



No. 07-115803- -00001-0000

Fecha: 2007-11-02 11:30:37 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Evt. 378 FASENACIONALI
Act. 329 COINFORMACION Folios: 102

Industria y Comercio

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES
2000-10

① SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud

② **SOLICITANTE** Nombre: IMMUNOGEN, INC.
Dirección: 128 Sidney Street
E-mail:
Domicilio: Cambridge, Massachusetts 02139-4239,
Estados Unidos de América

③ **REPRESENTANTE** Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
Dirección: **Cra. 7 No. 74-64, Of. 506** C.C. ☒ NIT
O APODERADO Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** C.E. ☐ OTRO
E-mail: No. **17'192.062** TP. **50.007**

④ Número de expediente: 07-115,803 Título
"ELIMINACION DE POBLACION
CELULAR HETEROGENEA O MEZCLADA
EN TUMORES"

⑤ Descripción de la corrección o modificación solicitada

De conformidad con el Artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la
Comunidad Andina, presento nuevo capítulo descriptivo con algunas modificaciones
efectuadas. Estas modificaciones no implican ningún cambio sustancial, ni
material de la solicitud presentada inicialmente. También presento nuevo
Capítulo Reivindicatorio

⑥ Comprobante de pago No. 07-89,574 Fecha: 1 de Noviembre de 2007

⑦ Anexos:

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

⑧

NOMBRE **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

Cpím.-

FIRMA

C.C. 17'192.062 de Bogotá T.P. 50.007

7 192 11

PARA USO EXCLUSIVO DE
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

ACTA DE EMISIÓN

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 89,574
FECHA : NOVIEMBRE 1 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-115803-00001-0000

Fecha: 2007-11-02 11:30:37 Dep. 2020 NUECREACION:
Tra 11 PATENTE(YII) Evt: 378 FASENACIONAL
Act 329 CTOINFORMACION Folios: 102

***** COMBINACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	VAL. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ASOCIADOS	ENTRADA REGULAR	080-00110-6	00283110	01-11/2007	1,685,000.00	

***** C O N C E P T O *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
	11 MATERIAL Y LEÑAS CONCRETAS	89,000.00
	TOTAL	89,000.00

SON: NOVENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CASH APLICADO AL EFECTIVO AS.

B 113

ELIMINACIÓN DE POBLACIÓN CELULAR HETEROGÉNEA O MEZCLADA EN
TUMORES

La presente solicitud reclama la prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos de Norteamérica no. 60/671,498, presentada el 15 de abril de 2005 y de la solicitud provisional de los Estados Unidos de Norteamérica no. 60/781,722, presentada el 14 de marzo de 2006. Las descripciones de ambas solicitudes provisionales están expresamente incorporadas en la presente mediante referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para eliminar o aniquilar poblaciones celulares heterogéneas o mezcladas. En particular, la presente invención se refiere a un método de eliminación de un tumor comprendido por poblaciones celulares heterogéneas o mezcladas mediante el direccionamiento selectivo de un ligando, tal como un antígeno, un epítopo o un receptor, que es expresado en una población celular particular para eliminar una población celular que carece del ligando único.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La eficacia terapéutica de fármacos anticancerígenos citotóxicos se puede mejorar al incrementar su selectividad hacia las células cancerígenas. Una forma de lograr este objetivo es enlazar un fármaco de manera covalente con un anticuerpo monoclonal u otro tipo de agente de direccionamiento que tiene afinidad selectiva para las células tumorales. Este enfoque ha sido ampliamente explorado con varios tipos de agentes citotóxicos y se

A
114
115

han desarrollado varios tipos de conjugados antifármaco humanizados (o humanos), o inmunoconjugados, que combinan alta potencia y selectividad en la eliminación de células tumorales de objetivo, prolongados tiempos de retención y carencia de inmunogenicidad. Esta nueva generación de agentes anticancerígenos altamente efectivos incluyen conjugados de anticuerpos con maitansinoides, análogos de CC 1065, derivados de taxol (taxoides), de auristatina, y de una caliqueamicinila. Varios conjugados de maitansinoide (DMI) están actualmente en desarrollo clínico, y un conjugado de un anticuerpo anti-CD33 con caliqueamicina, Mylotarg, ha sido aprobado por la Federal Food and Drug Administration para uso clínico como un fármaco anticancerígeno.

Se han publicado muchos informes que detallan los intentos para direccionar de manera específica las células tumorales con conjugados anticuerpo monoclonal-fármaco (Sela et al. en Inmunoconjugados 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al, en Targeted Drugs 1- 22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al, en Antibody Mediated Delivery Systems 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, en Antibody Mediated Delivery Systems 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al, en Antibody Mediated Delivery Systems 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988). Los fármacos citotóxicos tales como metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalano, mitomicina C, y clorambucil se han conjugado para una variedad de anticuerpos monoclonales. En algunos casos, las moléculas de fármaco fueron enlazadas a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula portadora intermedia tal como albúmina del suero (Garnett et al. Cancer Res. 46:2407-2412 (1986); Ohkawa et al. Cancer Immunol. Immunother. 23:81-86 (1986); Endo et al. Cancer Res. 47:1076-1080 (1980)), dextrano (Hurwitz et al. Appl. Biochem. 2:25-35 (1980); Manabi et al. Biochem. Pharmacol. 34:289-291 (1985); Dillman et al. Cancer Res. 46:4886-4891 (1986); Shoval et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8276-8280 (1988)), o ácido poliglutámico (Tsukada et al. J. Natl. Cancer Inst. 73:721-729 (1984); Kato

et al. J. Med. Chem. 27:1602-1607 (1984); Tsukada et al. Br. J. Cancer 52:111-116 (1985)).

La eficacia de un conjugado anticuerpo-fármaco es comprometida de manera general por la expresión heterogénea del antígeno de objetivo en algunos tumores, debido a que el suministro dirigido de fármaco conjugado a través de un anticuerpo que se enlaza a las células tumorales antígeno positivas repondrá cualesquiera células tumorales antígeno negativas a las cuales no pueda enlazarse el anticuerpo. Además, la vasculatura del tumor es un objetivo atractivo que está captando más y más la atención como una forma de contraer los tumores al impedirles su suministro sanguíneo. La vasculatura del tumor es de manera usual antígeno-negativa del tumor. Se ha informado previamente que varias clases de agentes citotóxicos anticuerpo-direccionados de hecho son capaces de erradicar no solamente las células antígeno-positivas sino también las células antígeno-negativas cercanas, el llamado "efecto espectador". Este efecto espectador se observe con inmunoradionucleótidos, inmunoliposomas, y ADEPT (Allen TM, Nat Rev Cancer 2 (10):750-63 (2002); Muldoon LL, Neurosurgery 53(6): 1406-12 (2003), Muldoon LL y Neuwelt EA, J Neurooncol 65(1):49-62 (2003)). En un resumen publicado en Proceedings of the American Association for Cancer Research, vol 41, March 2000, los autores describen que una porción del DMI separado es evacuada por la p-glicoproteína y otros transportes de evacuación en una célula. Esto se debe a que, en el ambiente extracelular, el DMI-tiol descargado libre reacciona con facilidad con las moléculas celulares que tienen un grupo sulfhidrilo o enlaces disulfuro, tales como en cisteína o cistina, glutatona oxidada o reducida, o proteínas (por ejemplo, albúmina del plasma). Una vez que reaccionó con estas moléculas biológicas hidrofílicas, el DM-I se convierte en un compuesto disulfuro mezclado, inactivo, lo que le impide que sea efectivo para penetrar a células cercanas y retener su potencia.

716
112

Por lo tanto, sería enormemente benéfico el tratamiento de varias enfermedades proliferantes si los conjugados de agente de enlace celular-fármaco pudiera ser diseñado de tal manera que proporcione una forma más y potente del fármaco libre para destruir no solamente las células tumorales antígeno positivas, sino también cualesquiera células tumorales antígeno negativas circundantes o células de la vasculatura neoplástica, aumentando al máximo de este modo el éxito en el tratamiento de tumores mediante la liberación del fármaco libre estable desde el conjugado dentro de la célula de objetivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para eliminar poblaciones celulares heterogéneas o mezcladas AB, en donde A representa una población celular que expresa de manera selectiva un ligando específico y B representa una población celular que carece del ligando expresado por A. Los métodos comprenden de manera general, suministrar un conjugado de agente de enlace celular-fármaco, enlazado por un enlazador que comprende un grupo disulfuro, para la población celular seleccionada A que expresa el ligando, permitiendo el enlace de este agente al ligando en la población celular A, con la opción de que el fármaco sea internalizado dentro de las células que comprenden la población celular A. Un fármaco unido al agente de enlace celular en un conjugado es referido como un pro-fármaco; el pro-fármaco, una vez separado del conjugado es convertido en un fármaco citotóxico o "fármaco" y es capaz de experimentar modificación adicional, tal como alquilación. Un fármaco citotóxico o un fármaco citotóxico modificado es el ingrediente farmacéutico activo. Por lo tanto, en una modalidad, el fármaco, una vez separado del conjugado, experimenta alquilación, de preferencia metilación, la cual impide al grupo tiol sin reaccionar que experimente

modificación adicional que resultaría en inactivación del fármaco. El fármaco alquilado libre es efectivo para eliminar las células en la población celular A; y dicho fármaco "activado" es liberado desde la población celular A para inducir la eliminación de las células en la población celular B, eliminando de esta manera la población heterogénea o mezclada AB. El término "activado", como se utilice en la presente, se refiere a un fármaco libre, de preferencia un fármaco libre modificado, en donde la modificación del fármaco libre mejora su estabilidad o actividad. Dicha modificación comprende alquilación, por ejemplo, metilación, del fármaco después de que es separado del conjugado anticuerpo-fármaco.

Por tanto, se ha encontrado de manera inesperada que si un fármaco experimenta alquilación (por ejemplo metilación) en el grupo tiol una vez que el fármaco es liberado del conjugado, la alquilación brinda protección al fármaco a fin de que no reaccione con las moléculas celulares que tienen un grupo sulfhidrilo, como la cisteína, o proteínas (por ejemplo, albúmina del plasma), el cual obstruiría o inactivaría al fármaco libre. Como se muestra en esta invención, el fármaco libre alquilado es altamente estable, potente y se transfiere con facilidad a y elimina las células antígeno negativas cercanas, eliminando de esta manera una población heterogénea o mezclada de células en un tumor.

Aunado al hallazgo anterior esta otro descubrimiento sorprendente de que la alquilación del fármaco libre es un evento preferido si el enlace disulfuro en el enlazador, el cual enlaza el agente de enlace celular al fármaco, es estabilizado mediante la creación de un obstáculo estérico en la cercanía del enlace disulfuro. En una modalidad preferida, el enlace disulfuro es estabilizado al proporcionar un obstáculo estérico en el lado del fármaco del enlace. El obstáculo estérico por lo general es proporcionado mediante átomos alquilo, tales como grupos metilo, aunque otros grupos alquilo también podrían ser utilizados. El "lado del fármaco", como se utiliza en la presente se refiere a sustituciones

en un átomo α -carbono de los dos átomos α -carbono del enlace disulfuro que se conectará al fármaco después de que se separa el enlace de disulfuro en el conjugado.

Una "población celular heterogénea o mezclada" se refiere a la diversidad en una población celular tumoral, la cual incluye, diferentes características fenotípicas o identificaciones moleculares, tales como heterogeneidad de ligandos, por ejemplo, antígenos, epítopes o receptores en la superficie de las células tumorales. También se refiere a poblaciones celulares mezcladas en un tejido tumoral, tales como células tumorales, células de la vasculatura tumoral, y células de estroma tumoral. Además, también se refiere a un tumor en el cual una célula tumoral puede haber experimentado mutaciones espontáneas que dan como resultado una población de células genéticamente heterogéneas a medida que crece desde una célula individual transformada en maligna. La característica fenotípica podría comprender de una célula tumoral que expresa un ligando, tal como un antígeno, un epítipo o un receptor en la superficie de la célula tumoral en una etapa particular de la progresión de tumor. La misma célula tumoral puede perder la expresión de los ligandos sobre la superficie a medida que la célula experimenta el cambio fenotípico, por ejemplo, mediante diferenciación. El cambio fenotípico incluye también células que pierden sus ligandos al dispersarlos en el entorno.

Una "población celular heterogénea o mezclada" se refiere también a células infectadas por virus, células infectadas por microorganismo y células infectadas por parásito, en la cual un virus, microorganismo o un parásito puede haber experimentado mutaciones espontáneas que dan como resultado una población de células genética o fenotípicamente heterogéneas a medida que crecen a partir de una sola célula.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención es un método para dirigir un fármaco a una población celular seleccionada en un tumor en donde por lo menos una de

las células expresa un ligando particular para aniquilar o eliminar una población celular no relacionada dentro del mismo tumor que carece de dicho ligando. El método comprende poner en contacto una población celular seleccionada o tejido que expresa un ligando particular con un conjugado de agente de enlace celular-fármaco, en donde uno o más fármacos están enlazados de manera covalente al agente de enlace celular a través de un enlazador y la población celular seleccionada libera el agente citotóxico o el fármaco "activado" para eliminar o aniquilar las células no relacionadas que carecen del ligando expresado por la población celular de objetivo.

Otro aspecto de la presente invención es un método para eliminar una población celular heterogénea o mezclada al dirigir un conjugado de agente de enlace celular-fármaco a una población celular seleccionada en donde dichas por lo menos algunas de las células expresan un ligando dentro de la población celular heterogénea o mezclada. El ligando es reconocido por el agente de enlace celular del conjugado, el cual tiene uno o más fármacos enlazados de modo covalente a través de un enlazador. El agente de enlace celular se enlaza a las células de objetivo y es internalizado, eliminando de esta manera las células de objetivo. El fármaco activado es liberado dentro de los alrededores a fin de inducir la eliminación de otra población celular seleccionada que carece del ligando, eliminando así la población celular heterogénea o mezclada.

La presente invención enseña también un método para eliminar células en un tumor que comprende dirigir un ligando que fue expresado inicialmente en la población celular seleccionada A de una de las poblaciones celulares heterogéneas o mezcladas AB, y en el curso del tiempo se dispersó en el medio. Aquí, el conjugado de agente de enlace celular-fármaco es dirigido de manera preferible al ligando dispersado. El conjugado de agente de enlace celular-fármaco es separado para liberar el fármaco activado el cual se difunde dentro de las células anormales que circundan al antígeno

dispersado para inducir la eliminación de aquellas células que comprenden una población celular heterogénea o mezclada en un tumor y carecen del ligando que fue dirigido de manera selectiva, eliminando de este modo las células en el tumor.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Estructuras de conjugados anticuerpo-fármaco.

10

Figura 2. Histogramas del anticuerpo huC242 que se enlaza a líneas celulares de adenocarcinoma de colon COLO 205 y HT-29, la línea celular de carcinoma gástrico SNU-16, la línea celular de melanoma A375, y al línea celular Namalwa de linfoma de Burkitt. Las células fueron incubadas con huC242 y después teñidas con IgC anti-humano etiquetado para fluorescencia como se describe en la sección de Métodos y Materiales, Ejemplo 1. La fluorescencia asociada a célula fue medida en un clasificador de célula activada por fluorescencia (FACS) y los histogramas se muestran en líneas sólidas. Las líneas punteadas representan los histogramas de células teñidas con IgC anti-humano etiquetado para fluorescencia sin pre-incubación con huC242 (tinción de fondo). Los porcentajes de células antígeno-positivas y antígeno-negativas se proporcionan en forma numérica.

15

20

Figura 3. Histogramas que muestran que inmunoconjugados enlazados a través de un disulfuro, aunque no tioéter, eliminan células no de objetivo ubicadas de manera próxima a sus células de objetivo in vitro.

25

A. Efecto de células COLO 205 tratadas con huC242-DMI, formaldehído, o luz UV, sobre la proliferación de las células COLO 205 no tratadas en cultivos celulares de colágeno 3D. Las células no tratadas fueron mezcladas con las células tratadas en diferentes relaciones y las muestras fueron incubadas en colágeno durante 5 días,

#P 424
122

después las células viables fueron medidas usando una prueba MTT. La fracción de células supervivientes se muestra para cada relación de mezcla de célula. Barras negras, grises y blancas representan los resultados de los cultivos con células tratadas con huC242-DMI, con células tratadas con formaldehído y con células tratadas con luz UV, respectivamente. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

B. Efecto de células COLO 205 tratadas con huC242-DMI o huC242-SMCC-DMI sobre células no tratadas COLO205, Namalwa, A375, y HepG2 cuando crecen en cultivos celulares de colágeno 3D mezclados. Las muestras de células COLO 205 tratadas con huC242-DMI o huC242-SMCC-DMI fueron mezcladas con números iguales de Namalwa, A375, HepG2, o células COLO 205 no tratadas y los cultivos mezclados fueron incubados en una matriz de colágeno durante cinco días, cuando se determinó el número de células viables utilizando una prueba MTT y comparadas con aquellas de las muestras de control (sólo células no tratadas). La fracción de células supervivientes se muestra para cada línea celular, barras negras para células COLO 205, barras grises para células Namalwa, barras blancas para A375, y barras punteadas para células HepG2.

C. Tratamiento de células COLO 205 CanAg-positivas, células Namalwa CanAg-negativas o poblaciones celulares COLO 205 y Namalwa mezcladas con huC242-DMI, huC242-SMCC-DMI, huC242-DCI, o huC242-SMCC-DCI en cultivo celular líquido. Las células COLO 205, células Namalwa, y poblaciones mezcladas de números iguales de células COLO 205 y Namalwa se cultivaron en pozos de fondo Redondo de placas de cultivo de tejido en ausencia (fila izquierda) o presencia (fila derecha) de 1 nM de uno de los conjugados anticuerpo-fármaco. Después de cinco días de incubación, se tomaron fotografías de los pozos.

D. Resultados de un experimento análogo a aquel según C, excepto que la línea celular antígeno-positiva es SNU-16.

122
123

Figura 4. Un maitansinoide citotóxico se acumula de manera gradual en el sobrenadante de células de objetivo antígeno-positivas tratadas con huC242-DM1.

Muestras de células COLO 205 CanAg-positivas (A, C, D, F) y células Namalwa CanAg-negativas (B, E) fueron incubadas con huC242-DMI (A, B, D, E) o huC242- SMCC-
DMI (C, F). Los medios de cultivo fueron extraídos al inicio y después de 6, 24, y 48 horas de incubación y probadas para la presencia del conjugado (barras negras) y fármaco maitansinoide liberado (barras blancas) (A, B, C), y para actividad citotóxica sobre células Namalwa CanAg-negativas (D, E, F). Las fracciones supervivientes de las células son graficadas contra la concentración del conjugado en la muestra.

La Figura 5. Citotoxicidad de expectación de inmunoconjugados en modelos de tumor de xenoinjerto.

A. Análisis inmunohistoquímico de tumores de xenoinjerto COLO 205/Namalwa mezclados cultivados en ratones SCID y tratados con huC242-DMI o huC242-SMCC-DMI. Los portaobjetos fueron teñidos con anticuerpo C242 murino para detectar células COLO 205 (columna izquierda) o un anticuerpo anti-CD38 para detectar células Namalwa (columna derecha), a y b son secciones consecutivas de un tumor no tratado, c y d están a partir de un tumor del grupo de animales de control tratados con PBS, e y f están a partir de un tumor en un animal tratado con huC242-SMCC-DMI, y g y h están a partir de un tumor en un animal tratado con huC242-DMI. Las flechas señalan las áreas necróticas.

B. Actividad de conjugados huC242-DMI y huC242-SMCC-DMI contra tumores de xenoinjerto de células COLO 205 de objetivo CanAg-positivas (a), células Namalwa antígeno-negativas (b), y poblaciones mezcladas de células COLO 205 y Namalwa (c). Animales con tumores establecidos de un tamaño de aproximadamente 100 mm fueron probados durante cinco días consecutivos con PBS (■, grupo de control), huC242-SMCC-DMI (○, •), o huC242-DMI (Δ, ▲) con dosis diarias de los conjugados que contenían 150

17
123
114

$\mu\text{g/kg}$ de DMI enlazado. Los volúmenes de tumor en mm^3 fueron graficados contra tiempo (días después de la inoculación celular).

Figura 6. Actividad de conjugados huC242-DMI y huC242-SMCC-DMI contra tumores de xenoinjerto HT-29, los cuales expresan el antígeno de objetivo, CanAg, de una manera heterogénea. Grupos de cinco ratones que tienen tumores subcutáneos de 13 días de duración de un volumen medio de aproximadamente 170 mm^3 fueron tratados durante cinco días consecutivos ya sea con PBS (■, grupo de control), huC242-DMI (A) o con huC242-SMCC-DMI (B) en dosis diarias de los conjugados que contenían ya sea $25 \mu\text{g/kg}$ (○), $75 \mu\text{g/kg}$ (♦) o $150 \mu\text{g/kg}$ (o) de DMI enlazado. Los volúmenes de tumor en mm^3 fueron graficados contra tiempo (días después de la inoculación celular).

Figura 7. Citotoxicidad de huC242-SPDB-DM4 y huC242-SMCC-DMI y sus efectos sobre el ciclo celular en presencia del inhibidor lisosomal BafA1. (A) Las fracciones supervivientes de células COLO 205 antígeno-positivas (símbolos cerrados) y Nawalma antígeno negativas (símbolos abiertos) fueron medidas usando una prueba MTT después de la exposición a diferentes concentraciones de huC242-SPDB-DM4 (diamantes) o huC242-SMCC-DMI (cuadrados) durante 4 días, y graficados contra concentraciones de conjugado. (B) Actividades antitumorales de huC242-SPDB-DM4 y huC242-SMCC-DMI en ratones SCID que tienen xenoinjertos de tumor HT-29 humano de colon. Las dosis se basan en la cantidad de DM4 o DMI conjugado. Los ratones con tumor fueron tratados con PBS (círculos cerrados, ambos paneles), una sola dosis de $50 \mu\text{g/kg}$ huC242-SPDB-DM4 (diamantes abiertos), $150 \mu\text{g/kg}$ huC242-SPDB-DM4 (diamantes cerrados), o cinco inyecciones diarias de huC242-SMCC-DMI a una dosis de $150 \mu\text{g/kg}$ (cuadros abiertos). (C) FACS histogramas (FL2-A) exhibe contenidos de ADN de células COLO 205 de crecimiento exponencial, asíncrono tratadas durante 20 horas con $0.66 \mu\text{M}$ nocodazol, 10^{-8} M DMI-SMe, $3 \times 10^{-9} \text{ M}$ huC242-SMCC-DMI, o $3 \times 10^{-9} \text{ M}$ huC242-SPDB-DM4, en

presencia de 30 μ M cloroquina, 30 nM BafA1, o sin tratamiento.

Figura 8. Efectos de cloroquina sobre la suspensión mitótica inducida por huC242-SMCC-DMI. Los histogramas FACS (FL2-A) exhiben contenidos ADN de muestras de células COLO 205 de crecimiento exponencial asíncrono tratadas o no tratadas durante 20 horas con 10^{-8} M DMI-SMe, 3×10^{-9} M huC242-SMCC-DMI, en presencia o ausencia de 30 μ M cloroquina. En presencia de cloroquina, la suspensión G_2/M inducida por huC242-SMCC-DMI fue abrogada casi por completo (14% in G_2), considerando que la cloroquina tuvo sólo un efecto modesto sobre la suspensión G_2/M ocasionada por DMI-SMe (51% in G_2).

Figura 9. Metabolitos maitansinoides formados al tratamiento de células COLO 205 con huC242-SMCC- ^3H DMI (A) o huC242-SPDB- ^3H DM4 (B). Los metabolitos fueron extraídos con acetona a partir de la pella celular y los medios usados, respectivamente, y después analizados por medio de HPLC. El efluente de la columna fue monitoreado para tritio utilizando un analizador de escintilación de flujo en línea con una salida en mV^2 ; por tanto los cromatogramas muestran el tiempo de retención sobre la abscisa y mV^2 como una medida de ^3H en la ordenada. Los paneles a-f son los cromatogramas asociados con el medio y las pellas celulares de las células COLO 205 que fueron tratadas durante 5, 9 y 26 horas con huC242-SMCC- ^3H DMI (A) o huC242-SPDB- ^3H DM4 (B). El panel g de (A) y panel h (B) son los cromatogramas obtenidos a partir del extracto de acetona de la muestra de conjugado huC242-SMCC- ^3H DMI y huC242-SPDB- ^3H DM4, respectivamente, usada en el experimento. El cromatograma en el panel g (B) se deriva a partir de las células que fueron tratadas igualmente para la pella celular a partir de la incubación de 9-h (como en el panel c), excepto que la muestra fue expuesta de manera adicional a NEM antes de la cromatografía para alquilar cualesquiera grupos sulfhidrilo.

Figura 10 Tratamiento de metabolitos en el medio a partir de células COLO 205

tratadas con huC242-SPDB- ^3H] DM4 con DTT y selenol. Los metabolitos fueron extraídos con acetona a partir de los medios usados después de una exposición de 26-h de las células al conjugado. El extracto fue dividido en dos porciones iguales. Una porción fue sometida directamente a cromatografía (a) y la otra porción (b) fue tratada con DTT y selenol antes de la cromatografía para reducir todos los enlaces disulfuro. El efluente de la columna fue monitoreado para tritio utilizando un analizador de escintilación en línea con una salida en mV^2 ; por tanto, los cromatogramas muestran el tiempo de retención en la abscisa y mV^2 como una medida de ^3H en la ordenada.

Figura 11. Acumulación de metabolitos maitansinoides dentro y fuera de células COLO 205 tratadas con conjugados ^3H] y su correlación con la suspensión mitótica. (A) Las áreas asociadas con los picos de radioactividad de los metabolitos en la Figura 9 fueron cuantificadas y convertidas a pmol como se describe en la sección de Materiales y Métodos, Ejemplo 2. Los paneles a-c muestran los cambios en la cantidad de metabolitos en las muestras durante un periodo de incubación de 26-h. Panel a: Acumulación de lisina- N^6 -SMCC-DMI en los medios (círculos abiertos) y células (círculos cerrados) después del tratamiento de células COLO 205 con huC242-SMCC- ^3H]DMI. Panel b: Cambios en las cantidades de metabolitos maitansinoides en la pella celular (símbolos cerrados) y en los medios (símbolos abiertos) después del tratamiento de COLO 205 con huC242-SPDB- ^3H]DM4: S-metil-DM4 (cuadrados), lisina- V^6 -SPDB-DM4 (círculos), ϵ -cisteinil-DM4 (diamantes). Panel c: Cambio de la suma de todos los metabolitos presentes para ambos conjugados, huC242-SMCC- ^3H]DMI (círculos) y huC242-SPDB- ^3H]DM4 (cuadrados), ya sea en la pella celular (símbolos sólidos) o en la pella celular y el medio juntos (símbolos abiertos). (B) Las células COLO 205 fueron sincronizadas en la fase S con un tratamiento de 24 h de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ afidicolina. Las células fueron liberadas desde la fase S mediante la remoción de afidicolina e incubadas con 10^{-8} M DMI-SMe, 3×10^{-9} M

226
127

huC242-SMCC-DMI, 3×10^{-9} M huC242-SPDB-DM4, o se ejecutó el análisis FACS de las células que se dejaron sin tratar a 5, 10, y 18 h después de la liberación de afidicolina.

Figura 12 Generación de metabolitos maitansinoides a partir de huC242-SPDB- ^3H DM4 enlazado a superficie celular. Las células COLO 205 proliferantes fueron colocadas sobre hielo e incubadas con una cantidad de saturación de huC242-SPDB- ^3H DM4 (10^{-7} M) a fin de permitir que el conjugado se enlace a los receptores de superficie sin ser internalizado. Las células fueron lavadas después y la cantidad de radioactividad enlazada fue cuantificada al someter pequeñas fracciones de las muestras a conteo de escintilación. La cantidad total de radioactividad asociada con la muestra de célula después del enlace de conjugado a 0°C se muestra en la ordenada a $T = 0$ (triángulo abierto, 78 pmol) y después de 22 horas de incubación (triángulo abierto, 57 pmol). Las curvas muestran la acumulación de varios metabolitos en las células (símbolos cerrados) y en el medio (símbolos abiertos) para muestras incubadas durante 5, 9, 22, y 30 horas. Los metabolitos maitansinoides son S'-metil-DM4 (cuadrados), lisina- N^E -SPDB-DM4 (círculos), y S-cisteinil-DM4 (diamantes).

Figura 13. Dependencia de antígeno del metabolismo celular. Los metabolitos maitansinoides fueron estudiados con conjugados que no se enlazan a las células COLO 2005. El panel A (a, b) muestra cromatogramas de extractos de acetona de células (a) y medio (b) después del tratamiento de células COLO 205 durante 26 horas con Tras-SMCC- ^3H DM1. De manera correspondiente, el Panel A (c) (células) y d (medio) son para el conjugado huB4-SPDB- ^3H DM4. El Panel B muestra cromatogramas asociados con extractos de acetona de Tras-SMCC- ^3H DM1 (a) y huB4-SPDB- ^3H DM4 (b).

Figura 14. El rol de los principales metabolitos en la toxicidad celular. (A) Influencia de BafA1 en el metabolismo celular de huC242-SMCC- ^3H DMI y huC242-SPDB- ^3H DM4 en presencia o ausencia de BafA1. Los cromatogramas están a partir de extractos de

acetona de células COLO 205 tratadas con huC242-SMCC-[³H] DMI o huC242-SPDB-[³H]DM4 durante 22 h, en presencia de BafA1 o sin tratamiento. (B) Acumulación de metabolitos maitansinoides formados al tratamiento de células COLO 205 con huC242-SPDB-D-[³H] DM4 contra huC242-SPDB-[³H]DM4. Las cantidades totales de metabolitos maitansinoides generados a partir de huC242-SPDB-D-[³H]DM4 (cuadros cerrados) y a partir de huC242-SPDB-[³H]DM4 (círculos cerrados). Los metabolitos fueron cuantificados como se describe en la Figura 9.

Figura 15. Los metabolitos maitansinoides formados al tratamiento de células COLO 205 con huC242-SPDB-D-[³H]DM4. Las células COLO 205 fueron tratadas con huC242-SPDB-D-[³H]DM4 y las células y los medios fueron cultivados a 5, 9, 22, y 30 h y analizados para metabolitos como se describe en la Figura 7. (A) los Paneles Izquierdos muestran los cromatogramas de los extractos celulares en los cuatro puntos de tiempo consecutivos, y los paneles Derechos representan los cromatogramas de las muestras de medio correspondientes. (B) Las cantidades totales de metabolitos maitansinoides generados a partir de huC242-SPDB-D-[³H]DM4 en las células (círculos cerrados) y a partir del medio (cuadros abiertos) fueron cuantificadas como se describe en la Figura 9.

La Figura 16. Modelo para la activación de huC242-maitansinoide en células cancerígenas de objetivo. Las etapas iniciales de la activación de conjugado son similares para el conjugado disulfuro enlazado, huC242-SPDB-DM4, y el conjugado no-disulfuro enlazado, huC242-SMCC-DMI. Ambos son internalizados primero por medio de las células cancerígenas de objetivo a través de endocitosis antígeno-mediada, suministrados a lisosomas mediante la circulación vesicular, y después degradados en derivados de lisina, lisina-N⁶-SMCC-DMI y lisina-N⁶-SPDB-DM4. Estos derivados de lisina se enlazan igualmente al objetivo intracelular, tubulina, y ocasionan la citotoxicidad por medio de la inhibición de la polimerización microtubular. A diferencia de la lisina-N⁶-SMCC-DMI, la

18
19
20

lisina- $\Lambda^{\wedge}$ -SPDB-DMtø puede experimentar modificaciones intracelulares adicionales, reducción y S-metilación, conduciendo finalmente a la formación de S-metil-DM4. Considerando que los derivados de lisina cargados ya no están activos una vez que dejan las células de objetivo, el compuesto 5'-meti-DM4 lipofílico neutro continúa activo y puede reingresar a las células de objetivo o entrar a células cercanas (en expectativa).

Figura 17. Esquema que muestra la síntesis de tiometil maitansinoides.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado de manera inesperada que si un fármaco experimenta alquilación (por ejemplo, metilación) en un grupo tiol una vez que el fármaco es liberado desde el conjugado, la alquilación proporciona protección al fármaco a fin de que no reaccione con las moléculas celulares que tienen un grupo sulfhidrilo, como la cisteína, o proteínas (por ejemplo, albúmina del plasma), o grupo disulfuro, tal como cistina, glutatona oxidada, que podrían obstruir o inactivar al fármaco libre. Además, los inventores han descubierto de modo inesperado que la potencia de un fármaco en un conjugado de agente de enlace celular-fármaco depende de la obstrucción proporcionada en el enlace entre un fármaco citotóxico y un agente de enlace celular. El conjugado es obstruido mediante la adición de grupos alquilo, tales como grupos metilo, que se unen los dos α -carbonos junto al enlace de disulfuro. La obstrucción, si se proporciona en el lado del fármaco del conjugado, induce la alquilación (por ejemplo, metilación) del fármaco libre, una vez que el fármaco es liberado en su objetivo, el cual podría ser intra- o extra-celular. La preparación de tiol estéricamente impedido y maitansinoides que contienen disulfuro, los cuales ostentan uno o dos sustituyentes alquilo en el átomo α -carbono que tiene el átomo de azufre se describen en la publicación de patente de los

Estados Unidos de Norteamérica No. 2004/0235840, publicada el 25 de noviembre de 2004, la cual está incorporada a la presente en su totalidad mediante referencia.

Por tanto, en una modalidad, cuando el enlace disulfuro es separado en el conjugado de agente de enlace celular-fármaco, libera el fármaco dentro o en la cercanía de la célula de objetivo. Además, el fármaco experimenta alquilación (por ejemplo, metilación, o la adición de uno o más grupos CH_3) en el grupo tiol, lo cual hace al fármaco estable y potente para eliminar no solamente la célula de objetivo sino también una célula no de objetivo, o células que están cerca de la célula de objetivo en una población celular heterogénea o mezclada presente, por ejemplo, en un tumor.

El grupo tiol impedido en un conjugado de agente de enlace celular-fármaco proporciona ventaja sobre los grupos tiol no impedidos en un conjugado similar debido a que, a diferencia del grupo tiol no impedido, experimenta con mayor facilidad la alquilación a la separación del fármaco lo cual evita que el fármaco experimente una reacción de modificación que resultaría en pérdida de su funcionalidad. Además, el fármaco alquilado es potente durante un tiempo y es capaz de dirigirse a una célula cercana en un tumor para de este modo eliminar la célula cercana. La forma de fármaco alquilado potente puede ser químicamente sintetizada como se muestra en los ejemplos, y se encontró que es por lo menos 100-veces más potente in vitro.

Esta invención proporciona también un método mejorado para dirigir células en poblaciones celulares mezcladas o heterogéneas, en especial células que van a ser destruidas, tales como células tumorales (en particular células tumorales sólidas), células infectadas por virus, células infectadas por microorganismo, y células infectadas por parásito, que están comprendidas de una población heterogénea o mezclada de células anormales.

El conjugado usado en el método de la invención tiene uno o más maitansinoides,

20/10
13/1

taxanos o análogos CC-1065, enlazados a un agente de enlace celular a través de un enlazador disulfuro. En un método para elaborar el conjugado, un agente de enlace celular, por ejemplo un anticuerpo, es modificado primero con un reactivo de entrelazamiento heterobifuncional tal como SPP, SPDP, SPDB, SSNPB, o SSNPP. Los reactivos de entrelazamiento listados utilizan química de éster de N-hidroxisuccinimida para la reacción con el anticuerpo. Los compuestos listados varían en la longitud de cadena y el grado de impedimento alrededor de la ditiopiridina que reacciona con un tiol libre. En una segunda etapa, el agente modificado se hace reaccionar con un fármaco, por ejemplo, un maitansinoide, un taxano o un análogo CC-1065 que tiene un grupo tiol a fin de producir el conjugado de agente de enlace celular-fármaco. Por lo tanto, el enlazador final es ensamblado a partir de dos piezas, el reactivo de entrelazamiento introducido dentro del agente de enlace celular y el grupo sulfhidrilo a partir del fármaco tal como en DMI o DM4. De manera alternativa, el fármaco, tal como un maitansinoide, puede ser modificado con un reactivo de entrelazamiento antes de reaccionar con un agente de enlace celular. Véase por ejemplo, la patente de los Estados Unidos de Norteamérica no. 6,441,163 B1.

Aunque la alquilación a la separación del fármaco es el evento preferido y es posible para alguien con experiencia en la técnica aislar los maitansionoides alquilados in vivo (por ejemplo, maitansinoides metilados in vivo), los maitansinoides también pueden ser alquilados in vitro como se muestra en la Figura 8. Los maitansionoides metilados in vitro son altamente potentes en la eliminación de células tumorales.

Agentes de enlace celular

La efectividad de los compuestos de la invención como agentes terapéuticos depende de la cuidadosa selección de un agente de enlace celular apropiado. Los

A31
12/2

agentes de enlace celular pueden ser de cualquier clase actualmente conocida, o que se llegue a conocer e incluyen péptidos y no-péptidos. De manera general, estos pueden ser anticuerpos (en especial anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas transportadoras de nutriente (tales como transferina), o cualquier otra molécula de enlace celular o sustancia subcutánea que se enlace de modo específico a un objetivo.

El objetivo está presente de manera general en el tumor aunque no necesariamente en la superficie celular de las células tumorales, por ejemplo, el objetivo puede estar presente de manera inicial sobre la superficie de la célula y separarse para ser dispersado en el medio circundante.

Ejemplos más específicos de agentes de enlace celular que se pueden utilizar incluyen:

anticuerpos policlonales y monoclonales, incluyendo anticuerpos totalmente humanos;

anticuerpos de cadena simple (policlonales y monoclonales);
fragmentos de anticuerpos (policlonales y monoclonales) tal como Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv (Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983); Spring et al., 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff et al., 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960));

anticuerpos quiméricos y fragmentos de enlace de antígeno de los mismos;
anticuerpos de dominio (dAbs) y fragmentos de enlace de antígeno de los mismos, incluyendo anticuerpos camelidos (Desmyter et al., 3 Nature Struct. Biol, 752, 1996);

anticuerpos de tiburón llamados receptores de nuevo antígeno (IgNAR) (Greenberg et al., 374 Nature, 168, 1995; Stanfield et al. 305 Science 1770-1773, 2004);

interferones (por ejemplo, alfa, beta, gama);

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

hormonas tales como insulina, TRH (hormona de liberación de tirotrópina), MSH (hormona de estimulación de melanocito), hormonas esteroides, tales como andrógenos y estrógenos;

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

transferina (O'Keefe et al., 260 J. Biol. Chem. 932-937 (1985)); y

vitaminas, tales como folato.

Las técnicas de anticuerpo monoclonal permiten la producción de agentes de enlace celular extremadamente específicos en la forma de anticuerpos monoclonales específicos. Particularmente bien conocidas son las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos al inmunizar ratones, ratas, cobayos o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés tal como la célula de objetivo intacta, antígenos aislados a partir de la célula de objetivo, virus completo, virus completo atenuado, y proteínas virales tales como proteínas de recubrimientos virales. También se pueden usar células humanas sensibilizadas. Otro método para crear anticuerpos monoclonales es el uso de bibliotecas de fago de fragmentos de anticuerpo, tales como Fab y scFv (región variable de cadena individual), scFv específicamente humano (véase por ejemplo, Griffiths et al., Patentes de los estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,885,793 y 5,969,108; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587). Además, también pueden emplearse los anticuerpos recubiertos descritos en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,639,641, como anticuerpos humanizados.

La selección del agente de enlace celular apropiado es una cuestión de elección que depende de la población celular particular a la que se va a dirigir, aunque en anticuerpos monoclonales humanos generales son preferidos si hay alguno disponible.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal J5 es un anticuerpo IgG2a murino que es específico para el Antígeno de Leucemia Linfoblástica Aguda Común (CALLA) (Ritz et al, 283 Nature 583-585 (1980)) y puede ser utilizado si las células de objetivo expresan CALLA tal como en la enfermedad de la leucemia linfoblástica aguda.

5 El anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG₁ murino que se enlaza de manera específica al antígeno CD33 (J.D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)) y puede ser utilizado si las células de objetivo expresan CD33 como en la enfermedad de leucemia mielogénica aguda (AML).

10 De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 llamado también de manera intercambiable B4, es un IgG₁ murino que enlaza al antígeno CD 19 en células B (Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)) y puede ser utilizado si las células de objetivo son células B o células enfermas que expresan este antígeno tal como en leucemia de linfoma no-Hodgkin o linfoblástica crónica. Asimismo, se puede usar N901, que es anticuerpo monoclonal de murino que se enlaza al antígeno CD56 (molécula de adhesión de célula neural) encontrado en las células de origen neuroendócrino, incluyendo tumor pulmonar de célula pequeña. Estos anticuerpos son recubiertos o humanizados de manera preferible antes de su uso. Por ejemplo, un MY9, anti-B4 o N901 recubierto o humanizado es un anticuerpo preferido en el conjugado fármaco-anticuerpo. El recubrimiento o humanización de estos anticuerpos se describe en Roguska et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1;91(3):969-73, la cual está incorporada mediante referencia.

15

20

Además, el anticuerpo monoclonal C242 que se enlaza al antígeno CanAg (patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5, 552,293) puede ser utilizado para tratar tumores que expresan CanAg, tales como cánceres colorectal, pancreático, pulmonar de célula no pequeña, y gástricos. HuC242 es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal C242 que está descrito en la patente de los Estados Unidos de

25

24
474
125

Norteamérica no. 5, 552,293 y para el cual el hibridoma es depositado con el Número de Identificación ECACC, 90012601. Una forma humanizada puede ser preparada mediante la aplicación de la metodología de injertación CDR (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5, 585,089; 5, 693,761; y 5,693,762) o la metodología de recubrimiento (Patente de los estados Unidos de Norteamérica No. 5,639,641). HuC242 también puede ser utilizado para tratar tumores que expresan CanAg, tales como cánceres colorectal, pancreático, pulmonar de célula no pequeña y gástrico.

Además, el anticuerpo trastuzumab puede ser utilizado para tratar cánceres de seno y otros, tales como cánceres de próstata y de ovario que expresan el antígeno Her2.

También son útiles los anticuerpos anti-IGF-IR que enlazan al receptor del factor de crecimiento de insulina.

El cáncer de ovario y el cáncer de próstata pueden ser identificados de manera exitosa, por ejemplo, mediante un anticuerpo anti-MUCI, tal como anti-HMFG-2 (Taylor-Papadimitriou et al., 28. Int. J. Cancer 17-21, 1981) o hCTMOI (56 Cancer Res. 5179-5185, 1996) o DS6 y un anti-PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), tal como J591 (Liu et al. 57 Cancer Res. 3629-3634, 1997) respectivamente.

Las moléculas sin anticuerpo también pueden ser utilizadas para dirigirse a poblaciones celulares específicas. Por ejemplo, GM-CSF, que se enlaza a células mieloides, pueden utilizarse como agente de enlace celular para dirigir las células enfermas de objetivo a partir de leucemia mielogénica aguda. Además, IL-2, que se enlaza a células T activadas, puede ser utilizado para la prevención de rechazo de injerto de trasplante, para la terapia y prevención de enfermedad injerto contra huésped, y para el tratamiento de leucemia de célula T aguda. MSH, que se enlaza a melanocitos, puede ser utilizado para el tratamiento of melanoma. El ácido fólico puede ser utilizado para identificar el receptor de folato expresado en tumores de los ovarios y otros. El factor de

25
136 AB

crecimiento epidérmico (EGF) puede ser utilizado para identificar cánceres escamosos tales como de pulmón, de cabeza y de cuello. Se puede usar la somatostatina para identificar neuroblastomas y otros tipos de tumor. Los canceres de seno y de testículos pueden ser identificados de manera exitosa con estrógeno (o análogos de estrógeno) o andrógeno (o análogos de andrógeno) respectivamente como agentes de enlace celular.

Reactivos de Entrelazamiento

Como se usa en la presente, un "enlazador" es cualquier porción química que enlaza un agente de enlace celular de manera covalente a un fármaco, tal como un maitansinoide, un taxano, o un análogo CC 1065. Parte del enlazador es proporcionado por el fármaco. Por ejemplo, DMI₅ un maitansinoide que contiene tiol, es un derivado de maitansina. Para formar DMI, la cadena lateral en el grupo hidroxilo C-3 de maitansina es modificada para tener un SH modificado. Esta forma tiolada de maitansina es susceptible a reaccionar con un agente de enlace celular modificado para formar un conjugado. Por lo tanto, el enlazador final es ensamblado a partir de dos piezas, parte desde el reactivo de entrelazamiento introducido dentro del agente de enlace celular y parte desde la células cadena lateral desde el DMI.

Los enlazadores separables son enlazadores que pueden ser separados bajo condiciones moderadas, es decir, condiciones bajo las cuales la actividad del fármaco, tales como maitansinoides, taxanos o CC 1065, no es afectada y condiciones que están presentes dentro de una célula. Muchos enlazadores conocidos se ubican en esta categoría y se describen a continuación.

Los enlazadores que contienen disulfuro son enlazadores separables a través de intercambio de disulfuro, el cual puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas.

Los enlazadores lábiles al ácido son enlazadores separables en pH ácido. Por

248
436
132x

ejemplo, ciertos compartimientos intracelulares, tales como endosomas y lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5), y proporcionan las condiciones adecuadas para separar enlazadores lábiles al ácido.

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

Algunos enlazadores pueden ser separados mediante peptidasas. Sólo ciertos péptidos son fácilmente separados dentro o fuera de las células, véase por ejemplo Trouet et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) y Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989).

Agentes Citotóxicos

El agente citotóxico usado en el conjugado citotóxico de la presente invención puede ser cualquier compuesto que resulte en la muerte de una célula, o induzca la muerte celular, o de alguna manera disminuya la viabilidad celular. Los agentes citotóxicos preferidos incluyen, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoide, taxoides, CC-1065 y análogos CC-1065, dolastatina y análogos de dolastatina, definidos a continuación. Estos agentes citotóxicos son conjugados para los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus análogos como se describe en la presente.

Los conjugados citotóxicos pueden ser preparados a través de métodos in vitro. Para enlazar un fármaco o profármaco al anticuerpo, se utiliza un grupo disulfuro. Los conjugados pueden ser contruidos utilizando una reacción de intercambio de disulfuro entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco.

137 137

Maitansinoides

Entre los agentes citotóxicos que se pueden emplear en la presente invención para formar un conjugado citotóxico, están los maitansinoides y análogos de maitansinoide. Ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol.

5 Los maitansinoides son fármacos que inhiben la formación de microtúbulo y son altamente tóxicos para las células de mamífero.

Ejemplos de análogos de maitansinol incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides adecuados se describen en las Patentes de los Estados Unidos de

10 Norteamérica Nos. 4,424,219; 4,256,746; 4,294,757; 4,307,016; 4,313,946; 4,315,929; 4,331,598; 4,361,650; 4,362,663; 4,364,866; 4,450,254; 4,322,348; 4,371,533; 6,333,410; 5,475,092; 5,585,499; y 5,846,545.

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

- 15 (1) C-19-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,256,746) (preparado mediante reducción LAH de ansamitocina P2);
- (2) C-20-hidroxi (o C-20-demetil) +/-C-19-decloro (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4, 361,650 y 4, 307,016) (preparado mediante desmetilación utilizando Estreptomicinas o Actinomicinas o desclorinación usando LAH); y
- 20 (3) C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4, 294,757) (preparado mediante acilación utilizando cloruros de acilo).

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

- 25 (1) C-9-SH (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,424,219)

28
130
139

(preparado mediante reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅);

(2) C-14-alcoximetil (demetoxi/CH₂OR) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,331,598);

5

(3) C-14-hidroxirnetil o aciloximetil (CH₂OH o CH₂OAc) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,450,254) (preparado a partir de Nocardia);

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

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

10

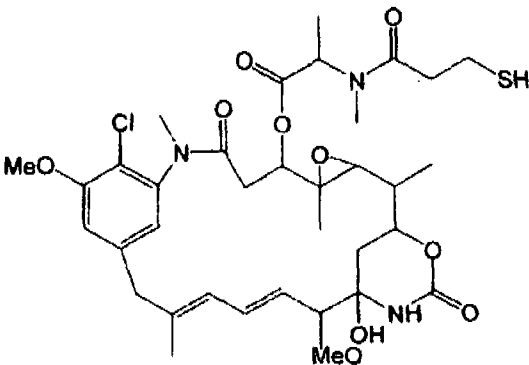
(6) C-18-iV-demetil (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,362,663 y 4,322,348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol a través de Estreptomicinas); y

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

15

En una modalidad preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el DM1 maitansinode que contiene tiol, anteriormente denominado N²-deacetil-iV² - (3- mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como el agente citotóxico. DMI está representado por la siguiente fórmula estructural (I):

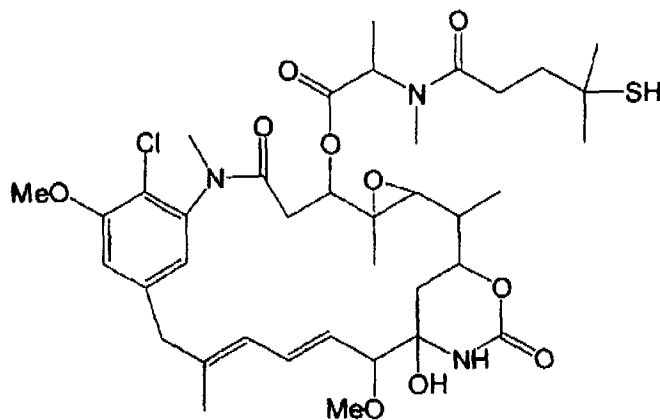
20



25

89
234
100

En otra modalidad preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el DM4 maitansinoide que contiene tiol anteriormente denominado N²-deacetil-N-²(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina como el agente citotóxico. DM4 está representado por la siguiente fórmula estructural (II):



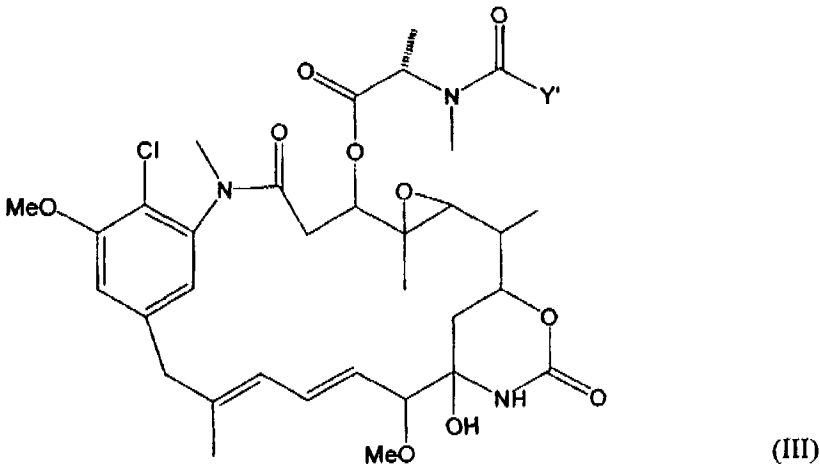
(II)

En modalidades preferidas adicionales de la invención, se pueden utilizar otras maitansinas, que incluyen tiol y maitansinoides que contienen disulfuro que tienen una mono- o di-alquil sustitución en el átomo de carbono que tiene el átomo de azufre. Estos incluyen un maitansinoide que tiene, en C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidroxil, o C-20 desmetil, una cadena lateral de amino ácido acilado con un grupo acilo que tiene un grupo sulfhidrido impedido, en donde el átomo de carbón del grupo acilo que tiene la funcionalidad tiol posee uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes que son CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal o ramificado o alqueno que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo cíclico o alqueno que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y en donde además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo

30
140
1-11

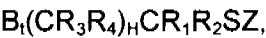
de azufre.

Dichas maitansinas adicionales incluyen compuestos representados por la fórmula (III):



en donde:

Y' representa



en donde:

R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH₃ y C₂H₅, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además R₂ puede ser H;

A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tienen 3 -10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, y R₁₂ son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH₃ y C₂H₅, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de

39
441
142

carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático;

l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u no sean cero en ningún momento; y

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

10 Modalidades preferidas de fórmula (III) incluyen compuestos de la fórmula (III) en donde:

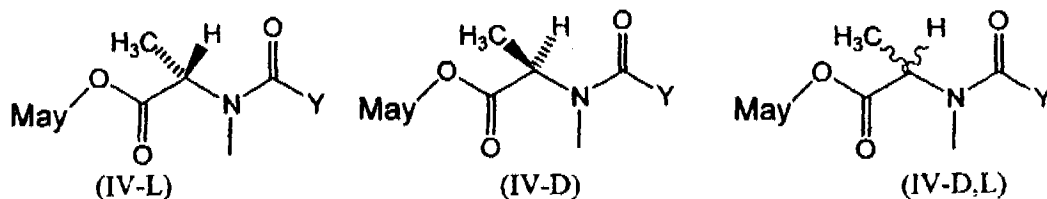
R₁ es metilo, R₂ es H y Z es H.

R₁ y R₂ son metilo y Z es H.

R₁ es metilo, R₂ es H, y Z es -SCH₃.

R₁ y R₂ son metilo, y Z es -SCH₃.

15 Dichas maitansinas adicionales incluyen también compuestos representados por la fórmula (IV-L), (IV-D)₅ o (IV-D,L):



en donde:

Y representa (CR₇R₈)_i(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ,

en donde:

25 R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tienen

372
12/3/42

desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH₃ y C₂H₅, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además R₂ puede ser H;

5 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH₃ y C₂H₅, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico;

 I, m and n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

10 Z es H, SR o -COR en donde R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico; y

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

 Modalidades preferidas de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) incluyen compuestos de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) en donde:

 R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, I y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H.

20 R₁ and R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, I y m son 1, n es 0, y Z es H.

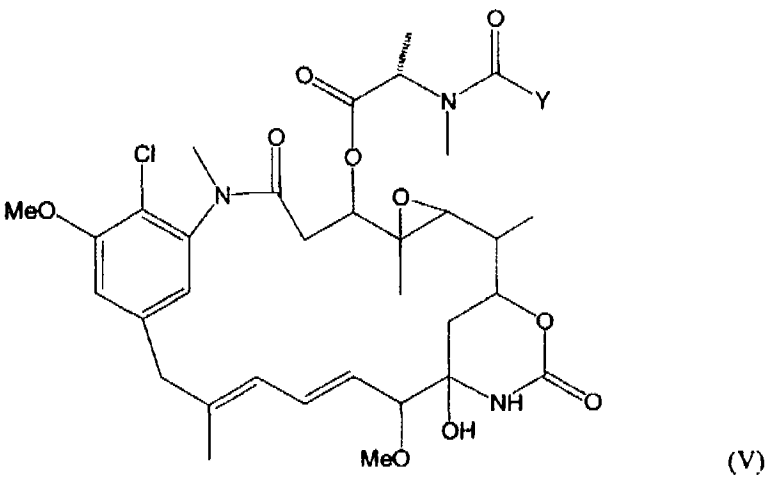
 R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, 1 y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

 R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, 1 y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

25 De manera preferible el agente citotóxico es representado por la fórmula (IV-L).

33
443
104

Dichas maitansinas adicionales incluyen también compuestos representados por la fórmula (V):



en donde:

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

en donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH_3 and C_2H_5 , alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 and R_8 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH_3 y C_2H_5 , alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico;

l , m and n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

3A
165-144

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

5 Modalidades preferidas de la fórmula (V) incluyen compuestos de la fórmula (V) en donde:

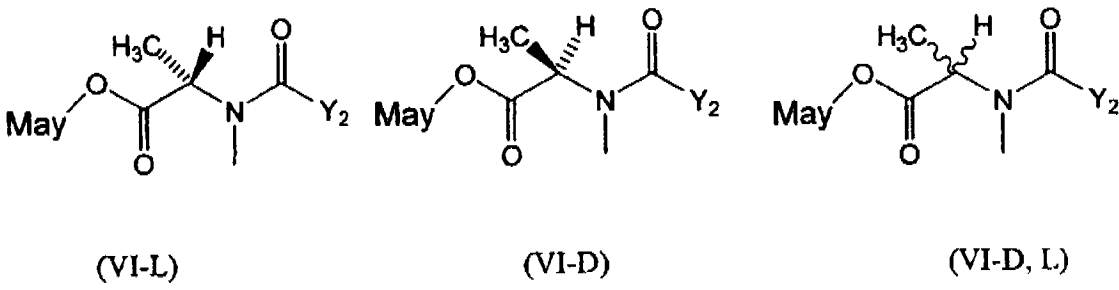
 R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0; y Z es H.

 R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1; n es 0; y Z es H.

10 R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

 R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

15 Dichas maitansinas adicionales incluyen además compuestos representados por las fórmulas (VI-L), (VI-D), o (VI-D₅L):



20 en donde:

 Y₂ representa (CR₇R₈)₁(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ

 en donde:

25 R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tienen

30
146 145

desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH₃ y C₂H₅, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además R₂ puede ser H;

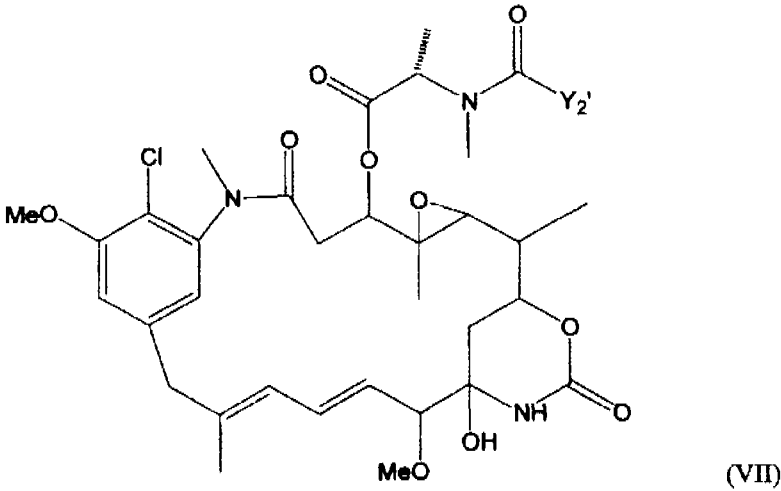
5 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo cíclico lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH₃ and C₂H₅, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico;

l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

10 Z₂ es SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico; y

May es un maitansinoide.

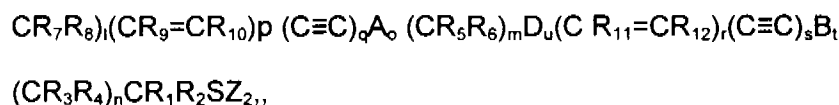
15 Dichas maitansinas adicionales incluyen también compuestos representados por la fórmula (VII):



25 en donde:

30
11/16
11/17

Y_2' representa



en donde:

- 5 R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo ramificado lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH_3 y C_2H_5 , alquilo o alquenilo cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además R_2 puede ser H;

- 10 A, B, y D cada uno de manera independiente es cicloalquilo o cicloalquenilo que tienen de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico;

- 15 $R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}$, y R_{12} son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH_3 y C_2H_5 , alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico;

$l, m, n, o, p, q, r, s, t$ y u son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de $l, m, n, o, p, q, r, s, t$ y u no sean cero en ningún momento; y

- 20 Z_2 es SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 - 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico.

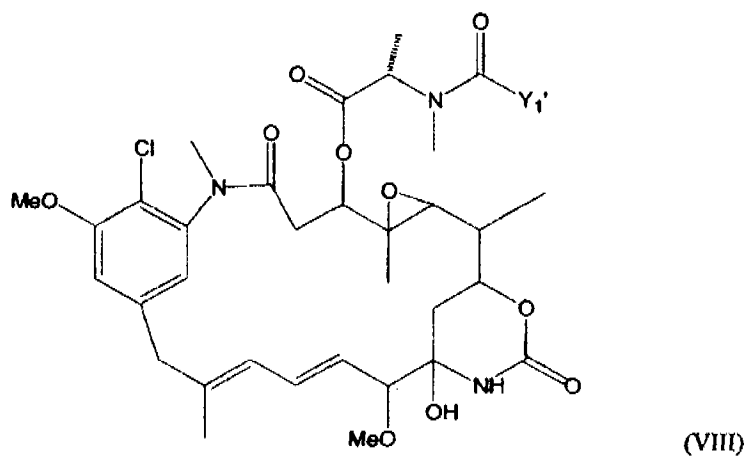
Modalidades preferidas de la fórmula (VII) incluyen compuestos de la fórmula (VII) en donde: R_1 es metilo y R_2 es H.

- 25 Los maitansinoides mencionados con anterioridad pueden ser conjugados a

37
147

anticuerpo DS6 anti-CA6, huN901, huC242, huCD33, MY9, trastuzumab, o un homólogo o
fragmento de los mismos, en donde el anticuerpo es enlazado al maitansinoide utilizando
la funcionalidad tiol o disulfuro que está presente en el grupo acilo de una cadena lateral
de aminoácido acilatado encontrada en C-3, C-14 hidroximetilo, C- 15 hidroxilo o C-20
desmetilo del maitansinoide, y en donde el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido
acilatado tiene su funcionalidad tiol o disulfuro ubicada en el átomo de carbono que tiene
uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes que son alquilo o alquenilo lineal que tienen
desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH₃ y C₂H₅, alquilo o alquenilo
ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo
sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además uno de los
sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal
de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de
azufre.

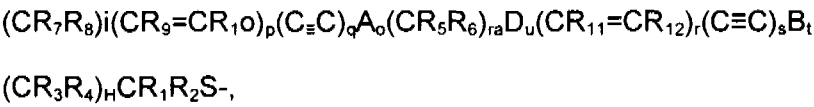
Un conjugado preferido de la presente invención es uno que comprende el
anticuerpo anti-anti-CA6 DS6, huN901, huC242, huCD33, MY9, trastuzumab, o un
homólogo o fragmento del mismo o un homólogo o fragmento del mismo, conjugado para
un maitansinoide de la fórmula (VIII):



38
748
100

en donde:

Y₁' representa



5

en donde:

A, B, y D, cada uno de manera independiente es cicloalquilo o cicloalquenilo que tienen de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico;

10

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ and R₁₂ son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH₃ y C₂H₅, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico; y

15

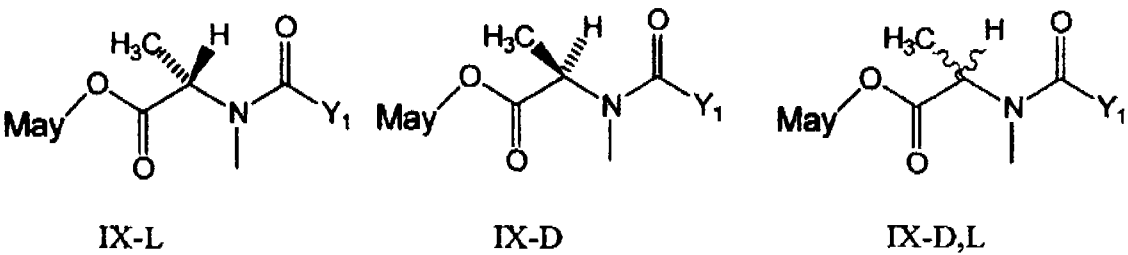
l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u no sean cero en ningún momento.

De preferencia, R₁ es metilo y R₂ es H o R₁ y R₂ son metilo.

20

Un conjugado aún más preferido de la presente invención es uno que comprende el anticuerpo DS6 anti-CA6, huN901, huC242, huCD33, MY9, trastuzumab, o un homólogo o fragmento del mismo o un homólogo o fragmento del mismo, conjugado para un maitansinoide de la fórmula (IX-L), (IX-D), o (IX-D,L):

25



en donde:

Y_1 representa $(CR_7Rs)_i(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$,

en donde:

5 R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH_3 y C_2H_5 , alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además R_2 puede ser H;

10 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, tales como CH_3 y C_2H_5 , alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico;

l , m and n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

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

Modalidades preferidas de las fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D₅L) incluyen compuestos de las fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D₅L) en donde:

R_1 es H y R_2 es metilo,

20 R_1 es metilo y R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H; l y m son cada uno l ; n es 0,

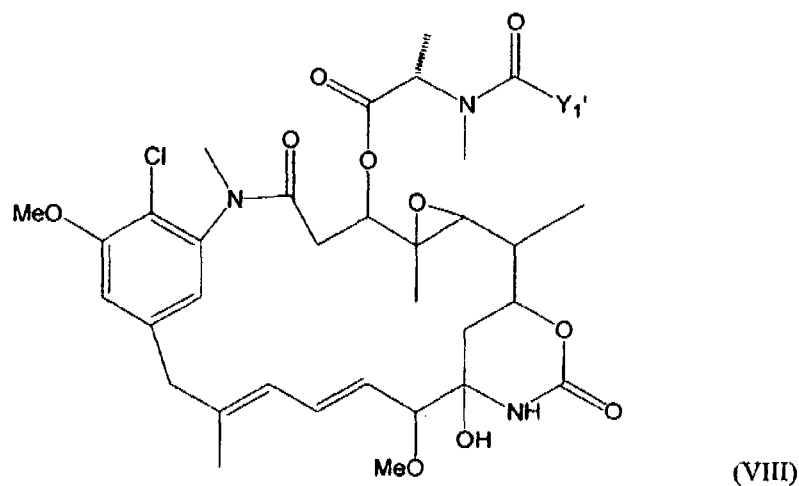
R_1 y R_2 son metilo; R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H; l y m son 1; n es 0.

De manera preferible el agente citotóxico está representado por la fórmula (IX-L).

25 Un conjugado preferido adicional de la presente invención es uno que comprende el anticuerpo DS6 anti-CA6, huN901, huC242, huCD33, MY9, trastuzumab, o un homólogo o fragmento del mismo o un homólogo o fragmento del mismo conjugado para

40
x50
131

un maitansinoide de la fórmula (X):



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

De especial preferencia son cualquiera de los compuestos antes descritos, en donde 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, y n es 0.

Son especialmente preferidos cualquiera de los compuestos antes descritos, en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0

Además, se prefiere el estereoisómero Z-aminoacilo.

Cada uno de los maitansinoides mostrados en la publicación de patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2004/0235840, publicada el 25 de noviembre de 2004 también pueden ser utilizados en el conjugado citotóxico de la presente invención. La descripción completa de la publicación de patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2004/0235840, publicada el 25 de noviembre de 2004 está incorporada a la presente mediante referencia.

911
154
152

Grupos de enlace que contienen disulfuro

A fin de enlazar el maitansinoide a un agente de unión celular, tal como el anticuerpo DS6, huN901, huC242, huCD33, MY9, o trastuzumab, el maitansinoide comprende una porción de enlace. La porción de enlace contiene un enlace químico que permite la liberación de maitansinoides completamente activos en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces lábiles al ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles a peptidasa y enlaces lábiles a esterasa. Se prefieren los enlaces de disulfuro.

La porción de enlace también comprende un grupo reactivo químico. En una modalidad preferida, el grupo químico reactivo puede ser enlazado de manera covalente al maitansinoide vía una porción de unión de enlace de disulfuro.

Los grupos químicos reactivos particularmente preferidos son iV-succinimidil ésteres y JV-sulfosuccinimidil ésteres.

Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden una porción de unión que contiene un grupo químico reactivo son ésteres C-3 de maitansinol y sus análogos en donde la porción de unión contiene un enlace disulfuro y el grupo químico reactivo comprende un iV-succinimidil o N-sulfosuccinimidil éster.

Muchas posiciones en los maitansinoides pueden server como la posición para enlazar químicamente la porción de unión. Por ejemplo, se espera que sean útiles la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición the C-15 modificada con hidroxil y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxil. Sin embargo, la posición C-3 es preferida y la posición C-3 de maitansinol es especialmente preferida.

La síntesis de maitansinoides y derivados de maitansinoide que tienen una porción disulfuro que posee un grupo reactivo se describen en las Patentes de los Estados Unidos

12
A. 32
15

de Norteamérica Nos. 6, 441,163 y 6, 333,410, y la solicitud de los Estados Unidos de Norteamérica No. 10/161,651, cada una de las cuales está incorporada a la presente mediante referencia.

Los maitansinoides que contienen grupo reactivo, tales como DMI, se hacen reaccionar con un anticuerpo, tal como el anticuerpo DS6, huN901, huC242, huCD33, MY9, o trastuzumab, a fin de producir conjugados citotóxicos. Estos conjugados pueden ser purificados mediante HPLC o mediante filtración de gel.

Varios esquemas excelentes para producir dichos conjugados de anticuerpo-maitansinoide se proporcionan en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6, 716,821, 6, 441,163, y 6, 333,410, y en la publicación de patente de los Estados Unidos de Norteamérica no. 2003/0055226, publicada el 20 de marzo de 2003, cada una de las cuales está incorporada en la presente en su totalidad.

En general, una solución de un anticuerpo en regulador de pH acuoso puede ser incubada con un exceso molar de maitansinoides que tienen a porción disulfuro que posee un grupo reactivo. La mezcla de reacción puede ser extinguida mediante la adición de amina en exceso (tal como etanolamina, taurina, etc.). El conjugado maitansinoide-anticuerpo puede ser purificado después mediante filtración de gel.

El número de moléculas de maitansinoide enlazadas por molécula de anticuerpo puede ser determinado a través de la medición espectrofotométrica de la relación de la absorbancia en 252 nm y 280 nm. Se prefiere un promedio de 1-10 moléculas de maitansinoide/molécula de anticuerpo.

Los conjugados de anticuerpos con fármacos de maitansinoide puede ser evaluados para su habilidad para suprimir la proliferación de varias líneas celulares indeseables in vitro. Por ejemplo, líneas celulares tales como la línea de carcinoma epidermoide humano A-431, la línea celular de cáncer de pulmón de célula pequeña SW2,

48
x59
154

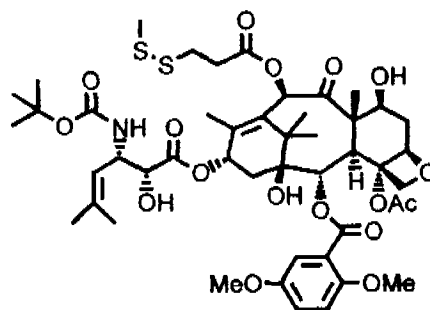
la línea celular de tumor de seno humano SKBR3 y la línea de Namalwa linfoma de Burkitt pueden ser utilizadas con facilidad para la determinación de citotoxicidad de estos compuestos. Las células que van a ser evaluadas pueden ser expuestas a los compuestos durante 24 horas y las fracciones supervivientes de las células medidas en pruebas directas a través de métodos conocidos. Los valores IC_{50} pueden ser calculados después a partir de los resultados de las pruebas.

Taxanos

El agente citotóxico utilizado en los conjugados citotóxicos de acuerdo con la presente invención también puede ser un taxano o derivado del mismo.

Los taxanos son una familia de compuestos que incluye paclitaxel (Taxol), un producto natural ciototóxico, y docetaxel (Taxotere), un derivado semi-sintético, dos compuestos que son ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer. Los taxanos son venenos de eje mitótico que inhiben la despolimerización de tubulina, dando como resultado la muerte celular. En tanto que docetaxel y paclitaxel son agentes útiles en el tratamiento del cáncer, su actividad antitumoral está limitada debido a su toxicidad no-específica hacia las células normales. Además, compuestos como paclitaxel y docetaxel no son suficientemente potentes para ser utilizados en conjugados de agentes de enlace celular.

Un taxano preferido para uso en la preparación de conjugados citotóxicos es el taxano de la fórmula (XI):



(XI)

Los métodos para sintetizar taxanos que pueden ser utilizados en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con los métodos para conjugar los taxanos para los agentes de enlace celular tales como anticuerpos, se describen en detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, 6,436,931, 6,716,821, y 6,596,757 y en las publicaciones de patente de los Estados Unidos de Norteamérica nos, 2003/0014048, publicada el 16 de enero de 2003 y 2004/0024049, publicada el 5 de febrero de 2004.

Análogos CC-1065

El agente citotóxico usado en los conjugados citotóxicos de acuerdo con la presente invención pueden ser también CC-1065 o un derivado del mismo.

CC-1065 es un potente antibiótico anti-tumoral aislado a partir del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 100 veces más potente in vitro que los fármacos anti-cancerígenos comúnmente utilizados, tales como doxorubicina, metotrexato y derivados de vincristina (B.K. Bhuyan et al, Cancer Res., 42. 3532-3537 (1982)). CC-1065 y sus análogos se describen en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6, 372,738, 6, 340,701, 5, 846,545 y 5, 585,499.

La potencia citotóxica de CC-1065 ha sido correlacionada con su actividad de alquilación y su actividad de enlace ADN o actividad de intercalación-ADN. Estas dos actividades residen en partes separadas de la molécula. Por tanto, la actividad de alquilación es contenida en la subunidad ciclopropapirrolindol (CPI) y la actividad de enlace ADN reside en las dos subunidades pirrolindol.

Aunque CC-1065 tiene ciertas características atractivas como un agente citotóxico, posee limitaciones en el uso terapéutico. La administración de CC-1065 a ratones ocasionó una hepatotoxicidad retardada que condujo al deceso en el día 50 después de

98
156

una sola dosis intravenosa de 12.5 µg/kg {V. L. Reynolds et al., J. Antibiotics, XXIX, 319-334 (1986)}. Esto ha activado los esfuerzos para desarrollar análogos que no ocasionen toxicidad retardada, y se ha descrito la síntesis de análogos más simples modelados en CC-1065 {M.A. Warpehoski et al., J. Med. Chem., 31, 590-603 (1988)}.

5 En otra serie de análogos, la porción CPI fue reemplazada con una porción ciclopropabenzindol (CBI) {D.L. Boger et al., J. Org. Chem., 55, 5823-5833, (1990), DX. Boger et al., BioOrg. Med. Chem. Lett., 1, 115-120 (1991)}. Estos compuestos mantienen la alta potencia in vitro del fármaco parenteral, sin ocasionar toxicidad retardada en ratones. Al igual que CC-1065, estos compuestos son agentes de alquilación que enlazan a la hendidura menor del AND de una manera conveniente para ocasionar la muerte celular. Sin embargo, la evaluación clínica de los análogos más promisorios, Adozelesin y Carzelesin, ha conducido a resultados decepcionantes {B.F. Foster et al., Investigational New Drugs, 13, 321-326 (1996); I. Wolff et al., Clin. Cancer Res., 2, 1717-1723 (1996)}. Estos fármacos exhiben escasos efectos terapéuticos debido a su alta toxicidad sistémica.

10 La eficacia terapéutica de los análogos CC-1065 puede ser enormemente mejorada al cambiar la distribución in vitro a través del suministro dirigido al sitio del tumor, resultando en menor toxicidad para los tejidos que no son de objetivo, y por tanto, menor toxicidad sistémica. Para lograr este objetivo, se han descrito los conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con los agentes de enlace celular que se dirigen de manera específica a células tumorales de objetivo {Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica: 5, 475,092; 5, 585,499; 5, 846,545}. Estos conjugados exhiben de manera común alta citotoxicidad específica de objetivo in vitro, y excepcional actividad anti-tumoral en modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones {R.V. J. Chari et al., Cancer Res., 55, 4079-4084 (1995)}.

20 Los métodos para sintetizar los análogos CC-1065 que pueden ser utilizados en

25

46
T96
157

los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con los métodos para conjugar los análogos para los agentes de enlace celular tales como anticuerpos, son descritos en detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,475,092, 5,846,545, 5,585,499, 6,534,660, 6,586,618, y 6,756,397 y en la publicación de patente de los Estados Unidos de Norteamérica no. 2003/0195365, publicada el 16 de octubre de 2003.

Otros Fármacos

Fármacos tales como metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalano, mitomicina C, clorambucil, caliqueamicina, tubulisina y análogos de tubulisina, duocarmicina y análogos de duocarmicina, dolastatina y análogos de dolastatina también son adecuados para la preparación de conjugados de la presente invención. Las moléculas de fármaco también pueden ser enlazadas a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula portadora intermediaria tal como albúmina del suero. Los compuestos de Doxorubicina y Daunorubicina, como se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,630,579, también pueden ser agentes citotóxicos útiles.

Composiciones y métodos de uso

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad efectiva de cualquiera de los fármacos-agentes de enlace celular, de la presente invención, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona también métodos de tratamiento que comprenden administrar a un sujeto que necesita del tratamiento una cantidad efectiva de

44
157
158

cualquiera de los conjugados antes descritos.

De manera similar, la presente invención proporciona un método para inducir la muerte celular en población celular heterogénea o mezclada que comprende poner en contacto las células de objetivo o tejido que contiene las células de objetivo con una cantidad efectiva de un agente citotóxico que comprende cualquiera de los fármacos-
agentes de enlace celular (por ejemplo, maitansinoide, taxanos o CC1065-agentes de
enlace celular) de la presente invención, una sal o solvato de la misma. Las células de
objetivo son las células a las cuales puede enlazarse el agente de enlace celular debido a
que expresan un antígeno único expresado por esas células. El fármaco citotóxico es
separado del conjugado en la célula de objetivo para liberar el fármaco y eliminar la célula
que carece del antígeno expresado en las células de objetivo.

Proporciona también la eliminación de una población celular heterogénea o mezclada, en donde el ligando fue expresado inicialmente en una célula particular o un tejido y después dispersado dentro del medio. Aquí el ligando dispersado es el objetivo para el agente de enlace celular y el fármaco elimina la población heterogénea o mezclada de células tumorales en la cercanía del antígeno dispersado.

Si se desea, otros agentes activos, tales como otros agentes anti-tumorales, pueden ser administrados junto con el conjugado.

Los portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos y pueden ser determinados por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica según lo garantice la situación clínica.

Ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina regulada en su pH con fosfato de Dulbecco, pH de aproximadamente 7.4, que contiene o no aproximadamente 1 mg/ml hasta 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) 0.9% solución salina (0.9% p/v NaCl), y (3) 5% (p/v) dextrosa; y puede

46
150
159

contener también un antioxidante tal como triptamina y un agente de estabilización tal como Tween 20. El método para inducir la muerte celular en las poblaciones celulares seleccionadas puede ser practicado in vitro e in vivo. Ejemplos de de uso in vitro se muestran en la sección de Ejemplos de esta especificación.

- 5 Para uso in vivo clínico, el agente citotóxico de la invención será suministrado como una solución o un polvo liofilizado que son probados para esterilidad y para niveles de endotoxina. Ejemplos de protocolos adecuados para la aDM1nistración de conjugado son como sigue. Los conjugados son suministrados semanalmente durante 4 semanas como un bolo intravenoso cada semana. Las dosis de bolo son suministradas en 50 a
- 10 1000 ml de solución salina normal a la cual se pueden agregan de 5 hasta 10 ml de albúmina de suero humano. Las dosis serán de 10 µg hasta 2000 mg por aDM1nistración, por vía intravenosa (rango de 100 ng hasta 20 mg/kg por día). Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo el tratamiento en una base semanal. Los protocolos clínicos específicos con respecto a la ruta de
- 15 aDM1nistración, excipientes, diluyentes, dosis, horarios, etc., pueden ser determinados por alguien con experiencia ordinaria en la técnica según lo garantice la situación clínica.

- Ejemplos de condiciones médicas que pueden ser tratadas de acuerdo a los métodos in vivo o ex vivo para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas incluyen malignidad de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer del
- 20 pulmón, seno, colon, próstata, riñón, páncreas, ovarios o cualquier clase de crecimiento neoplástico que incluya una población celular anormal heterogénea o mezclada.

Referencias AU citadas en la presente y en los ejemplos que siguen están incorporadas expresamente mediante referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

El amplio alcance de esta invención es mejor comprendido con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales no están destinados a limitar la invención a las modalidades específicas.

Ejemplo 1 – Efecto de Expectación de los Conjugados Anticuerpo-Fármaco

Materiales y Métodos

Inmunoconjugados

Preparación de inmunoconjugados: El maitansinoide DMI (N^2 -deacetil- iV^2 -(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina) fue sintetizado a partir del producto de fermentación microbial ansamitocina P-3 como se describió con anterioridad {Chari, R. V., et al., Cancer Res., 52, 127-31 (1992); patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,333,410}. La síntesis del análogo de CC-1065, 5-[(3-mercapto-1-oxopropil)amino]-bis-indolil-(seco)-1,2,9,9a-tetrahidrociclopropa[c]benz[e]indol-4-ona, DCI, ha sido reportado en cualquier otra parte {Chari, R.V., et al., Cancer Res. 55, 4079-84 (1995)}. La humanización del anticuerpo C242 (huC242) se realizó mediante el método de recubrimiento que ha sido descrito de manera previa {Roguska M. A., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 969-73 (1994)}. Los conjugados anticuerpo-fármaco fueron preparados utilizando iV -succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato para enlace de disulfuro o JV -succinimidil-4-(N -maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) para enlace de tioéter como se describe en otra parte {Liu, C, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 8618-23 (1996); Chari, R.V., et al., Cancer Res., 52, 127-31 (1992)}. Los inmunoconjugados usados en este estudio contenían, en promedio, 3.5 moléculas de fármaco citotóxico, DMI o DCI, por molécula de anticuerpo.

Líneas celulares

Se mantuvieron cultivos de COLO 205 (adenocarcinoma de colon humano, ATCC CCL-222), HL-60 (leucemia promielocítica aguda humana, ATCC CCL-240) y Namalwa (linfoma de Burkitt humano, ATCC CRL-1432) en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal termo-inactivado al 10% y 50 µg/mL de sulfato de gentamicina. Se mantuvieron cultivos de HT-29 (adenocarcinoma de colon humano, ATCC HTB-38), A375 (melanoma humano maligno, ATCC CRL-1619) y HepG2 (carcinoma hepatocelular humano, ATCC HB-8065) en medio DMEM complementado con suero bovino fetal termo-inactivado al 10% y 50 µg/mL de sulfato de gentamicina. Se mantuvo un cultivo de SNU-16 (carcinoma gástrico, ATCC CRL-5974) en medio RPMI-1640 modificado (ATCC, 30-2003) complementado con suero bovino fetal termo-inactivado al 10% y 50 µg/mL de sulfato de gentamicina. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en una incubadora humidificada a 37°C, 6% CO₂.

Enlace del anticuerpo huC242 a CanAg

El enlace del anticuerpo huC242 a células CanAg-positivas fue evaluado por medio de una prueba de inmunofluorescencia indirecta utilizando citometría de flujo. Las células (5×10^4 por pozo) fueron colocadas en una placa de 96 pozos de fondo redondo e incubadas a 4°C durante 3 h con diluciones seriales de anticuerpo huC242 en 0.2 mL de medio alfa-MEM complementado con 2% (v/v) suero de cabra normal (Sigma). Cada muestra fue probada por triplicado. Los pozos de control carecieron de huC242. Las células fueron lavadas después con 0.2 mL de medio frío (4 °C) y teñidas con anticuerpo IgG anti-humano de cabra fluoresceína-etiquetado durante 1 h a 4°C. Las células fueron lavadas de nuevo con medio, fijadas en solución al 1% de formaldehído/PBS y analizadas utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA).

Prueba de citotoxicidad de colágeno 3D

Células COLO 205 (2×10^5 células por mL) fueron tratadas con huC242-DMI (1×10^{-8} M de anticuerpo conjugado, 24 h de incubación a 37°C , 6% CO_2), 1% formaldehído (20 min de incubación), o irradiación 5 Gy UV (UV Stratalinker 1800, Stratagene, CA). Las células tratadas fueron lavadas tres veces con 20-30 mL de medio de cultivo fresco y suspendidas nuevamente en medio de cultivo a 1×10^8 células por mL. Células COLO 205, Namalwa, A375 y HepG2 no tratadas fueron lavadas y suspendidas nuevamente de una manera similar. Un microlitro de cada una de las suspensiones celulares no tratadas se mezcló después con 0, 1, 2, 4, u 8 μL de las células COLO 205 tratadas. Cien microlitros de solución de gel de colágeno enfriada con hielo (Sistema de Cultivo Celular de Colágeno 3D, Chemicon International) fueron agregados a las mezclas de células, y después las mezclas de célula-colágeno fueron suministradas inmediatamente (5 μL por pozo) en placas de 96 pozos de fondo redondo. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 1 h a fin de permitir la polimerización del colágeno. Se agregó de manera moderada medio de cultivo fresco (200 μL) a cada pozo. Entre cinco y seis días después, se determinó el número de células viable utilizando una prueba de proliferación celular colorimétrica que mide la reducción de sal de tetrasolio MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan, Sigma) para formazan mediante células vivas. Se agregaron cincuenta microlitros de la solución concentrada MTT (5 mg/mL en solución salina regulada en pH con fosfato) a cada pozo. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 3 h y después centrifugadas durante 10 minutos a 860 xg. El medio de cultivo fue aspirado desde cada pozo, los cristales de formazan fueron solubilizados con dimetil sulfóxido (100 μL por pozo) y se midió $\text{OD}_{540\text{nm}}$. Se calculó el número relativo de células (supervivencia celular) en cada pozo al corregir la lectura de anterior de medio, y después dividir cada valor entre el promedio de los valores en los pozos de control (células no tratadas).

163/162

Prueba de citotoxicidad de cultivo líquido

Diluciones de inmunoconjugados en el medio apropiado fueron agregadas a los pozos de las placas de 96 pozos de fondo redondo que contienen 2×10^3 de células COLO 205, o 2×10^3 de células SNU-16, o 2×10^3 de células Namalwa, o una mezcla de 2×10^3 células COLO 205 con 2×10^3 células Namalwa, o una mezcla de 2×10^3 SNU-16 con 2×10^3 células Namalwa. Las placas fueron incubadas durante cinco días a 37°C, 6% CO₂. Se tomaron fotografías de las células en cada pozo con un microscopio invertido Nikon Diaphot 300.

Pruebas ELISA para la cuantificación de huC242-DMI, huC242-SMCC-DMI, y fármaco maitansinoide liberado desde el conjugado.

Los métodos han sido descritos de manera previa {Xie, H., et al., J Pharmacol Exp Ther, 308, 1073-82 (2004)}. Brevemente, para medir las concentraciones de huC242-DMI, el conjugado a partir del estándar, o las muestras de prueba fueron recolectadas en placas ELISA recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-maitansinoide de murino (ImmunoGen), y detectadas con IgG anti-humano de asno peroxidasa de rábano-etiquetado (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Para determinar la concentración del fármaco maitansinoide liberado desde el conjugado, la proteína fue precipitada a partir de muestras mediante la adición de cinco volúmenes de acetona enfriada con hielo. La proteína precipitada fue sedimentada mediante centrifugación a 16,000 x g, y las concentraciones de fármaco liberado en el sobrenadante fueron determinadas usando una prueba ELISA de competencia como sigue. Las placas fueron cubiertas con DMI que había sido conjugado para albumina de suero bovino (BSA-DMI, ImmunoGen). Las muestras de dilución de una solución estándar de maitansina y las muestras de prueba fueron mezcladas con anticuerpo monoclonal anti-maitansinoide de

164 98 167

murino biotinilado (ImmunoGen) y después incubadas en la placa recubierta con BSA-DMI. Finalmente, el anticuerpo anti-maitansinoide biotinilado enlazado fue detectado con estreptavidina-peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch).

5 **Modelos de tumor de xenoinjerto humano en ratones**

Se obtuvieron ratones hembra CB-17 con inmunodeficiencia combinada severa(SCID) de cinco semanas de Taconic (Germantown, NY). Una semana después, los ratones fueron inoculados por vía subcutánea con una de las siguientes líneas celulares: HT-29 (2×10^6 células por ratón), COLO 205 (1×10^7), Namalwa (2×10^6), o una mezcla de células COLO 205 y Namalwa (1×10^7 y 2×10^6 células por ratón, respectivamente). De nueve a trece días después, cada ratón recibió diariamente inyecciones de bolo intravenoso de PBS (control), huC242-SMCC-DMI, o huC242-DMI que contienen 25, 75, o 150 $\mu\text{g/kg}$ de DMI conjugado durante cinco días consecutivos (qd x 5). Se midieron las dimensiones del tumor dos veces por semana y se calculó el volumen como $1/2 (L \times W \times H)$ en donde L es la longitud, W la anchura, y H la altura del tumor.

Inmunohistoquímica

Los tejidos tumorales fueron fijados en formalina al 10% e incrustados en parafina. La examinación inmunohistoquímica de las secciones de parafina se ejecutó usando anticuerpo C242 de murino para detectar células COLO 205, y anticuerpo anti-CD38 de murino (RDI-CD38abm-290, Research Diagnostic, Flanders, NJ) para detectar células Namalwa usando la técnica de avidin-biotin-peroxidasa (ABC).

165 74 164

Resultados:

HuC242-DMI elimina las células no de objetivo próximas a sus células de objetivo in vitro

El inmunoconjugado, cantuzumab mertansina o huC242-DMI, es efectivo en la erradicación de xenoinjertos de tumor humano que expresan CanAg en ratones, incluyendo aquellos que expresan el antígeno de una manera heterogénea, {Liu, C, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 8618-23 (1996)} aunque no es efectivo contra tumores de xenoinjerto CanAg negativos. Para determinar si el conjugado huC242-DMI asociado con las células CanAg-positivas tiene la habilidad para eliminar células no de objetivo cercanas, se estudió su comportamiento in vitro utilizando cultivos de células mezcladas antígeno-positivas y antígeno-negativas en una matriz de colágeno 3D. Las células pueden ser incrustadas en la matriz a altas densidades que simulan el ambiente de tumor in vivo.

En una primera serie de experimentos, se utilizaron células COLO 205 antígeno positivas tratadas y no tratadas (Figura 2). Un conjunto de células fue incubado en el medio de cultivo con huC242-DMI a 37°C durante 16 h. El conjugado no enlazado fue removido después mediante lavado extensivo, y números crecientes de las células tratadas fueron mezclados con muestras de células no tratadas para proporcionar las relaciones de células tratadas a células no tratadas de 0:1 (control), 1:1, 4:1, y 8:1, respectivamente. Las mezclas de células fueron incrustadas después en colágeno, incubadas durante cinco días, y se determinó el número de células viables en cada muestra en una prueba MTT. En cultivos de control adicionales, las células COLO 205 tratadas con inmunoconjugado, fueron reemplazadas por células COLO 205 tratadas con formaldehído o tratadas con luz UV. Los resultados se muestran en la Figura 3A. La fracción superviviente de las células disminuyó de manera progresiva en los cultivos que

166 88 85

contienen números crecientes de células tratadas con conjugado (Figura 3 A, barras negras). Por lo tanto, las células no tratadas fueron eliminadas en los cultivos mezclados. Esta eliminación dependió del conjugado y no se debe a ningún efecto inhibidor de tinción de células COLO 205 en la población celular no tratada, ya que las células COLO 205 eliminadas por el tratamiento de formaldehído o la irradiación UV no afectan de manera significativa la proliferación de las células no tratadas (Figura 3A, barras grises y blancas, respectivamente).

En una segunda serie de experimentos, células COLO-205 tratadas con huC242-DMI, como se describió con anterioridad, fueron mezcladas con líneas celulares antígeno-negativas en una relación de 1:1, incrustadas en colágeno, incubadas durante cinco días, y después probadas para crecimiento celular en una prueba MTT. Las líneas celulares antígeno-negativas fueron de diversos orígenes: un linfoma de Burkitt (Namalwa), un melanoma (A375), y un hepatocarcinoma (HepG2). Como se muestra en la Figura 3B, las células tratadas con huC242-DMI inhibieron el crecimiento de todas las líneas celulares antígeno-negativas, co-cultivadas. Las células Namalwa fueron las más sensible al efecto citotóxico generado por las células COLO 205 pretratadas con el conjugado, como se indica mediante una disminución en la fracción superviviente hasta menos de 0.2, las células HepG2 fueron las menos sensibles con una fracción superviviente de aproximadamente 0.7, and A375 y las células COLO 205 mostraron sensibilidad intermedia.

A continuación se examina si la eliminación dependiente de célula de objetivo de las células no de objetivo ocurre en cultivos celulares líquidos. Células Namalwa no adherentes, antígeno-negativas fueron tratadas como células reportero en cultivos mezclados y células COLO 205 semi-adherentes como células de objetivo. Los dos tipos de células fueron colocados juntos en una placa de 96-pozos de fondo redondo. En unas

167 SK
106

cuantas horas todas las células se sedimentaron juntas en estrecha proximidad en la parte media del pozo. El experimento incluyó pozos que contenían 2×10^3 células Namalwa solas, 2×10^3 células COLO 205 solas, y una mezcla de 2×10^3 células de cada una de las dos líneas celulares, todas en 0.2 mL e3 medio de cultivo líquido que contiene 1 nM huC242-DMI. Después de la incubación durante cinco días a 37°C , se tomaron fotografías de las poblaciones celulares (Figura 3C). En ausencia del conjugado (Figura 3 C, columna izquierda), el número de las células en toso los pozos se había incrementado unas 20 veces como se determinó por medio del conteo celular. Las poblaciones celulares mezcladas también fueron analizadas por medio de citometría de flujo para confirmar que tanto las células Namalwa como las células COLO 205 habían proliferado. huC242 Alexa-etiquetado sirvió para teñir las células COLO 205 CanAg-positivas, en tanto que el anticuerpo anti-CD 19 Alexa-etiquetado específico de célula B fue utilizado para la detección de las células Namalwa. Este análisis reveló que después de cinco días de proliferación, los cultivos mezclados libres de conjugado constaron de 40% de células COLO 205 y 60% de células Namalwa, demostrando que ambos tipos de células habían proliferado a velocidades similares. Como es esperaba, huC242-DMI eliminó a la mayoría de las células en los pozos que contienen células COLO 205 CanAg-positivas (Figura 3C, fila superior) y no afecta de manera significativa el crecimiento en pozos que contienen células Namalwa antígeno-negativas (Figura 3 C, fila media). En pozos con un población mezclada de células, el conjugado eliminó tanto células COLO 205 como células Namalwa (Figura 3C, fila inferior). Por tanto, las células COLO 205 tratadas con huC242-DMI pueden erradicar las células antígeno negativas próximas en cultivo líquido así como en un cultivo celular de colágeno 3D.

Para probar si las líneas celulares de objetivo diferentes a COLO 205 pueden ejercer este efecto citotóxico sobre células espectadoras, se ejecutó un experimento

10 39 267

análogo utilizando otra línea celular CanAg-positiva, el carcinoma gástrico SNU-16 (Figura 2). Como se muestra en la Figura 3D, huC242-DMI (1 nM) eliminó células SNU-16, no afectó la proliferación de células Namalwa, y eliminó la población celular Namalwa/SNU-16 mezclada. Juntos estos experimentos demuestran que el efecto de expectativa in vitro de huC242-DMI no está limitado a un tipo particular de célula de objetivo CanAg-positiva o un tipo particular de célula espectadora CanAg-negativa.

El efecto de expectativa de inmunoconjugados es afectado por la naturaleza del enlazador anticuerpo-fármaco

HuC242-DMI consta de moléculas DMI conjugadas para el anticuerpo huC242 a través de un enlazador que contiene disulfuro. Este enlazador es fácilmente reducido por tioles in vitro en un ambiente libre de célula, y por lo tanto es posible que sea separable por medio de abundantes timoles célula-asociados. Para probar si la presencia del enlace de disulfuro en el enlazador es requerida para la generación del efecto de expectativa, se sintetizó huC242-SMCC-DMI, un conjugado en el cual DMI es enlazado al anticuerpo por medio de un enlace tioéter no-reducible (Figura 1), y se probó su citotoxicidad in vitro sobre células COLO 205, células Namalwa y poblaciones celulares mezcladas COLO 205/Namalwa. huC242-SMCC-DMI fue tan potente como huC242-DMI en la eliminación de células de objetivo COLO 205 con un valor IC_{50} de $4 \times 10^{-11} M$ (datos no mostrados). Esta citotoxicidad fue CanAg-selectiva ya que ninguno de los conjugados fueron citotóxicos para las células Namalwa antígeno-negativas en todo el rango de concentración probado (hasta $1 \times 10^{-9} M$). A diferencia de huC242-DMI, huC242-SMCC-DMI exhibió solamente citotoxicidad marginal, si es que la hubo, sobre las células espectadoras en cualquier prueba de matriz de colágeno 3D, o prueba de cultivo líquido (Figura 3B y 3C, respectivamente), sugiriendo que el mecanismo del efecto de expectativa

16^a 188

para huC242-DMI incluye una etapa de separación del enlace de disulfuro.

El efecto de expectativa no está limitado a los conjugados anticuerpo-maitansinoide

Para determinar si el efecto de expectativa es una propiedad única de los conjugados anticuerpo-maitansinoide, se examinaron conjugados de huC242 con DCI. DCI es un análogo del alquilador CC-1065 de enlace de ADN y difiere de DMI tanto en su estructura (Figura 1) como en el mecanismo de acción. Se reportaron los conjugados antígeno-selectivos potentes anteriores de DCI con un anticuerpo anti-CD19, y un anticuerpo anti-CD56 {Chari, R.V., et al., Cancer Res. 55, 4079-84 (1995)}. Los conjugados análogos fueron construidos de DCI con huC242, en el cual el fármaco y el anticuerpo fueron conjugados a través de un enlazador que contiene disulfuro (huC242-DCI) o un enlazador que contiene tioéter (huC242-SMCC-DCI) como se muestra en la Figura 1, y se probó su habilidad para eliminar células antígeno-positivas y espectadoras in vitro. En concentraciones entre $2 \times 10^{-10}M$ y $2 \times 10^{-9}M$, ya sea conjugadas o no eliminaron la mayoría de las células en cultivos COLO 205 antígeno-positivos (Figura 3 C, fila superior muestra los resultados para la concentración $1 \times 10^{-9}M$), aunque no las células en cultivos Namalwa antígeno-negativos (Figura 3C, fila media), confirmando que su citotoxicidad es antígeno-dependiente. Cuando se probaron en poblaciones celulares de objetivo/no de objetivo mezcladas, huC242-DCI fue capaz de eliminar la mayoría de las células de ambas clase, en tanto que huC242-SMCC-DCI no lo fue (Figura 3C, fila inferior). Estos experimentos demuestran que la habilidad para eliminar las células espectadoras no es una propiedad exclusiva de los conjugados DMI, sino que aplica a otros conjugados anticuerpo-fármaco enlazados por enlaces que contienen disulfuro.

El efecto de expectativa de huC242-DMI es generado a través de procesamiento del

170 169

conjugado mediante células de objetivo y libera un maitansinoide citotóxico en el medio

Para definir el mecanismo del efecto de expectativa, se determine si las células que expresan CanAg tratadas con huC242-DMI liberan un compuesto citotóxico en el medio, el cual se difunde después hacia células cercanas. Las células de objetivo COLO 205 o Namalwa antígeno-negativas fueron incubadas con huC242-DMI o huC242-SMCC-DMI (10^{-7} M) a 37°C durante 0, 6, 24, o 48 h. Las células fueron removidas desde el medio por centrifugación, y los sobrenadantes fueron probados para la presencia de huC242-DMI y maitansinoides libres utilizando dos métodos ELISA diferentes (véase Materiales y Métodos). Los resultados se muestran en la Figura 4A-C. Después de una incubación de 48 h con las células de objetivo, la concentración de cualquier conjugado en el sobrenadante disminuyó aproximadamente 3 veces y, de manera concurrente, la concentración de una especie de maitansinoide libre se incrementó aproximadamente 4 veces (Figura 4A, C). Una incubación similar de huC242-DMI con células Namalwa CanAg-negativas no condujo a la desaparición del conjugado ni la aparición de un maitansinoide libre en el medio (Figura 4B), indicando que el enlace al antígeno de la superficie celular es necesario para el procesamiento de estos conjugados y la liberación de fármacos de maitansinoide dentro del medio.

La actividad citotóxica de los fármacos de maitansinoide liberados fue analizada después mediante la exposición de células Namalwa CanAg-negativas al conjugado que contiene medio acondicionado con células COLO 205. La citotoxicidad específica de medio que contiene huC242-DMI se incrementa de manera gradual aproximadamente 10-veces durante 48 horas, como se demostró mediante el cambio a partir de un valor IC_{50} inicial de 2×10^5 M (sobrenadante cosechado inmediatamente después del mezclado, sin incubación) hasta 3×10^9 M y 1.7×10^9 M después de la incubación durante 24 h y 48 h,

171 86 170

respectivamente (Fig. 4D). En contraste, no hubo incremento detectable en la citotoxicidad del medio que contiene huC242-DMI cuando fue acondicionado por la presencia de células Namalwa (Figura 4E). La citotoxicidad mejorada del conjugado que contiene, medio acondicionado con COLO 205 se asemeja al incremento en la concentración del maitansinoide libre en la Figura 4 A. Estos datos sugieren un mecanismo para la citotoxicidad de expectativa de huC242-DMI en la que el conjugado se enlaza a las células que expresan antígeno, seguido por el procesamiento mediado por célula del conjugado y la liberación progresiva de una especie de maitansinoide citotóxico capaz de eliminar células cercanas.

La incubación de huC242-SMCC-DMI con células COLO 205 conduce tan solo a un modesto incremento de 2 veces en la citotoxicidad no-específica del medio de cultivo (Figura 4F). ya que tanto el conjugado enlazado a disulfuro como el conjugado enlazado a tioéter son procesados por células COLO 205 y liberan una cantidad comparable de especies de maitansinoide libre dentro del medio (Figuras 4A y 4C), distintos metabolitos son igualmente formados a partir de huC242-DMI y huC242-SMCC-DMI. Como se describe a continuación, las estructuras químicas de los metabolitos han sido identificadas, y se ha confirmado que algunos de los productos del procesamiento de huC242-DMI son 100 hasta 10,000 veces más potentes que el metabolito de huC242-SMCC-SMI.

Efecto de expectativa de huC242-DMI en modelos de tumor de xenoinjerto humano

Mediante analogía con los sistemas de cultivo celular mezclados in vitro, se desarrollaron los modelos de tumor de xenoinjerto que constan de células COLO 205 que expresan CanAg y células Namalwa CanAg-negativas. Una mezcla de células COLO 205 y Namalwa fue inyectada por vía subcutánea en ratones SCID (un total de 1.2×10^7

172 121

células/ratón). Cada animal (un total de 23 ratones) desarrolló un tumor medible y, nueve días después del implante celular, el volumen de tumor medio alcanzó aproximadamente 100 mm³. Dos tumores de nueve días fueron retirados a partir de animales sacrificados y analizados para la presencia de células COLO 205 (CanAg+/CD38-) y células Namalwa (CD38+/CanAg-) mediante tinción histoquímica de los tejidos con el anticuerpo C242 murino y un anticuerpo anti-CD38 murino, respectivamente. El marcador para células COLO 205 (Figura 5Aa) y aquel par alas células Namalwa (Figura 5Ab) tiñó áreas de tamaño aproximadamente igual, confirmando la naturaleza mezclada de los tumores. La vasta mayoría tanto de las células COLO 205 como de las células Namalwa parecieron viables, con poca necrosis aparente. Grupos de ratones que poseen dichos tumores mezclados con un tamaño de aproximadamente 100 mm³ fueron tratados después con cinco inyecciones intravenosas, suministradas en cinco días consecutivos (qd x 5), of PBS (grupo de control), huC242-SMCC-DMI, o huC242-DMI, en dosis diarias del conjugados que contiene 150 µg/kg de DMI enlazado. Un día después de la última inyección, dos ratones de cada grupo fueron sacrificados y sus tumores fueron analizados mediante inmunohistoquímica, como se describió con anterioridad. En el grupo de control tratado con PBS, las secciones de tumor parecieron similares a aquellas obtenidas a partir de tumores no tratados (comparar Figura 5 Ac con 5 Aa, y 5Ad con 5Ab), con áreas de tamaño similar de tejidos COLO 205 y Namalwa, exhibiendo ambos sólo un grado mínimo de necrosis. Las secciones de tumor tratadas con huC242-SMCC-DMI mostraron tejido COLO 205 altamente necrótico (50 a 60% necrótico, Figura 5 Ae) y tejido Namalwa saludable (Figura 5 Af). Finalmente, las secciones de los tumores tratados con huC242-DMI mostraron un alto grado de necrosis (70-80%) tanto en los tejidos COLO 205 como en los Namalwa (Figura 5 Ag y 5 Ah). Estos datos in vivo se asemejan a los resultados in vitro utilizando poblaciones celulares mezcladas. La actividad del conjugado con el

123 62 446

enlazador sin disulfuro estuvo restringida a las células que expresan el antígeno de objetivo, en tanto que el conjugado con el enlazador que contiene disulfuro eliminó tanto las células tumorales de objetivo y no de objetivo en el mismo tumor.

5 Estos resultados inmunohistoquímicos estuvieron de acuerdo con los efectos de huC242-DMI y huC242-SMCC-DMI sobre el crecimiento del tumor. El tratamiento con cualquier conjugado fue igualmente efectivo contra tumores COLO 205 CanAg-positivos (Figura 5Ba): tumores en cuatro e cinco ratones completamente invertidos y sin recaída hasta el día 90, Cuando se terminó el experimento, y en cada grupo, un ratón con recaída condujo a un retraso de en el día 28 en el crecimiento del tumor. Ningún conjugado estuvo
10 active sobre los tumores Namalwa no de objetivo: el tratamiento con huC242-SMCC-DMI no retrasó el crecimiento del tumor en tanto que huC242-DMI logró tan sólo un modesto retrasó el día 7 en el crecimiento del tumor (Figura 5Bb), confirmando que los activos anti-tumorales son CanAg-selectivos. Los dos conjugados difirieron marcadamente en su actividad anti-tumoral contra tumores COLO 205-Namalwa mezclados. huC242-SMCC-
15 DMI no retrasó la progresión de los tumores mezclados, en tanto que huC242-DMI ocasionó regresiones completas de los tumores en un lapso de dos semanas (Figura 5Bc) con cuatro de cinco ratones que permanecen libres de tumor hasta el final del estudio (150 días, es decir, aproximadamente 34 veces la duplicación del tumor). El análisis inmunohistoquímico del único tumor con recaída en este grupo reveló que el tumor
20 consistió por completo de células Namalwa (datos no mostrados). En conclusión, solo el conjugado con el enlazador de disulfuro mostró una habilidad para eliminar células espectadoras in vivo.

Se determinó también el efecto de expectativa in vivo de huC242-DMI y huC242-SMCC-DMI en el modelo de xenoinjerto de cáncer de colon humano HT-29 en ratones
25 SCID. Tumores HT-29 son ejemplos de casos especiales de tumores "mezclados" que se

124 68 123

generan de manera espontánea a partir de una sola línea celular aunque son heterogéneos con respecto a la expresión de antígeno. Las células HT-29 expresan el objetivo de anticuerpo huC242, CanAg, solamente en una minoría de las células (20-40%) in vitro (Figura 2) o en tumores de xenoinjerto {Liu, C, et al., Proc Natl Acad Sci U S A ;93, 8618-23 (1996)}. Los ratones que tienen tumores HT-29 establecidos (aproximadamente 130 mm³) fueron tratados con huC242-DMI o con huC242-SMCC-DM 1 en varias dosis (25 µg/kg, 75 µg/kg, o 100 µg/kg de DMI enlazado, qd x 5), y se monitoreó el crecimiento del tumor. En tanto que el conjugado huC242-DMI enlazado con disulfuro indujo marcados retrasos de crecimiento del tumor en cada dosis (5-25 días dependiendo de la dosis, Figura 6A), el conjugado huC242-SMCC-DMI produjo tan sólo efectos anti-tumorales marginales (2.5-3.5 días de retraso de crecimiento, Figura 6B). Considerados en conjunto, estos datos proporcionan evidencia de que el conjugado huC242-SMCC-DMI que contiene un enlazador sin disulfuro es eficaz solamente contra tumores en las cuales todas las células proliferantes expresan el antígeno de objetivo. En contraste, el efecto de expectativa asociado con el conjugado que contiene disulfuro hace a este conjugado efectivo contra tumores en los cuales solamente una fracción de las células expresan el objetivo CanAg target.

Ejemplo 2 – Activación Intracelular de Conjugados Anticuerpo-Maitansinoide

Abreviaturas

- BafAI, Bafilomicina AI
- BSA, albumina de suero bovino
- FACS, clasificador celular activado por fluorescencia
- HPLC, cromatografía líquida de alta presión
- MTT, 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan

64
125 124

- NEM₅ N-etilmaleimida
- SPDB, JV-succinimidil 4-(2-piridilditio)butirato
- SMCC, iV-succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato
- DMI, JV² -deacetil-iV²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina
- DM4, iV²-deacetyl-N²-(4-mercapto-4-metil-l-oxopentil)-maitansina
- DMI-SMe, N^{2>}-deacetil-N²-[(3-metilditio)-l-oxopropil]-maitansina
- DTT, ditioneitol

Materiales y Métodos

10 J RPMI 1640 y glutamina fueron adquiridos con Cambrex Bioscience. El fluido de
escintilación Ultima Flo™ M fue de PerkinElmer life and analytical sciences. El sulfato de
gentamicina fue de Gibco BRL. iV-etilmaleimida (NEM) y todos los demás productos
químicos se obtuvieron de Sigma. Los anticuerpos AU utilizados, huC242, Tras, y huB4
son anticuerpos IgG1 humanizados. Los maitansinoides [³H]DM4, D-[³H]DM4, S-metil-
15 DM4, lisina-N⁶-SMCC-DMI, y lisina-7V⁶-SPDB-DM4, y los conjugados, huC242-SPDB-
[³H]DM4, huC242-SMCC-[³H]DM4, Tras-SMCC-[³H]DM4, y huB4-SPDB-[³H]DM4, se
prepararon siguiendo los procedimientos publicados {Chari, R. V., et al., Cancer Res, 52,
127-131 (1992) y Xie, H., et al., J Pharmacology and Experimental Therapeutics, 308,
1073-1082 (2004)}.

20

Tratamiento de células COLO 205 con conjugados anticuerpo-fármaco

25 Células COLO 205 (6 x 10⁶) suspendidas en 3 mL de medio de cultivo que
contiene un conjugado anticuerpo-fármaco a una concentración de 10⁻⁷M de anticuerpo
conjugado fueron incubadas a 37°C durante 3-30 h. Las células y el medio fueron
separados después mediante centrifugación (2000 x g, 5 min). El sobrenadante (3 mL) fue

176 68 126

enfriado sobre hielo, mezclado con 4 mL de acetona enfriada con hielo, y mantenido a -80°C durante por lo menos 1 h o hasta procesamiento adicional. Las células fueron suspendidas en 3 mL de regulador de pH HBBS y sedimentadas mediante centrifugación, suspendidas de nuevo posteriormente en 0.3 mL de TBS que contiene 0.5% BSA. En este punto, si se desea la alquilatación para bloquear en el extremo los tioles libres, se agregó NEM hasta 7.5 mM, la solución mezclada y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. La suspensión celular fue mezclada después con 0.6 mL de acetona enfriada con hielo. Las muestras fueron colocadas en -80°C durante por lo menos 1 h o hasta procesamiento adicional. Las muestras de medio tratadas con acetona fueron retiradas a partir de -80°C. La proteína precipitada fue removida mediante centrifugación a 2500 x g y los sobrenadantes fueron acidificados con ácido acético al 5% y evaporados hasta sequedad. Las muestras fueron disueltas en 12 mL de CH₃CN acuoso al 20% que contiene 0.025% TFA, alícuotas de 0.1 mL fueron sometidas a HPLC.

Estudios in vivo

La actividad anti-tumoral de los conjugados fue determinada en ratones SCID hembra CB-17 (Taconic Labs, Germantown, NY) que tienen el tumor HT-29 como se describió de formas previa {Liu, C₅ et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 8618-23 (1996)}. Los conjugados fueron administrados por vía intravenosa a grupos de 6 ratones.

Estudios de ciclo celular

Las células COLO 205 de crecimiento exponencial fueron suspendidas nuevamente a 1-2 x 10⁵ células/mL antes del tratamiento con fármaco o conjugado. Los núcleos de las células fueron teñidos con yoduro de propidio como se describió con anterioridad {Firpo, E.J., et al, Mol Cell Biol, 14, 4889- 901 (1994)}. Se ejecutó el análisis

127 176

de contenidos de ADN usando FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Se recolectaron 10,000 eventos por muestra y se generaron histogramas FL2-A para cada muestra. Se utiliza el software de análisis de ciclo celular, ModFit LT 3.1 (Verity Software House, Topsham, ME) para determinar el porcentaje de células en diferentes fases del ciclo celular.

Métodos Analíticos

Todos los maitansinoides fueron separados en una columna analítica C-18 (0.46 x 25 cm) equilibrada con CH₃CN acuosos al 20% que contiene 0.025% ácido trifluoroacético (TFA) y desarrollado con un gradiente lineal de 2% CH₃CN min⁻¹ y una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. El efluente fue dirigido a un detector de disposición de diodo seguido por un β-contador Radiomatic 150 (Perkin Elmer) en donde el efluente fue mezclado de manera continua con 3 mL de cocktail de escintilación antes de que fuera dirigido hasta una celda de flujo 0.5 mL o un espectrómetro de masa de electroaspersión Bruker Daltonics Esquire 3000 en la aplicación. El intervalo de muestreo de datos fue 6 s. Las áreas pico de los cromatogramas fueron convertidas a picomols como sigue: Se preparó una curva estándar para relacionar el pico de radioactividad (mV²) en los cromatogramas a los conteos por minuto (cpm) de tritio mediante inyección de 1000 cpm hasta 50,000 cpm de una solución concentrada de [³H]DM4 (250 mCi/mmol) diluida en CH₃CN acuoso al 20% que contiene 0.025% TFA. Duplicados de cada muestras fueron sometidos a HPLC como se describió antes.

Resultados

Potencia in vitro y actividad in vivo de conjugados huC242-maitansinoide

178 88
+77

El conjugado de anticuerpo-maitansinoide disulfuro-enlazado, huC242-SPDB-DM4, y el conjugado tioéter-enlazado, huC242-SMCC-DMI, fueron probados primero para su potencia citotóxica contra células COLO 205 antígeno-positivas y células Namalwa antígeno-negativas (ambas sensibles a maitansina con valores IC₅₀ de aproximadamente 30-60 pM para ambas líneas celulares) utilizando una prueba en base a MTT. Los conjugados desplegaron potencias similares con valores IC₅₀ de 40 pM contra células COLO 205 y 20-80 nM contra células Namalwa en una exposición de 4 días de las células a los conjugados (Figura 7A). La actividad anti-tumoral de los dos conjugados fue determinada en ratones SCID que tienen tumores HT-29 o COLO 205 subcutáneos (ambos adenocarcinoma de colon humano CanAg-positivo). La actividad de huC242-SPDB-DM4 en una dosis única de 50 µg /kg (concentración en base a DM4 conjugado) en la erradicación de tumores HT-29 fue mayor que aquella de huC242-SMCC-DMI cuando se administró como cinco inyecciones diarias a una dosis de 150 µg/kg /día (Figura 7B). HuC242-SPDB-DM4 también exhibió mayor actividad que huC242-SMCC-DMI cuando ambos fueron administrados como cinco inyecciones diariamente a una dosis de 150 µg/kg/día en ratones SCID que tienen tumores COLO 205 (cinco de cinco ratones libres de tumor en 122 días en comparación con dos de cinco ratones libres de tumor en 122 días – datos no mostrados). Estos resultados demuestran que en tanto que ambos conjugados exhiben citotoxicidad similar in vitro, su eficacia contra tumores in vivo difiere de manera significativa.

Efecto de inhibidores lisosomales sobre la suspensión de ciclo celular inducida por conjugados huC242-maitansinoide.

Los maitansinoides inhiben la polimerización de tubulina lo que conduce a la suspensión del ciclo celular en la fase G₂M {Issell B.F., et al Cancer Treat Rev, 5, 199-207

179 98
178

(1978)), por lo tanto, ambos conjugados fueron revisados para esta actividad. Las muestras de células con crecimiento asíncrono fueron expuestas al conjugado (3 nM), o DMI-SMe (10 nM ver Figura 16 para la estructura), o nocodazol (0.66 μ M) otro inhibidor de polimerización de microtúbulo, a 37°C durante 20 h y después se analizó del contenidos de ADN de las células mediante citometría de flujo. En cultivos tratados con nocodazol o DMI-SMe, más del 50% de las células fueron detenidas en la fase G₂/M (Figura 7C, primera columna), en comparación con tan sólo el 10% de células COLO 205 no tratadas (de manera común aproximadamente 60% en G₁ y 30% en S). En muestra tratadas con cualquiera de los dos conjugados, aproximadamente 70-80% de las células fueron detenidas en la fase G₂/M, indicando que los efectos del ciclo celular de los conjugados de maitansinoide conjugados son similares a aquellos de los maitansinoides libres (Figura 7C). No se indujo suspensión de ciclo celular por medio de los conjugados en células que carecen del antígeno de objetivo (datos no mostrados).

Para probar si la aDM1ssion y procesamiento de los conjugados a través de lisosomas fue necesaria para su actividad contra células cancerígenas, se examinó la suspensión G₂/M inducida por conjugados en presencia de Bafilomycin A1, un inhibidor lisosomal. BafA1 inhibe de manera selectiva V-ATPase, una bomba de protón que está presente en endosomas y lisosomas, lo cual conduce a la neutralización del pH en estas vesículas {Drose, S., et al, J Exp Biol, 200, 1-8 (1997); Bowman, EJ., et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 85, 7972-76 (1988)}. La neutralización del pH bloquea el tráfico desde los endosomas finales a los lisosomas y el procesamiento lisosomal, afecta aunque de manera modesta la velocidad de internalización y el reciclado, y no inhibe el tráfico entre los endosomas y trans-Golgi {van Weert, A. W., et al, J Cell Biol, 130, 821-34 (1995); Oda, K., et al, Biochem Biophys Res Commun, 178, 369-77 (1991); Zetser, A., et al, J Cell Sci, 117, 2249-58 (2004)}. Se encontró también que la velocidad de internalización de un

180
179

huC242 modificado por fluorescencia no fue afectada por BafAl (datos no mostrados). El tratamiento de células COLO 205 con BafAl solamente no alteró de manera significativa la distribución de células entre las fases del ciclo celular (Figura 7C). Sin embargo, en presencia de BafAl, la suspensión G₂/M inducida por huC242-SMCC-DMI o por huC242-SPDB-DM4 fue eliminada casi por completo (6-9% en G₂M, Figura 7C). En contraste, el tratamiento BafAl tuvo un efecto modesto sobre la extensión de la suspensión G₂ZM ocasionada por el maitansinoide libre, DMI-SMe o por nocodazol (37%-39% en G₂/M, Fig. 7C). También se encontraron resultados similares cuando se utilizó cloroquina, otro inhibidor lisosomal que neutraliza el pH a través de un mecanismo diferente {Zetser A., et al, J Cell Sci., 117, 2249-58 (2004) y Homewood, C.A., et al, Nature, 235, 50- 52 (1972)}. (Figura 8). Estos hallazgos fueron la primera indicación de la importancia del procesamiento lisosomal en la activación tanto de huC242-SMCC-DMI como de C242-SPDB-DM4.

Aislamiento de metabolitos maitansinoides a partir de conjugados huC242-maitansinoide.

Para examinar el destino del fármaco maitansinoide a la incubación de las células de objetivo con un conjugado anticuerpo-maitansinoide, se prepararon conjugados con maitansinoides que fueron [³H]-etiquetados en el grupo metoxi C-20 (ver Figura 16). Conjugados maitansinoides radioetiquetados, huC242-SPDB-[³H]DM4 (250 mCi/mmol) y huC242-SMCC-[³H]DMI (214 mCi/mmol), exhibieron citotoxicidades in vitro similares a muestras de conjugado no-radioetiquetado (datos no mostrados). Cultivos de células COLO 205 de 2 x 10⁶ fueron expuestos a conjugados 10⁻⁷ M [³H]-etiquetados durante periodos de 5, 9, y 26 h, separados en fracciones de célula y medio acondicionado, y cada muestra fue extraída con acetona. Las células tratadas bajo estas condiciones

181 70
10/10

permanecieron viable con membranas de plasma intactas durante por lo menos las primeras 26 h de exposición como se determinó mediante tinción de azul Trypan (datos no mostrados). Los extractos de acetona fueron analizados para los metabolitos [³H]-etiquetados mediante HPLC de fase inversa. Los cromatogramas exhiben señales de la cantidad de radioactividad en las muestras extraídas de acetona desde las células tratadas huC242-SMCC-[³H]DMI tioéter-enlazadas (Figura 9A). Se preparó un control a partir de un extracto de acetona del conjugado usado en el experimento a fin de identificar las especies de maitansinoide libres presentes en la muestra huC242-SMCC-[³H]DMI antes de la exposición a las células (Figura 9 A; g). Dos nuevos picos de radioactividad parcialmente separados con tiempos de retención de aproximadamente 18.7 minutos y 19.2 minutos, respectivamente fueron identificados en extractos a partir de pellas de células. Estos metabolitos son fácilmente detectables después de una exposición de 5- horas, e incrementa por medio de 9 y 26 h (Figura 9A; a, c, e). Estos mismos metabolitos también fueron detectables en el medio de cultivo aunque no hasta el punto de tiempo de 9-h, y después fueron fácilmente detectables en la muestra de 26-h. En experimentos separados, los dos metabolitos fueron aislados y encontrados mediante espectrometría de masa para ser los dos isómeros de lisina N⁸-SMCC-[³H] DM1 (configuración R o S en el carbono del enlace tioéter formado en la reacción de conjugación; ambos picos M⁺ = 1103.5; M+Na = 1125.5).

Los resultados a partir de un experimento análogo con el conjugado huC242-SPDB-[³H]DM4 disulfuro-enlazado se muestran también en la Figura 9B. Se observaron tres picos de radioactividad distintos con tiempos de retención de 20.5, 26.5, y 27 minutos en los cromatogramas derivados a partir de las pellas celulares tratadas con huC242-SPDB-[³H]DM4 durante 5 y 9 h (Figura 9B; a, c). las células tratadas durante 26 h produjeron por mucho un pico con un tiempo de retención de 27 minutos (Figura 9B; e),

122 *
121

indicando que los metabolitos que se eluyen a 20.5 y 26.5 minutos han sido convertidos para el metabolito eluyendo a 27 minutos o no estuvieron presentes en las células. El pico a 26.5 minutos tuvo el mismo tiempo de retención que DM4. Para estudiar adicionalmente este metabolito y para determinar si cualquiera de los otros metabolitos contenía un grupo sulfhidrilo libre, un extracto de acetona a partir de una exposición de 9-horas fue tratado con N-etil-maleimida (NEM) y después sometido a HPLC (Figura 2B; g). Después de la alquilatación, el pico a 26.5 minutos, observado en las muestras de 5-h y 9-h, fue reemplazado con un nuevo pico a 25 minutos. Este nuevo pico co-eluye con un estándar del producto de reacción DM4-NEM purificado (datos no mostrados), sugiriendo que el metabolito en 26.5 minutos es de hecho DM4.

Los cromatogramas correspondientes asociados con los medios acondicionados a partir de las células tratadas se exhibe en la Figura 9B (b, d y f). Después de una exposición de 5 h, ningún metabolito pudo ser detectado — los picos presentes están disponibles también en el cromatograma de control del extracto de acetona de la muestra de conjugado (Figura 9B; h). Sin embargo, después de 9 h de exposición, el metabolito desconocido con un tiempo de retención de 20.5 minutos que se observó en las células después de 5 h puede ser detectado en el medio y, después de 26 h, estuvieron presentes dos metabolitos adicionales con tiempos de retención de 18.5 minutos y 27 minutos. Se encontró que el único metabolito en el medio que eluye a 18.5 minutos posee el mismo tiempo de retención que el disulfuro mezclado entre DM4 y cisteína (S'-cisteinil-DM4, datos no mostrados). El medio RPMI 1640 contiene 0.21 mM cistina, y experimentos separados han demostrado que DM4 bajo estas condiciones reacciona con rapidez ($t_{1/2} < 1$ hora) para formar S-cisteinil-DM4 a través de reacción de intercambio de disulfuro de tiol (datos no mostrados). Por tanto, se esperaría que el compuesto de disulfuro S-cisteinil-DM4 se forme en el medio si el DM4 observado en la pella celular sale

183 72
+82

de las células. Para probar de manera adicional si cualquiera de los metabolitos en los medios fue un compuesto de disulfuro, una muestra de sobrenadante celular a partir de una exposición de 26-hour fue dividido en dos porciones iguales de las cuales una fue sometida directamente a cromatografía, y la otra porción fue tratada con DTT y selenol antes de la cromatografía para reducir todos los enlaces disulfuro (18). Después de la reducción, todos los picos de radioactividad en los cromatogramas desaparecieron excepto el pico que eluye a 27 minutos y apareció un nuevo pico individual con un tiempo de retención de 26.5 minutos, el cual es aquel de DM4 (Figura 10). Por lo tanto, los metabolitos que eluyen a 18.5 minutos y 20.5 minutos, aunque no el metabolito a 27 minutos, son especies DM4 que contienen un sustituyente disulfuro enlazado. En experimentos separados, se encontró que los metabolitos desconocidos que eluyen a 20.5 y 27 minutos tienen una masa consistente con lisina-JV^{*}-SPDB-DM4 (M+Na = 1048.4) y S-metil-DM4 (M+Na = 816.4/ M+K = 832.5), respectivamente.

En los experimentos anteriores, 2×10^6 de células COLO 205 fueron incubadas en 3 mL de medio que contiene 10^{-7} M de conjugado. A partir de esta gran cantidad de conjugado, se recuperó menos del 20% del maitansinoide conjugado-enlazado en los metabolitos maitansinoides identificados después de la incubación con las células durante 26 horas (línea punteada en la Figura 11A; c representas nivel del 20%). En un experimento separado después del destino de huC242-SPDB-[³H]DM4 que fue enlazado a las células a 4°C, se mantuvo dentro de un período de 22 h a 37°C, 73% del conjugado DM4 enlazado a células COLO 205 fue convertido en los cuatro metabolitos maitansinoides, DM4, S-cisteinil-DM4, lisina-iV⁵-SPDB-DM4, y Sⁱ-metil-DM4 (Figura 12). Se considera que estos metabolitos representan la mayoría de (sino es que a todos) los metabolitos formados en el proceso de activación celular. Además, la producción de estos metabolitos maitansinoides no se observó cuando las células COLO 205 fueron incubadas

184 77 107

con conjugados de maitansinoide disulfuro-enlazados o SMCC-enlazados que no enlaza antígenos de objetivos en esas células (Figura 13).

La cinética para la acumulación de metabolitos y suspensión de ciclo celular

5 Las áreas pico de radioactividad asociadas con los metabolitos generados a partir de huC242-SMCC-[³H]DMI y a partir de huC242-SPDB-[³H]DM4 (Fig. 9) fueron determinados y convertidos a pmol de maitansinoide como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 11A como acumulación de los metabolitos maitansinoides durante el tiempo a partir de la adición de los conjugados a las células (T = 0). El panel (a) muestra la acumulación de lisina-N⁸-SMCC-DM1, el metabolito individual a partir de huC242-SMCC-[³H]DMI, en la pella celular y en el medio. La concentración del metabolito en las células alcanza un estado estable después de 9 h de incubación, el cual se puede deber a la saturación de un sitio de enlace intracelular. Este metabolito maitansinoide empieza a aparecer en el medio a las 9 h, sugiriendo el eflujo eficiente de las especies lisina-N⁸-SMCC-DMI cargadas a través de la membrana del plasma. La Figura 11A (b) muestra la acumulación de los tres metabolitos estables generados a partir de huC242-SPDB- [³H] DM4, en la pella celular y en el medio. La cantidad intracelular del compuesto de disulfuro, lisina-N⁸-SPDB-DM4, declina durante el período observado de 26h, presumiblemente a través de la separación de disulfuro para DM4 en el ambiente de reducción intracelular, seguido por la conversión subsecuente del tiol libre resultante, DM4, para el derivado estable 5'-metil-DM4. Se observo muy poco, si lo hay, DM4 dentro de las células después de 9 h de incubación, indicando la rápida metilación probablemente catalizada por una metil transferasa. La acumulación intracelular total de metabolitos alcanza un estado estable después de 9 h de exposición a cualquier conjugado y los niveles de metabolitos en el estado estable son

185 9A 104

aproximadamente los mismos para ambos conjugados (Figura 11A) sugiriendo que los conjugados comparten la misma etapa de limitación de velocidad con respecto a la producción de los metabolitos y que estos metabolitos se enlazan igualmente al mismo objetivo intracelular.

5 Ya que solo aproximadamente se requieren 9 h para la acumulación intracelular de los metabolitos para que alcancen el nivel de estado estable, se condujo un experimento para determinar si la suspensión G₂/M inducida por cualquier conjugado puede ocurrir dentro de esta estructura de tiempo. Las células COLO 205 fueron sincronizadas primero con un tratamiento de 24-hr de afidicolina, un inhibidor de reproducción AND invertible que bloque las células en la fase S (Ikegami S. et al, Nature, 275, 458- 460 ((1978))). Ya que la mayoría de la población asíncrona de células COLO 205 estaban en la fase G₁, la mayor parte de las células tratadas con afidicolina suspendidas al inicio de la fase A, que no pueden distinguirse de la fase G₁ en el análisis FACS (Figura 11B, imagen superior). Las células sincronizadas fueron liberadas después a partir de la suspensión mediante la remoción de afidicolina, y tratadas o sin tratar, o tratadas con DMI-SMe o con cualquier conjugado. Las células no tratadas continúan de inmediato con la síntesis de ADN, y la mayoría está en la fase G₂/M (59%) después de 5 h (Figura 11B), y ha experimentado mitosis a las 10 h y están en la fase G₁ (76%). En contraste, la mayoría de las células tratadas con DMI-SMe o cualquier conjugado están en la fase G₂/M (75% hasta 85%) después de 10 h y después de 18 h, indicando que cantidades suficientes de especies de fármaco activo se han acumulado de manera intracelular para inducir la suspensión mitótica cuando las células liberadas con afidicolina alcanzan la mitosis. Por lo tanto, las células COLO 205 requieren tan solo de 5 h, aunque no más de 10 h para producir suficientes metabolitos de fármaco activo para ocasionar la suspensión del ciclo celular. Por tanto, la cinética de la suspensión de fase G₂/M inducida por estos conjugados se

78
186 185

correlaciona con el tiempo requerido para alcanzar el nivel de estado estable de la acumulación intracelular de los metabolitos de fármaco.

Actividad de metabolitos maitansinoides

5 Los dos principales metabolitos, S'-metil-DM4 y lisina-N⁸-SMCC-DMI, fueron sintetizados y probados para su citotoxicidad in vitro contra células COLO 205 y células Namalwa. 5'-metil-DM4 fue altamente citotóxico con un valor IC₅₀ de 2 Pm contra ambas líneas celulares, en tanto que lisina-N⁸-SMCC-DMI fue aproximadamente 10⁵-veces menos potente contra ambas líneas celulares con un valor IC₅₀ de 0.1 µM (datos no mostrados). Esta diferencia fue explicada por el diferente estatus de carga de los compuestos. Se espera que los derivados de lisina cargados penetren las membranas celulares de manera muy ineficiente de modo que son necesarias concentraciones externas elevadas para alcanzar las concentraciones tóxicas requeridas, en tanto que la penetración de las membranas celulares es eficiente para el compuesto S'-metil-DM4 lipofílico neutro.

10

15

 La acumulación del metabolito lisina-N⁸-SMCC-DM 1 a partir del conjugado no separable es coincidente con la formación observada del potente S-metil-DM4, DM4, y lisina-N⁸-SPDB-DM4 a partir del conjugado separable. Esto sugiere que el metabolito lisina-N⁸-SMCC-DM1 es tan potente como los metabolitos a partir del conjugado separable cuando se suministra de manera intracelular y que todos los metabolitos maitansinoides son activos cuando se producen en la célula. La suspensión de ciclo celular de los conjugados separables y no separables fue eliminada en presencia del inhibidor lisosomal BafA1 (Figura 7C). Si el metabolito lisina-N⁸-SMCC-DMI y los demás metabolitos observados a partir de células de suspensión de conjugado separable, BafA1 evitará su formación. Para investigar esta posibilidad, las células COLO 205 fueron

20

25

87 70 100

incubadas a 37°C durante 22 h con conjugado 10^{-7} M huC242-SMCC- ^3H DMI o huC242-SPDB- ^3H DM4 en presencia o en ausencia de 300 nM BafA1. BafA1 abolió la formación tanto de lisina-N⁶-SMCC-DMI a partir del conjugado de tioéter, y 5-metil-DM4 a partir del conjugado disulfuro enlazado (Figura 14A). Además, no se detectaron metabolitos en el medio de las células tratadas con conjugado en presencia de BafA1 (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que los metabolitos de lisina son tóxicos cuando son suministrados de manera intracelular y que el procesamiento lisosomal es necesario para la producción de todos los metabolitos observados.

La velocidad de liberación de maitansinoides totales es aproximadamente constante durante 20 h, aunque unos cuantos metabolitos son observados en el medio hasta después de 9 h para cuyo tiempo la cantidad máxima de metabolitos en la célula ha sido alcanzada (Figura 11A ,c). Esto sugiere que el enlace de metabolitos al objetivo intracelular afecta la velocidad del eflujo, y que derivados menos tóxicos de DM4 pueden efluir en momentos iniciales si la toxicidad disminuida se debe a una menor afinidad de enlace para el objetivo intracelular. Para investigar esta posibilidad, se estudió el procesamiento celular de un conjugado preparado a partir de un isómero 50-veces menos potente (datos no mostrados) de DM4, D- ^3H DM4. DM4 tiene el grupo L-N-metil-alanyl natural en la cadena lateral, en tanto que D-DM4 tiene su isómero D-N-metil-alanilo. Los conjugados HuC242 preparados con el D-isómero de DM4 fueron por lo menos 700-veces menos tóxicos para las células COLO 205 que el conjugado de L-isómero correspondiente (datos no mostrados). Las muestras de 2×10^6 células COLO 205 fueron expuestas a conjugado 10^{-7} M huC242-SPDB-D- ^3H DM4 y 10^{-7} M huC242-SPDB- ^3H DM4 como un control a 37°C durante varios períodos y analizados mediante HPLC de fase inversa (Figura15). Casi no se observaron metabolitos en las células tratadas con huC242-SPDB-D- ^3H DM4 incluso después de 30 h, en tanto que se observó un metabolito desconocido

188 74 187

con un tiempo de retención de 22 minutos en el medio después de tan sólo 5 h de incubación y se incrementa de manera estable después de 9, 22, y 30 h de exposición. La identidad del desconocido fue confirmada como lisina-N^ε-SPDB-D-DM4 por medio de análisis MS (M+Na = 1048.5).

5 La cantidad del metabolito lisina- N^ε-SPDB-D-DM4 después de 30 h fue similar a la suma de todos los metabolitos a partir de las células de control tratadas con huC242-SPDB-[³H]DM4 después de 30 h (Figura 14B), sugiriendo que los dos conjugados con los isómeros D y L de DM4 son internalizados y procesados para sus respectivos aductos lisina-DM4 a velocidades similares. La explicación de la falta de una acumulación apreciable de D-DM4, 5-cisteinil-D-DM4 y S-metil-D-DM4 a partir del conjugado con el isómero D de DM4 se puede dar por el escaso enlace intracelular y el rápido eflujo de lisina-N^ε-SPDB-D-DM4.

10

Ejemplo 3

15 **Síntesis de algunos tiometil maitansinoides (Figura 17)**

N²-deacetil-N²-(3-metiltio-1-oxopropil)-maitansina (S-Metil-DM1, DM1Me): A una solución de N²-deacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DMI, 30 mg, 0.041 mmol) en dimetilacetamida (0.25 mL) se agregó una solución de yodometano (5.8 mg, 0.041 mmol) en 0.2 mL de dimetilacetamida bajo una atmósfera de argón, con agitación magnética. Se agregó después diisopropiletilamina (5.0 mg, 0.041 mmol) y la reacción se agitó durante 3 horas. La purificación mediante cromatografía líquida de alta presión utilizando una columna de fase inversa C18 y un gradiente de agua desionizada y acetonitrilo produjo 20 mg (65% de rendimiento) del producto deseado DMIME. Espectro de masa: encontrado 774.5 (M +Na⁺), calculado 774.3 (M + Na⁺); ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.84

20

25

187/100

(3H, s), 1.33 (3H, d, J= 5 Hz), 1.35 (3H, d, J=5 Hz), 1.60 (3H, s), 1.68 (3H₅ s), 2.05 (3H, s)
2.22 (1H, dd, J=3 Hz, 14 Hz, 2.60-2.82 (2H, m), 2.88 (3H, s), 3.08-3.20 (2H₃ m), 3.25 (3H,
s), 3.39 (3H, s), 3.55 (1H, d, J=9 Hz), 3.71 (1H, d, J=12 Hz), 4.02 (3H₅ s), 4.32 (1H, t, J=10
Hz), 4.81 (1H, dd, J=3 Hz, 12 Hz), 5.45 (1H, q, J=7 Hz), 5.67 (1H₃ ddJ=9 Hz, 15 Hz), 6.25
5 (1H, s), 6.47 (1H, dd, J=1 1 Hz₃ 15 Hz), 6.70 (1H₃ d, J=1.5 Hz), 6.75 (1H, d, J=1 1 Hz), 6.86
(1H₃ d₃ J=1.5 Hz).

N²¹-deaceti-N²¹-(4-metiltio-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (S-Metil-DM4,

DM4Me): A una solución de N²¹-deacetil-N²¹-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina
10 (DM4, 12 mg, 0.015 mmol) en dimetilacetamida (0.1 mL) se agregó una solución de
yodometano (2.2 mg, 0.015 mmol) en dimetilacetamida (0.04 mL) bajo una atmósfera de
argón, con agitación magnética. Se agregó después diisopropiletil amina (2.0 mg, 0.015
mmol) y la reacción fue agitada durante 3 horas. El producto deseado se aisló mediante
cromatografía líquida a alta presión de fase inversa utilizando una columna C18 y un
15 gradiente de agua desionizada y acetonitrilo (7 mg, 57 % rendimiento). Espectro de masa:
Encontrado 816.4 (M + Na⁺) Calculado 816.3 (M + Na⁺); ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.798 (3H, s),
1.219 (3H, d, J = 15.6 Hz), 1.294 (6H, d, J = 6.4Hz), 1.331 (3H₅ d, J = 15.6 Hz), 1.470 (2H₅
m), 1.639 (3H₅ s), 1.76 (3H, s), 1.805-1.966 (2H₅ m), 1.826 (1H, dd₅ J = 19.2, 7.2 Hz),
2.179 (1H₅ dd, J = 17.6, 11.2 Hz), 2.595 (2H₅ m), 2.877 (3H, s), 3.035 (1H, d₅ J = 10 Hz)₅
20 3.113 (1H, d, J = 12.4 Hz), 3.234 (3H₅ s), 3.353 (3H, s), 3.500 (1H₅ d, J = 8.8 Hz), 3.634 (1H,
d, J = 12.8 Hz), 3.819 (1H, d, J = 1.6 Hz), 3.983 (3H₅ s), 4.273 (1H₅ 1), 4.787 (1H₅ dd₅ J -
15.2, 8.8 Hz), 5.414 (1H, q, J = 6.8 Hz)₅ 5.682 (1H, dd, J = 24.4, 6 Hz), 6.214 (1H, s), 6.424
(1H, dd, J = 26.4 and 4 Hz), 6.649 (1H, d, J = 1.6 Hz), 6.731 (1H, d, J = 11.2 Hz).

190 789

REIVINDICACIONES

1. Un método para eliminar una población celular heterogénea o mezclada AB, en donde A representa una población celular que expresa de manera selectiva un ligando y B representa una célula que carece del ligando expresado en A, el método que comprende:

a. dirigir un conjugado de agente de enlace celular-fármaco a la población celular seleccionada A, caracterizado porque uno o más fármacos son enlazados de manera covalente al agente de enlace celular vía un enlazador que comprende un enlace disulfuro y el agente de enlace celular enlaza al ligando en la población celular A;

b. internalizar el conjugado de agente de enlace celular-fármaco en las células que comprenden la población celular A;

c. separar el fármaco desde el conjugado de manera que el fármaco experimenta una etapa de alquilación antes de eliminar las células en la población celular A; y

d. liberar el fármaco alquilado desde la población celular A a fin de inducir la eliminación de células en la población celular B, eliminando de esta manera la población celular heterogénea.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el enlazador es separado a través de intercambio de disulfuro, en pH ácido, mediante luz o mediante peptidasas.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el fármaco es por lo menos un maitansinoide, taxano o un CCI 065, o un análogo del mismo.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el enlazador tiene un grupo alquilo en un átomo de carbono adyacente al enlace disulfuro dentro del enlazador.

5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el grupo

191 30
100

alquilo está en el lado del fármaco del conjugado.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de alquilación celular resulta en metilación del fármaco libre.

5 7. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el fármaco es por lo menos un maitansinoide.

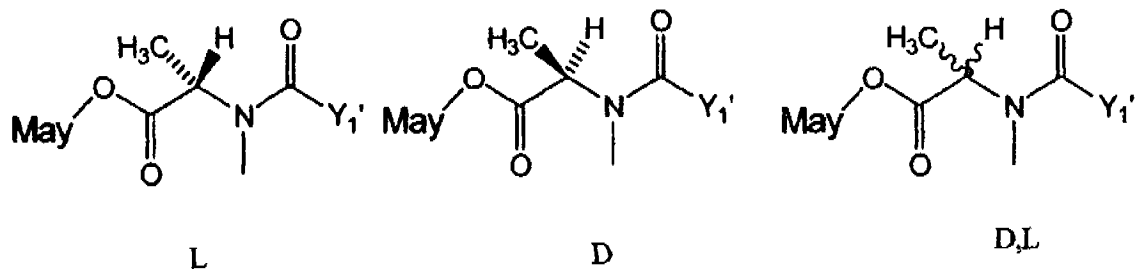
8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el enlazador está en cualquiera de los grupos C-3 hidroxilo, C- 14 hidroximetilo, C- 15 hidroxilo o C-20 desmetilo de dicho por lo menos un maitansinoide.

10 9. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide es un éster of maitansinol que contiene N-metil-alanina.

10. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide es un éster de maitansinol que contiene N-metil-cisteina.

11. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II-L), (II-D) o (II-D,L):

15



20

en donde:

Y₁' representa



en donde:

25

R₁ a R₁₂ son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que

192⁸¹
+91

tienen 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además, R₂ to R₁₂ puede ser H;

5 A, B, y D, cada uno de manera independiente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico;

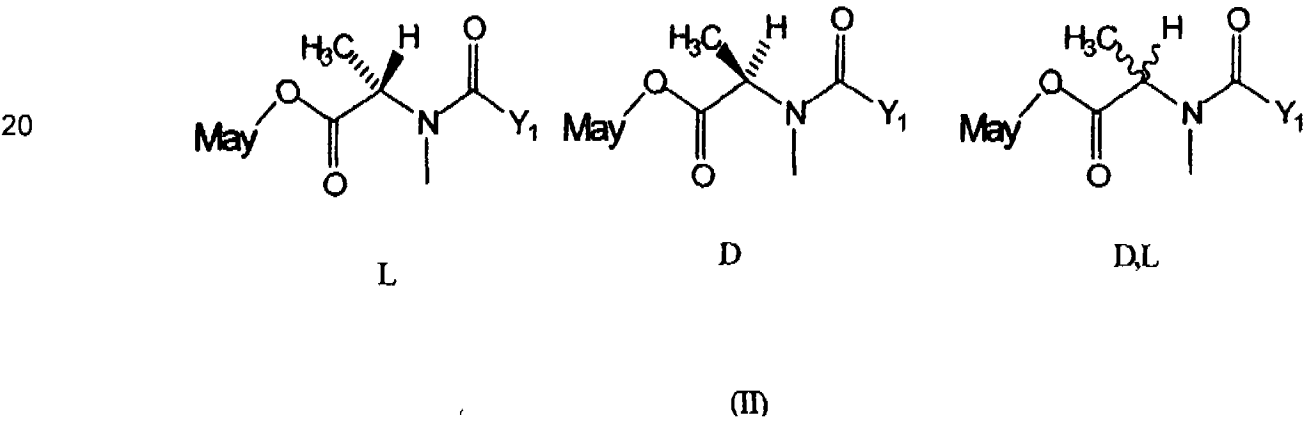
I, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno de manera independiente 0 o un entero de 1 a 5, a condición de que por lo menos dos de I, m, n, o, p, q, r, s, t y u no sean cero; y

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

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque R₁ es metilo y R₂ es H o R₁ y R₂ son metilo.

15 13. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, I y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, I y m son 1, y n es 0.

14. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II-L), (II-D), o (II-D,L):



25 en donde:

Y₁ representa (CR₇R₈)_i(CR₅R₆)_{ra}(CR₃R₄)_nCR₁R₂S₋₅ en donde:

R₁ a R₈ son cada uno de manera independiente, alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además R₂ to R₈ puede ser H;

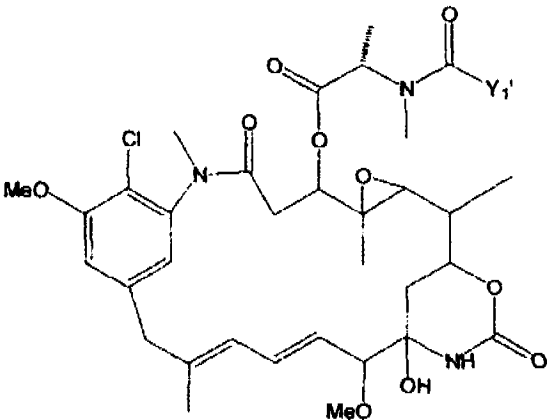
l, m and n son cada uno de manera independiente un entero de 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

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

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque R₁ es metilo y R₂ y H o R₁ y R₂ son metilo.

16. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

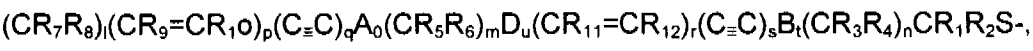
17. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula 41':



en donde:

Y₁' representa

3/3 194



en donde:

R₁ to R₁₂ son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tienen 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además, R₂ to R₁₂ puede ser H;

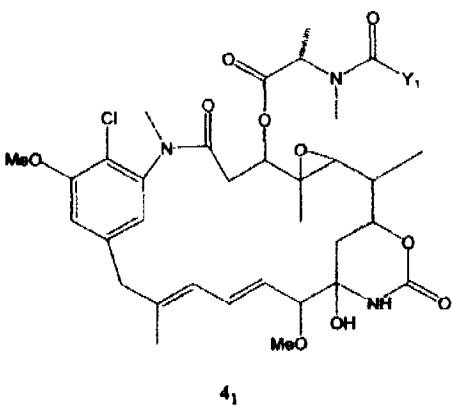
A, B, y D, cada uno de manera independiente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico;

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

18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque R₁ es metilo y R₂ es H o R₁ y R₂ son metilo.

19. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

20. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula 4₁:



4₁

84
194
195

en donde:

Y_1 representa $(CR_7R_8)_i(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S_{-5}$ en donde:

R_1 a R_8 son cada uno de manera independiente, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además R_2 to R_8 puede ser H; y

l , m y n son cada uno de manera independiente un entero de 1 hasta 5, y además n puede ser 0.

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

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

23. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide es DM1.

24. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide es DM3.

25. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide es DM4.

26. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular enlaza a las células tumorales, células infectadas por virus, células infectadas por microorganismo, células infectadas por parásito, células autoinmunes, células activadas, células mieloides, células T activadas, células B o melanocitos, células que expresan los antígenos CD33, CD 19, CanAg, CALLA, o Her-2; o células que expresan receptor del factor de crecimiento de insulina, receptor del factor de

75
45
196

crecimiento epidérmico, o receptor de folato.

5

27. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la población celular B son células tumorales, células infectadas por virus, células infectadas por microorganismo, células infectadas por parásito, células autoinmunes, células activadas, células mieloides, células T activadas, células B, o melanocitos o combinaciones de las mismas.

10

28. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el ligando expresado por la población celular de objetivo A es un antígeno seleccionado para antígenos CD33, CD19, CanAg, CALLA, o Her-2 y en donde la población celular no de objetivo B carece del antígeno de objetivo en la población celular A.

15

29. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se supone que la población celular de objetivo A expresa el receptor del factor de crecimiento de insulina, receptor del factor de crecimiento epidérmico, o receptor de folato y en donde la población celular no de objetivo B carece del receptor de objetivo en la población celular A.

20

30. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular se enlaza a las células seleccionadas a partir del grupo que comprende células de cáncer de seno, células de cáncer de próstata, células de cáncer de ovario, células de cáncer de colorectal, células de cáncer de gástrico, células de cáncer escamosas, células de cáncer de pulmón de célula pequeña, células de cáncer testicular, y células de neuroblastoma que expresan un ligando particular.

25

31. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la población celular B es seleccionada a partir del grupo que comprende células de cáncer de seno, células de cáncer de próstata, células de cáncer de ovario, células de cáncer de colorectal, células de cáncer de gástrico, células de cáncer escamosas, células de cáncer

38
116
198

de pulmón de célula pequeña, células de cáncer testicular, y células de neuroblastoma.

32. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque la célula tumoral es a partir de tumor heterogéneo.

33. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el tumor heterogéneo es un tumor sólido.

34. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento de anticuerpo que enlaza de manera específica a una célula de objetivo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo, un anticuerpo de dominio, un fragmento de anticuerpo de dominio que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo, una linfocina, una hormona, una vitamina, un factor de crecimiento, un factor de estimulación de colonia, o una molécula de transporte de nutriente.

35. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un interferon, IL2, IL3, IL4, IL6, insulina, hormona liberación de tirotropina, hormona de estimulación de melanocito, una hormona esteroide, somatostatina, EGF, TGF- α , FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF, ácido fólico, transferina, estrógeno, análogos de estrógeno, andrógeno, o análogos de andrógeno.

36. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple, o un fragmento de anticuerpo que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

37. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo recubierto, un anticuerpo de cadena simple

37
1987

recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

38. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena simple humanizado, o un fragmento de anticuerpo humanizado que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

39. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

40. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena simple recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

41. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena simple humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

42. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

43. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se enlaza de manera

27
190
199

específica a las células tumorales.

44. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena simple recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto que se enlaza de manera específica a las células tumorales.

45. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena simple humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que se enlaza de manera específica a las células tumorales.

46. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que se enlaza de manera específica a las células tumorales.

47. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se enlaza de manera específica a células de cáncer colorectal o a células de cáncer de seno.

48. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena simple recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto que se enlaza de manera específica a células de cáncer colorectal o a células de cáncer de seno.

49. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena simple humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal

humanizado que se enlaza de manera específica a células de cáncer colorectal o a células de cáncer de seno.

50. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena simple recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto que se enlaza de manera específica a células de cáncer de seno.

51. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena simple humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que se enlaza de manera específica a células de cáncer de seno.

52. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CALLA, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-IGF-IR, o un anticuerpo anti-Her2.

53. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es anticuerpo recubierto My9-6, KS77, o N901.

54. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es el anticuerpo trastuzumab, anticuerpo B4, o anticuerpo huC242.

55. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es el anticuerpo huC242.

56. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de enlace celular es el anticuerpo trastuzumab.

57. Un método para eliminar células en una población celular anormal, el método que comprende:

a) dirigir un conjugado de agente de enlace celular-fármaco a una población celular seleccionada que expresa un ligando reconocido por el agente de enlace celular del conjugado, caracterizado porque uno o más fármacos están enlazados de manera covalente al agente de enlace celular por medio de un enlazador que comprende un enlace disulfuro y el agente de enlace celular enlaza a las células;

b) conversión del pro-fármaco en el conjugado a un fármaco citotóxico que experimenta además una etapa de alquilatación antes de eliminar la población celular seleccionada que se supone que contiene el ligando; y

c) liberar el fármaco citotóxico alquilatado desde la población celular seleccionada para inducir la eliminación de otra población celular seleccionada que supone que carece del ligando, eliminando de esta manera células en la población celular anormal.

58. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el enlazador es separado a través del intercambio de disulfuro, en pH ácido, mediante luz o mediante peptidasas.

59. El método de conformidad con la reivindicación 57 o 58, caracterizado porque el fármaco es por lo menos un maitansinoide, taxano o un CC 1065, o un análogo del mismo.

60. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el enlazador posee un grupo alquilo en un átomo de carbono adyacente al enlace disulfuro dentro del enlazador.

61. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el grupo alquilo está en el lado del fármaco del conjugado.

62. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el fármaco es por lo menos un maitansinoide.

63. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque el

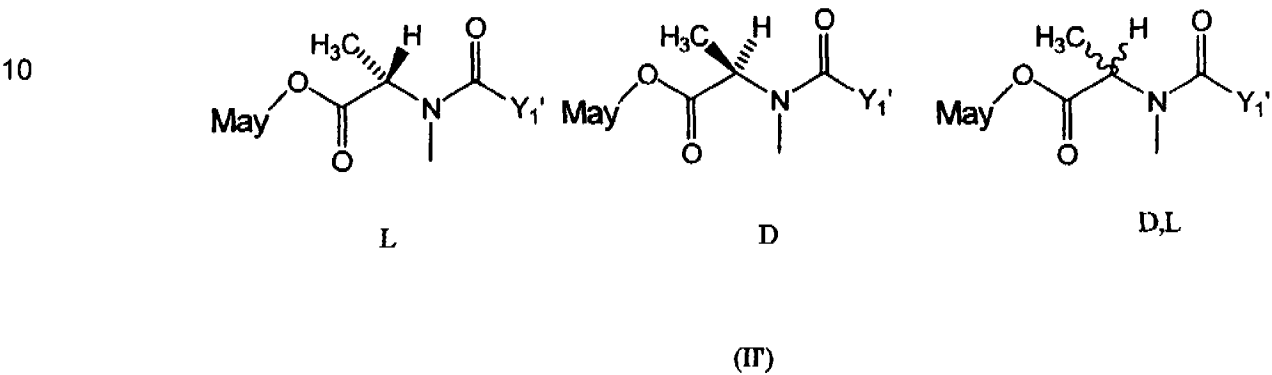
201
202

enlazador está en cualquiera de los grupos C-3 hidroxilo, C- 14 hidroximetilo, C- 15 hidroxilo o C-20 desmetilo de dicho por lo menos un maitansinoide.

64. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide es un éster de maitansinol que contiene N-metil-alanina.

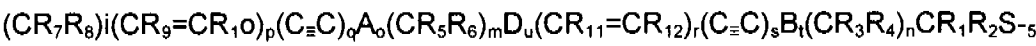
5 65. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide es un éster de maitansinol que contiene N-metil-cisteína.

66. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II-L), (II-D) o (II-D,L):



en donde:

Y₁' representa



en donde:

20 R₁ a R₁₂ son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además, R₂ to R₁₂ puede ser H;

25 A, B, y D, cada uno de manera independiente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, es radical aromático

heterocíclico o heterocíclico:

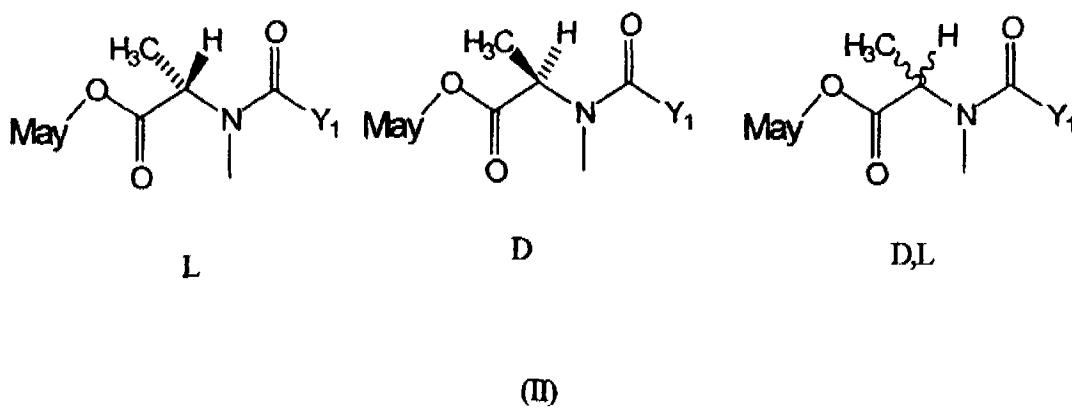
$l, m, n, o, p, q, r, s, t$ y u son cada uno de manera independiente 0 o un entero de 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de $l, m, n, o, p, q, r, s, t$ y u no son cero; y

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

67. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

68. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

69. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula (II-L), (II-D), o (II-D,L):



en donde:

Y_1 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_{H1}(CR_3R_4)_{H1}CR_1R_2S-$, en donde:

R₁ a R₈ son cada uno de manera independiente, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además R₂ a R₈ puede ser H;

72
262
203

93
203
204

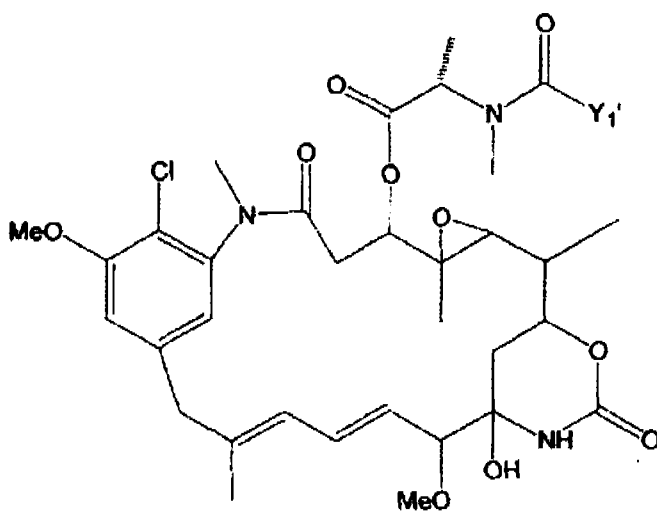
l, m and n son cada uno de manera independiente un entero de 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

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

70. El método de conformidad con la reivindicación 69, caracterizado porque R₁ es metilo y R₂ es H o R₁ y R₂ son metilo.

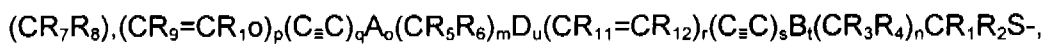
71. El método de conformidad con la reivindicación 69, caracterizado porque R₁ es metilo, R₂ es H, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

72. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula 4₁:



en donde:

Y₁' representa



en donde:

R₁ a R₁₂ son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tiene

204
205

de 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además, R_2 to R_{12} puede ser H;

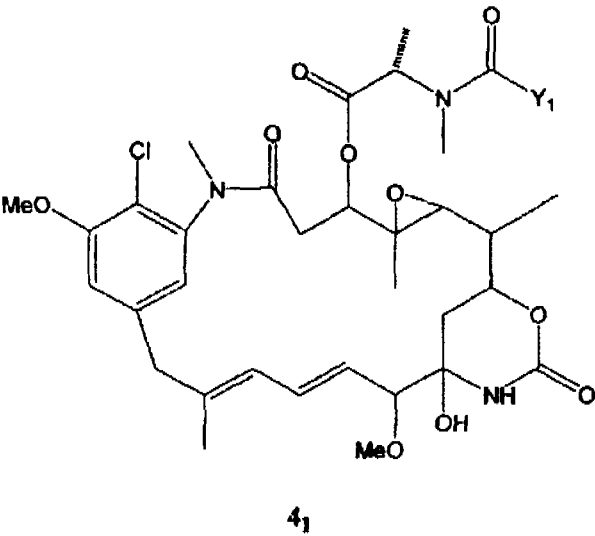
5 A, B, y D, cada uno de manera independiente es alquilo cíclico o alquenilo cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico; y

l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno de manera independiente 0 o un entero de 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s, t y u no son cero.

10 73. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

74. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l and m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

15 75. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide está representado por la fórmula 4₁



25 en donde:

98
205
206

Y_1 representa $(CR_7R_8)_i(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$, en donde:

R_1 a R_8 son cada uno de manera independiente, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y además R_2 to R_8 puede ser H; y

l , m y n son cada uno de manera independiente un entero de 1 hasta 5, y además n puede ser 0.

76. El método de conformidad con la reivindicación 75, caracterizado porque R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

77. El método de conformidad con la reivindicación 75, caracterizado porque R_1 es metilo, R_2 es H, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0; o en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

78. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide es DM1.

79. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide es DM3.

80. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque dicho por lo menos un maitansinoide es DM4.

81. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular se enlaza a células tumorales; células infectadas por virus, células infectadas por microorganismo, células infectadas por parásito, células autoinmunes, células activadas, células mieloides, células T activadas, células B, o melanocitos, células que expresan los antígenos CD33, CD 19, CanAg, CALLA, o Her-2; o células que expresan receptor del factor de crecimiento de insulina, receptor del factor de crecimiento epidérmico, o receptor de folato.

9/6
26/6
20/7

5

82. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular se enlaza a células seleccionadas del grupo que consta de células de cáncer de seno, células de cáncer de próstata, células de cáncer de ovario, células de cáncer de colorectal, células de cáncer de gástrico, células de cáncer escamosas, células de cáncer de pulmón de célula pequeña, células de cáncer testicular, y células de neuroblastoma.

10

83. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento de anticuerpo que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo, un anticuerpo de dominio, un fragmento de anticuerpo de dominio que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo, una linfocina, una hormona, una vitamina, un factor de crecimiento, un factor de estimulación de colonia, o una molécula de transporte de nutriente.

15

20

84. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un interferon, IL2, IL3, IL4, IL6, insulina, hormona de liberación de tirotropina, hormona de estimulación de melanocito, una hormona esteroide, somatostatina, EGF, TGF- α , FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF, ácido fólico, transferina, estrógeno, análogos de estrógeno, andrógeno, o análogos de andrógeno.

25

85. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple, o un fragmento de anticuerpo que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

86. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el

208 98 207

agente de enlace celular es un anticuerpo recubierto, un anticuerpo de cadena simple recubierto, o un fragmento de anticuerpo recubierto que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

5

87. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena simple humanizado, o un fragmento de anticuerpo humanizado que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

10

88. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

15

89. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena simple recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

20

90. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena simple humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

25

91. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que se enlaza de manera específica a una célula de objetivo.

92. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de

209 98 208

cadena simple, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se enlaza de manera específica a las células tumorales.

5

93. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena simple recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto que se enlaza de manera específica a las células tumorales.

10

94. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena simple humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que se enlaza de manera específica a las células tumorales.

15

95. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico, un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio que se enlaza de manera específica a las células tumorales.

20

96. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se enlaza de manera específica a células de cáncer colorectal o a células de cáncer de seno.

97. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena simple recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto que se enlaza de manera específica a células de cáncer colorectal o a células de cáncer de seno.

25

98. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo

210 94 209

monoclonal de cadena simple humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que se enlaza de manera específica a células de cáncer colorectal o a células de cáncer de seno.

5 99. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal recubierto, un anticuerpo monoclonal de cadena simple recubierto, o un fragmento de anticuerpo monoclonal recubierto que se enlaza de manera específica a células de cáncer de seno.

10 100. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal de cadena simple humanizado, o un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que se enlaza de manera específica a células de cáncer de seno.

15 101. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo anti- CanAg, un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CALLA, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-IGF-IR, o un anticuerpo anti-Her2.

102. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es anticuerpo recubierto My9-6, KS77, o N901.

20 103. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es el anticuerpo trastuzumab, anticuerpo B4, o anticuerpo huC242.

104. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es el anticuerpo huC242.

105. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el agente de enlace celular es el anticuerpo trastuzumab.

25 106. Un método para utilizar una población celular de objetivo para inhibir o

7/10
21/2/10

eliminar células no de objetivo en una población celular heterogénea o mezclada, el método que comprende:

5 a) dirigir un conjugado de agente de enlace celular-fármaco a la población celular de objetivo que se supone que contiene un ligando reconocido por el agente de enlace celular del conjugado, caracterizado porque uno o más fármacos son enlazados de manera covalente al agente de enlace celular a través de un enlazador que comprende un enlace disulfuro y el agente de enlace celular se enlaza a las células;

b) convertir el pro-fármaco en el conjugado a un fármaco citotóxico en la población celular de objetivo seleccionada para inhibir o eliminar las células de objetivo; y

10 c) liberar el fármaco citotóxico desde la población celular de objetivo para inhibir o eliminar las células no de objetivo que carecen del ligando en la célula de objetivo,

d) inhibir de esta manera o eliminar la población celular heterogénea o mezclada, de objetivo y no de objetivo.

107. Un método para eliminar células tumorales en un tumor que comprende una población celular heterogénea o mezclada, el método que comprende:

20 a) dirigir de manera selectiva un ligando dispersado, dispersado desde una población seleccionada de células tumorales que se supone que expresan el ligando con un conjugado de agente de enlace celular-fármaco caracterizado porque uno o más fármacos son enlazados de manera covalente al agente de enlace celular por medio de un enlazador que comprende un enlace disulfuro y el agente de enlace celular que se enlaza al ligando dispersado.

b) convertir el pro-fármaco en el conjugado a un fármaco citotóxico que experimenta además una etapa de alquilación antes de eliminar la población celular seleccionada de células tumorales que dispersan el ligando; y

25 c) inducir de manera adicional la eliminación de células tumorales que carecen por

212 101 211

complete del ligando, para eliminar de esta manera las células heterogéneas o mezcladas en el tumor.

108. Un compuesto de la fórmula:



5 caracterizado porque, $n = 0$ o 1 , y May = maitansinoide.

109. Un compuesto de la fórmula:



caracterizado porque, DMIMe: $n=0$; DM4Me: $n=1$

10 110. Un maitansinoide alquilado, caracterizado porque el maitansinoide ha experimentado alquilación en un grupo tiol sin reaccionar.

111. El maitansinoide alquilado de conformidad con la reivindicación 110, caracterizado porque el alquilo es metilo, etilo, propilo o butilo.

112. Lisina-N⁸-SMCC-DMI aislada.

113. Lisina-N⁸-SPDB-DM4 aislada.

15 114. S-cisteinil-DM4 aislado.

115. S-metil-DM4 aislado.

102
213**RESUMEN**

Se describen métodos para eliminar o inhibir tumores que comprenden poblaciones celulares heterogéneas o mezcladas. La eliminación o inhibición de tumores se logra mediante el direccionamiento selectivo de un ligando único que se supone que es expresado en una población celular particular para eliminar también una población celular que carece del ligando único. Estos conjugados tienen uso terapéutico a medida que son suministrados a una población celular específica para eliminar esas células y el fármaco citotóxico es liberado para eliminar las células no de objetivo, eliminando de esta manera el tumor.

213
214

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RUBIO CAMACHO HUMBERTO
Apoderado(a) y/o Representante de
IMMUNOGEN, INC

REFERENCIA	Radicación No.	07 115803
	Solicitud internacional	PCT/US2006/014411
	Fecha inicio fase nacional	15/11/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	815

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 21.11.20
adpall

215
215
2

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by *W. Montgomery*

3. acting in the capacity of *Certifying Officer*

4. bears the seal/stamp of *U. S. Patent and Trademark Office*

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the *twenty-eighth* of February, 2008

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. *08014302-1*

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Fernesia T. Crawford
Fernesia T. Crawford

A 7110659



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office**

February 04, 2008

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
MARCH 14, 2006.**

**By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office**

W. Montgomery
W. MONTGOMERY
Certifying Officer



04-20-2006

Docket No. A8861
A8861MODIFIED Form PTO-1595
(Rev. 10/02)103223284
ENTRIES ONLY

COVER SHEET

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
U.S. Patent and Trademark Office

To the Director of the U.S. Patent and Trademark Office: Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

Viktor S. GOLDBAKHER
Robert J. LUTZ
Ravi V.J. CHARI
Yelena V. KOVTUN
John M. LAMBERT
Rita STEEVES
Hans K. ERICKSON

2. Name and address of receiving party(ies):

IMMUNOGEN INC.
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139-4239Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

- ☒
- Assignment
- ☐
- Merger
-
- ☐
- Security Agreement
- ☐
- Change of Name
-
- ☐
- Other

Execution Date: April 14, 2006

Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is: April 15, 2006

A. Patent Application No.(s)

B. Patent No.(s)

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

SUGHRUE MION, PLLC

WASHINGTON OFFICE

23373

CUSTOMER NUMBER

6. Total number of applications and patents involved:

1

7. Total fee (37 CFR 3.41): \$40.00

- ☐
- Enclosed.
-
- ☒
- Authorized to be charged to Deposit Account No. 19-4880.

The USPTO is directed and authorized to charge all required fees, except for the Issue Fee and the Publication Fee, to Deposit Account No. 19-4880. Please also credit any overpayments to said Deposit Account.

8. Deposit Account Number:

19-4880

(Attach duplicate copy of this page if paying by deposit account)

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Susan J. Mack

Reg. No. 30,951

April 14, 2006

Date

Total number of pages including cover sheet, attachments, and documents: 2

Mail documents to be recorded with required cover sheet information to:

MAIL STOP ASSIGNMENT RECORDATION SERVICES

Director of the U.S. Patent and Trademark Office

P.O. Box 1450

Alexandria, VA 22313-1450

PATENT

REEL: 017792 FRAME: 0373

278
218

Docket No. A8861
For U.S. Clients

Assignment

Whereas, We, Viktor S. GOLDBAKHER, Robert J. LUTZ, Ravi V.J. CHARI, Yelena V. KOVTUN, John M. LAMBERT, Rita STEEVES, and Hans K. ERICKSON of Newton, MA, Wayland, MA, Newton, MA, Maynard, MA, Cambridge, MA, Stoneham, MA, Cambridge, MA, respectively, hereinafter called assignors, have invented certain improvements in ELIMINATION OF HETEROGENEOUS OR MIXED CELL POPULATION IN TUMORS and executed an application for Letters Patent of the United States of America therefor on _____; and

Whereas, IMMUNOGEN INC., 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139-4239 (assignee), desires to acquire the entire right, title, and interest in the application and invention, and to any United States patents to be obtained therefor;

Now therefore, for valuable consideration, receipt whereof is hereby acknowledged,

We, the above named assignors, hereby sell, assign and transfer to the above named assignee, its successors and assigns, the entire right, title and interest in the application and the invention disclosed therein for the United States of America and all countries foreign thereto, including rights of priority under the International Convention of Paris (1883) as amended, and we request the Director of the U.S. Patent and Trademark Office to issue any Letters Patent granted upon the invention set forth in the application to the assignee, its successors and assigns; and we hereby agree that the assignee may apply for foreign Letters Patent on the invention and we will execute without further consideration all papers deemed necessary by the assignee in connection with the United States and foreign applications when called upon to do so by the assignee.

We hereby authorize and request our attorneys SUGHRUE MION, PLLC of 2100 Pennsylvania Avenue, NW, Washington, DC 20037-3213 to insert here in parentheses (Application number _____ and Confirmation number _____, filed April 14, 2006) the application number and filing date of said application when known.

Date: 4/14/06 Viktor S. GOLDBAKHER
s/Viktor S. GOLDBAKHER
Date: 14 April 2006 Robert J. LUTZ
s/Robert J. LUTZ
Date: 14 April 2006 Ravi V.J. CHARI
s/Ravi V.J. CHARI
Date: 4/14/2006 Yelena V. KOVTUN
s/Yelena V. KOVTUN
Date: 14 APRIL 2006 John M. LAMBERT
s/John M. LAMBERT
Date: 14 April 2006 Rita STEEVES
s/Rita STEEVES
Date: 14 April 2006 Hans K. ERICKSON
s/Hans K. ERICKSON

(Legalization not required for recording but is prima facie evidence of execution under 35 U.S.C. §261)

RECORDED: 04/14/2006

PATENT
REEL: 017792 FRAME: 0374