

Clarke, Mod...

COLOM

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-019768-00004-0000

Fecha: 2009-12-22 15:51:29 Dep: 2020 DIR NULVASOR
Tra: 11 PATENTE/II Lvs: 378 FASENACIONAL
Act: 329 CTOINFORMACION Folios: 52

P-1099

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Ref.: Expediente No. 08.019.768

Solicitud de Patente a nombre de **IMMUNOGEN, INC.**

Yo, DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53 Piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **IMMUNOGEN, INC.**, domiciliada en Cambridge, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, me permito informar lo siguiente:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nueva descripción y nuevo capítulo reivindicatorio que ahora consta de 36 cláusulas y en las cuales se realizaron las siguientes modificaciones:

1.1 En la descripción

Se enmendó la descripción con el fin de enunciar la divulgación de los párrafos 0008 y 0060 a 0062 de la descripción de la Solicitud de Patente Estadounidense No. 11/352.121 publicada el 17 de agosto de 2006 como la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2006/0182750 A1, las cuales fueron incorporadas de manera total como referencia en la presente solicitud, como se estableció en el folio 103 y 126 de la solicitud en español de la descripción originalmente presentada.

En este sentido, específicamente se ha modificado el párrafo 0010 y se han insertado los nuevos párrafos 0018 y 0019 entre los párrafos originales 0017 y 0018. En consecuencia, se renumeraron de conformidad los párrafos restantes.

Adicionalmente, los nuevos párrafos 0041 y 0049 de la solicitud originalmente presentada se modificaron con el fin de corregir errores tipográficos en la fórmula química y en el texto. En cuanto a la corrección de la fórmula química expuesta en los párrafos 0041 y 0049, el solicitante respetuosamente dirige la atención del señor examinador a la publicación de la solicitud de

patente U.S. 2004/0235840 A1, la cual revela la fórmula 4' en los párrafos 0027-0029 y en los párrafos 0273 a 0275 que corresponde a la fórmula III de la solicitud en estudio.

La publicación de la solicitud de patente U.S. 2004/0235840 también revela la fórmula 4'₂ en los párrafos 0119-0121 y en los párrafos 0309-0311, que corresponde a la fórmula VII de la presente invención. Adicionalmente, los párrafos 0029 y 0275 de la publicación de la solicitud de patente U.S. 2004/0235840 define a Y' de la fórmula 4' para tener dos enlaces triples de carbono. De manera similar, los párrafos 0121 y 0311 de la publicación de la solicitud de patente U.S. 2004/0235840 define a Y'₂ de la fórmula 4'₂ para tener dos enlaces triples de carbono.

En este orden de ideas, el inventor respetuosamente manifiesta que las definiciones de Y' y Y'₂ expuestas en la publicación de la solicitud de patente U.S. 2004/0235840 comprenden errores tipográficos inadvertidos, que revelan un átomo de carbono trivalente. No obstante, una persona versada en la materia apreciaría que el carbono es un átomo tetravalente y por lo tanto, dicha persona reconocería que tal átomo de carbono trivalente no existe. Más aún, estos errores tipográficos fueron subsiguientemente corregidos durante la prosecución de la publicación de la solicitud de patente U.S. 2004/0235840, en donde el sustento para las mismas modificaciones se encuentra en la figura 2 de dicha publicación.

Los errores tipográficos en la publicación de la solicitud de patente U.S. 2004/0235840 serían obvios para una persona versada en la materia de modo que las modificaciones para Y' y Y'₂ expuestas en el presente escrito representan la recitación de la materia objeto que fue previamente incorporada como referencia en la presente solicitud.

Adicionalmente, el señor examinador puede observar que se introdujeron los números de párrafo entre corchetes como aparece en el texto original en inglés, esto con el fin de poder ubicar más fácilmente las modificaciones anteriormente expuestas. El sustento para estas modificaciones se encuentra en los documentos de prioridad estadounidenses 60/710,853 y 60/797,713 del 24 de agosto de 2005 y 4 de mayo de 2006, respectivamente.

1.2 En el capítulo reivindicatorio

1.2.1 Se especificó en el literal c) de la reivindicación 1 que el fármaco es un agente citotóxico y además se definió que el pH de la solución es menor que 6.0 o el pH es mayor que 6.5 de acuerdo con lo revelado en la antigua reivindicación 5 y esta reivindicación junto con las antiguas cláusulas 7 y 8 se modificaron de tal manera que queden consistentes con lo manifestado ahora en la nueva reivindicación 1. El sustento para este cambio se encuentra en el párrafo 0014 de la descripción.

1.2.2 En las antiguas reivindicaciones 5 y 6 se canceló el término "resina".

1.2.3 Se cancelaron las antiguas reivindicaciones 9 a 20, 23 a 27, 33 y 40 a 41.

1.2.4 Las antiguas reivindicaciones 21 y 22 se renumeraron como las nuevas reivindicaciones 9 y 10.

1.2.5 Se introdujeron las nuevas reivindicaciones 11 a 25. El sustento para estas reivindicaciones se encuentra en el párrafo 0015. El soporte para la nueva reivindicación 17 se encuentra en el párrafo 0012. Las nuevas reivindicaciones 18 a 20 se encuentran sustentadas por lo divulgado en el párrafo 0014. Las reivindicaciones 21 y 22 tienen sustento en el párrafo 0016.

Las nuevas reivindicaciones 11 a 14 y 23 a 25 se encuentran sustentadas por el lenguaje de la Solicitud de Patente Estadounidense No. 11/352,121 la cual se encuentra debidamente referenciada en la descripción

1.2.6 Las antiguas cláusulas 28 a 32 y 34 a 39 se renumeraron como las nuevas reivindicaciones 26 a 36 y se modificó su dependencia.

1.2.7 Se especificó en la antigua reivindicación 35 (nueva cláusula 32) que el fármaco es un agente citotóxico, al igual que se nombró en la nueva reivindicación 1. El sustento para esta modificación se encuentra en el párrafo 0033 y en la cláusula original 14.

En cuanto a estas modificaciones, atentamente nos permitimos manifestar que las mismas no amplían de ninguna manera la materia originalmente presentada en la solicitud en estudio y se proporcionan en aras de especificar el alcance de la presente invención.

Atentamente acompañamos el recibo de caja No.09-90,923 del 2 de diciembre de 2009, con el cual queda cubierta la tasa por la modificación de la solicitud y formulario de modificaciones debidamente diligenciado.

Señor Superintendente,



DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

CC. 41.654.882

TP 20824 CSJ

NEA

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

SOLICITUD DE:

1

☐

Corrección de error material

☒

Modificación a una solicitud.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: INMUNOGEN, INC.
Dirección: 128 Sidney Street, Cambridge, MA
02139 Estados Unidos de América
Nacionalidad o domicilio: Cambridge, MA,
Estados Unidos de América
Lugar de Constitución: Massachussets, Estados
Unidos de América

Teléfono:
E-mail

Fax:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN
Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6
Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824
E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4 Número del expediente: 08.019.768

5 Descripción de la corrección o modificación solicitada: Que se anote: Se enmendó la descripción con el fin de enunciar la divulgación de los párrafos 0008 y 0060 a 0062 de la descripción de la Solicitud de Patente Estadounidense No. 11/352.121 publicada el 17 de agosto de 2006 como de la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2006/0182750 A1, las cuales fueron incorporadas de manera total como referencia en la presente solicitud. Adicionalmente, se modificó el capítulo reivindicatorio para especificar que el fármaco es un agente citotóxico. También, se cancelaron las antiguas reivindicaciones 9 a 20, 23 a 27, 33 y 40 a 41.

Comprobante de pago No. 09-90.923

7 Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa

☐

Podere si fuese el caso

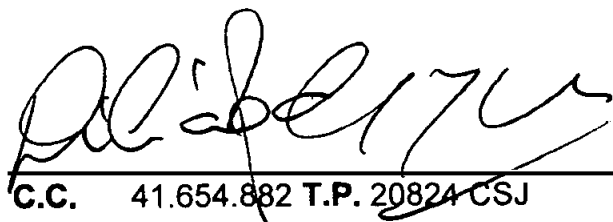
☐

Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

8

NOMBRE : DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:


C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ

702

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 899173339-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 90,923
FECHA : DICIEMBRE 2 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-019768- -00004-0000

Fecha: 2009-12-22 15:51:29 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTE/II Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act: 329 CTOINFORMACION Folios: 82

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CG. COLOMB	RECIBO DE CAJA			90739	02/12/2009	44,255,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	111,000.00
		TOTAL :	111,000.00

SON: CIENTO ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

5
P-1099

**PROCESO PARA PREPARAR CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y
MAYTANSINOIDE**

CAMPO DE LA INVENCION

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0002] El tratamiento de cáncer ha progresado significativamente con el desarrollo de productos farmacéuticos que llegan más eficientemente a y matan a células cancerosas. Para este fin los investigadores han
15 tomado ventaja de receptores de superficie celular y antígenos expresados selectivamente por células de cáncer para desarrollar fármacos basados en anticuerpos que enlazan a antígenos específicos de tumor o asociados a tumor. A este respecto, moléculas citotóxicas tales como
20 bacterias y toxinas vegetales, radionucleótidos, y ciertos fármacos quimioterapéuticos han sido ligados químicamente a anticuerpos monoclonales que enlazan a antígenos de superficie celular asociados a tumor o específicos de tumor (ver, por ejemplo, las Solicitudes de Patentes
25 Internacionales WO 00/02587, WO 02/060955, y WO 02/092127, Patentes U. S. Nos. 5,475,092, 6,340,701, y 6,171,586, Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2003/0004210 A1, y Ghetie y colaboradores, J. Immunol. Methods, 112:267-

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

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

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

205

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

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

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

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

8

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

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

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

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

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

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

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

primera mezcla a filtración de flujo tangencial, cromatografía de adsorción, filtración de adsorción, precipitación selectiva, o combinaciones de los mismos, para purificar los agentes de enlace celular que tengan

5 ligantes enlazados a los mismos desde otros componentes de la primera mezcla y así preparar una primera mezcla purificada de agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos, (c)conjuguar un fármaco a los

10 agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos en la primera mezcla purificada haciendo reaccionar los agentes de enlace celular que tengan

15 ligantes enlazados a los mismos con el fármaco en una solución que tenga un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para preparar una segunda mezcla que comprenda (i) agente de enlace celular químicamente

20 acoplado a través del ligante al fármaco, (ii) fármaco libre, y (iii) sub-productos de reacción, y (d) someter la segunda mezcla a filtración de flujo tangencial, cromatografía de adsorción, filtración de adsorción,

25 precipitación selectiva, o combinación de los mismos, para remover los fármacos, reactantes y sub-productos no conjugados, así como también para obtener conjugados de fármaco - agente de enlace celular sustancialmente purificados. **Opcionalmente, el proceso de la invención comprende además detener la mezcla entre al menos uno de los pasos a-b, pasos b-c y/o los pasos c-d con el fin de liberar los ligantes enlazados inestablemente del agente de enlace celular.**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0015]Opcionalmente, la purificación del agente de enlace celular modificado puede ser omitida. En una situación tal, el fármaco puede ser añadido simultáneamente con el reactivo reticulador o al mismo tiempo, por ejemplo
15 1, 2, 3, o más horas después de adición del reactivo reticulador al agente de enlace celular.

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

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

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

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

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

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

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

10 [0019] En una modalidad, la duración del paso de detención puede ser sustancialmente reducida mediante la adición de nucleófilos. Los nucleófilos pueden ser agregados durante el paso de conjugación y el paso de detención puede ser realizado de manera simultánea con la
15 conjugación. En el contexto de la invención, los nucleófilos son partes químicas que pueden reaccionar con grupos éster e imidazolamidas sobre los agentes de enlace celular en soluciones acuosas. Son conocidos en el arte adecuados nucleófilos e incluyen, por ejemplo, aminas
20 primarias, es decir, RNH_2 , donde R es un grupo alquilo o aromático; o aminas secundarias, es decir, $RR'NH$, donde R y R' son grupos alquilo o aromático. También las aminas pueden ser aminoácidos, péptidos que contienen aminoácidos de lisina, péptidos que contienen grupos alfa-amino o
25 grupos amino secundarios no naturales, o aminas solubles en agua. Los nucleófilos pueden estar en solución, in un estado polimérico, o en una forma inmovilizada como un reactivo en fase sólida. Ejemplos de nucleófilos

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

20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

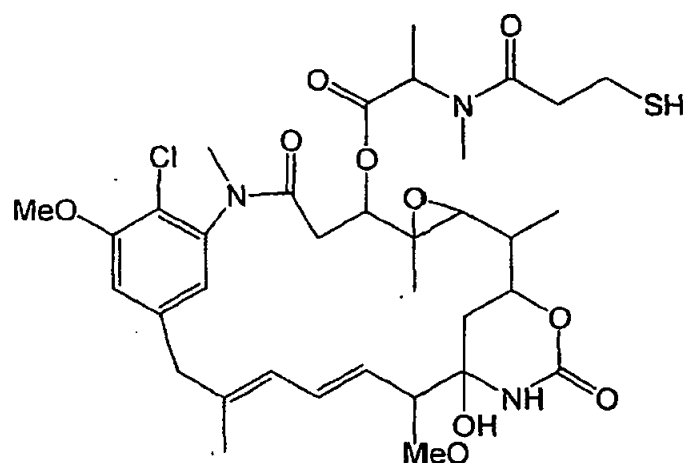
15 [0036] Ejemplos de análogos de maytansinoides que tengan un anillo aromático modificado incluyen: (1) descloro de 19 átomos de carbono (Patente U.S. No. 4,256,746) (preparado por reducción por LAH de ansamitosina P2), (C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/- C-19-
20 descloro (Patentes U.S. Nos. 4,361,650 y 4,307, Streptomyces o Actinomyces 016) (preparado por desmetilación usando o descloración usando LAH), y (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/- descloro (Patente U.S. No. 4,294,757) (preparado por acilación usando
25 cloruros de acilo).

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

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

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

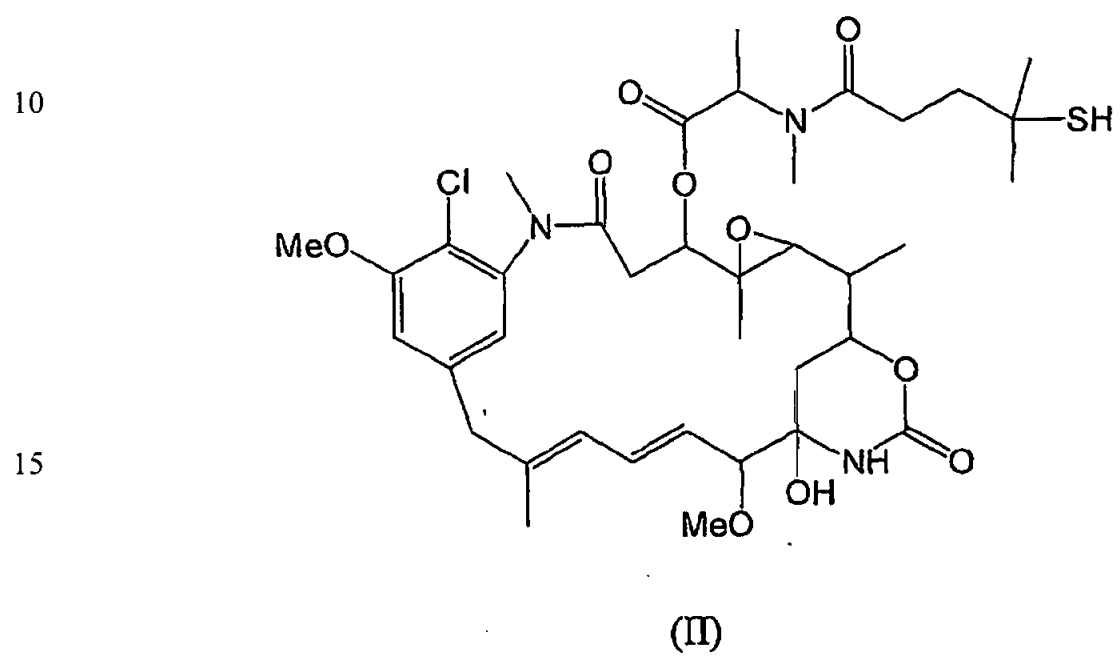
20



25

(I)

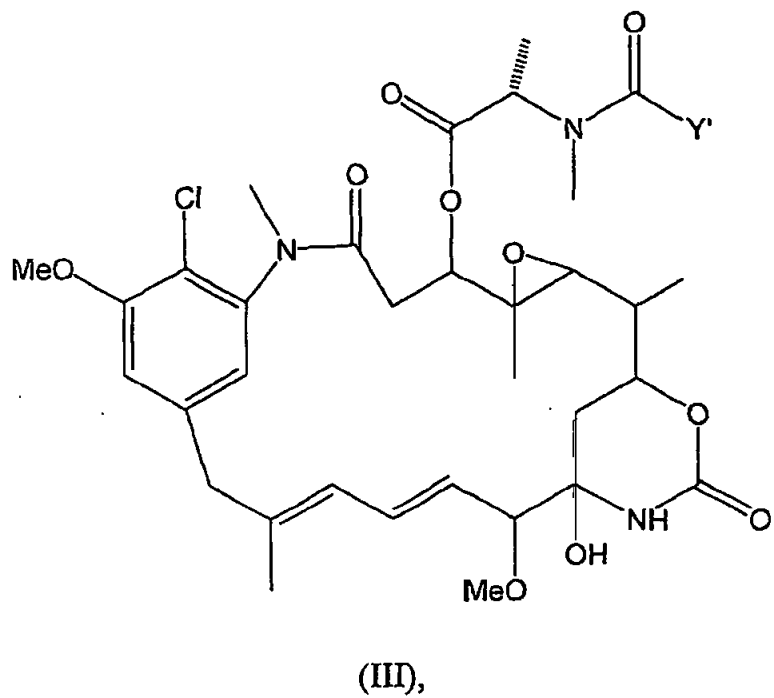
[0039] En otra modalidad preferida de la invención, el conjugado utiliza el maytansinoide DM4 que contenga tiol, también conocido como N^{2'}-desacetil-N^{2'}-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maytansina, como el agente citotóxico. La estructura de DM4 está representada por la Fórmula (II):



[0040] Pueden usarse otras maytansinas en el contexto de la invención, incluyendo, por ejemplo, maytansinoides que contengan tiol y disulfuro que posean una sustitución mono- o di- alquilo sobre el átomo de carbono que posea el átomo de azufre. Se prefiere de manera particular el maytansinoide que tenga en la posición C-3 (a) la funcionalidad C-14-hidroximetilo, C-15-hidroxi, o C-20 desmetilo, y (b) una cadena lateral aminoácido acilado con un grupo acilo que posea un grupo sulfhidrilo interrumpido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que posea la

funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes que sean CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde adicionalmente uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una extensión de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

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



en donde Y' representa

$(CR_7R_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5R_6)_m \bar{D}_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3R_4)_n - CR_1R_2SZ$, en donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que

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

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

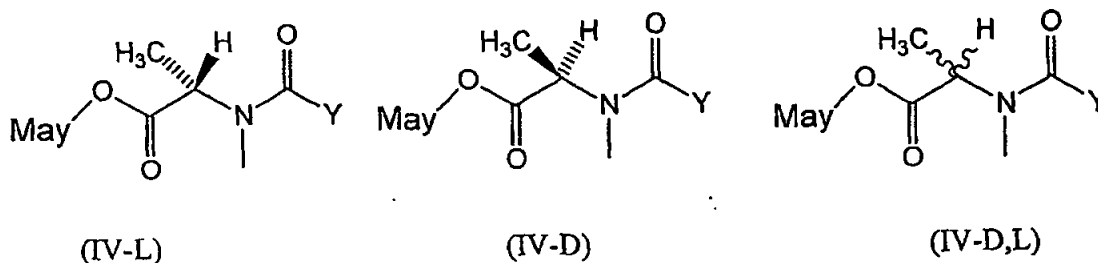
10 en donde $R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}$, y R_{12} son
cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o
alqueno lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono,
alquilo o alqueno cíclico o ramificado que tenga desde 3
a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o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

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

25 [0042] Modalidades preferidas de la Fórmula (III)
incluyen compuestos de Fórmula (III) en donde (a) R_1 es H,
 R_2 es metilo y Z es H, (b) R_1 y R_2 son metilo y Z es H, (c)

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

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



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

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

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

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

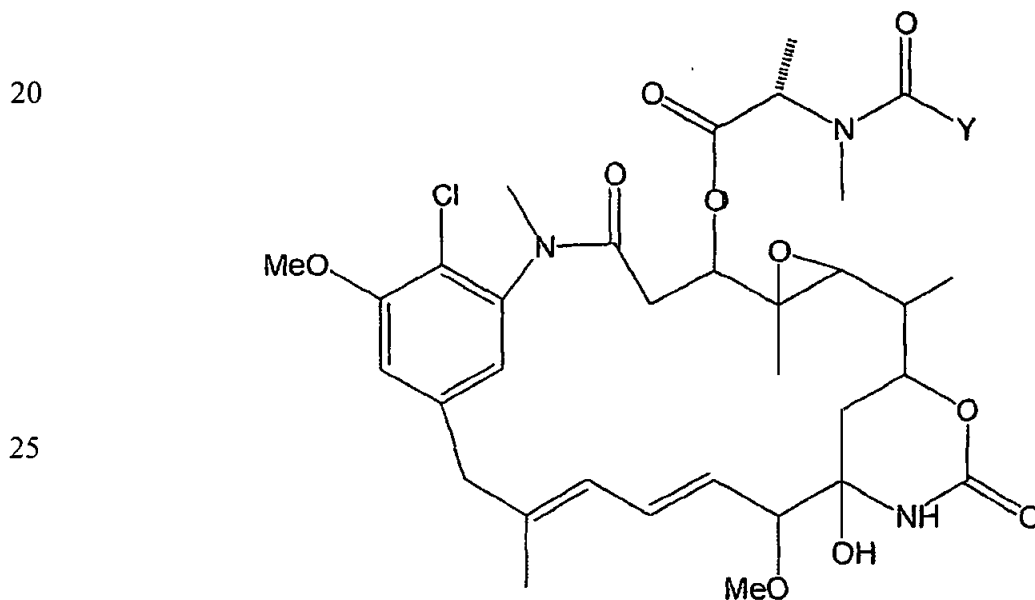
en donde Z es H, SR, o COR en donde R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical

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

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

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

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



(V)

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

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

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

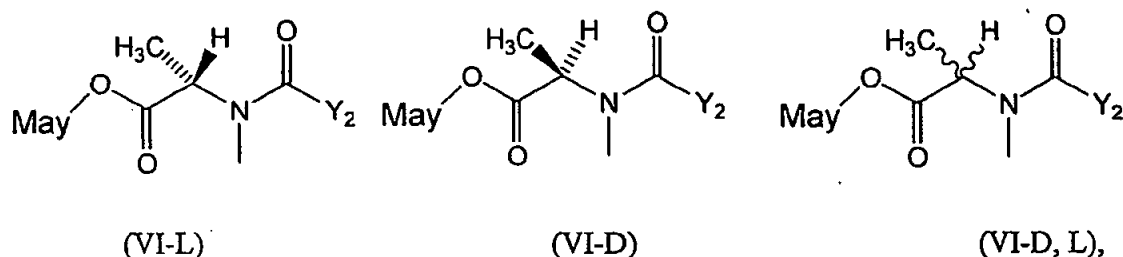
en donde l, m, y n son cada uno independientemente un entero desde 1 a 5, y además n puede ser cero,

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

[0047] Modalidades preferidas de la Fórmula (V) incluyen compuestos de Fórmula (V) en donde (a) R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H, (b) R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H, (c) R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es $-SCH_3$, o (d) R_1 y R_2 son metilo, R_5 ,

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

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



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

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

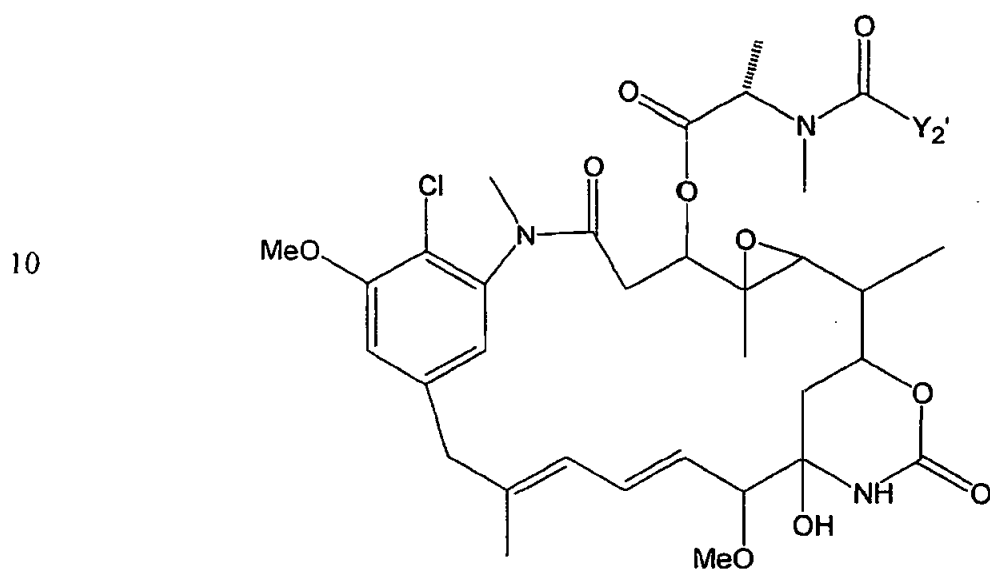
en donde R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico o ramificado que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático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

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

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

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

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



(VII),

en donde Y2' representa

$(\text{CR}_7\text{R}_8)_1 (\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p (\text{C}\equiv\text{C})_q \text{A}_o (\text{CR}_5\text{R}_6)_m \text{D}_u (\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r (\text{C}\equiv\text{C})_s \text{B}_t (\text{CR}_3$
 $\text{R}_4)_n - \text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$, en donde R_1 y R_2 son cada uno
 independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que
 20 tengan desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno
 cíclico que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo,
 fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o
 heterocicloalquilo, y en donde R_2 también puede ser H,

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

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

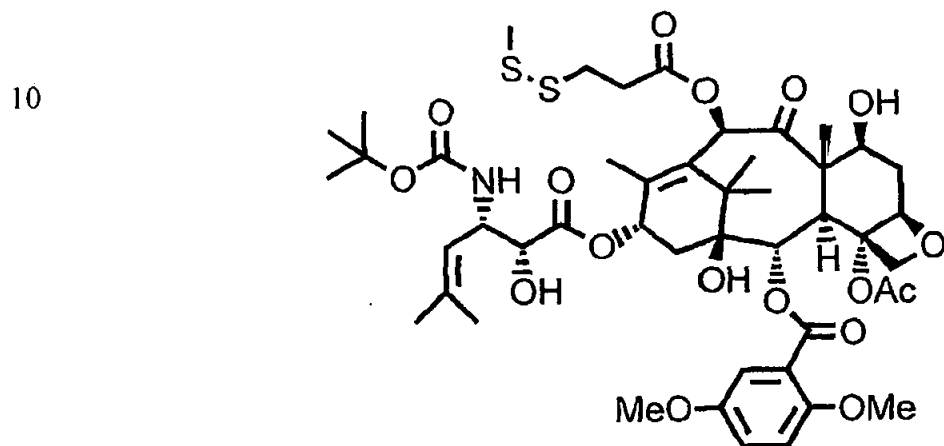
en donde l, m, n, o, p, q, r, s , y t son cada uno independientemente cero o un entero desde 1 a 5, a condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s , y t no sean cero a la vez, y en donde Z_2 es H, SR o $-COR$, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

ligante. Grupos ligantes adecuados son bien conocidos en el arte e incluyen grupos disulfuro, grupos ácidos lábiles, grupos fotolábiles, grupos peptidasa lábiles, y grupos estearasa lábiles. Grupos ligantes preferidos son los grupos disulfuro. Por ejemplo, los conjugados pueden ser 5 construidos usando una reacción de intercambio de disulfuro entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco. Las moléculas de fármaco también pueden ser enlazadas a un agente de enlace celular a través de una molécula portadora 10 intermediaria tal como albúmina de suero.

[0060] De conformidad con la invención, el agente de enlace celular es modificado haciendo reaccionar un reactivo reticulador bifuncional con el agente de enlace celular, dando así como resultado la fijación covalente de 15 una molécula ligante al agente de enlace celular. Como se usa en la presente, un reactivo reticulador bifuncional" es cualquier porción química que enlaza covalentemente a un agente de enlace celular a un fármaco, tal como los fármacos descritos en la presente. En una modalidad 20 preferida de la invención, una porción de la porción ligante es proporcionada por el fármaco. A este respecto, el fármaco comprende una porción ligante que es parte de una molécula enlazadora más grande que es usada para juntar al agente de enlace celular al fármaco. Por ejemplo, para 25 formar el maytansinoide DM1, la cadena lateral en el grupo hidroxilo en C-3 de la maytansina es modificada para tener un grupo sulfhidrilo (SH) libre. Esta forma tiolada de maytansina puede reaccionar con un agente de enlace celular.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



(IX)

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

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

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

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

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

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

EJEMPLO 1

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

10 [0071] El anticuerpo monoclonal huN901 (concentración final de 8 mg/ml) fue incubado con 4- (2- piridilditio) pentanoato) de N- succinimidilo (SPP, exceso molar de 5.6 veces) por aproximadamente 180 minutos a 20 °C en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 7.5) que contenga 50 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, y etanol al 5 %. En un primer grupo, la mezcla de reacción se purificó usando una columna
15 de resina Sephadex™ G25F equilibrada y eluida en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5) que contenga 50 mM de NaCl y 2 mM de EDTA. En un segundo grupo, la mezcla de reacción fue purificada usando un sistema Pellicon XL TFF (Millipore, Billerica, MA), y el anticuerpo fue
20 diafiltrado (5 volúmenes) en 50 mM de fosfato de potasio, 50 mM de NaCl (pH de 6.5), y 2 mM de EDTA usando una membrana de corte de peso molecular de 10,000 (membrana de celulosa regenerada Ultracel™, Millipore, Billerica, MA). Ambas muestras fueron conjugadas con DM1 (exceso molar de
25 1.7 veces sobre el enlazador sin enlazar) por 18 horas a pH de 6.5 en regulador de fosfato de potasio que contenía 50 mM de NaCl y una concentración final de DMA al 3 %.

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

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

Tabla 1. Métodos de Purificación para huN901
Modificado Usando G-25F versus TFF

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

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

EJEMPLO 2

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

10 [0076] El anticuerpo huB4 fue modificado con 4- (2-piridilditio) butanoato de N- succinimidilo (SPDB, exceso molar de 5.4 veces) por 120 minutos a temperatura ambiente en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH. De 6.5) que contenía 50 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, y etanol al 5 %.

15 En un primer grupo, la mezcla de reacción fue purificada usando la resina Sephadex™ G25F como se describió en el Ejemplo 1. En un segundo grupo, la mezcla de reacción fue cargada sobre una columna de cerámica hidroxiapatita (CHT), Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), la cual fue

20 equilibrada en 12.5 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5) y se eluyó con 80 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5).

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

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

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

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

25

EJEMPLO 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

10

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

15

20

EJEMPLO 4

25

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

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

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

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

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

258

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

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

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

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

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

Tabla 4 (Continuación)

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

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

61

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

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

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

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

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

EJEMPLO 5

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

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

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

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

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

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

	A	B	C	D	E	F	G	H
	4.6	4.7	3.8	3.6	97.5	2.2	0.4	74
	5.1	4.4	4.7	3.6	97.6	1.9	0.6	75
20	5.6	5.0	4.9	3.6	97.7	1.5	0.8	85
	5.9	5.5	5.3	3.7	96.4	2.3	1.4	76
	6.5	6.6	6.4	3.7	95.1	2.8	1.9	71

A = pH del regulador

25 B = Exceso molar de SPP

C = L/A, proporción de ligante/anticuerpo

D = D/A, proporción de fármaco/anticuerpo

E = Monómero (%)

F = Especies de peso molecular alto (%)

G = Especies de bajo peso molecular (%)

H = Rendimiento de la etapa de conjugación (%)

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

EJEMPLO 6

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

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

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

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

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

264

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

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

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

L/A, proporción de ligante/anticuerpo

D/A, proporción de fármaco/anticuerpo

20 **[0106]** Como se demostró por los resultados expuestos en la Tabla 7, la etapa para purificar el anticuerpo modificado puede ser eliminada en el contexto de la invención.

25 EJEMPLO 7

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

67

265

reactivo de modificación bifuncional y luego conjugado con un maytansionide.

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

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

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

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

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

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

68

266

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

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

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

Tabla 8: Comparación de la Etapa de Purificación Conjugación

20

25

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

69

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

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

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

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

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

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

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

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

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

5

REIVINDICACIONES

1.- Un proceso para preparar un conjugado de agente de enlace celular-fármaco caracterizado porque comprende las etapas de:

10

(a) poner en contacto un agente de enlace celular con un reactivo de reticulación bifuncional para fijar covalentemente un ligante al agente de enlace celular y preparar así una primera mezcla que comprenda agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos,

15

(b) someter la primera mezcla a filtración de flujo tangencial, precipitación selectiva, filtración por adsorción, o una resina para cromatografía por adsorción, y preparar así una primera mezcla purificada de agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos,

20

(c) conjugar un agente citotóxico a los agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos en la primera mezcla purificada por reacción de los agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos con un agente citotóxico en una solución que tenga un pH menor que 6.0 o un pH mayor que 6.5 para preparar una segunda mezcla que comprenda

25

(i) agente de enlace celular químicamente acoplado a través del ligante al agente citotóxico,

291

(ii) agente citotóxico libre, y

(iii) sub-productos de reacción, y

(d) someter la segunda mezcla a filtración de flujo tangencial, precipitación selectiva, filtración por adsorción, o cromatografía por adsorción, para purificar los agentes de enlace celular químicamente acoplados a través de ligantes al agente citotóxico desde otros componentes de la segunda mezcla y preparar así una segunda mezcla purificada.

10 2.- El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la resina para cromatografía por adsorción es seleccionada del grupo que consiste de hidroxapatita, cromatografía por inducción de carga hidrofóbica (HCIC), cromatografía por interacción
15 hidrofóbica (HIC), cromatografía por intercambio iónico, cromatografía por intercambio iónico en modalidad de mezcla, cromatografía por afinidad del metal inmovilizado (IMAC), cromatografía de ligando teñido, cromatografía por afinidad, cromatografía en fase inversa, y combinaciones de
20 las mismas.

3.- El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la filtración de flujo tangencial es utilizada en las etapas (b) y (d).

4.- El proceso de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la cromatografía por adsorción es utilizada en las etapas (b) y (d).

5.- El proceso de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la filtración de flujo

74

272

tangencial es utilizada en la etapa (b) y no se utiliza cromatografía por adsorción en la etapa (d).

6.- El proceso de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la cromatografía por adsorción es utilizada en la etapa (b) y la filtración de flujo tangencial es utilizada en la etapa (d).

7.- El proceso de conformidad con las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la solución en la etapa (c) tiene un pH desde aproximadamente 4 hasta menos de 6.0.

8.- El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la solución en la etapa (c) tiene un pH mayor que 6.5.

9.- El proceso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la solución en la etapa (c) comprende sacarosa.

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

11. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque además comprende el paso de detención de la mezcla entre al menos uno de los pasos a-b, pasos b-c ó pasos c-d para liberar los ligantes unidos inestablemente del agente de enlace celular.

78

12. El proceso de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la mezcla se detiene entre los pasos a-b.

5 13. El proceso de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la mezcla se detiene entre los pasos b-c.

10 14. El proceso de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la mezcla se detiene entre los pasos c-d.

15 15. Un proceso para la preparación de un conjugado agente de enlace celular-agente citotóxico caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

(a) poner en contacto un agente de enlace celular con un reactivo de reticulación bifuncional para unir un ligante al agente de enlace celular y de este modo preparar una primera mezcla que comprende agentes de enlace celular que tiene ligantes unidos a los mismos;

20

(b) conjugar un agente citotóxico a los agentes de enlace celular que tienen los ligantes unidos a los mismos en la primera mezcla mediante la reacción del agente de enlace celular que tiene los ligantes unidos a los mismos con un agente citotóxico en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para preparar una segunda mezcla que comprende (i) agente de enlace celular químicamente acoplado a través del ligante al agente

25

citotóxico, (ii) agente citotóxico, y (iii) subproductos de reacción producidos durante el paso (b), y

(c) someter la segunda mezcla a filtración de flujo tangencial, precipitación selectiva, filtración por adsorción, cromatografía por adsorción, o una combinación de las mismas para purificar los agentes de enlace celular químicamente acoplados a través de ligantes al agente citotóxico, de otros componentes de la segunda mezcla y de este modo preparar una segunda mezcla purificada de agentes de enlace celular químicamente acoplados a través de ligantes al agente citotóxico, con la condición de que la primera mezcla no es sometida a filtración de flujo tangencial, precipitación selectiva, filtración por adsorción o cromatografía por adsorción.

15

16. El proceso de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la mezcla no es sometida a purificación.

20

17. El proceso de conformidad con la reivindicación 15 ó 16, caracterizado porque la cromatografía por adsorción se selecciona del grupo que consiste de cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de inducción de carga hidrofóbica (HCIC), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico de modo mezclado, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC), cromatografía de tinción de ligante, cromatografía

25

275

de afinidad, cromatografía de fase reversa y combinaciones de las mismas.

18. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizado porque la solución en el paso (b) tiene un pH de desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6.0.

19. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizado porque la solución en el paso (b) tiene un pH de desde aproximadamente 6.5 hasta 9.

20. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizado porque la solución en el paso (b) tiene un pH menor que 6.0 o un pH mayor que 6.5.

21. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, caracterizado porque la solución en el paso (b) comprende sacarosa.

22. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, caracterizado porque la solución en el paso (b) adicionalmente comprende un agente regulador seleccionado del grupo que consiste de regulador de citrato, un regulador de acetato, un regulador de succinato y un regulador de fosfato.

78

23. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, caracterizado porque además comprende (d) detener la mezcla entre al menos uno de los
5 pasos a-b y pasos b-c para liberar los ligantes unidos inestablemente del agente de enlace celular.

24. El proceso de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la mezcla se
10 detiene entre los pasos a-b.

25. El proceso de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la mezcla se detiene entre los pasos b-c.
15

26.- El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, caracterizado porque el agente de enlace celular es seleccionado del grupo que consiste de anticuerpo, inrterferones, interleuquina 2 (IL-2),
20 interleuquina 3 (IL-3), interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 6 (IL-6), insulina, EGF, TGF- α , FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF, y transferrina.

27.- El proceso de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el agente de enlace celular es un
25 anticuerpo.

28.- El proceso de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5 29.- El proceso de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.

10 30.- El proceso de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste de huN901, HuMy9-6, huB-4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, CNT095, huDS6, y rituximab.

15 31.- El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, caracterizado porque el agente citotóxico es seleccionado del grupo que consiste de maytansinoides, taxanos, y CC1065.

20 32.- El proceso de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el agente citotóxico es un maytansinoide.

25 33.- El proceso de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque el maytansinoide comprende un grupo tiol.

34.- El proceso de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque el maytansinoide es DM1.

5 35.- El proceso de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque el maytansinoide es DM4.

36.- El proceso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, caracterizado porque el agente de enlace celular está químicamente acoplado al agente citotóxico vía enlaces químicos seleccionados del grupo que
10 consiste de enlaces disulfuro, enlaces ácido lábiles, enlaces foto lábiles, enlaces lábiles a la peptidasa, enlaces tioéteres, y enlaces lábiles a la estearasa.

40.- El proceso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 39, caracterizado porque la
15 solución en la etapa (c) comprende sacarosa.

41.- El proceso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 40, caracterizado porque la solución en la etapa (c) comprende adicionalmente un agente
20 regulador seleccionado del grupo que consiste de un regulador de citrato, un regulador de acetato, un regulador de succinato, y un regulador de fosfato.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

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