo un mejoramiento en el nivel de monómero conjugado y puede ser fácilmente llevado a escala.

[0118] Además de CHT (cerámica hidroxiapatita), CFT (cerámica fluoroapatita) también pueden usarse bajo condiciones cromatográficas similares. Alternativamente ambas resinas la CHT y la CFT pueden ser usadas en modalidad n- adsorbente de modo que el producto deseado sustancialmente conjugado monomérico no sea retenido por las resinas, mientras que especies de alto peso molecular son retenidas y así separadas del producto deseado.

[0119] Aunque una composición estándar de regulador/solvente para conjugación comprende 3 % de DMA, 50 mM de fosfato de potasio, 50 mM de NaCl, y 2 mM de EDTA a pH de 6.5 (como se utilizó en el Ejemplo 1), otras composiciones son más compatibles con alguna de las etapas cromatográficas descritas en la presente y proporcionan otros beneficios en relación al proceso estándar. Por ejemplo, la conjugación puede ser efectuada en DMA al 3 %, 12.5 mM de fosfato de potasio, 12.5 mM de NaCl, y 0.5 mM de EDTA a pH de 6.5. Bajo estas condiciones, la cantidad de DM4 incorporado en relación a la cantidad de ligante incorporado en el anticuerpo huB4 fue de aproximadamente 10 % más alta que para las condiciones estándares. Además,

000081

32
70

estas condiciones son más compatibles con cargar sobre resinas tales como resinas de intercambio catiónico y CHT.

[0120] Todas las referencias incluyendo publicaciones, solicitudes de patentes, y patentes, citadas en la presente se incorporan a la misma como referencia en la misma medida que si cada referencia fuera individual y específicamente indicada para ser incorporada como referencia y fuera expuesta íntegramente en la presente.

[0121] El uso de "un" (antes de consonante) y "un" (antes de vocal) y "el, la" y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) son construidas para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en la presente o sea contraindicada claramente por el contexto. Los términos "que comprenda", "que tenga", "que incluya" y "que contenga" se construyeron como términos de finalidad abierta (es decir que significan "que incluya pero no se limite a") a menos que se indique de otra manera. La cita de intervalos de valores en la presente está meramente prevista para servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que caiga en el intervalo, a menos que se indique de otra manera en la presente, y cada valor separado es incorporado en la especificación como si fuera citado individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente pueden ser efectuados en cualquier orden a menos que se indique de otra manera en la presente o se contraindique claramente

1000000082

23
71

por el contexto. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o lenguajes ejemplares (por ejemplo "tal como") proporcionado en la presente, está previsto meramente para mejor iluminar la invención y no presenta una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reclame de manera diferente. Ningún lenguaje en la especificación deberá construirse como indicando cualquier elemento no reclamado como esencial para la práctica de la invención.

10 [0122]En la presente se describen modalidades preferidas de esta invención, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Variaciones de las modalidades preferidas pueden volverse obvias para los expertos en el arte a partir de la lectura de la descripción anterior. Los inventores esperan
15 que los expertos empleen dichas variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención sea practicada de otra manera a la específicamente descrita en la presente. Por consiguiente, la invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del asunto citado en las
20 reivindicaciones anexas a la presente como permitidas por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las variaciones posibles de los mismos está abracada por la invención a menos que se indique de otra manera en la presente o se
25 contraíndique claramente por el contexto.

000000083

72

74
72

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un conjugado anticuerpo-maitansinoide que comprende las etapas de:

5 (a) poner en contacto un anticuerpo con un reactivo reticulador bifuncional para unir covalentemente un ligante al anticuerpo y por consiguiente preparar una primera mezcla que comprende anticuerpos que tienen ligantes unidos a los mismos,

10 (b) someter la primera mezcla a filtración de flujo tangencial, precipitación selectiva, filtración por adsorción, o cromatografía por absorción y por consiguiente preparar una primera mezcla purificada de anticuerpos que tienen ligantes unidos a los mismos,

15 (c) conjugar un maitansinoide a los anticuerpos que tienen ligantes unidos a los mismos en la primera mezcla purificada al hacer reaccionar los anticuerpos que tienen ligantes unidos a los mismos con un maitansinoide en una solución que tiene un pH de
20 aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para preparar una segunda mezcla que comprende (i) anticuerpo químicamente acoplado a través del ligante al maitansinoide, (ii) maitansinoide libre, y (iii) subproductos de reacción producidos durante la etapa (c), y

25 (d) someter la segunda mezcla a filtración de flujo tangencial para purificar los anticuerpos químicamente acoplados a través de los ligantes al

000704

75
70

maitansinoide a partir de los otros compuestos de la segunda mezcla y por consiguiente preparar una segunda mezcla purificada de anticuerpos químicamente acoplados a través de los ligantes al maitansinoide.

5

2. El proceso de la reivindicación 1, en donde la cromatografía por absorción se selecciona del grupo que consiste de cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC),
10 cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico de modo mezclado, cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), cromatografía de ligando de tinte, cromatografía de afinidad,
15 cromatografía de fase inversa, y combinaciones de las mismas.

3. El proceso de la reivindicación 1, en donde filtración de flujo tangencial se utiliza en la etapa (b).

20

4. El proceso de la reivindicación 1, en donde precipitación selectiva se utiliza en la etapa (b).

5. El proceso de la reivindicación 1, en donde filtración por adsorción se utiliza en la etapa (b).

25

000005

76
74

6. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde se utiliza la cromatografía por absorción en la etapa (b).

7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la solución en la etapa (c) tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.0.

8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la solución en la etapa (c) tiene un pH de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9.

9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la solución en la etapa (c) comprende sacarosa.

10. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la solución en la etapa (c) comprende un agente regulador seleccionado del grupo que consiste de un regulador de citrato, un regulador de acetato, un regulador de succinato, y un regulador de fosfato.

11. Un proceso para preparar un conjugado anticuerpo-maitansinoide que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un anticuerpo con un reactivo reticulador bifuncional para unir covalentemente un ligante al anticuerpo y por consiguiente preparar una primera mezcla que comprende anticuerpos que tienen ligantes unidos a los mismos,

000086

77
75

(b) conjugar un maitansinoide to los anticuerpos que tienen ligantes unidos a los mismos en la primera mezcla al hacer reaccionar los anticuerpos que tienen ligantes unidos a los mismos con un maitansinoide en una
5 solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para preparar una segunda mezcla que comprende (i) anticuerpo químicamente acoplado a través del ligante al maitansinoide, (ii) maitansinoide libre, y (iii) subproductos de reacción producidos durante la
10 etapa (b), y

(c) someter la segunda mezcla a filtración de flujo tangencial, precipitación selectiva, filtración por adsorción, cromatografía por absorción, o una combinación de las mismas, para purificar los
15 anticuerpos químicamente acoplados a través de los ligantes al maitansinoide a partir de los otros compuestos de la segunda mezcla y por consiguiente preparar una segunda mezcla purificada de anticuerpos químicamente acoplados a través de los ligantes al
20 maitansinoide

en donde la primera mezcla no se somete a filtración de flujo tangencial, precipitación selectiva, filtración por adsorción, o cromatografía por absorción.

25 12. El proceso de la reivindicación 11, en donde la primera mezcla no se somete a purificación.

78
76

13. El proceso de la reivindicación 11 o 12, en donde la cromatografía por absorción se selecciona del grupo que consiste de cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico de modo mezclado, cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), cromatografía de ligando de tinte, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa, y combinaciones de las mismas.

14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde la solución en la etapa (b) tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.0.

15. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde la solución en la etapa (b) tiene un pH de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9.

16. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en donde la solución en la etapa (b) comprende sacarosa.

17. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en donde la solución en la etapa (b) comprende un agente regulador seleccionado del grupo que consiste de un regulador de citrato, un regulador de acetato, un

000088

79
77

regulador de succinato, y un regulador de fosfato.

18. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17,
en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5

19. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17,
en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal
humanizado.

10 20. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17,
en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que
consiste de huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab,
bivatuzumab, sibrotuzumab, CNT095, huDS6, y rituximab.

15 21. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17,
en donde el anticuerpo es trastuzumab.

22. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17,
en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

20

23. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17,
en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

24. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17,
25 en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal
humano.

000089

80
73

P-3553
P117812CO
OCTUBRE 24, 2012

25. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17,
en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de
ratón.

5 26. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-25,
en donde el maitansinoide comprende un grupo tiol.

27. El proceso de la reivindicación 26, en donde el
maitansinoide es N^{2'}-deacetil-N^{2'}-(3-mercapto-1-
10 oxopropil)-maitansina (DM1).

28. El proceso de la reivindicación 26, en donde el
maitansinoide es N^{2'}-deacetil-N^{2'}-(4-metil-4-mercapto-1-
oxopentil)-maitansina (DM4).

15

29. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-28,
en donde el anticuerpo se acopla químicamente al
maitansinoide a través de enlaces químicos seleccionados
del grupo que consiste de enlaces de disulfuro, enlaces
20 lábiles en medio ácido, enlaces fotolábiles, enlaces
lábiles en peptidasa, enlaces de tioéter, y enlaces
lábiles en esterasa.

30. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-29,
25 en donde el reactivo reticulador bifuncional se
selecciona del grupo que consiste de 3-(2-
piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), N-

000090

81
79

succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-
(6-amidocaproato), (LC-SMCC), éster de N-succinimidilo
de ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), éster de N-
succinimidilo de ácido γ -maleimidoundecanoico (GMBS),
5 éster de N-hidroxisuccinimida de ácido α -
maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoil-N-
hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α -
maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -
maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), N-succinimidil
10 4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB), N-(p-
maleimidofenil)isocianato (PMPI), N-succinimidil-4-
(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-
succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo
(SBA), y 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidilo
15 (SBAP).

31. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-29,
en donde el reactivo reticulador bifuncional se
selecciona del grupo que consiste de 4-(2-
20 piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB), 4-(2-
piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP), y 4-
(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-
succinimidilo (SMCC).

25 32. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-29,
en donde el reactivo reticulador bifuncional es 4-
(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-

000091

82
80

P-3553
P117812CO
OCTUBRE 24, 2012

succinimidilo (SMCC).

33. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17,
en donde el anticuerpo es trastuzumab, el reactivo
5 reticulador bifuncional es 4-
(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-
succinimidilo (SMCC), y el maitansinoide es N^{2'}-deacetyl-
N^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1).

10

000092

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

5 La invención proporciona un proceso para preparar un agente de enlace celular químicamente acoplado a un fármaco. El proceso comprende fijar covalentemente un ligante a un agente de enlace celular, una etapa de purificación, conjugar un fármaco al agente de enlace celular y una etapa de purificación subsiguiente.

000093

- / -

Bogotá D.C., Octubre 24 de 2012 - 12:15:26

NI 830.008.643

RE

465.000,00

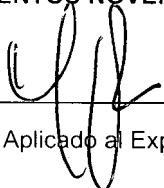
\$590,000.00

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

Fecha: 2012-10-24 15:25:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 95 **96**

. Octubre 24 de 2012 - 12:15:30

85
83

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 110882	
				Bogotá D.C., Octubre 24 de 2012 - 12:15:26	
RECIBIDO DE : CLARKE MODET				NI 830.008.643	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	95120	14/09/2012		820.000.00
RECIBO DE CA	999999999	95124	14/09/2012		820.000.00
RECIBO DE CA	999999999	95126	14/09/2012		820.000.00
RECIBO DE CA	999999999	95127	14/09/2012		820.000.00
RECIBO DE CA	999999999	95212	14/09/2012		465.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
23 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES			30.000.00	690.000.00
					\$690.000.00
=====					
SON: **SEISCIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEI					
Responsable: 			SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO		
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____			 No. 08-019768-B-00000-0000 Fecha: 2013-03-08 13:53:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 83		
			SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO		
			 No. 08-019768-A-00003-0000 Fecha: 2012-10-24 15:25:36 Dep. 2020 DIR NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 523 RESPUESTA Folios: 95 96		
000095					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Octubre 24 de 2012 - 12:15:30					