

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD



P.F.

PATENTE DE INVENCION

08-19768

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

PROCESO PARA PREPARAR CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y MAYTANSINOIDE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K47/48 // A61P37/00

71. SOLICITANTE

IMMUNOGEN INC

DOMICILIO

MA ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO

DILIA MARIA RODRIGUEZ D ALEMAN

22. BOGOTÁ, D. C.,

FEBRERO 26, 2008



PETI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-019768- -00000-0000

Fecha: 2008-02-26 15:49:24

Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 164

FORMULARIO ÚNICO DE S
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad
--	--

☒ Capítulo I.	☐ Capítulo II.
---	---------------------------------------

2) SOLICITANTE (71)	Nombre: IMMUNOGEN, INC. Dirección: 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 Estados Unidos de América Nacionalidad o domicilio: Cambridge, MA, Estados Unidos de América Lugar de constitución: MA, Estados Unidos de América	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____	

3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
---------------------------------	---	--

4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: VER LISTA ADJUNTA Dirección: Nacionalidad o Domicilio:
--------------------------	--

5) PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2006/031653. Fecha: AGOSTO 14, 2006

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

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

7) Clasificación Internacional: A61K 47/48 // A61P31/00

8) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	Estados Unidos	Agosto 24, 2005	60/710,858
SI ☒ NO ☐	Estados Unidos	Mayo 4, 2006	60/797,713

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

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

2

10)

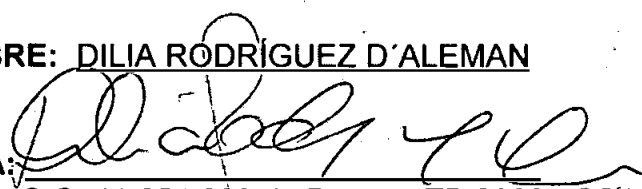
ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
 - 1. Reporte internacional de búsqueda
 - 2. Opinión escrita
 - 3. Request

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA: 

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

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

NOMBRE DE LOS INVENTORES:

1) YONG DAI

NACIONALIDAD:

ESTADOUNIDENSE

DOMICILIO ACTUAL:

15 BEECHWOOD CIRCLE,
NORTHBOROUGH,
MASSACHUSETTS, 01532, E.U.A.

2) YONG WANG

NACIONALIDAD:

ESTADOUNIDENSE

DOMICILIO ACTUAL:

27 PEQUOT ROAD, WAYLAND,
MASSACHUSETTS 01778, E.U.A.

3) SHENGJIN JIN

NACIONALIDAD:

ESTADOUNIDENSE

DOMICILIO:

415 ARLINGTON STREET, ACTON,
MA 01720, E.U.A.

4) DEBORAH H. MESHULAM

NACIONALIDAD:

ESTADOUNIDENSE

DOMICILIO:

32 JAMES STREET #6, BROOKLINE,
MA, 02446, E.U.A.

5) GODFREY W. AMPHLETT

NACIONALIDAD :

ESTADOUNIDENSE

DOMICILIO :

8 1/2 ASH STREET PLACE,
CAMBRIDGE, MA 02138, E.U.A.

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

OFICIAL DE CAJA : 08 - 12,362
: FEBRERO 13 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-019768- -00000-0000

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

***** CONSIGNACION *****

ANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2926011	13/02/2008	42,520,000.00

***** CONCEPTO *****

RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
	TOTAL :	\$ 501,000.00

QUINIENTOS UN MIL PESOS

TABLE : _____

DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P 1099

4

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 March 2007 (01.03.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/024536 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/031653

(22) International Filing Date: 14 August 2006 (14.08.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/710,858 24 August 2005 (24.08.2005) US
60/797,713 4 May 2006 (04.05.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): IM-
MUNOGEN, INC. [US/US]; 128 Sidney Street, Cam-
bridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DAI, Yong [CN/US];
139 Oakdale Road, Newton, MA 02461 (US). WANG,
Yong [CN/US]; 65 East Washington Street, North Attle-
boro, MA 02760 (US). JIN, Shengjin [CN/US]; 415 Ar-
lington Street, Acton, MA 01720 (US). MESHULAM,
Deborah, H. [US/US]; 32 James Street #6, Brookline, MA
02446 (US). AMPHLETT, Godfrey, W. [US/US]; 8 1/2
Ash Street Place, Cambridge, MA 02138 (US).

(74) Agents: DUK, Jennifer, M. et al.; Leydig, Voit & Mayer,
Ltd., Suite 4900, Two Prudential Plaza, 180 North Stetson
Avenue, Chicago, IL 60601-6780 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PROCESS FOR PREPARING PURIFIED DRUG CONJUGATES

(57) Abstract: The invention provides a process for preparing a cell-binding agent chemically coupled to a drug. The process comprises covalently attaching a linker to a cell-binding agent, a purification step, conjugating a drug to the cell-binding agent and a subsequent purification step.

WO 2007/024536 A2

PROCESS FOR PREPARING PURIFIED DRUG CONJUGATES

FIELD OF THE INVENTION

[0001] This invention pertains to a process for preparing conjugates of substantially high purity and stability, wherein the conjugates comprise a cell-binding agent chemically coupled to a drug.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] The treatment of cancer has progressed significantly with the development of pharmaceuticals that more efficiently target and kill cancer cells. To this end, researchers have taken advantage of cell-surface receptors and antigens selectively expressed by cancer cells to develop drugs based on antibodies that bind the tumor-specific or tumor-associated antigens. In this regard, cytotoxic molecules such as bacteria and plant toxins, radionuclides, and certain chemotherapeutic drugs have been chemically linked to monoclonal antibodies that bind tumor-specific or tumor-associated cell surface antigens (see, e.g., International Patent Applications WO 00/02587, WO 02/060955, and WO 02/092127, U.S. Patents 5,475,092, 6,340,701, and 6,171,586, U.S. Patent Application Publication No. 2003/0004210 A1, and Ghetie et al., *J. Immunol. Methods*, 112: 267-277 (1988)). Such compounds are typically referred to as toxin, radionuclide, and drug "conjugates," respectively. Often they also are referred to as immunoconjugates, radioimmunoconjugates, and immunotoxins. Tumor cell killing occurs upon binding of the drug conjugate to a tumor cell and release or/and activation of the cytotoxic activity of the drug. The selectivity afforded by drug conjugates minimizes toxicity to normal cells, thereby enhancing tolerability of the drug in the patient.

[0003] Processes for conjugating antibodies to sulfhydryl-containing cytotoxic agents such as maytansinoids have been described previously (see, e.g., U.S. Patents 5,208,020, 5,416,064, and 6,441,163). For example, U.S. Patents 5,208,020 and 5,416,064 disclose a process for manufacturing antibody-maytansinoid conjugates wherein the antibody is first modified with a heterobifunctional reagent such as described in U.S. Patents 4,149,003, 4,563,304 and U.S. Patent Application Publication No. 2004/0241174 A1. U.S. Patents

5,208,020 and 5,416,064 further describe conjugation of a modified antibody with an excess of a sulfhydryl-containing cytotoxic agent at pH 7, followed by purification on Sephadex™ G25 chromatography columns. Purification of antibody-drug conjugates by size exclusion chromatography (SEC) also has been described (see, e.g., Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93: 8618-8623 (1996), and Chari et al., *Cancer Research*, 52: 127-131 (1992)).

[0004] The processes that have been previously described for manufacture of the antibody-drug conjugates are complex because they are encumbered with steps that are cumbersome to perform or produce immunoconjugates that are less pure or less stable than optimally desired. For example, conjugation at a pH of between 6.0 and 6.5 is not optimal for producing pure and stable conjugates. In addition, the conjugation reactions under these conditions are generally slow and inefficient, leading to a requirement for excessive time and material usage.

[0005] It would be desirable to modify or eliminate one or more manufacturing steps without compromising product quality, such as purity and/or stability. It would be further desirable to have additional purification options than those that have been so far described inasmuch as some options will be more efficacious with certain combinations of cell binding agents, linkers, and drugs, than with others.

[0006] In view of the foregoing, there is a need in the art to develop improved methods of preparing cell-binding agent-drug conjugate compositions that are of substantially high purity and at the same time have greater stability. The invention provides such a method. These and other advantages of the invention, as well as additional inventive features, will be apparent from the description of the invention provided herein.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0007] The invention provides a process for preparing a conjugate of substantially high purity and stability comprising a cell-binding agent chemically coupled to a drug. The process comprises (a) contacting a cell-binding agent with a bifunctional crosslinking reagent to covalently attach a linker to the cell-binding agent and thereby prepare a first mixture comprising cell-binding agents having linkers bound thereto, (b) subjecting the first mixture to tangential flow filtration, adsorptive chromatography, adsorptive filtration, selective precipitation, or combination thereof, and thereby prepare a purified first mixture of cell-binding agents having linkers bound thereto, (c) conjugating a drug to the cell-binding agents having linkers bound thereto in the purified first mixture by reacting the cell-binding agents

having linkers bound thereto with a drug in a solution having a pH of about 4 to about 9 to prepare a second mixture comprising (i) cell-binding agent chemically coupled through the linker to the drug, (ii) free drug, and (iii) reaction by-products, and (d) subjecting the second mixture to tangential flow filtration, adsorptive chromatography, adsorptive filtration, selective precipitation, or combination thereof to purify the cell-binding agents chemically coupled through the linkers to the drug from the other components of the second mixture and thereby prepare a purified second mixture.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0008] The invention provides a process for preparing cell-binding agent-drug conjugates of substantially high purity and stability. Such compositions can be used for treating diseases because of the high purity and stability of the conjugates. Compositions comprising a cell-binding agent, such as an antibody, chemically coupled to a drug, such as a maytansinoid, are described in, for example, U.S. Patent Application Publication No. 2004/0241174 A1. In this context, substantially high purity is considered to be: (a) greater than 90%, preferably greater than 95%, of conjugate species are monomeric, and/or (b) free drug level in the conjugate preparation is less than 2% (relative to total drug).

[0009] In this respect, the inventive process comprises (a) modifying the cell-binding agent with a bifunctional crosslinking reagent to covalently attach a linker to the cell-binding agent and thereby prepare a first mixture comprising cell-binding agents having linkers bound thereto, (b) subjecting the first mixture to tangential flow filtration, adsorptive chromatography, adsorptive filtration, selective precipitation, or combinations thereof, to purify the cell-binding agents having linkers bound thereto from other components of the first mixture and thereby prepare a purified first mixture of cell-binding agents having linkers bound thereto, (c) conjugating a drug to the cell-binding agents having linkers bound thereto in the purified first mixture by reacting the cell-binding agents having linkers bound thereto with the drug in a solution having a pH of about 4 to about 9 to prepare a second mixture comprising (i) cell-binding agent chemically coupled through the linker to the drug, (ii) free drug, and (iii) reaction by-products, and (d) subjecting the second mixture to tangential flow filtration, adsorptive chromatography, adsorptive filtration, selective precipitation, or combination thereof, to remove the non-conjugated drugs, reactants, and by-products, as well as to obtain substantially purified cell-binding agent-drug conjugates.

[0010] Preferably, tangential flow filtration (TFF, also known as cross flow filtration, ultrafiltration and diafiltration) and/or adsorptive chromatography resins are utilized in the purification steps. However, when TFF is used in the first purification step (step b), in (step c), a conjugation at pH of 6.0-6.5 is used, and an adsorptive chromatography resin is utilized in the second purification step (step d), it is preferred that the adsorptive chromatography resin is a non-ion exchange resin. In other preferred embodiments, TFF is utilized in both purification steps, or adsorptive chromatography resins are utilized in both purification steps. Alternatively, an adsorptive chromatography resin is utilized in the first purification step, and TFF is utilized in the second purification step. A combination of TFF and an adsorptive chromatography resin can be utilized in the first and/or second purification step as well.

[0011] Any suitable TFF systems may be utilized, including a Pellicon type system (Millipore, Billerica, MA), a Sartoclon Cassette system (Sartorius AG, Edgewood, NY), and a Centrasette type system (Pall Corp., East Hills, NY).

[0012] Any suitable adsorptive chromatography resin may be utilized. Preferred adsorptive chromatography resins include resins for hydroxyapatite chromatography, hydrophobic charge induction chromatography (HCIC), hydrophobic interaction chromatography (HIC), ion exchange chromatography, mixed mode ion exchange chromatography, immobilized metal affinity chromatography (IMAC), dye ligand chromatography, affinity chromatography, reversed phase chromatography, and combinations thereof. Examples of suitable hydroxyapatite resins include ceramic hydroxyapatite (CHT Type I and Type II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), HA Ultrogel hydroxyapatite (Pall Corp., East Hills, NY), and ceramic fluoroapatite (CFT Type I and Type II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). An example of a suitable HCIC resin is MEP Hypercel resin (Pall Corp., East Hills, NY). Examples of suitable HIC resins include Butyl-Sepharose, Hexyl-Sepharose, Phenyl-Sepharose, and Octyl Sepharose resins (all from GE Healthcare, Piscataway, NJ), as well as Macro-prep Methyl and Macro-Prep t-Butyl resins (Biorad Laboratories, Hercules, CA). Examples of suitable ion exchange resins include SP-Sepharose, CM-Sepharose, and Q-Sepharose resins (all from GE Healthcare, Piscataway, NJ), and Unosphere S resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Examples of suitable mixed mode ion exchangers include Bakerbond ABx resin (JT Baker, Phillipsburg NJ). Examples of suitable IMAC resins include Chelating Sepharose resin (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and Profinity IMAC resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Examples of suitable dye ligand resins include Blue Sepharose resin (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

and Affi-gel Blue resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Examples of suitable affinity resins include Protein A Sepharose resin (e.g., MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ), where the cell binding agent is an antibody, and lectin affinity resins, e.g. Lentil Lectin Sepharose resin (GE Healthcare, Piscataway, NJ), where the cell binding agent bears appropriate lectin binding sites. Alternatively an antibody specific to the cell binding agent may be used. Such an antibody can be immobilized to, for instance, Sepharose 4 Fast Flow resin (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Examples of suitable reversed phase resins include C4, C8, and C18 resins (Grace Vydac, Hesperia, CA).

[0013] In accordance with the inventive method, a first mixture is produced comprising the cell-binding agent having linkers bound thereto, as well as reactants and other by-products. Purification of the modified cell-binding agent from reactants and by-products is carried out by subjecting the first mixture to a purification process. In this regard, the first mixture can be purified using tangential flow filtration (TFF), e.g., a membrane-based tangential flow filtration process, adsorptive chromatography, adsorptive filtration, or selective precipitation, or any other suitable purification process, as well as combinations thereof. This first purification step provides a purified first mixture, i.e., an increased concentration of the cell-binding agents having linkers bound thereto and a decreased amount of unbound bifunctional crosslinking reagent, as compared to the first mixture prior to purification in accordance with the invention.

[0014] After purification of the first mixture to obtain a purified first mixture of cell-binding agents having linkers bound thereto, a drug is conjugated to the cell-binding agents having linkers bound thereto in the first purified mixture by reacting the cell-binding agents having linkers bound thereto with a drug in a solution having a pH from about 4 to about 9, whereupon a second mixture comprising (i) the cell-binding agent chemically coupled through the linker to the drug, (ii) free drug, and (iii) reaction by-products is produced. While the conjugation reaction is performed at a pH of about 4 to about pH 9, the reaction is preferably performed at a pH of about 6 or below or at a pH of about 6.5 or greater, most preferably at a pH of about 4 to about 6 or at a pH of about 6.5 to about 9, and especially at a pH of 4 to less than 6 or at a pH of greater than 6.5 to 9. When the conjugation step is performed at a pH of about 6.5 or greater, some sulhydryl-containing drugs may be prone to dimerize by disulfide-bond formation. Removal of trace metals and/or oxygen from the reaction mixture, as well as optional addition of antioxidants or the use of linkers with more

reactive leaving groups, or addition of drug in more than one aliquot, may be required to allow for efficient reaction in such a situation.

[0015] Optionally, purification of the modified cell binding agent may be omitted. In such a situation, the drug may be added simultaneously with the crosslinking reagent or at some later point, e.g., 1, 2, 3, or more hours after addition of the crosslinking reagent to the cell binding agent.

[0016] The inventive method may optionally include the addition of sucrose to the conjugation step used in the inventive method to increase solubility and recovery of the cell-binding agent-drug conjugates. Desirably, sucrose is added at a concentration of about 0.1% (w/v) to about 20% (w/v) (e.g., about 0.1% (w/v), 1% (w/v), 5% (w/v), 10% (w/v), 15% (w/v), or 20% (w/v)). Preferably, sucrose is added at a concentration of about 1% (w/v) to 10% (w/v) (e.g., about 2% (w/v), about 4% (w/v), about 6% (w/v), or about 8% (w/v)). In addition, the conjugation reaction also can comprise the addition of a buffering agent. Any suitable buffering agent known in the art can be used. Suitable buffering agents include, for example, a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, and a phosphate buffer.

[0017] Following the conjugation step, the second mixture is subjected to a purification step. In this regard, the second mixture can be purified using tangential flow filtration (TFF), e.g., a membrane-based tangential flow filtration process, adsorptive chromatography, absorptive filtration, selective precipitation, or any other suitable purification process, as well as combinations thereof, which are set forth herein. This second purification step provides a purified second mixture, i.e., an increased concentration of the cell-binding agents chemically coupled through the linkers to the drug and a decreased amount of one or more other components of the second mixture, as compared to the second mixture prior to purification in accordance with the invention.

[0018] The cell-binding agent can be any suitable agent that binds to a cell, typically and preferably an animal cell (e.g., a human cell). The cell-binding agent preferably is a peptide or a polypeptide. Suitable cell-binding agents include, for example, antibodies (e.g., monoclonal antibodies and fragments thereof), lymphokines, hormones, growth factors, nutrient-transport molecules (e.g., transferrin), and any other agent or molecule that specifically binds a target molecule on the surface of a cell.

[0019] The term "antibody," as used herein, refers to any immunoglobulin, any immunoglobulin fragment, such as Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, diabodies, and triabodies, or immunoglobulin chimera, which can bind to an antigen on the surface of a cell (e.g., which

contains a complementarity determining region (CDR)). Any suitable antibody can be used as the cell-binding agent. One of ordinary skill in the art will appreciate that the selection of an appropriate antibody will depend upon the cell population to be targeted. In this regard, the type and number of cell surface molecules (i.e., antigens) that are selectively expressed in a particular cell population (typically and preferably a diseased cell population) will govern the selection of an appropriate antibody for use in the inventive composition. Cell surface expression profiles are known for a wide variety of cell types, including tumor cell types, or, if unknown, can be determined using routine molecular biology and histochemistry techniques.

[0020] The antibody can be polyclonal or monoclonal, but is most preferably a monoclonal antibody. As used herein, "polyclonal" antibodies refer to heterogeneous populations of antibody molecules, typically contained in the sera of immunized animals. "Monoclonal" antibodies refer to homogenous populations of antibody molecules that are specific to a particular antigen. Monoclonal antibodies are typically produced by a single clone of B lymphocytes ("B cells"). Monoclonal antibodies may be obtained using a variety of techniques known to those skilled in the art, including standard hybridoma technology (see, e.g., Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5: 511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), and C.A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). In brief, the hybridoma method of producing monoclonal antibodies typically involves injecting any suitable animal, typically and preferably a mouse, with an antigen (i.e., an "immunogen"). The animal is subsequently sacrificed, and B cells isolated from its spleen are fused with human myeloma cells. A hybrid cell is produced (i.e., a "hybridoma"), which proliferates indefinitely and continuously secretes high titers of an antibody with the desired specificity *in vitro*. Any appropriate method known in the art can be used to identify hybridoma cells that produce an antibody with the desired specificity. Such methods include, for example, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot analysis, and radioimmunoassay. The population of hybridomas is screened to isolate individual clones, each of which secretes a single antibody species to the antigen. Because each hybridoma is a clone derived from fusion with a single B cell, all the antibody molecules it produces are identical in structure, including their antigen binding site and isotype. Monoclonal antibodies also may be generated using other suitable techniques including EBV-hybridoma technology (see, e.g., Haskard and Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2): 361-67 (1984), and Roder et al., *Methods*

12

12

Enzymol., 121: 140-67 (1986)), bacteriophage vector expression systems (see, e.g., Huse et al., *Science*, 246: 1275-81 (1989)), or phage display libraries comprising antibody fragments, such as Fab and scFv (single chain variable region) (see, e.g., U.S. Patents 5,885,793 and 5,969,108, and International Patent Applications WO 92/01047 and WO 99/06587).

[0021] The monoclonal antibody can be isolated from or produced in any suitable animal, but is preferably produced in a mammal, more preferably a mouse or human, and most preferably a human. Methods for producing an antibody in mice are well known to those skilled in the art and are described herein. With respect to human antibodies, one of ordinary skill in the art will appreciate that polyclonal antibodies can be isolated from the sera of human subjects vaccinated or immunized with an appropriate antigen. Alternatively, human antibodies can be generated by adapting known techniques for producing human antibodies in non-human animals such as mice (see, e.g., U.S. Patents 5,545,806, 5,569,825, and 5,714,352, and U.S. Patent Application Publication No. 2002/0197266 A1).

[0022] While being the ideal choice for therapeutic applications in humans, human antibodies, particularly human monoclonal antibodies, typically are more difficult to generate than mouse monoclonal antibodies. Mouse monoclonal antibodies, however, induce a rapid host antibody response when administered to humans, which can reduce the therapeutic or diagnostic potential of the antibody-drug conjugate. To circumvent these complications, a monoclonal antibody preferably is not recognized as "foreign" by the human immune system.

[0023] To this end, phage display can be used to generate the antibody. In this regard, phage libraries encoding antigen-binding variable (V) domains of antibodies can be generated using standard molecular biology and recombinant DNA techniques (see, e.g., Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Phage encoding a variable region with the desired specificity are selected for specific binding to the desired antigen, and a complete human antibody is reconstituted comprising the selected variable domain. Nucleic acid sequences encoding the reconstituted antibody are introduced into a suitable cell line, such as a myeloma cell used for hybridoma production, such that human antibodies having the characteristics of monoclonal antibodies are secreted by the cell (see, e.g., Janeway et al., *supra*, Huse et al., *supra*, and U.S. Patent 6,265,150). Alternatively, monoclonal antibodies can be generated from mice that are transgenic for specific human heavy and light chain immunoglobulin genes. Such methods are known in the art and described in, for example, U.S. Patents 5,545,806 and 5,569,825, and Janeway et al., *supra*.

[0024] Most preferably the antibody is a humanized antibody. As used herein, a "humanized" antibody is one in which the complementarity-determining regions (CDR) of a mouse monoclonal antibody, which form the antigen binding loops of the antibody, are grafted onto the framework of a human antibody molecule. Owing to the similarity of the frameworks of mouse and human antibodies, it is generally accepted in the art that this approach produces a monoclonal antibody that is antigenically identical to a human antibody but binds the same antigen as the mouse monoclonal antibody from which the CDR sequences were derived. Methods for generating humanized antibodies are well known in the art and are described in detail in, for example, Janeway et al., *supra*, U.S. Patents 5,225,539, 5,585,089 and 5,693,761, European Patent No. 0239400 B1, and United Kingdom Patent No. 2188638. Humanized antibodies can also be generated using the antibody resurfacing technology described in U.S. Patent 5,639,641 and Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235: 959-973 (1994). While the antibody employed in the conjugate of the inventive composition most preferably is a humanized monoclonal antibody, a human monoclonal antibody and a mouse monoclonal antibody, as described above, are also within the scope of the invention.

[0025] Antibody fragments that have at least one antigen binding site, and thus recognize and bind to at least one antigen or receptor present on the surface of a target cell, also are within the scope of the invention. In this respect, proteolytic cleavage of an intact antibody molecule can produce a variety of antibody fragments that retain the ability to recognize and bind antigens. For example, limited digestion of an antibody molecule with the protease papain typically produces three fragments, two of which are identical and are referred to as the Fab fragments, as they retain the antigen binding activity of the parent antibody molecule. Cleavage of an antibody molecule with the enzyme pepsin normally produces two antibody fragments, one of which retains both antigen-binding arms of the antibody molecule, and is thus referred to as the $F(ab')_2$ fragment. Reduction of a $F(ab')_2$ fragment with dithiothreitol or mercaptoethylamine produces a fragment referred to as a Fab' fragment. A single-chain variable region fragment (sFv) antibody fragment, which consists of a truncated Fab fragment comprising the variable (V) domain of an antibody heavy chain linked to a V domain of a light antibody chain via a synthetic peptide, can be generated using routine recombinant DNA technology techniques (see, e.g., Janeway et al., *supra*). Similarly, disulfide-stabilized variable region fragments (dsFv) can be prepared by recombinant DNA technology (see, e.g., Reiter et al., *Protein Engineering*, 7: 697-704 (1994)). Antibody fragments in the context of the invention, however, are not limited to these exemplary types of antibody fragments. Any

M

15

suitable antibody fragment that recognizes and binds to a desired cell surface receptor or antigen can be employed. Antibody fragments are further described in, for example, Parham, *J. Immunol.*, 131: 2895-2902 (1983), Spring et al., *J. Immunol.*, 113: 470-478 (1974), and Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 89: 230-244 (1960). Antibody-antigen binding can be assayed using any suitable method known in the art, such as, for example, radioimmunoassay (RIA), ELISA, Western blot, immunoprecipitation, and competitive inhibition assays (see, e.g., Janeway et al., *supra*, and U.S. Patent Application Publication No. 2002/0197266 A1).

[0026] In addition, the antibody can be a chimeric antibody or an antigen binding fragment thereof. By "chimeric" it is meant that the antibody comprises at least two immunoglobulins, or fragments thereof, obtained or derived from at least two different species (e.g., two different immunoglobulins, such as a human immunoglobulin constant region combined with a murine immunoglobulin variable region). The antibody also can be a domain antibody (dAb) or an antigen binding fragment thereof, such as, for example, a camelid antibody (see, e.g., Desmyter et al., *Nature Struct. Biol.*, 3: 752, (1996)), or a shark antibody, such as, for example, a new antigen receptor (IgNAR) (see, e.g., Greenberg et al., *Nature*, 374: 168 (1995), and Stanfield et al., *Science*, 305: 1770-1773 (2004)).

[0027] Any suitable antibody can be used in the context of the invention. For example, the monoclonal antibody J5 is a murine IgG2a antibody that is specific for Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA) (Ritz et al., *Nature*, 283: 583-585 (1980)), and can be used to target cells that express CALLA (e.g., acute lymphoblastic leukemia cells). The monoclonal antibody MY9 is a murine IgG1 antibody that binds specifically to the CD33 antigen (Griffin et al., *Leukemia Res.*, 8: 521 (1984)), and can be used to target cells that express CD33 (e.g., acute myelogenous leukemia (AML) cells).

[0028] Similarly, the monoclonal antibody anti-B4 (also referred to as B4) is a murine IgG1 antibody that binds to the CD19 antigen on B cells (Nadler et al., *J. Immunol.*, 131: 244-250 (1983)), and can be used to target B cells or diseased cells that express CD19 (e.g., non-Hodgkin's lymphoma cells and chronic lymphoblastic leukemia cells). N901 is a murine monoclonal antibody that binds to the CD56 (neural cell adhesion molecule) antigen found on cells of neuroendocrine origin, including small cell lung tumor, which can be used in the conjugate to target drugs to cells of neuroendocrine origin. The J5, MY9, and B4 antibodies preferably are resurfaced or humanized prior to their use as part of the conjugate.

15

Resurfacing or humanization of antibodies is described in, for example, Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 969-73 (1994).

[0029] In addition, the monoclonal antibody C242 binds to the CanAg antigen (see, e.g., U.S. Patent 5,552,293), and can be used to target the conjugate to CanAg expressing tumors, such as colorectal, pancreatic, non-small cell lung, and gastric cancers. HuC242 is a humanized form of the monoclonal antibody C242 (see, e.g., U.S. Patent 5,552,293). The hybridoma from which HuC242 is produced is deposited with ECACC identification Number 90012601. HuC242 can be prepared using CDR-grafting methodology (see, e.g., U.S. Patents 5,585,089, 5,693,761, and 5,693,762) or resurfacing technology (see, e.g., U.S. Patent 5,639,641). HuC242 can be used to target the conjugate to tumor cells expressing the CanAg antigen, such as, for example, colorectal, pancreatic, non-small cell lung, and gastric cancer cells.

[0030] To target ovarian cancer and prostate cancer cells, an anti-MUC1 antibody can be used as the cell-binding agent in the conjugate. Anti-MUC1 antibodies include, for example, anti-HMFG-2 (see, e.g., Taylor-Papadimitriou et al., *Int. J. Cancer*, 28: 17-21 (1981)), hCTM01 (see, e.g., van Hof et al., *Cancer Res.*, 56: 5179-5185 (1996)), and DS6. Prostate cancer cells also can be targeted with the conjugate by using an anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) as the cell-binding agent, such as J591 (see, e.g., Liu et al., *Cancer Res.*, 57: 3629-3634 (1997)). Moreover, cancer cells that express the Her2 antigen, such as breast, prostate, and ovarian cancers, can be targeted using the antibody trastuzumab. Anti-IGF-IR antibodies that bind to insulin-like growth factor receptor also can be used in the conjugate.

[0031] Particularly preferred antibodies are humanized monoclonal antibodies, examples of which include huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, and rituximab (see, e.g., U.S. Patents 5,639,641 and 5,665,357, U.S. Provisional Patent Application No. 60/424,332 (which is related to U.S. Patent Application Publication No. 2005/0118183 A1), International Patent Application WO 02/16401, Pedersen et al., *supra*, Roguska et al., *supra*, Liu et al., *supra*, Nadler et al., *supra*, Colomer et al., *Cancer Invest.*, 19: 49-56 (2001), Heider et al., *Eur. J. Cancer*, 31A: 2385-2391 (1995), Welt et al., *J. Clin. Oncol.*, 12: 1193-1203 (1994), and Maloney et al., *Blood*, 90: 2188-2195 (1997)). Most preferably, the antibody is the huN901 humanized monoclonal antibody or the huMy9-6 humanized monoclonal antibody. Other preferred antibodies include CNTO95,

huDS6, huB4, and huC242. Other humanized monoclonal antibodies are known in the art and can be used in connection with the invention.

[0032] While the cell-binding agent preferably is an antibody, the cell-binding agent also can be a non-antibody molecule. Suitable non-antibody molecules include, for example, interferons (e.g., alpha, beta, or gamma interferon), lymphokines (e.g., interleukin 2 (IL-2), IL-3, IL-4, or IL-6), hormones (e.g., insulin), growth factors (e.g., EGF, TGF-alpha, FGF, and VEGF), colony-stimulating factors (e.g., G-CSF, M-CSF, and GM-CSF (see, e.g., Burgess, *Immunology Today*, 5: 155-158 (1984)), somatostatin, and transferrin (see, e.g., O'Keefe et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 932-937 (1985)). For example, GM-CSF, which binds to myeloid cells, can be used as a cell-binding agent to target acute myelogenous leukemia cells. In addition, IL-2, which binds to activated T-cells, can be used for prevention of transplant graft rejection, for therapy and prevention of graft-versus-host disease, and for treatment of acute T-cell leukemia. Epidermal growth factor (EGF) can be used to target squamous cancers such as lung cancer and head and neck cancer. Somatostatin can be used to target neuroblastoma cells and other tumor cell types.

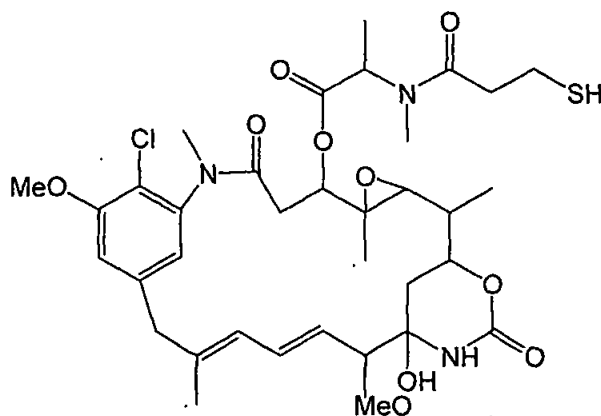
[0033] The conjugate can comprise any suitable drug, typically a cytotoxic agent. A "cytotoxic agent," as used herein, refers to any compound that results in the death of a cell, induces cell death, or decreases cell viability. Suitable cytotoxic agents include, for example, maytansinoids and maytansinoid analogs, taxoids, CC-1065 and CC-1065 analogs, and dolastatin and dolastatin analogs. In a preferred embodiment of the invention, the cytotoxic agent is a maytansinoid, including maytansinol and maytansinol analogs. Maytansinoids are compounds that inhibit microtubule formation and are highly toxic to mammalian cells. Examples of suitable maytansinol analogues include those having a modified aromatic ring and those having modifications at other positions. Such maytansinoids are described in, for example, U.S. Patents 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, and 6,333,410.

[0034] Examples of maytansinol analogs having a modified aromatic ring include:

- (1) C-19-dechloro (U.S. Patent 4,256,746) (prepared by LAH reduction of ansamycin P2),
- (2) C-20-hydroxy (or C-20-demethyl) +/-C-19-dechloro (U.S. Patents 4,361,650 and 4,307,016) (prepared by demethylation using *Streptomyces* or *Actinomyces* or dechlorination using LAH), and
- (3) C-20-demethoxy, C-20-acyloxy (-OCOR), +/-dechloro (U.S. Patent 4,294,757) (prepared by acylation using acyl chlorides).

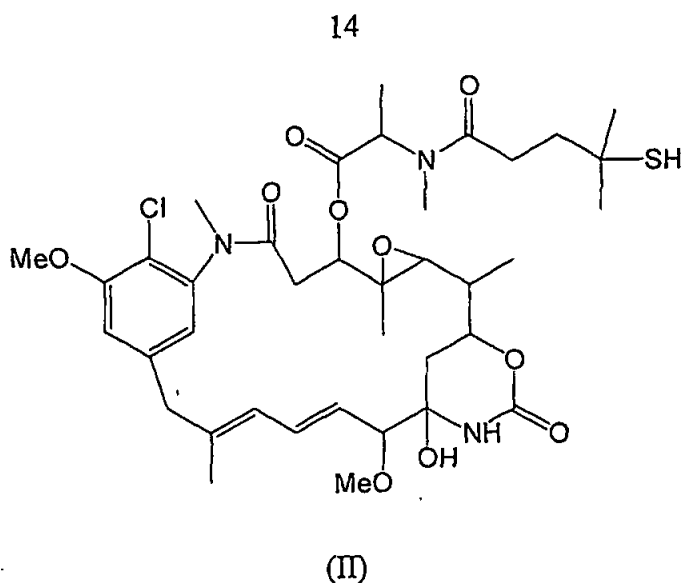
[0035] Examples of maytansinol analogs having modifications of positions other than an aromatic ring include: (1) C-9-SH (U.S. Patent 4,424,219) (prepared by the reaction of maytansinol with H_2S or P_2S_5), (2) C-14-alkoxymethyl (demethoxy/ CH_2OR) (U.S. Patent 4,331,598), (3) C-14-hydroxymethyl or acyloxymethyl (CH_2OH or CH_2OAc) (U.S. Patent 4,450,254) (prepared from *Nocardia*), (4) C-15-hydroxy/acyloxy (U.S. Patent 4,364,866) (prepared by the conversion of maytansinol by *Streptomyces*), (5) C-15-methoxy (U.S. Patents 4,313,946 and 4,315,929) (isolated from *Trewia nudiflora*), (6) C-18-N-demethyl (U.S. Patents 4,362,663 and 4,322,348) (prepared by the demethylation of maytansinol by *Streptomyces*), and (7) 4,5-deoxy (U.S. Patent 4,371,533) (prepared by the titanium trichloride/LAH reduction of maytansinol).

[0036] In a preferred embodiment of the invention, the conjugate utilizes the thiol-containing maytansinoid DM1, also known as N^{2'}-deacetyl-N^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine, as the cytotoxic agent. The structure of DM1 is represented by formula (I):



(I)

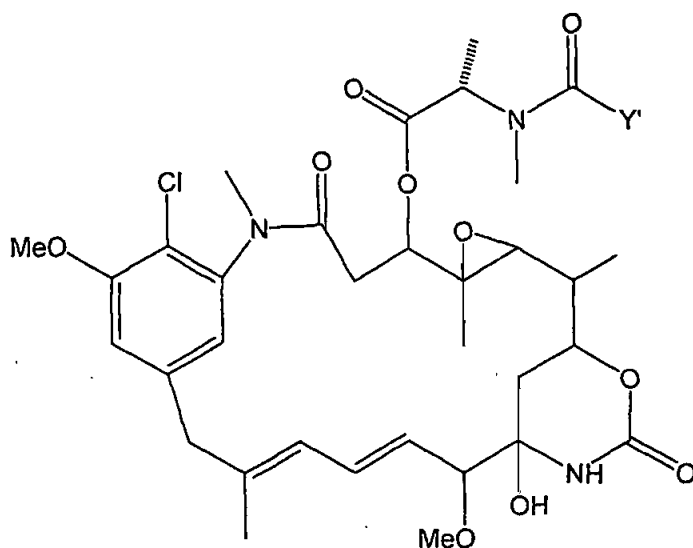
[0037] In another preferred embodiment of the invention, the conjugate utilizes the thiol-containing maytansinoid DM4, also known as N²'-deacetyl-N²'-(4-methyl-4-mercapto-1-oxopentyl)-maytansine, as the cytotoxic agent. The structure of DM4 is represented by formula (II):



[0038] Other maytansines may be used in the context of the invention, including, for example, thiol and disulfide-containing maytansinoids bearing a mono or di-alkyl substitution on the carbon atom bearing the sulfur atom. Particularly preferred is a maytansinoid having at the C-3 position (a) C-14 hydroxymethyl, C-15 hydroxy, or C-20 desmethyl functionality, and (b) an acylated amino acid side chain with an acyl group bearing a hindered sulfhydryl group, wherein the carbon atom of the acyl group bearing the thiol functionality has one or two substituents, said substituents being CH_3 , C_2H_5 , linear or branched alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and further wherein one of the substituents can be H, and wherein the acyl group has a linear chain length of at least three carbon atoms between the carbonyl functionality and the sulfur atom.

[0039] Additional maytansines for use in the context of the invention include compounds represented by formula (III):

15



(III),

wherein Y' represents

$$(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p\text{C}=\text{C}_q\text{A}_r(\text{CR}_5\text{R}_6)_m\text{D}_u(\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r(\text{C}=\text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{R}_4)_n-\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ},$$

wherein R_1 and R_2 are each independently CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and wherein R_2 also can be H,

wherein A, B, D are cycloalkyl or cycloalkenyl having 3-10 carbon atoms, simple or substituted aryl, or heterocyclic aromatic, or heterocycloalkyl radical,

wherein R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} , and R_{12} are each independently H, CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic, or heterocycloalkyl radical,

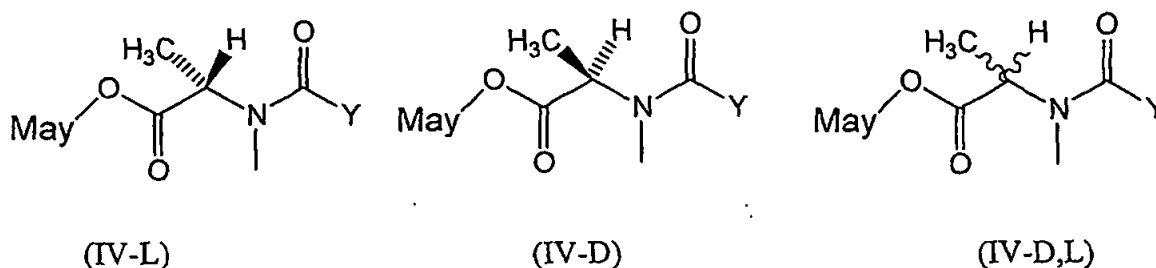
wherein l, m, n, o, p, q, r, s, and t are each independently zero or an integer from 1 to 5, provided that at least two of l, m, n, o, p, q, r, s and t are not zero at any one time, and

wherein Z is H, SR or COR, wherein R is linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic, or heterocycloalkyl radical.

[0040] Preferred embodiments of formula (III) include compounds of formula (III)

wherein (a) R_1 is H, R_2 is methyl and Z is H, (b) R_1 and R_2 are methyl and Z is H, (c) R_1 is H, R_2 is methyl, and Z is $-\text{SCH}_3$, and (d) R_1 and R_2 are methyl, and Z is $-\text{SCH}_3$.

[0041] Such additional maytansines also include compounds represented by formula (IV-L), (IV-D), or (IV-D,L):



wherein Y represents $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

wherein R_1 and R_2 are each independently CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl, or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and wherein R_2 also can be H,

wherein R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are each independently H, CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical,

wherein l, m, and n are each independently an integer of from 1 to 5, and in addition n can be zero,

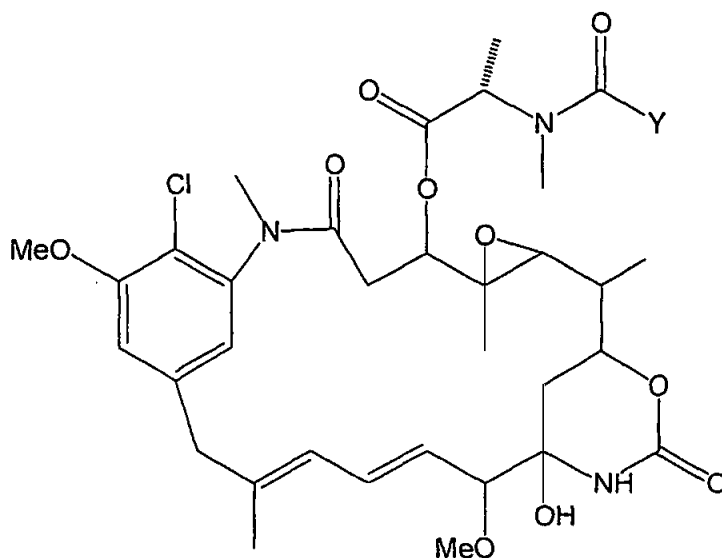
wherein Z is H, SR, or COR wherein R is linear or branched alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and

wherein May represents a maytansinoid which bears the side chain at C-3, C-14 hydroxymethyl, C-15 hydroxy, or C-20 desmethyl.

[0042] Preferred embodiments of formulas (IV-L), (IV-D) and (IV-D,L) include compounds of formulas (IV-L), (IV-D) and (IV-D,L) wherein (a) R_1 is H, R_2 is methyl, R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are each H, l and m are each 1, n is 0, and Z is H, (b) R_1 and R_2 are methyl, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 are each H, l and m are each 1, n is 0, and Z is H, (c) R_1 is H, R_2 is methyl, R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are each H, l and m are each 1, n is 0, and Z is $-SCH_3$, or (d) R_1 and R_2 are methyl, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 are each H, l and m are each 1, n is 0, and Z is $-SCH_3$.

[0043] Preferably the cytotoxic agent is represented by formula (IV-L).

[0044] Additional preferred maytansines also include compounds represented by formula (V):



(V)

wherein Y represents $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

wherein R_1 and R_2 are each independently CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl, or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and wherein R_2 also can be H,

wherein R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are each independently H, CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical,

wherein l, m, and n are each independently an integer of from 1 to 5, and in addition n can be zero, and

wherein Z is H, SR or COR, wherein R is linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical.

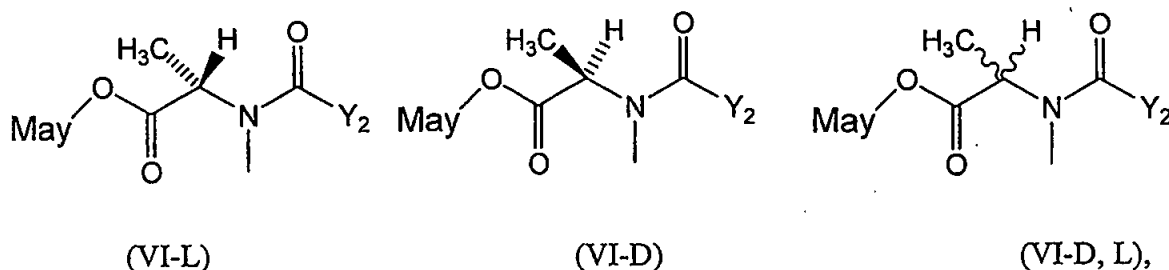
[0045] Preferred embodiments of formula (V) include compounds of formula (V)

wherein (a) R_1 is H, R_2 is methyl, R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are each H; l and m are each 1; n is 0;

and Z is H, (b) R_1 and R_2 are methyl; R_5 , R_6 , R_7 , R_8 are each H, l and m are 1; n is 0; and Z is

H, (c) R_1 is H, R_2 is methyl, R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are each H, l and m are each 1, n is 0, and Z is $-\text{SCH}_3$, or (d) R_1 and R_2 are methyl, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 are each H, l and m are 1, n is 0, and Z is $-\text{SCH}_3$.

[0046] Still further preferred maytansines include compounds represented by formula (VI-L), (VI-D), or (VI-D,L):



wherein Y_2 represents $(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_5\text{R}_6)_m(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}_2$,

wherein R_1 and R_2 are each independently CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and wherein R_2 also can be H,

wherein R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are each independently H, CH_3 , C_2H_5 , linear cyclic alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical,

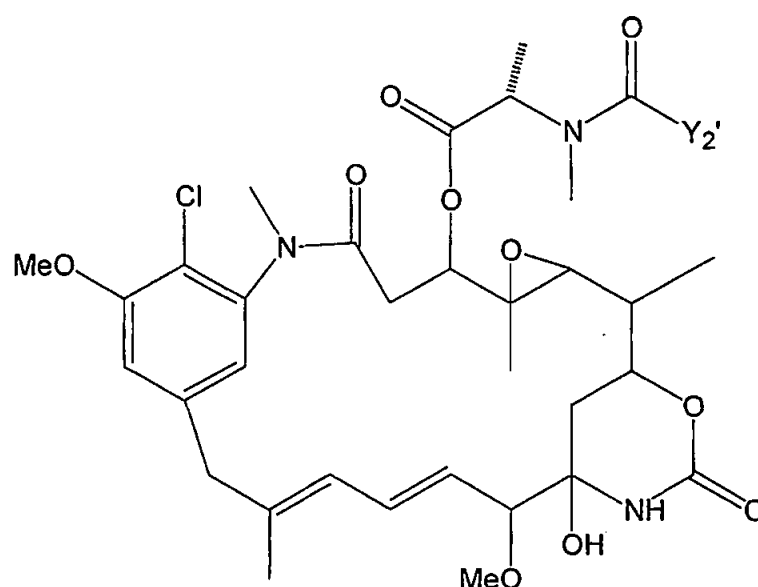
wherein l , m , and n are each independently an integer of from 1 to 5, and in addition n can be zero,

wherein Z_2 is SR or COR, wherein R is linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and

wherein May is a maytansinoid.

[0047] Additional preferred maytansines include compounds represented by formula (VII):

19



(VII),

wherein Y_2 represents

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qAr(CR_5R_6)_mDu(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sBt(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

wherein R_1 and R_2 are each independently CH_3 , C_2H_5 , linear branched or alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical, and in addition R_2 can be H,

wherein A, B, and D each independently is cycloalkyl or cycloalkenyl having 3 to 10 carbon atoms, simple or substituted aryl, or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical,

wherein R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} , and R_{12} are each independently H, CH_3 , C_2H_5 , linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical,

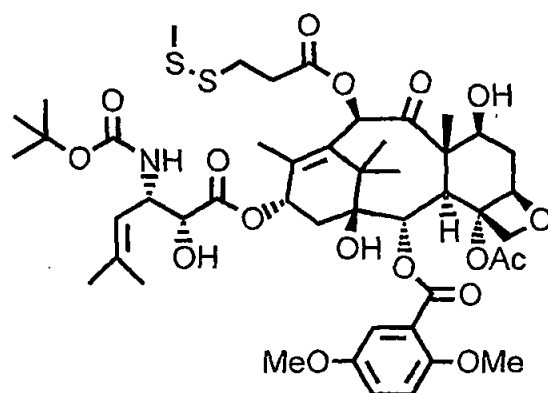
wherein l, m, n, o, p, q, r, s, and t are each independently zero or an integer of from 1 to 5, provided that at least two of l, m, n, o, p, q, r, s and t are not zero at any one time, and

wherein Z_2 is SR or -COR, wherein R is linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical.

[0048] Preferred embodiments of formula (VII) include compounds of formula (VII), wherein R_1 is H and R_2 is methyl.

[0049] In addition to maytansinoids, the cytotoxic agent used in the conjugate can be a taxane or derivative thereof. Taxanes are a family of compounds that includes paclitaxel (Taxol®), a cytotoxic natural product, and docetaxel (Taxotere®), a semi-synthetic derivative, which are both widely used in the treatment of cancer. Taxanes are mitotic spindle poisons that inhibit the depolymerization of tubulin, resulting in cell death. While docetaxel and paclitaxel are useful agents in the treatment of cancer, their antitumor activity is limited because of their non-specific toxicity towards normal cells. Further, compounds like paclitaxel and docetaxel themselves are not sufficiently potent to be used in conjugates of cell-binding agents.

[0050] A preferred taxane for use in the preparation of a cytotoxic conjugate is the taxane of formula (VIII):



(VIII)

[0051] Methods for synthesizing taxanes that can be used in the context of the invention, along with methods for conjugating taxanes to cell-binding agents such as antibodies, are described in detail in U.S. Patents 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, 6,436,931, 6,596,757, 6,706,708, and 6,716,821, and in U.S. Patent Application Publication No. 2004/0024049 A1.

[0052] The cytotoxic also can be CC-1065 or a derivative thereof. CC-1065 is a potent anti-tumor antibiotic isolated from the culture broth of *Streptomyces zelensis*. CC-1065 is about 1000-fold more potent *in vitro* than commonly used anti-cancer drugs, such as doxorubicin, methotrexate, and vincristine (Bhuyan et al., *Cancer Res.*, 42: 3532-3537 (1982)). CC-1065 and its analogs are disclosed in U.S. Patents 5,585,499, 5,846,545, 6,340,701, and 6,372,738. The cytotoxic potency of CC-1065 has been correlated with its

alkylating activity and its DNA-binding or DNA-intercalating activity. These two activities reside in separate parts of the molecule. In this respect, the alkylating activity is contained in the cyclopropapyrroloindole (CPI) subunit and the DNA-binding activity resides in the two pyrroloindole subunits of CC-1065.

[0053] Several CC-1065 analogs are known in the art and also can be used as the cytotoxic agent in the conjugate (see, e.g., Warpehoski et al., *J. Med. Chem.*, 31: 590-603 (1988)). A series of CC-1065 analogs has been developed in which the CPI moiety is replaced by a cyclopropabenzindole (CBI) moiety (Boger et al., *J. Org. Chem.*, 55: 5823-5833 (1990), and Boger et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1: 115-120 (1991)). These CC-1065 analogs maintain the high *in vitro* potency of the parental drug, without causing delayed toxicity in mice. Like CC-1065, these compounds are alkylating agents that covalently bind to the minor groove of DNA to cause cell death.

[0054] The therapeutic efficacy of CC-1065 analogs can be greatly improved by changing the *in vivo* distribution through targeted delivery to a tumor site, resulting in lower toxicity to non-targeted tissues, and thus, lower systemic toxicity. To this end, conjugates of analogs and derivatives of CC-1065 with cell-binding agents that specifically target tumor cells have been generated (see, e.g., U.S. Patents 5,475,092, 5,585,499, and 5,846,545). These conjugates typically display high target-specific cytotoxicity *in vitro*, and anti-tumor activity in human tumor xenograft models in mice (see, e.g., Chari et al., *Cancer Res.*, 55: 4079-4084 (1995)).

[0055] Methods for synthesizing CC-1065 analogs are described in detail in U.S. Patents 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, 6,534,660, 6,586,618, and 6,756,397 and U.S. Patent Application Publication No. 2003/0195365 A1.

[0056] Drugs such as methotrexate, daunorubicin, doxorubicin, vincristine, vinblastine, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, calicheamicin, tubulysin and tubulysin analogs, duocarmycin and duocarmycin analogs, dolastatin and dolastatin analogs also can be used in the context of the invention. Doxorubicin and daunorubicin compounds (see, e.g., U.S. Patent 6,630,579) can also be used as the drug.

[0057] The drug conjugates may be prepared by *in vitro* methods. In order to link a drug or prodrug to the antibody, a linking group is used. Suitable linking groups are well known in the art and include disulfide groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups, and esterase labile groups. Preferred linking groups are disulfide groups. For example, conjugates can be constructed using a disulfide exchange reaction between the

26

26

antibody and the drug or prodrug. The drug molecules also can be linked to a cell-binding agent through an intermediary carrier molecule such as serum albumin.

[0058] In accordance with the invention, the cell-binding agent is modified by reacting a bifunctional crosslinking reagent with the cell-binding agent, thereby resulting in the covalent attachment of a linker molecule to the cell-binding agent. As used herein, a "bifunctional crosslinking reagent" is any chemical moiety that covalently links a cell-binding agent to a drug, such as the drugs described herein. In a preferred embodiment of the invention, a portion of the linking moiety is provided by the drug. In this respect, the drug comprises a linking moiety that is part of a larger linker molecule that is used to join the cell-binding agent to the drug. For example, to form the maytansinoid DM1, the side chain at the C-3 hydroxyl group of maytansine is modified to have a free sulfhydryl group (SH). This thiolated form of maytansine can react with a modified cell-binding agent to form a conjugate. Therefore, the final linker is assembled from two components, one of which is provided by the crosslinking reagent, while the other is provided by the side chain from DM1.

[0059] Any suitable bifunctional crosslinking reagent can be used in connection with the invention, so long as the linker reagent provides for retention of the therapeutic, e.g., cytotoxicity, and targeting characteristics of the drug and the cell-binding agent, respectively. Preferably, the linker molecule joins the drug to the cell-binding agent through chemical bonds (as described above), such that the drug and the cell-binding agent are chemically coupled (e.g., covalently bonded) to each other. Preferably, the linking reagent is a cleavable linker. More preferably, the linker is cleaved under mild conditions, i.e., conditions within a cell under which the activity of the drug is not affected. Examples of suitable cleavable linkers include disulfide linkers, acid labile linkers, photolabile linkers, peptidase labile linkers, and esterase labile linkers. Disulfide containing linkers are linkers cleavable through disulfide exchange, which can occur under physiological conditions. Acid labile linkers are linkers cleavable at acid pH. For example, certain intracellular compartments, such as endosomes and lysosomes, have an acidic pH (pH 4-5), and provide conditions suitable to cleave acid labile linkers. Photo labile linkers are useful at the body surface and in many body cavities that are accessible to light. Furthermore, infrared light can penetrate tissue. Peptidase labile linkers can be used to cleave certain peptides inside or outside cells (see e.g., Trouet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 626-629 (1982), and Umemoto et al., *Int. J. Cancer*, 43: 677-684 (1989)).

27

28

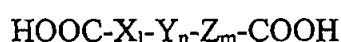
[0060] Preferably the drug is linked to a cell-binding agent through a disulfide bond. The linker molecule comprises a reactive chemical group that can react with the cell-binding agent. Preferred reactive chemical groups for reaction with the cell-binding agent are *N*-succinimidyl esters and *N*-sulfosuccinimidyl esters. Additionally the linker molecule comprises a reactive chemical group, preferably a dithiopyridyl group, that can react with the drug to form a disulfide bond. Particularly preferred linker molecules include, for example, *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) (see, e.g., Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)), *N*-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate (SPDB) (see, e.g., U.S. Patent 4,563,304), *N*-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP) (see, e.g., CAS Registry number 341498-08-6), and other reactive cross-linkers which are described in U.S. Patent 6,913,748, which is incorporated herein in its entirety by reference.

[0061] While cleavable linkers preferably are used in the inventive method, a non-cleavable linker also can be used to generate the above-described conjugate. A non-cleavable linker is any chemical moiety that is capable of linking a drug, such as a maytansinoid, a taxane, or a CC-1065 analog, to a cell-binding agent in a stable, covalent manner. Thus, non-cleavable linkers are substantially resistant to acid-induced cleavage, light-induced cleavage, peptidase-induced cleavage, esterase-induced cleavage, and disulfide bond cleavage, at conditions under which the drug or the cell-binding agent remains active.

[0062] Suitable crosslinking reagents that form non-cleavable linkers between a drug and the cell-binding agent are well known in the art. Examples of non-cleavable linkers include linkers having an *N*-succinimidyl ester or *N*-sulfosuccinimidyl ester moiety for reaction with the cell-binding agent, as well as a maleimido- or haloacetyl-based moiety for reaction with the drug. Crosslinking reagents comprising a maleimido-based moiety include *N*-succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate (SMCC), *N*-succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxy-(6-aminocaproate), which is a "long chain" analog of SMCC (LC-SMCC), κ -maleimidoundecanoic acid *N*-succinimidyl ester (KMUA), γ -maleimidobutyric acid *N*-succinimidyl ester (GMBS), ϵ -maleimidocaproic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (EMCS), *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester (MBS), *N*-(α -maleimidoacetoxy)-succinimide ester (AMAS), succinimidyl-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoate (SMPH), *N*-succinimidyl 4-(*p*-maleimidophenyl)-butyrate (SMPB), and *N*-(*p*-maleimidophenyl)isocyanate (PMPI). Cross-linking reagents comprising a haloacetyl-based moiety include *N*-succinimidyl-4-(iodoacetyl)-aminobenzoate

(SIAB), N-succinimidyl iodoacetate (SIA), N-succinimidyl bromoacetate (SBA), and N-succinimidyl 3-(bromoacetamido)propionate (SBAP).

[0063] Other crosslinking reagents lacking a sulfur atom that form non-cleavable linkers can also be used in the inventive method. Such linkers can be derived from dicarboxylic acid based moieties. Suitable dicarboxylic acid based moieties include, but are not limited to, α,ω -dicarboxylic acids of the general formula (IX):



(IX),

wherein X is a linear or branched alkyl, alkenyl, or alkynyl group having 2 to 20 carbon atoms, Y is a cycloalkyl or cycloalkenyl group bearing 3 to 10 carbon atoms, Z is a substituted or unsubstituted aromatic group bearing 6 to 10 carbon atoms, or a substituted or unsubstituted heterocyclic group wherein the hetero atom is selected from N, O or S, and wherein l, m, and n are each 0 or 1, provided that l, m, and n are all not zero at the same time.

[0064] Many of the non-cleavable linkers disclosed herein are described in detail in U.S. Patent Application No. 10/960,602, which corresponds to U.S. Patent Application Publication No. 2005/0169933 A1.

[0065] Alternatively, as disclosed in U.S. Patent 6,441,163 B1, the drug can be first modified to introduce a reactive ester suitable to react with a cell-binding agent. Reaction of these maytansinoids containing an activated linker moiety with a cell-binding agent provides another method of producing a cleavable or non-cleavable cell-binding agent maytansinoid conjugate.

[0066] Additional information concerning maytansinoids, cytotoxic agents comprising same, drug conjugates, and related preparation methods is disclosed in U.S. Patent Application No. 11/352,121 and U.S. Patent Application No. 10/849,136, which corresponds to U.S. Patent Application Publication No. 2004/0235840 A1.

[0067] The following examples further illustrate the invention but, of course, should not be construed as in any way limiting its scope.

EXAMPLE 1

[0068] This example demonstrates the purification of an antibody modified with a heterobifunctional modification reagent using TFF.

[0069] The huN901 monoclonal antibody (final concentration of 8 mg/ml) was incubated with N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP, 5.6-fold molar excess) for approximately 180 minutes at 20° C in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 5% ethanol. In a first group, the reaction mixture was purified using a column of Sephadex™ G25F resin equilibrated and eluted in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing 50 mM NaCl and 2 mM EDTA. In a second group, the reaction mixture was purified using a Pellicon XL TFF system (Millipore, Billerica, MA), and the antibody was diafiltered (5 volumes) into 50 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl (pH 6.5), and 2 mM EDTA using a 10,000 molecular weight cutoff membrane (Ultracel™ regenerated cellulose membrane, Millipore, Billerica, MA). Both samples were conjugated with DM1 (1.7 fold molar excess over the unbound linker) for 18 hours at pH 6.5 in potassium phosphate buffer containing 50 mM NaCl and a final concentration of 3% DMA.

[0070] In both groups, yields were determined spectrophotometrically (wavelength 280 nm) for the combined modification and purification step. Linker/antibody ratios were also determined by treatment with dithiothreitol to release pyridine-2-thione, which has an extinction coefficient of 8,080 M⁻¹cm⁻¹ at 343 nM. Drug/antibody ratios were determined spectrophotometrically (wavelengths of 280 nm and 252 nm) for the conjugation step. In addition, the removal of SPP-related small molecule species was measured by Hisep HPLC.

[0071] The resulting data are set forth in Table 1.

Table 1: Purification Methods for Modified huN901 Using G-25F versus TFF

		Sephadex™ G25F Resin	TFF
Modification Step	Step yield	94 %	98 %
	Linker/Antibody ratio	4.9	4.9
	SPP-related small molecules	0.2 %	0.2 %
Conjugation Step	Drug/Antibody ratio	3.7	3.7

[0072] As shown in Table 1, the use of TFF yields drug conjugate product of at least equivalent quality to the nonadsorptive chromatography (G25) process while being more convenient and scaleable.

EXAMPLE 2

[0073] This example demonstrates the purification of an antibody modified with a heterobifunctional modification reagent using adsorptive chromatography.

[0074] The huB4 antibody was modified with N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate (SPDB, 5.4 fold molar excess) for 120 minutes at room temperature in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 5% ethanol. In a first group, the reaction mixture was purified using the Sephadex™ G25F resin as described in Example 1. In a second group, the reaction mixture was loaded onto a column of ceramic hydroxyapatite (CHT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), which was equilibrated in 12.5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) and eluted with 80 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5).

[0075] In both groups, yields and linker/antibody ratios were determined as described in Example 1. The first group had a 91% yield and 4.2 linker/antibody ratio. The second group had a 89% yield and a 4.2 linker/antibody ratio.

[0076] The CNT095 antibody (final concentration of 10 mg/ml) was modified with N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate (SPDB, 4.5 fold molar excess) for 120 minutes at 20° C in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 2.7 % sucrose and 5% ethanol. In a first group, the reaction mixture was purified using Sephadex™ G25F resin in 12.5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.6) containing 12.5 mM NaCl and 0.5 mM EDTA. In a second group, the reaction mixture was loaded onto a column of SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ), which was equilibrated in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) and eluted with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), containing 50 mM NaCl.

[0077] In both groups, yields and linker/antibody ratios were determined as described in Example 1. The first group had an 96% yield and 4.0 linker/antibody ratio. The second group had a 97% yield and a 4.1 linker/antibody ratio.

[0078] The data obtained in this example demonstrate that adsorptive chromatography can be used to purify an antibody modified with a heterobifunctional modification reagent.

EXAMPLE 3

[0079] This example demonstrates the beneficial effects of conjugating a modified antibody with a drug at a pH of above 6.5.

[0080] In a first experiment, CNTO95 antibody was modified and purified as described in Example 2. The modified antibody was then divided into two groups. In the first group, conjugation was performed in 12.5 mM potassium phosphate at pH 6.5 containing 12.5 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 3% DMA, and 1.7 fold molar excess drug per linker at 20° C. In the second group, the conjugation reaction was at pH 7.5. The conjugated antibody was purified over NAP-10 columns.

[0081] The drug/antibody ratio was measured for both groups. The resulting data are set forth in Table 2.

Table 2: Drug/Antibody Ratio at Conjugation Reaction of pH 6.5 versus 7.5

Reaction Time (hours)	Drug/Antibody Ratio at Conjugation Reaction pH 6.5	Drug/Antibody Ratio at Conjugation Reaction pH 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

[0082] As shown by the data set forth in Table 2, conjugation proceeds faster at pH 7.5 than at pH 6.5.

[0083] In a second experiment, huB4 humanized monoclonal antibody was modified with either (a) a 4.9-fold molar excess of SPDB relative to antibody, or (b) a 4.8-fold molar excess of SPDB relative to antibody. In both situations, reaction was in 50 mM potassium phosphate, 50 mM potassium chloride, and 2 mM EDTA (pH 6.5) in 5% ethanol for a total of 120 minutes at room temperature. Sample (a) was purified over a column of Sephadex™ G25F resin equilibrated in 50 mM potassium phosphate, 50 mM sodium chloride, and 2 mM EDTA at pH 6.5. Sample (b) was purified equivalently except that the chromatography

buffer was adjusted to pH 7.5. Both samples were conjugated with DM4 (1.7 fold molar excess over bound linker) for 18 hours at room temperature in a final concentration of dimethylacetamide (DMA) of 3%.

[0084] Thus, sample (a) was conjugated at pH 6.5, and sample (b) was conjugated at pH 7.5. The samples were then purified over a column of Sephadex™ G25F resin equilibrated in 9.6 mM potassium phosphate and 4.2 mM sodium chloride at pH 6.5. Both samples were incubated at 4° C for up to 7 months and subjected to analysis of released free drug at intervals. The resulting data are set forth in Table 3.

Table 3: Release of Free Drug Over Time from Samples Conjugated at pH 6.5 and 7.5

Time (months)	pH 6.5 Conjugation	pH 7.5 Conjugation
0	1.0	0.8
1.5	1.8	1.0
2.5	3.2	1.9
7	4.0	2.8

[0085] As shown by the data set forth in Table 3, release of free drug is substantially slower from sample (b) that had been conjugated at pH 7.5 relative to sample (a) that had been conjugated at pH 6.5. Accordingly, drug conjugate product prepared at pH 7.5 is shown to be more stable with respect to release of free drug over time as compared to the drug conjugate product prepared at pH 6.5. The conjugation at pH 7.5 also shows a better drug incorporation than at pH 6.5, thereby requiring less drug to be used.

EXAMPLE 4

[0086] This example demonstrates the beneficial effects of conjugating a modified antibody with a drug at a pH of below 6.0.

[0087] The huN901 monoclonal antibody (final concentration of 8 mg/ml) was incubated with N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP, 5.6-fold molar excess) for approximately 180 minutes at 20° C in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 5% ethanol. In a first group, the reaction mixture was purified using a column of Sephadex™ G25F resin equilibrated and eluted in 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.0) containing 50 mM NaCl and 2 mM EDTA. In a second group,

the reaction mixture was purified using a column of Sephadex™ G25F resin equilibrated and eluted in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing 50 mM NaCl and 2 mM EDTA. Both samples were conjugated with DM4 (1.7-fold molar excess over bound linker) for 3, 19, 25, 48, and 120 hours at room temperature in a final concentration of dimethylacetamide (DMA) of 3%.

[0088] Thus, the first group of samples was conjugated in 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.0) containing 50 mM NaCl and 2 mM EDTA, and the second group of samples was conjugated in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), containing 50 mM NaCl and 2 mM EDTA. The samples were then purified using a column of Sephadex™ G25F resin equilibrated and eluted in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing 50 mM NaCl.

[0089] In both groups, linker/antibody ratios were determined by treatment with dithiothreitol to release pyridine-2-thione, which has an extinction coefficient of 8,080 M⁻¹cm⁻¹ at 343 nM. Drug/antibody ratios were determined spectrophotometrically (wavelengths of 280 nm and 252 nm) for the conjugation step.

[0090] The first group had a 4.3 linker/antibody ratio. The second group had a 4.2 linker/antibody ratio.

[0091] The drug/antibody ratios over time for the two groups are set forth in Table 4.

Table 4: Rate of Incorporation of DM1 into SPP-modified huN901 as a Function of Conjugation pH

Reaction Time (hours)	Drug/Antibody Ratio (mol/mol)	
	pH 5.0 Conjugation	pH 6.5 Conjugation
3	2.43	2.97
19	3.38	3.28
25	3.41	NT
48	3.46	3.17
120	3.44	2.85

[0092] As is apparent from the data set forth in Table 4, conjugate that is made by conjugating the modified antibody with the drug at a pH of 5.0 reaches a higher and more stable level of bound drug during the course of the conjugation reaction than conjugate made at a conjugation pH of 6.5. In addition to increased stability, the results indicate that a higher

drug/antibody level is achieved upon conjugation at pH 5.0 than when using the same amount of drug at a conjugation pH of 6.5, thereby indicating more efficient usage of drug at pH 5.0.

[0093] In both groups, the conjugate monomer amounts were determined over time. The resulting data are set forth in Table 5.

Table 5: Effect of Conjugation pH on Level of Conjugate Monomer During Conjugation of SPP-modified huN901 with DM1

Reaction Time (hours)	Conjugate Monomer (%)	
	pH 5.0 Conjugation	pH 6.5 Conjugation
3	98.5	98.0
19	98.8	98.2
25	99.1	NT
48	99.2	98.3
120	99.2	97.8

[0094] As is apparent from the data set forth in Table 5, conjugate that is made by conjugating the modified antibody with the drug at a pH of 5.0 has a higher level of conjugate monomer than conjugate made at a conjugation pH of 6.5.

EXAMPLE 5

[0095] This example further demonstrates benefits of conjugating a drug to a modified antibody at a pH of less than 6.

[0096] BIWA 4 antibody was modified with SPP (molar excess of SPP as shown in Table 6) for 120-140 minutes at room temperature in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 5% ethanol. Aliquots of modified antibody were purified on separate NAP 25 columns equilibrated in buffers having various pH values (pH 4.6 – 6.5). The pH 4.6 – 5.9 buffers were composed of 35 mM sodium citrate, 150 mM sodium chloride, and 2 mM EDTA. The pH 6.5 buffer was PBS with 2 mM EDTA.

[0097] Modified antibody at each pH was conjugated with DM1 (1.7 fold molar excess over linker) in dimethylacetamide (DMA, final concentration of 3%). After incubation for 17-18 hours at room temperature, the conjugated antibody samples were purified by chromatography on NAP 25 columns equilibrated in PBS (pH 6.5). Linker/antibody ratios (L/A in Table 6) were determined by treatment with dithiothreitol to release pyridine-2-

thione, which has an extinction coefficient of 8,080 M⁻¹cm⁻¹ at 343 nM. Drug/antibody ratios were determined spectrophotometrically (wavelengths of 280 nm and 252 nm) for the conjugation step. Conjugate monomer, high molecular weight species, and low molecular weight species were determined by SEC-HPLC using a TSKG3000SWXL column equilibrated and developed in 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.2 M potassium chloride and 20% isopropanol.

[0098] The results of this analysis are set forth in Table 6.

Table 6: Drug Conjugate Product Characteristics Relative to pH

Buffer	SPP Molar Excess	L/A	D/A	Monomer (%)	High MW (%)	Low MW (%)	Conjugation Step Yield (%)
pH 4.6	4.7	3.8	3.6	97.5	2.2	0.4	74
pH 5.1	4.4	4.7	3.6	97.6	1.9	0.6	75
pH 5.6	5.0	4.9	3.6	97.7	1.5	0.8	85
pH 5.9	5.5	5.3	3.7	96.4	2.3	1.4	76
pH 6.5	6.6	6.4	3.7	95.1	2.8	1.9	71

[0099] The data set forth in Table 6 demonstrate that conjugation of SPP-modified BIWA 4 with DM1 was efficient at a pH below 6.0, compared with conjugation at pH 6.5. The amounts of linker and drug, specifically SPP linker and DM1, required to reach a particular final drug/antibody ratio was reduced at lower pH. In addition, levels of conjugate monomer, high molecular weight species, and low molecular weight species were more optimal, and yields were improved, at lower pH.

EXAMPLE 6

[0100] This example demonstrates that the step for purifying the modified antibody may optionally be eliminated. The drug may be added simultaneously with the bifunctional modifying reagent or at some later time.

[0101] In an example of addition of drug after the modifying reagent, the humanized monoclonal antibody CNT095 was modified at a concentration of 20 mg/mL with the bifunctional modifying reagent SPDB at a molar excess of SPDB over antibody of 4.6 for 120 min at 20° C. The modification buffer was 44 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing

5.3% sucrose and 5% ethanol. One aliquot of the modified antibody was purified over Sephadex™ G25F resin (standard four-step process), equilibrated and eluted in 12.5 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 12.5 mM NaCl, and was subsequently conjugated with DM4 (1.7 fold molar excess of drug over bound linker) at a final modified antibody concentration of 10 mg/mL in 12.5 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 12.5 mM NaCl and 10% DMA for 20 hours at room temperature. A second aliquot of the modified antibody was conjugated immediately at the end of the 120 minute modification reaction (three-step process), without being further purified.

[0102] The protein and buffer concentrations of the modification reaction mixture were adjusted to yield a modified protein concentration of 10 mg/mL and a buffer composition of 28 mM potassium phosphate (pH 7.5) containing 5.9 mM NaCl and 2.7% sucrose. DM4 was then added (1.7 fold molar excess over starting SPDB), and DMA was adjusted to a final concentration of 10%. After 20 hours incubation at room temperature, both aliquots of conjugated antibody were purified on Sephadex™ G25F resin equilibrated in 10 mM histidine and 10% sucrose at pH 5.5

[0103] Linker/antibody ratios (L/A) were determined by treatment with dithiothreitol to release pyridine-2-thione, which has an extinction coefficient of $8,080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 343 nM. Drug/antibody (D/A) ratios and yield were determined spectrophotometrically (wavelengths of 280 nm and 252 nm) for the conjugation step. Percentages of monomer were assayed by SEC-HPLC. Percentages of free drug were assayed by HPLC on a Hisep column. The results of these analyses are set forth in Table 7.

Table 7: Optional Elimination of Purification Step for Modified Antibody

Parameters	4-step Process	3-step Process
Starting SPDB	4.6 x	4.6 x
L/A	4.1	Not Determined
D/A	3.9	4.0
Yield	79%	91%
% Monomer	95.8%	96.1%
% Free Drug	2.4%	1.1%

[0104] As demonstrated by the results set forth in Table 7, the step for purifying the modified antibody can be eliminated in the context of the invention.

37

37

EXAMPLE 7

[0105] This example demonstrates an improved means of purifying antibody that has been modified with a heterobifunctional modification reagent and then conjugated with a maytansinoid.

[00100] The huN901 antibody modified with SPP(7 fold molar excess) and purified on Sephadex™ G25F resin, as described in Example 1, was conjugated with the maytansinoid DM1 (1.7 fold molar excess over linker, dissolved in dimethylacetamide (DMA), 3% final concentration).

[0106] A first sample of conjugate was purified by standard chromatography on Sephadex™ G25F resin in phosphate buffered saline (PBS, pH 6.5).

[0107] A second conjugate sample was purified by a Pellicon XL TFF system (Millipore, Billerica, MA), as described in Example 1

[0108] A third conjugate sample was purified using a column of MEP Hypercell resin equilibrated in 50 mM Tris (pH 8.0), and eluted with 50 mM sodium acetate (pH 4.0).

[0109] A fourth conjugate sample was purified using a column of UNOsphere S resin equilibrated in 50 mM sodium phosphate (pH 6.5) and eluted with 0.2 M NaCl and 50 mM sodium phosphate (pH 6.5).

[0110] A fifth conjugate sample was purified using a column of CHT resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) equilibrated in 50 mM sodium phosphate (pH 6.5) and eluted with 0.3 M NaCl and 50 mM sodium phosphate (pH 6.5).

[0111] A sixth conjugate sample was purified using a column of SP Sepharose resin equilibrated in 35 mM sodium citrate, 10 mM sodium chloride (pH 5.0), and eluted with 0.25 M NaCl, 35 mM sodium citrate (pH 5.0).

[0112] Conjugate monomer was determined by SEC-HPLC using a column of TSKG3000SW_{XL} resin equilibrated and developed in 0.2 M potassium phosphate buffer at pH 7.0, containing 0.2 M potassium chloride and 20% isopropanol. The conjugation step yield was determined by dividing the yield of conjugated antibody by the amount of modified antibody that was conjugated (determined spectrophotometrically at a wavelength of 280 nm).

[0113] The results of these analyses are set forth in Table 8.

Table 8: Conjugation Purification Step Comparison

Conjugate Sample	Conjugation Purification Step	Conjugate Monomer %	Step Yield %
1 (control)	G25F resin	93.2	86
2 (invention)	TFF	92.8	85
3 (invention)	MEP Hypercell resin	94.5	74
4 (invention)	UNOsphere resin	96.3	81
5 (invention)	CHT resin	97.9	72
6 (invention)	SP Sepharose resin	95.1	81

[0114] The results in Table 8 show that all of the inventive purification methods (groups 2-6) gave similar yields to those obtained with the control process (group 1). Each inventive chromatographic method yielded an improvement in the level of conjugate monomer and may be readily scaled up.

[0115] In addition to CHT (ceramic hydroxyapatite), CFT (ceramic fluoroapatite) also can be used under similar chromatographic conditions. Alternatively both the CHT and CFT resins may be used in non-adsorptive mode so that the desired product (substantially monomeric conjugate) is not retained by the resins, whereas high molecular weight species are retained and thereby separated from the desired product.

[0116] Although a standard buffer/solvent composition for conjugation comprises 3% DMA, 50 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, and 2 mM EDTA at pH 6.5 (as utilized in Example 1), other compositions are more compatible with some of the chromatographic steps described herein and provide other benefits relative to the standard process. For instance, conjugation may be performed in 3% DMA, 12.5 mM potassium phosphate, 12.5 mM NaCl, and 0.5 mM EDTA at pH 6.5. Under these conditions, the amount of DM4 incorporated relative to the amount of linker incorporated in huB4 antibody was about 10% higher than for the standard conditions. In addition, these conditions are more compatible with loading onto resins such as cation exchange and CHT resins.

[0117] All references, including publications, patent applications, and patents, cited herein are hereby incorporated by reference to the same extent as if each reference were individually and specifically indicated to be incorporated by reference and were set forth in its entirety herein.

[0118] The use of the terms “a” and “an” and “the” and similar referents in the context of describing the invention (especially in the context of the following claims) are to be construed to cover both the singular and the plural, unless otherwise indicated herein or clearly contradicted by context. The terms “comprising,” “having,” “including,” and “containing” are to be construed as open-ended terms (i.e., meaning “including, but not limited to,”) unless otherwise noted. Recitation of ranges of values herein are merely intended to serve as a shorthand method of referring individually to each separate value falling within the range, unless otherwise indicated herein, and each separate value is incorporated into the specification as if it were individually recited herein. All methods described herein can be performed in any suitable order unless otherwise indicated herein or otherwise clearly contradicted by context. The use of any and all examples, or exemplary language (e.g., “such as”) provided herein, is intended merely to better illuminate the invention and does not pose a limitation on the scope of the invention unless otherwise claimed. No language in the specification should be construed as indicating any non-claimed element as essential to the practice of the invention.

[0119] Preferred embodiments of this invention are described herein, including the best mode known to the inventors for carrying out the invention. Variations of those preferred embodiments may become apparent to those of ordinary skill in the art upon reading the foregoing description. The inventors expect skilled artisans to employ such variations as appropriate, and the inventors intend for the invention to be practiced otherwise than as specifically described herein. Accordingly, this invention includes all modifications and equivalents of the subject matter recited in the claims appended hereto as permitted by applicable law. Moreover, any combination of the above-described elements in all possible variations thereof is encompassed by the invention unless otherwise indicated herein or otherwise clearly contradicted by context.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A process for preparing a cell-binding agent-drug conjugate comprising the steps of:
 - (a) contacting a cell-binding agent with a bifunctional crosslinking reagent to covalently attach a linker to the cell-binding agent and thereby prepare a first mixture comprising cell-binding agents having linkers bound thereto,
 - (b) subjecting the first mixture to tangential flow filtration, selective precipitation, adsorptive filtration, or an adsorptive chromatography resin and thereby prepare a purified first mixture of cell-binding agents having linkers bound thereto,
 - (c) conjugating a drug to the cell-binding agents having linkers bound thereto in the purified first mixture by reacting the cell-binding agents having linkers bound thereto with a drug in a solution having a pH of about 4 to about 9 to prepare a second mixture comprising (i) cell-binding agent chemically coupled through the linker to the drug, (ii) free drug, and (iii) reaction by-products, and
 - (d) subjecting the second mixture to a tangential flow filtration, selective precipitation, adsorptive filtration, or an adsorptive chromatography resin to purify the cell-binding agents chemically coupled through the linkers to the drug from the other components of the second mixture and thereby prepare a purified second mixture.
2. The process of claim 1, wherein the adsorptive chromatography resin is selected from the group consisting of hydroxyapatite, hydrophobic charge induction chromatography (HCIC), hydrophobic interaction chromatography (HIC), ion exchange chromatography, mixed mode ion exchange chromatography, immobilized metal affinity chromatography (IMAC), dye ligand chromatography, affinity chromatography, reversed phase chromatography, and combinations thereof.
3. The process of claim 1, wherein tangential flow filtration is utilized in steps (b) and (d).
4. The process of claim 1 or 2, wherein the adsorptive chromatography resin is utilized in steps (b) and (d).

42

5. The process of claim 1 or 2, wherein tangential flow filtration is utilized in step (b) and step (c) is performed at a pH between 6-6.5, the adsorptive chromatography resin utilized in step (d) is a not an ion exchange resin.

6. The process of claim 1 or 2, wherein the adsorptive chromatography resin is utilized in step (b) and tangential flow filtration is utilized in step (d).

7. The process of any of claims 1-6, wherein the solution in step (c) has a pH of from about 4 to about 6.

8. The process of any of claims 1-6, wherein the solution in step (c) has a pH of from about 6.5 to about 9.

9. The process of any of claims 1-8, wherein the cell binding agent is selected from the group consisting of antibodies, interferons, interleukin 2 (IL-2), interleukin 3 (IL-3), interleukin 4 (IL-4), interleukin 6 (IL-6), insulin, EGF, TGF- α , FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF, and transferrin.

10. The process of claim 9, wherein the cell binding agent is an antibody.

11. The process of claim 10, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

12. The process of claim 11, wherein the antibody is a humanized monoclonal antibody.

13. The process of claim 12, wherein the antibody is selected from the group consisting of huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, CNTO95, huDS6, and rituximab.

14. The process of any of claims 1-13, wherein the drug is a cytotoxic agent.

15. The process of claim 14, wherein the cytotoxic agent is selected from the group consisting of maytansinoids, taxanes, and CC1065.

42

- 43
16. The process of claim 15, wherein the drug is a maytansinoid.
 17. The process of claim 16, wherein the maytansinoid comprises a thiol group.
 18. The process of claim 17, wherein the maytansinoid is DM1.
 19. The process of claim 17, wherein the maytansinoid is DM4.
 20. The process of any of claims 1-19, wherein the cell binding agent is chemically coupled to the drug via chemical bonds selected from the group consisting of disulfide bonds, acid labile bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds, thioether bonds, and esterase labile bonds.
 21. The process of any of claims 1-20, wherein the solution in step (c) comprises sucrose.
 22. The process of any of claims 1-21, wherein the solution in step (c) further comprises a buffering agent selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, and a phosphate buffer.
 23. A process for preparing a cell-binding agent-drug conjugate comprising the steps of:
 - (a) contacting a cell-binding agent with a bifunctional crosslinking reagent to covalently attach a linker to the cell-binding agent and thereby prepare a first mixture comprising cell-binding agents having linkers bound thereto,
 - (b) subjecting the first mixture to tangential flow filtration, selective precipitation, adsorptive filtration or an adsorptive chromatography resin and thereby prepare a purified first mixture of cell-binding agents having linkers bound thereto,
 - (c) conjugating a drug to the cell-binding agents having linkers bound thereto in the purified first mixture by reacting the cell-binding agents having linkers bound thereto with a drug in a solution having a pH of about 4 to about 6 or a pH of about 6.5 to about 9 to prepare a second mixture comprising (i) cell-binding agent
- 43

chemically coupled through the linker to the drug, (ii) free drug, and (iii) reaction by-products, and

(d) subjecting the second mixture to tangential flow filtration, selective precipitation, adsorptive filtration or an adsorptive chromatography resin to purify the cell-binding agents chemically coupled through the linkers to the drug from the other components of the second mixture and thereby prepare a purified second mixture.

24. The process of claim 23, wherein the adsorptive chromatography resin is selected from the group consisting of hydroxyapatite, hydrophobic charge induction chromatography (HCIC), hydrophobic interaction chromatography (HIC), ion exchange chromatography, mixed mode ion exchange chromatography, immobilized metal affinity chromatography (IMAC), dye ligand chromatography, affinity chromatography, reversed phase chromatography, and combinations thereof..

25. The process of claim 23, wherein tangential flow filtration is utilized in steps (b) and (d).

26. The process of claim 23 or 24, wherein the adsorptive chromatography resin is utilized in steps (b) and (d).

27. The process of claim 23 or 24, wherein the adsorptive chromatography resin is utilized in step (b) and tangential flow filtration is utilized in step (d).

28. The process of any of claims 23-27, wherein the cell binding agent is selected from the group consisting of antibodies, interferons, interleukin 2 (IL-2), interleukin 3 (IL-3), interleukin 4 (IL-4), interleukin 6 (IL-6), insulin, EGF, TGF- α , FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF, and transferrin.

29. The process of claim 28, wherein the cell binding agent is an antibody.

30. The process of claim 29, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

44

44

45

31. The process of claim 30, wherein the antibody is a humanized monoclonal antibody.
32. The process of claim 31, wherein the antibody is selected from the group consisting of huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, CNT095, huDS6, and rituximab.
33. The process of any of claims 23-32, wherein the drug is a cytotoxic agent.
34. The process of claim 33, wherein the cytotoxic agent is selected from the group consisting of maytansinoids, taxanes, and CC1065.
35. The process of claim 34, wherein the drug is a maytansinoid.
36. The process of claim 35, wherein the maytansinoid comprises a thiol group.
37. The process of claim 36, wherein the maytansinoid is DM1.
38. The process of claim 37, wherein the maytansinoid is DM4.
39. The process of any of claims 23-38, wherein the cell binding agent is chemically coupled to the drug via chemical bonds selected from the group consisting of disulfide bonds, acid labile bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds, thioether bonds, and esterase labile bonds.
40. The process of any of claims 23-39, wherein the solution in step (c) comprises sucrose.
41. The process of any of claims 23-40, wherein the solution in step (c) further comprises a buffering agent selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, and a phosphate buffer.

45

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 March 2007 (01.03.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/024536 A3

- (51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/031653

(22) International Filing Date: 14 August 2006 (14.08.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/710,858 24 August 2005 (24.08.2005) US
60/797,713 4 May 2006 (04.05.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **IM-MUNOGEN, INC.** [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DAI, Yong** [CN/US]; 139 Oakdale Road, Newton, MA 02461 (US). **WANG, Yong** [CN/US]; 65 East Washington Street, North Attleboro, MA 02760 (US). **JIN, Shengjin** [CN/US]; 415 Arlington Street, Acton, MA 01720 (US). **MESHULAM, Deborah, H.** [US/US]; 32 James Street #6, Brookline, MA 02446 (US). **AMPHLETT, Godfrey, W.** [US/US]; 8 1/2 Ash Street Place, Cambridge, MA 02138 (US).
- (74) Agents: **DUK, Jennifer, M.** et al.; Leydig, Voit & Mayer, Ltd., Suite 4900, Two Prudential Plaza, 180 North Stetson Avenue, Chicago, IL 60601-6780 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
5 July 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PROCESS FOR PREPARING MAYTANSINOID ANTIBODY CONJUGATES

(57) Abstract: The invention provides a process for preparing a cell-binding agent chemically coupled to a drug. The process comprises covalently attaching a linker to a cell-binding agent, a purification step, conjugating a drug to the cell-binding agent and a subsequent purification step.



WO 2007/024536 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/031653

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/057163 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; MAZZOLA GERGORY L [US]; WANG WILLIAM K []) 17 July 2003 (2003-07-17) page 9, lines 16,17; claims 1-8; examples 1,2,7; tables 1,2 page 10, lines 10-20	1-3, 8-18,20, 22-25, 28-37, 39,41
X	WO 02/098897 A2 (CORNELL RES FOUNDATION INC [US]) 12 December 2002 (2002-12-12) example 15	1,2,7, 9-12, 14-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 2007

Date of mailing of the international search report

03/04/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

GONZALEZ RAMON, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/031653

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/102132 A2 (GENETECH INC [US]; FAHNER ROBERT LEE [US]; FOLLMAN DEBORAH [US]; LEBRE) 11 December 2003 (2003-12-11) page 19 page 29, paragraph 3; example 2	1-41
Y	OKAMOTO K ET AL: "THERAPEUTIC EFFECT OF ANSAMITOCIN TARGETED TO TUMOR BY A BISPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY" JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, JAPANESE CANCER ASSOCIATION, TOKYO, JP, vol. 83, no. 7, July 1992 (1992-07), pages 761-768, XP008031957 ISSN: 0910-5050 abstract see discussion page 763, column 1, paragraph 3; figure 2	1-41
A	WO 02/094325 A2 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; ADOLF GUENTHER [AT]; HEIDER KARL-HEINZ) 28 November 2002 (2002-11-28) page 25; claims 23,26,27,29	1-41
Y	WO 01/24763 A2 (IMMUNOGEN INC [US]; CHARI RAVI V J [US]) 12 April 2001 (2001-04-12) page 16, paragraph 3; example 1	1-41
Y	WO 2004/103272 A2 (IMMUNOGEN INC [US]; WIDDISON WAYNE C [US]; CHARI RAVI V J [US]) 2 December 2004 (2004-12-02) page 59; claims 74,76,94,96; figures 5a-5d; examples 5b-5d,9,12	1-41
Y	CHRISTY C ET AL: "High-performance tangential flow filtration: a highly selective membrane separation process" DESALINATION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 144, no. 1-3, 10 September 2002 (2002-09-10), pages 133-136, XP004386208 ISSN: 0011-9164 see conclusions abstract	1-41
P,X	WO 2005/094882 A (MILLENNIUM PHARM INC [US]; HORVATH CHRISTOPHER J [US]; WEBB IAIN J [US]) 13 October 2005 (2005-10-13) examples 15,16; table 7	1,2,7, 9-12, 14-22
P,Y	WO 2005/117986 A2 (GENETECH INC [US]; EBENS JR ALLEN J [US]; JACOBSON FREDERIC S [US]; P) 15 December 2005 (2005-12-15) page 45; examples 3,4	1-41
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/031653

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	WO 2005/077090 A2 (SEATTLE GENETICS INC [US]; DUFFY ROBERT [US]; POWERS RICK [US]) 25 August 2005 (2005-08-25) page 19, paragraph 1; claims 7-10, 18; figure 1 -----	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/031653

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

- 3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

- 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

- 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-9,14-28, 33-41 in part; 10-13, 29-32 complete

A process for preparing a conjugate comprising a cell binding agent chemically coupled to a drug wherein the cell binding agent is an antibody, which process comprises the steps as listed in claim 1. Excluding the subject matter of invention 2.

2. claims: 1-9,14-28, 33-41 in part

A process for preparing a conjugate comprising a cell binding agent chemically coupled to a drug wherein the cell binding agent is selected from the group consisting of interferons, interleukin 2, interleukin 3, interleukin 4, interleukin 6, insulin, EGF, TGF, FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF, transferrin, which process comprises the steps as listed in claim 1. Excluding the subject matter of invention 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/031653

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03057163	A2	17-07-2003	AU 2003201824 A1 EP 1467758 A2 JP 2005532258 T	24-07-2003 20-10-2004 27-10-2005
WO 02098897	A2	12-12-2002	CA 2447695 A1 EP 1392360 A2 JP 2004532639 T MX PA03010804 A	12-12-2002 03-03-2004 28-10-2004 22-11-2004
WO 03102132	A2	11-12-2003	AU 2003265235 A1 CA 2478925 A1 EP 1501369 A2 JP 2005524092 T	19-12-2003 11-12-2003 02-02-2005 11-08-2005
WO 02094325	A2	28-11-2002	BG 108366 A BR 0209862 A CA 2443438 A1 CN 1509187 A CZ 20033477 A3 EE 200300568 A EP 1258255 A1 HR 20030932 A2 HU 0400046 A2 JP 2004529963 T MX PA03010432 A NO 20035108 A NZ 530167 A PL 365480 A1 SK 15582003 A3 YU 91503 A ZA 200307364 A	30-09-2004 08-06-2004 28-11-2002 30-06-2004 12-05-2004 15-04-2004 20-11-2002 30-04-2004 28-04-2004 30-09-2004 02-04-2004 17-11-2003 28-10-2005 10-01-2005 06-04-2004 25-05-2006 20-04-2004
WO 0124763	A2	12-04-2001	AU 775373 B2 AU 7988500 A CA 2385528 A1 EP 1229934 A2 JP 2003528034 T US 2006233811 A1	29-07-2004 10-05-2001 12-04-2001 14-08-2002 24-09-2003 19-10-2006
WO 2004103272	A2	02-12-2004	AU 2004240541 A1 BR PI0410748 A CA 2525130 A1 EP 1651162 A2 KR 20060003120 A MX PA05011811 A	02-12-2004 27-06-2006 02-12-2004 03-05-2006 09-01-2006 17-02-2006
WO 2005094882	A	13-10-2005	NONE	
WO 2005117986	A2	15-12-2005	AU 2005249490 A1 CA 2567520 A1 EP 1753463 A2	15-12-2005 15-12-2005 21-02-2007
WO 2005077090	A2	25-08-2005	US 2005175619 A1	11-08-2005

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

CAMPO DE LA INVENCION

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

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 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 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 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. 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, mejorando así la tolerancia del fármaco en el paciente.

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

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.

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.

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

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

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 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 tangencial, cromatografía por absorción, filtración por adsorción,

57

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 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 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 segunda mezcla purificada.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona un proceso para preparar conjugados de fármaco-agente de enlace celular 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, 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 monoméricas, y/o (b) el nivel de fármaco libre en la preparación del conjugado es de menos de 2 % (en relación al fármaco total).

A este respecto, el proceso de la invención comprende (a) modificar el agente de enlace celular con un 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 ligantes enlazados a los mismos desde otros componentes de la primera mezcla y así preparar una primera mezcla purificada de agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos, (c)conjuguar

un fármaco a los agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos en la primera mezcla purificada haciendo reaccionar los agentes de enlace celular que tengan ligantes enlazados a los mismos con el fármaco en una solución que tenga un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para preparar una segunda mezcla que comprenda (i) agente de enlace celular químicamente acoplado a través del ligante al fármaco, (ii) fármaco libre, y (iii) sub-productos de reacción, y (d) someter la segunda mezcla a filtración de flujo tangencial, cromatografía de adsorción, filtración de adsorción, 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.

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.

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

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 (IMAC), cromatografía de ligando teñido, cromatografía

por afinidad, cromatografía en fase inversa, y combinaciones de las mismas. Ejemplos de resinas de hidroxiapatita adecuadas incluyen hidroxiapatita cerámica (CHT de tipo I y de Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), hidroxiapatita HA 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 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 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, 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).

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.

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 de metales y/o de oxígeno a partir de la mezcla de reacción, así como también adición opcional de antioxidantes o el uso de ligantes con más grupos desplazables reactivos, o adición de fármaco en más de una alícuota, para permitir la reacción eficiente en una situación tal.

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

El método de la invención puede incluir opcionalmente la adición de sacarosa en la etapa de conjugación, usada en el método de la invención para

incrementar la solubilidad y la recuperación de conjugados de fármaco-agente de enlace celular. Deseablemente, la sacarosa es añadida a una concentración de aproximadamente 0.1 % (peso/volumen) a aproximadamente 20 % (peso/volumen) (por ejemplo, aproximadamente 0.1 % (peso/volumen), aproximadamente 5 % (peso/volumen) aproximadamente 10 % (peso/volumen) aproximadamente 15 % (peso/volumen), o aproximadamente 20 % (peso/volumen)). Preferiblemente, la sacarosa es añadida a una concentración de aproximadamente 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. 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. El agente de enlace celular puede ser cualquier agente adecuado que enlace a una célula, típicamente y preferiblemente una célula animal (por ejemplo, una célula humana). El agente de enlace celular preferiblemente es un péptido o un polipéptido. Los agentes de enlace celular adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos), linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas 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.

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.

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, Köhler & Milstein, Eur J. Immunol., 5: 511-519 (1976), Harlow y Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH 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 inmunsorbente 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).

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 Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2002/0197266 A1).

Mientras que sea la selección ideal para aplicaciones terapéuticas en humanos, anticuerpos humanos, particularmente anticuerpos monoclonales humanos, 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 conjugado fármaco-anticuerpo. Para eliminar estas complicaciones, un anticuerpo monoclonal, preferiblemente no es reconocido como "extraño" por el sistema inmune humano.

Para este fin, puede usarse la exposición del 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 (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3^a. 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.

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. 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,

85

Janeway y colaboradores, supra, y Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2002/0197266 A1).

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)).

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)).

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).

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.

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 en el conjugado.

Anticuerpos particularmente preferidos son anticuerpos monoclonales humanizados, ejemplos de los cuales incluyen huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatumumab, sibrotuzumab, y rituzumab (ver por ejemplo, las Patentes 5,639,641 y 5,665,357, Solicitud de Patente Provisional U.S. No. 60/242,332 (la cual está relacionada con la Publicación de Solicitud de Patente No. 2005/0118183 A1), Solicitud de Patente Internacional WO 02/16401, Pedersen y colaboradores, supra, Roguska y colaboradores, supra, Liu y colaboradores, supra, Nadler y colaboradores, supra, Colomer y colaboradores, Cancer Invest., 19: 49-56

(2001), Heider y colaboradores, Eur. J. Cancer, 31^a:2385-2391 (1995), Welt y colaboradores, J. Clin. Oncol., 12: 1193-1203 (1994), y Maloney y colaboradores, Blood, 90: 2188-2195 (1997)). Más preferiblemente, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal humanizado huN901 o el anticuerpo monoclonal humanizado huMy9-6. Otros anticuerpos preferidos incluyen CNT095, huDS6, huB4, y huC242. Se conocen en el arte otros anticuerpos monoclonales humanizados y pueden ser usados en conexión con la invención.

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.

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 maytansinoles son compuestos que inhiben la formación de microtúbulos y son muy tóxicos para células de mamíferos. Los ejemplos de análogos de

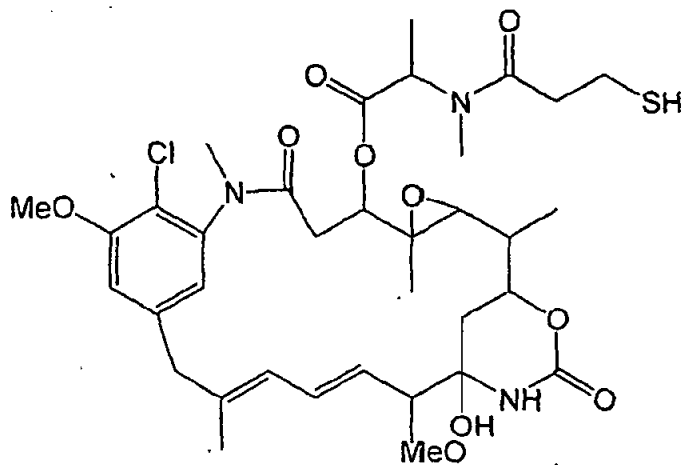
maytansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maytansinoides se describen en, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 4,256,746, 4,294,757, 4,307,016, 4,313,946, 4,315,929, 4,322,348, 4,331,598, 4,361,650, 4,362,663, 4,364,866, 4,424,219, 4,371,533, 4,450,254, 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, y 6,333,410.

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

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.

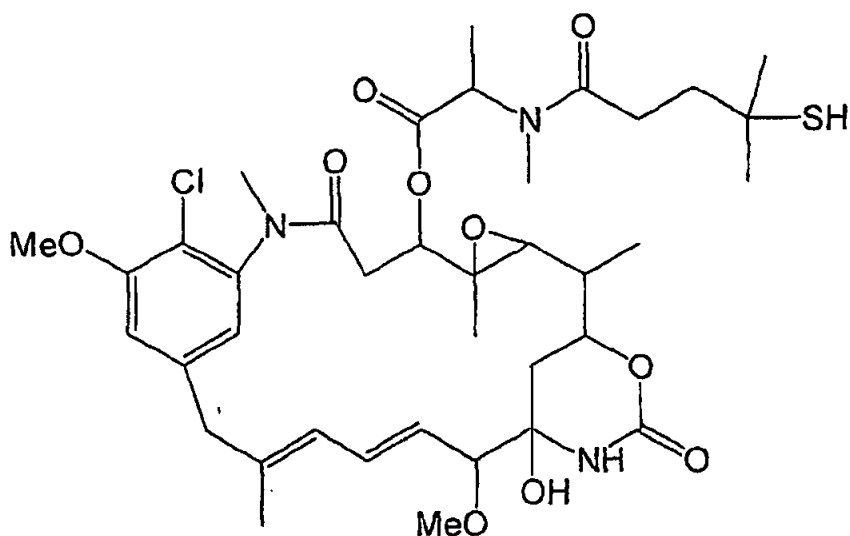
4,450,254) (preparado a partir de *Nocardia*), (4) C-15-hidroxi/aciloxi (Patente U.S. No. 4,364,866) (preparado por medio de la conversión de maytansinol por medio de *Streptomyces*), (5) C-15-metoxi (Patente U.S. No. 4,313,946) (aislado a partir de *Trevia mediflora*), (6) C-18-N-desmetilo (Patentes U.S. Nos. 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).

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).



(I)

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):

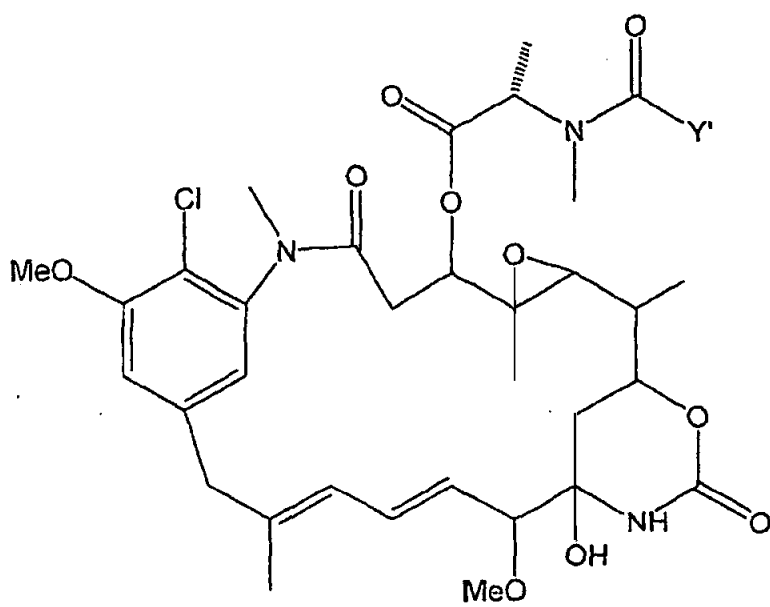


(II)

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

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



(III),

en donde Y' representa

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

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

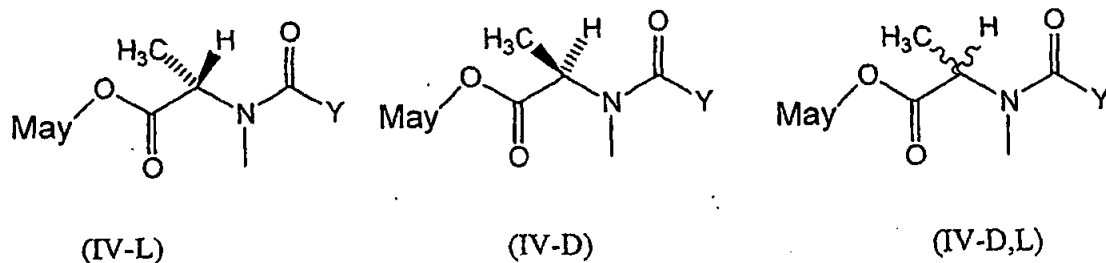
en donde R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} , y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico o ramificado que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical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

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

o lineal que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

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 $-SCH_3$, y (d) R_1 y R_2 son metilo, y Z es $-SCH_3$.

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



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

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

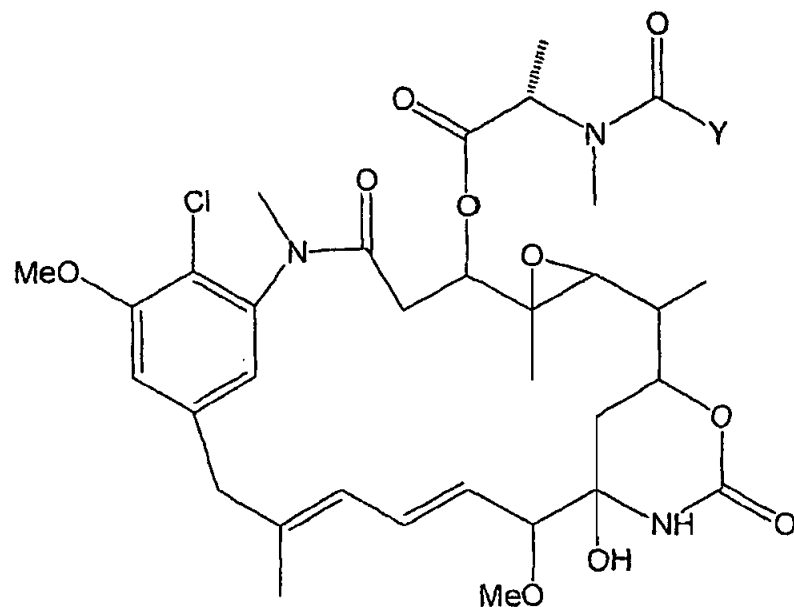
en donde l, m, y n son cada uno independientemente un entero desde 1 a 5, y además n puede ser cero,

en donde Z es H, SR, o COR en donde R es alquilo o alqueno lineal o ramificado que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno 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.

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.

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

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

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

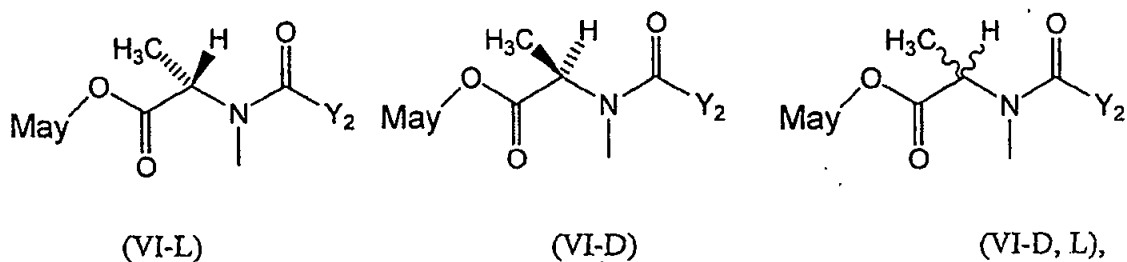
átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

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

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

Modalidades preferidas de la Fórmula (V) incluyen compuestos de Fórmula (V) 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, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

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



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

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

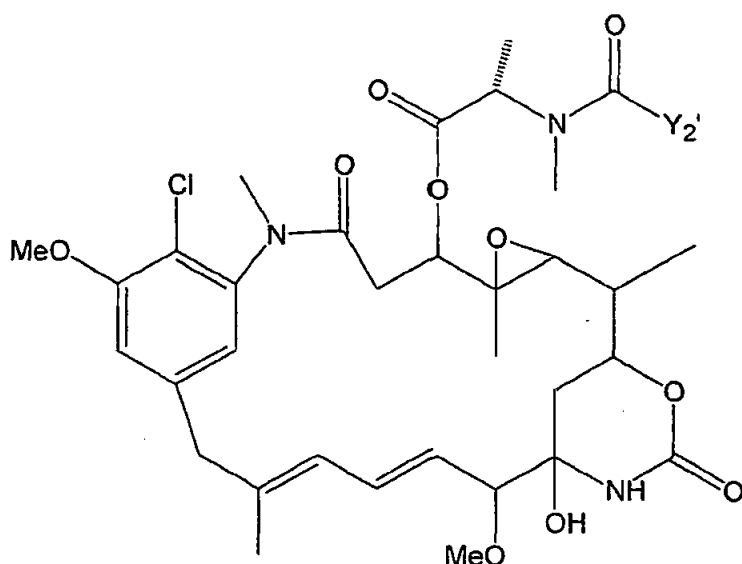
en donde R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico o ramificado que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático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

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

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

sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde May es un maytansinoide.

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



(VII),

en donde Y₂' representa

$(CR_7R_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C=C)_q A_r (CR_5R_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C=C)_s B_t (CR_3R_4)_n - CR_1R_2SZ$, 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 alquenilo cíclico que tenga desde 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R₂ también puede ser H,

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

sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

en donde R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{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,

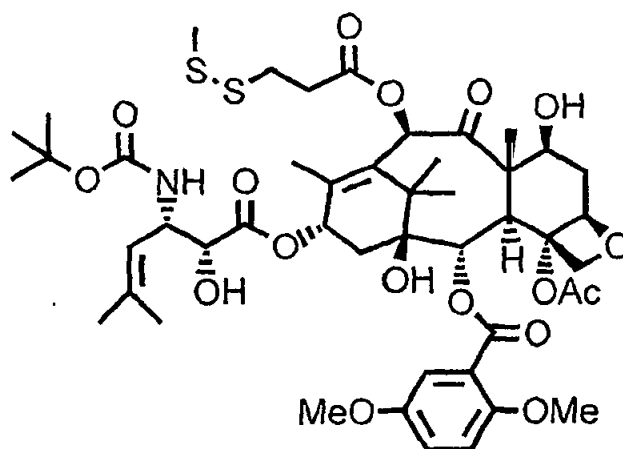
en donde l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente cero o un entero desde 1 a 5, a condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s, y t no sean cero a la vez, y en donde Z2 es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tenga desde 1 a 10 átomos de carbono, alquilo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

Modalidades preferidas de la Fórmula (VII) incluyen compuestos de Fórmula (VI) en donde R1 es H y R2 es metilo.

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 usados en conjugados de agentes de enlace celular.

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



(VIII)

Métodos para sintetizar taxanos que pueden ser usados en el contexto de la invención, junto con métodos para conjugar taxanos a agentes de enlace celular tales

como anticuerpos, son descritos en detalle en las Patentes U.S. Nos. 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, 6,436,931, 6,596,757, 6,706,708, y 6,716,821, y la Publicación de Solicitud de patente U.S. No. 2004/0024049 A1.

El citotóxico también puede ser CC-1065 o un derivado del mismo. CC-1065 es un potente antibiótico anti-tumoral aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1000 veces más potente in vitro que fármacos anti-cáncer comúnmente usados, tales 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 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 ciclopropapirrolóindol (CPI) y la actividad de enlace reside en las dos subunidades pirrolóindol de CC-1065.

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

105

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, 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 muerte celular.

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 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 humanos

(ver por ejemplo, Chari y colaboradores, cancer Res., 55: 4079-4084 (1995)).

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 en la Publicación de Solicitud de patente No. 2003/0195365 A1.

Fármacos tales como el metotrexate, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalano, mitomicina C, clorambucil, calicheamicina, 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 usados como el fármaco.

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 contruidos usando una reacción de intercambio de

disulfuro entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco. Las moléculas de fármaco también pueden ser enlazadas a un agente de enlace celular a través de una molécula portadora intermediaria tal como albúmina de suero.

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

es proporcionado por el reactivo reticulador, mientras que el otro es proporcionado por la cadena lateral de DM1.

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

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

lábiles son enlaces fragmentables a pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimentos intracelulares, tales como 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)).

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 N₂ 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-

110

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.

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 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 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.

100

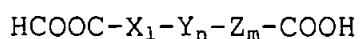
jdh

Reactivos reticuladores adecuados que forman 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 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 -maleimidoundecanoico (KMUA), éster N- succinimidílico del ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster N- hidroxisuccinimida del ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster m-maleimidobenzoyl- N- hidroxisuccinimida (MBS), éster N. (α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), 6- (β -maleimidopropionamido)hexanoato de succinimidilo (SMPH), 4- (p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), e isocianato de N- (p- maleimidofenilo) (PMPI). Reactivos reticuladores que comprenden una porción basada en haloacetilo incluyen 4- (iodoacetil)- aminobenzoato de N-

113

succinimidilo (SIAB), iodoacetato de N- succinimidilo (SIA), bromoacetato de N- succinimidilo (SBA), y 3-(bromoacetamido) propionato de N- succinimidilo (SBAP).

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



(IX)

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

Muchos de los ligantes no fragmentables descritos en la presente se describen en detalle en la Solicitud de

114

Patente No. 10/960,602, que corresponde a la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2005/0169933 A1.

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.

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.

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

EJEMPLO 1

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

118

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 de resina SephadexTM 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 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 UltracelTM, Millipore, Billerica, MA). Ambas muestras fueron conjugadas con DM1 (exceso molar de 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 %.

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

104

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.

Los datos resultantes se exponen en la Tabla 1.

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

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

Como se muestra en la Tabla 1, el uso de TFF produjo el fármaco conjugado producto de al menos calidad

117

equivalente al proceso de cromatografía no adsorbente (G25), mientras que sea más conveniente y transportable a escala.

EJEMPLO 2

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

El anticuerpo huB4 fue modificado con 4- (2-piridilditio) butanoato de N- succinimidilo (SPDB, exceso molar de 5.4 veces) por 120 minutos a temperatura ambiente en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH. De 6.5) que contenía 50 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, y etanol al 5 %. En un primer grupo, la mezcla de reacción fue purificada usando la resina Sephadex™ G25F como se describió en el Ejemplo 1. En un segundo grupo, la mezcla de reacción fue cargada sobre una columna de cerámica hidroxapatita (CHT), Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), la cual fue equilibrada en 12.5 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5) y se eluyó con 80 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5).

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

106

118

rendimiento de 89 % y una proporción de ligante/anticuerpo de 4.2.

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.

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.

Los datos obtenidos en este ejemplo demuestran que puede usarse la cromatografía de adsorción para purificar

un anticuerpo modificado con un reactivo de modificación heterobifuncional.

EJEMPLO 3

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

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.

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

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.

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

125

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 %.

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

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

EJEMPLO 4

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

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 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 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 %.

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

SephadexTM G25F equilibrada y eluida en 50 mM de regulador de fosfato de potasio (pH de 6.5) que contenía 50 mM de NaCl.

En ambos grupos, se determinaron las proporciones de enlazador(anticuerpo por tratamiento con ditiotreitól para liberar piridina-2-tiona, la cual tuvo un coeficiente de extinción de 8,00 M⁻¹ cm⁻¹ a 343 nM. Se determinaron espectrofotométricamente las relaciones de fármaco/anticuerpo (longitudes de onda de 280 nm y 252 nm) para la etapa de conjugación.

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

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

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

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

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

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

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 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 fue PBS con 2 mM de EDTA.

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 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 ditiotreitól para librar piridin-2-tiona, la cual tuvo un coeficiente de extinción estándar de $8,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 343 nm. Las proporciones de fármaco/anticuerpo fueron determinadas espectrofotométricamente (longitudes de onda de 280 nm y 252 nm) para la etapa de conjugación. El monómero conjugado, especies de alto peso molecular, y especies de bajo peso molecular fueron determinadas por SEC - HPLC

usando una columna TSKG3000WXL equilibrada y desarrollada en regulador de fosfato de potasio 0.2 M (pH. De 7) que contenía cloruro de potasio 0.2 M e isopropanol al 20 %.

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

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

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

- A = pH del regulador
- B = Exceso molar de SPP
- C = L/A, proporción de ligante/anticuerpo
- D = D/A, proporción de fármaco/anticuerpo
- E = Monómero (%)
- F = Especies de peso molecular alto (%)
- G = Especies de bajo peso molecular (%)
- H = Rendimiento de la etapa de conjugación (%)

Los datos expuestos en la Tabla 6, demuestran que la conjugación de BIWA modificado con SPP con DM1 fue

eficiente a pH inferior a 6.0, en comparación a la de pH de 4.5. Las cantidades de ligante y de fármaco, específicamente ligante de SPP y DM1, requeridas para alcanzar una proporción de fármaco/anticuerpo final 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

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.

En un ejemplo de adición de fármaco después del 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 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.

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

Las proporciones de ligante/anticuerpo (L/A) fueron determinadas por tratamiento con ditiotreitól para liberar piridin-2-tioná, la cual tuvo un coeficiente de

extinción estándar de 8,080 M⁻¹ cm⁻¹ a 343 nM. Las proporciones de fármaco/anticuerpo (D/A) y los rendimientos fueron determinados espectrofotométricamente (longitudes de onda de 280 nm y 252 nm) para la etapa de conjugación. Los porcentajes de monómero fueron ensayados por SEC-HPLC. Los porcentajes de fármaco libre fueron ensayados por HPLC sobre una columna Hisep. Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 7.

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

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

L/A, proporción de ligante/anticuerpo

D/A, proporción de fármaco/anticuerpo

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

EJEMPLO 7

Este ejemplo demuestra un medio mejorado de purificar el anticuerpo que ha sido modificado con un reactivo de modificación bifuncional y luego conjugado con un maytansionide. El anticuerpo huN901 modificado con SPP (exceso molar de 7 veces) y purificado sobre resina SephadexTM G25F, como se describió en el Ejemplo 1, fue conjugado con el maytansinoide DM1 (exceso molar de 1.7 veces sobre el ligante, disuelto en dimetilacetamida (DMA), concentración final de 3 %).

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

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.

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).

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).

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).

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).

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).

Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 8.

**Tabla 8: Comparación de la Etapa de Purificación
Conjugación**

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

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.

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.

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.

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.

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.

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 abracado 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:

REIVINDICACIONES

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

(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,

(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,

(c) conjugar un fármaco 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 de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para preparar una segunda mezcla que comprenda

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

(ii) fármaco libre, y

(iii) sub-productos de reacción, y

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

2.- El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la resina para cromatografía por adsorción es seleccionada del grupo que consiste de hidroxiapatita, 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 (IMAC), cromatografía de ligando teñido, cromatografía por afinidad, cromatografía en fase inversa, y combinaciones de 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 resina para 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 tangencial es utilizada en la etapa (b) y la etapa (c) es efectuada a un pH de entre 6 a 6.5, la resina para cromatografía por adsorción utilizada en la etapa (d) no es una resina de intercambio iónico.

6.- El proceso de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la resina para 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 a aproximadamente 6.

8.- El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la solución

en la etapa (c) tiene un pH desde aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9.

9.- El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el agente de enlace celular es seleccionado del grupo que consiste de anticuerpo, interferones, interleuquina 2 (IL-2), 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.

10.- El proceso de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo.

11.- El proceso de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

12.- El proceso de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.

13.- El proceso de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste de huN901, HuMy9-6, huB-4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, CNT095, huDS6, y rituzumab.

14.- El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque el fármaco es un agente citotóxico.

15.- El proceso de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el agente citotóxico es seleccionado del grupo que consiste de maytansinoides, taxanos, y CC1065.

16.- El proceso de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el fármaco es un maytansinoide.

17.- El proceso de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el maytansinoide comprende un grupo tiol.

18.- El proceso de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el maytansinoide es DM1.

19.- El proceso de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el maytansinoide es DM4.

20.- El proceso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado porque el agente de enlace celular está químicamente acoplado al fármaco vía enlaces químicos seleccionados del grupo que consiste de enlaces disulfuro, enlaces ácido lábiles, enlaces foto lábiles, enlaces lábiles a la peptidasa, enlaces tioéteres, y enlaces lábiles a la estearasa.

21.- El proceso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado porque la solución en la etapa (c) comprende sacarosa.

22.- El proceso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 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.

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

(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,

(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,

(c) conjugar un fármaco 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 de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 o un pH de aproximadamente 6.5 a 9 para preparar una segunda mezcla que comprenda

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

(ii) fármaco libre, y

(iii) sub-productos de reacción, y

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

24.- El proceso de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la resina para cromatografía por adsorción es seleccionada del grupo que consiste de hidroxiapatita, 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 (IMAC), cromatografía de ligando teñido, cromatografía por afinidad, cromatografía en fase inversa, y combinaciones de las mismas.

25.- El proceso de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la filtración de flujo tangencial es utilizada en las etapas (b) y (d).

26.- El proceso de conformidad con las reivindicaciones 23 o 24, caracterizado porque la resina para cromatografía por adsorción es utilizada en las etapas (b) y (d).

27.- El proceso de conformidad con las reivindicaciones 23 o 24, caracterizado porque la resina para cromatografía por adsorción es utilizada en la etapa (b) y la filtración de flujo tangencial es utilizada en la etapa (d).

28.- El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, caracterizado porque el agente de enlace celular es seleccionado del grupo que consiste de anticuerpo, inrterferones, interleuquina 2 (IL-2), 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.

29.- El proceso de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo.

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

31.- El proceso de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.

32.- El proceso de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste de huN901, HuMy9-6, huB-4, huC242, trastuzumab, bivatumumab, sibrotuzumab, CNT095, huDS6, y rituzumab.

33.- El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 32, caracterizado porque el fármaco es un agente citotóxico.

34.- El proceso de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque el agente citotóxico es seleccionado del grupo que consiste de maytansinoides, taxanos, y CC1065.

35.- El proceso de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el fármaco es un maytansinoide.

36.- El proceso de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque el maytansinoide comprende un grupo tiol.

37.- El proceso de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado porque el maytansinoide es DM1.

38.- El proceso de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el maytansinoide es DM4.

39.- El proceso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 38, caracterizado porque el agente de enlace celular está químicamente acoplado al fármaco vía enlaces químicos seleccionados del grupo que 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 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 regulador seleccionado del grupo que consiste de un regulador de citrato, un regulador de acetato, un regulador de succinato, y un regulador de fosfato.

1008

RESUMEN DE LA INVENCION

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

PCT REQUEST

Duplicate of Original

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.002.177 MT/FOP 20060101/0.20.4rc.2.7
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	253789
I	Title of Invention	PROCESS FOR PREPARING PURIFIED DRUG CONJUGATES
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	IMMUNOGEN, INC.
II-5	Address	128 Sidney Street Cambridge, Massachusetts 02139 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	617-995-2500
II-9	Facsimile No.	617-995-2510
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	DAI, Yong
III-1-5	Address	139 Oakdale Road Newton, Massachusetts 02461 United States of America
III-1-6	State of nationality	CN
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Duplicate of Original

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	WANG, Yong
III-2-5	Address	65 East Washington Street North Attleboro, Massachusetts 02760 United States of America
III-2-6	State of nationality	CN
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	JIN, Shengjin
III-3-5	Address	415 Arlington Street Acton, Massachusetts 01720 United States of America
III-3-6	State of nationality	CN
III-3-7	State of residence	US
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	MESHULAM, Deborah H.
III-4-5	Address	32 James Street #6 Brookline, Massachusetts 02446 United States of America
III-4-6	State of nationality	US
III-4-7	State of residence	US
III-5	Applicant and/or inventor	
III-5-1	This person is	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	AMPHLETT, Godfrey W.
III-5-5	Address	8 1/2 Ash Street Place Cambridge, Massachusetts 02138 United States of America
III-5-6	State of nationality	US
III-5-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Duplicate of Original

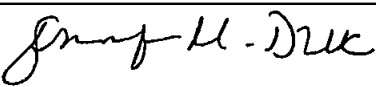
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	DUK, Jennifer M.
IV-1-2	Address	LEYDIG, VOIT & MAYER, LTD. Two Prudential Plaza, Suite 4900 180 North Stetson Avenue Chicago, Illinois 60601-6780 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	312-616-5600
IV-1-4	Facsimile No.	312-616-5700
IV-1-6	Agent's registration No.	52,838
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	LEYDIG, VOIT & MAYER, LTD.
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	24 August 2005 (24.08.2005)
VI-1-2	Number	60/710,858
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority claim of earlier national application	
VI-2-1	Filing date	04 May 2006 (04.05.2006)
VI-2-2	Number	60/797,713
VI-2-3	Country	US
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

253789

4/5

PCT REQUEST

Duplicate of Original

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description	35	-
IX-3	Claims	5	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	0	-
IX-7	TOTAL	46	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	DUK, Jennifer M.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

153

253789

5/5

PCT REQUEST

Duplicate of Original

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

142

PATENT COOPERATION TREATY

14

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2006/031653

International filing date (day/month/year)
14.08.2006

Priority date (day/month/year)
24.08.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K47/48

Applicant
IMMUNOGEN, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

LEVIN VOIT & MAYER

APR 05 2007

PAY/TM Due Date

7/3/07

LAH

JC

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

See form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

GONZALEZ RAMON, N

Telephone No. +31 70 340-3466



155

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2006/031653

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
- a. type of material:
- ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material:
- ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
- c. time of filing/furnishing:
- ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

144

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

156
International application No.
PCT/US2006/031653

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 1-41 in part

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 1-41 in part

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/031653

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☒ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>4-7,19,21,26,27,38,40</u>
	No: Claims	<u>1-3,8-18,20,22-25,28-37,39,41</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-41</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-41</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/031653

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)
and / or
2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)
see form 210

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

In the present application, the International Searching Authority has restricted the search under the following objections under Articles 5 and 6 PCT:

Claims 1-41 encompass a genus of compounds defined only by their function, namely "cell binding agent" "bifunctional crosslinking agent", "linker" (claims 1, 23); "cytotoxic agent" (claims 14, 32); "acid labile bonds", "photolabile bonds", "peptidase labile bonds", "esterase labile bonds" (claims 20, 39); wherein the relationship between the structural features of the members of the genus and said function have not been defined.

In the absence of such a relationship either disclosed in the as-filed application or which would have been recognized based upon information readily available to one skilled in the art, the skilled artisan would not know how to make and use compounds that lack structural definition.

The fact that one could have assayed a compound of interest using the described assays does not overcome this defect since one would have no knowledge beforehand as to whether or not any given compound (other than those that might be particularly disclosed in an application) would fall within the scope of what is claimed. It would require undue experimentation (be an undue burden) to randomly screen undefined compounds for the claimed activity.

Therefore, claims 1-41 do not fulfil the requirements of Art. 5 and Art. 6 PCT.

Moreover present claims 1-41 relate to compounds defined by reference to vague characteristics or properties, namely: "a drug" (claims 1, 23); "antibody" (claims 9-12, 28-31).

The claims cover all compounds having these characteristics or properties, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds.

Support is only to be found in the present application for those parts relating to the compounds effectively disclosed in the examples and those specifically mentioned by chemical name in claims 13, 15-19, 21, 22, 32, 34-38, 40, 41 and as such has been the subject of the search.

No opinion will be formulated by the ISA in respect of subject-matter which is not covered by the search report (Rule 66.1(e) PCT).

Re Item IV

Lack of unity of invention

The present application lacks unity of invention (Rule 13.1 PCT) for the following reasons:

The problem underlying the present application is the limitation of existing conjugation processes, in particular for antibody-drug conjugates that lead to slow release of the drug, conjugate instability and the formation of undesirable degradation products, high and low molecular weight species of conjugate and precipitates (page 2, lines 7-11).

As solution to this problem a process for preparing a conjugate comprising cell binding agent of diverse chemical and pharmacological nature to a drug are proposed.

The common feature linking the different inventions together is the use of steps comprising a) an activation reaction of the cell binding agent followed by b) a chromatography step, c) conjugation to the drug and d) chromatography to purify the cell binding agent having drug bound thereto.

Prior art documents:

- WO03057163 discloses a process for preparing conjugates of c242 antibody with the maytansinoid DM1 comprising steps (a) to (d) as recited by present claim 1. TFF step and chromatographic step using hydroxyapatite column and SP-Sepharose are exemplified. The adjustment of the reaction pH is described to obtain the desired linker:Mab ratios. The reaction buffers used include acetate and succinate buffers. (see page 9, lines 16-17; page 10, lines 10-20; examples 1, 2, 7; claims 1-8; tables 1,2)

160

149

- WO02098897 discloses a process for preparing conjugates of J591 antibody with the maytansinoid DM1 comprising steps (a) to (d) as recited by present claim 1. The use of two steps of tangential flow filtration b) and d) are described. The buffer used is a phosphate buffer pH 6.0 and the reaction takes place in a 10% sucrose solution (see example 15)

The idea to provide the use of steps comprising a) an activation reaction of the cell binding agent followed by b) a chromatography step, c) conjugation to the drug and d) chromatography to purify the cell binding agent having drug bound thereto is known in view of the prior art, and cannot serve as single general inventive concept linking the individual subjects in which the application has been divided.

As there is no other technical feature which could fulfil the role of special technical feature in the sense of rule 13 PCT, the present application lacks unity of invention, containing the following subjects.

1. Claims 1-9, 14-28, 33-41 in part; 10-13, 29-32 complete

A process for preparing a conjugate comprising a cell binding agent chemically coupled to a drug wherein the cell binding agent is an antibody, which process comprises the steps as listed in claim 1. Excluding the subject matter of invention 2.

2. Claims 1-9, 14-28, 33-41 in part

A process for preparing a conjugate comprising a cell binding agent chemically coupled to a drug wherein the cell binding agent is selected from the group consisting of interferons, interleukin 2, interleukin 3, interleukin 4, interleukin 6, insulin, EGF, TGF, FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF, transferrin, which process comprises the steps as listed in claim 1. Excluding the subject matter of invention 1.

Rule 13.1 PCT requires that all the claimed alternatives have a common property or activity, and a common structure is present, i.e. a significant structural element is shared by all alternatives, or all alternatives belong to a recognised class of chemical compounds in the art to which the invention pertains. In the present case, the compounds defined by

the claims allegedly share a common therapeutic activity. Each of the groups of compounds listed, represents a mere alternative characterised by its own special technical feature, defining the contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art, which is the structurally distinctive feature of each group. There appears to be no technical relationship between the special technical features characterising the structurally different groups of compounds claimed in the present application. No further technical feature(s) can be identified which may be regarded as a special technical feature involved in the technical relationship between the different inventions.

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The following documents (D) are referred to in this communication:

- D1: WO 03/057163 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; MAZZOLA GREGORY L [US]; WANG WILLIAM K [US]) 17 July 2003
- D2: WO 02/098897 A2 (CORNELL RES FOUNDATION INC [US]) 12 December 2002
- D3: WO 03/102132 A2 (GENETECH INC [US]; FAHNER ROBERT LEE [US]; FOLLMAN DEBORAH [US]; LEBRE) 11 December 2003
- D4: OKAMOTO K ET AL: JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, JAPANESE CANCER ASSOCIATION, TOKYO, JP, vol. 83, no. 7, July 1992 (1992-07), pages 761-768, XP008031957.

Novelty (Art 33 (2) PCT)

The subject-matter of claims 1-3, 8-18, 20, 22-25, 28-37, 39, 41 is not novel in the sense of Article 33(2) PCT.

D1 discloses a process for preparing conjugates of c242 antibody with the maytansinoid DM1 comprising steps (a) to (d) as recited by present claim 1. TFF step and chromatographic step using hydroxyapatite column and SP-Sepharose are exemplified.

The adjustment of the reaction pH is described to obtain the desired linker:Mab ratios. The reaction buffers used include acetate and succinate buffers (see page 9, lines 16-17; page 10, lines 10-20; examples 1, 2, 7; tables 1, 2; claims 1-8)

Consequently the subject matter of present claims 1-3, 8-18, 20, 22-25, 28-37, 39, 41 as far as related to the first invention is not novel over D1

D2 discloses a process for preparing conjugates of J591 antibody with the maytansinoid DM1 comprising steps (a) to (d) as recited by present claim 1. The use of two steps of tangential flow filtration b) and d) are described. The buffer used is a phosphate buffer pH 6.0 and the reaction takes place in a 10% sucrose solution (see example 15)

Thereby rendering the subject matter of present claims 1, 2, 7, 9-12, 14-22 as far as related to the first invention not novel.

Inventive step (Art 33(3) PCT)

Should the applicant overcome the above raised objections, an inventive step has to be demonstrated for the subject matter of present claims 1-41 (Art 33(3) PCT).

According to the description (page 2, lines 7-11), the problem underlying the present application is the limitation of existing conjugation processes, in particular for antibody-drug conjugates that lead to slow release of the drug, conjugate instability and the formation of undesirable degradation products, high and low molecular weight species of conjugate and precipitates.

As solution to this problem a process for preparing a conjugate comprising a cell binding agent chemically coupled to a drug, which process comprises the steps as listed in claim 1 is proposed.

Previously discussed D1 discloses the preparation of conjugates of maytansinoids to antibodies comprising the steps a) to d) (see examples 1, 2, 7; claims 1-8)

The difference between D1 and the subject matter of present claims is the fact that the particular use of the adsorptive chromatography technique in both purification steps b) and d) as in claim 4 or the reverse order of the adsorptive chromatography and the tangential

flow filtration as in claim 6 is not explicitly disclosed in D1.

D3 describes the purification of antibodies and antibody conjugates exemplified for rhu Mab anti HER2 trastuzumab with a combination of non affinity chromatography and high performance tangential flow filtration HPTFF (see page 19; page 29, paragraph 3; examples 2, 3)

D4 discloses a bispecific mAb reactive to ansamitocin and TfR purified by a combination of hydrophobic column chromatography and hydroxyapatite high performance liquid chromatography (see abstract; discussion; page 763, col. 1, paragraph 3; figure 2).

Documents D3-D4, which can be considered equivalent documents for the assessment of inventive step of the present application, describe the process of separation of antibody conjugates including adsorptive chromatography techniques of non-ionic exchange nature as well as tangential flow filtration and therefore render obvious such modification in order to achieve the optimisation of properties of the conjugate obtained in D1.

Furthermore, the attention of the applicant is also drawn to the fact that all embodiments covered by the claims should satisfy the criteria of inventive step.

When the inventive step is solely based on the achievement of a technical effect, such as the rapid onset together with a sustained activity in vivo, substantially all embodiments should exhibit this effect.

However, it is evident that the number of compounds comprising groups encompassed under "cell binding agent" "bifunctional crosslinking agent", "linker" (claims 1, 23); "a drug" (claims 1, 23); "antibody" (claims 9-12, 28-31); "cytotoxic agent" (claims 14, 32); "acid labile bonds", "photolabile bonds", "peptidase labile bonds", "esterase labile bonds" (claims 20, 39) is such that it is unlikely that all of them possess the effect claimed.

Therefore, as part of the subject matter of claims 1-41 does not exhibit this particular technical effect in a credible manner, said subject matter cannot involve inventive step.

Consequently an inventive step for the subject matter of claims 1-41 cannot be acknowledged.

165

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO2005/094882	13.10.2005	03.03.2004	03.04.2004

The PCT application WO2005/094882 published on 13.10.2005 claims the priority date of 03.03.2004.

This earlier application shows: Process for preparing conjugates of J591 antibody with the maytansinoid DM1 comprising steps (a) to (d) as recited by present claim 1. The buffer used is a phosphate buffer pH 6.0 and the reaction takes place in a 10% sucrose solution. The chromatographic steps are performed in Sephadex G25 and a final step of TFF of the conjugate obtained is described (see examples 15, 16; table 7)

Thus, it would be prejudicial to the novelty of the subject-matter of claims 1, 2, 7, 9-12, 14-22 of the present application.

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS CPRTENFRDE

PATENT COOPERATION TREATY

To:

LVM

253789

cc:

JMD

167

Immunogen

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

LEYDIG, VOIT & MAYER, LTD.
Attn. Duk, Jennifer M.
Two Prudential Plaza, Suite 4900
180 North Stetson Avenue
Chicago, Illinois 60601-6780
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year)	03/04/2007
Applicant's or agent's file reference 253789	LEYDIG, VOIT & MAYER RECEIVED
International application No. PCT/US2006/031653	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International filing date (day/month/year)	14/08/2006
Applicant IMMUNOGEN, INC.	APR 05 2007 PAY/TM Due Date 5/5/07 Cite Art to US # 253788

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46).

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Jens Ambrosch
--	-------------------------------------

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 253789	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US2006/031653	International filing date (day/month/year) 14/08/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 24/08/2005
Applicant IMMUNOGEN, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

PROCESS FOR PREPARING MAYTANSINOID ANTIBODY CONJUGATES

LAH

JC

**LEYDIG, VOIT & MAYER
RECEIVED**

APR 05 2007

PAY/TM Due Date _____

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/031653

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/057163 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; MAZZOLA GERGORY L [US]; WANG WILLIAM K []) 17 July 2003 (2003-07-17) page 9, lines 16,17; claims 1-8; examples 1,2,7; tables 1,2 page 10, lines 10-20 -----	1-3, 8-18,20, 22-25, 28-37, 39,41
X	WO 02/098897 A2 (CORNELL RES FOUNDATION INC [US]) 12 December 2002 (2002-12-12) example 15 ----- -/-	1,2,7, 9-12, 14-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 2007

Date of mailing of the international search report

03/04/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

GONZALEZ RAMON, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/031653

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/102132 A2 (GENETECH INC [US]; FAHNER ROBERT LEE [US]; FOLLMAN DEBORAH [US]; LEBRE) 11 December 2003 (2003-12-11) page 19 page 29, paragraph 3; example 2	1-41
Y	OKAMOTO K ET AL: "THERAPEUTIC EFFECT OF ANSAMITOCIN TARGETED TO TUMOR BY A BISPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY" JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, JAPANESE CANCER ASSOCIATION, TOKYO, JP, vol. 83, no. 7, July 1992 (1992-07), pages 761-768, XP008031957 ISSN: 0910-5050 abstract see discussion page 763, column 1, paragraph 3; figure 2	1-41
A	WO 02/094325 A2 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; ADOLF GUENTHER [AT]; HEIDER KARL-HEINZ) 28 November 2002 (2002-11-28) page 25; claims 23,26,27,29	1-41
Y	WO 01/24763 A2 (IMMUNOGEN INC [US]; CHARI RAVI V J [US]) 12 April 2001 (2001-04-12) page 16, paragraph 3; example 1	1-41
Y	WO 2004/103272 A2 (IMMUNOGEN INC [US]; WIDDISON WAYNE C [US]; CHARI RAVI V J [US]) 2 December 2004 (2004-12-02) page 59; claims 74,76,94,96; figures 5a-5d; examples 5b-5d,9,12	1-41
Y	CHRISTY C ET AL: "High-performance tangential flow filtration: a highly selective membrane separation process" DESALINATION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 144, no. 1-3, 10 September 2002 (2002-09-10), pages 133-136, XP004386208 ISSN: 0011-9164 see conclusions abstract	1-41
P,X	WO 2005/094882 A (MILLENNIUM PHARM INC [US]; HORVATH CHRISTOPHER J [US]; WEBB IAIN J [US]) 13 October 2005 (2005-10-13) examples 15,16; table 7	1,2,7, 9-12, 14-22
P,Y	WO 2005/117986 A2 (GENENTECH INC [US]; EBENS JR ALLEN J [US]; JACOBSON FREDERIC S [US]; P) 15 December 2005 (2005-12-15) page 45; examples 3,4	1-41
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/031653

172

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	WO 2005/077090 A2 (SEATTLE GENETICS INC [US]; DUFFY ROBERT [US]; POWERS RICK [US]) 25 August 2005 (2005-08-25) page 19, paragraph 1; claims 7-10,18; figure 1 -----	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/031653

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

- 3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

- 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

- 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-9,14-28, 33-41 in part; 10-13, 29-32 complete

A process for preparing a conjugate comprising a cell binding agent chemically coupled to a drug wherein the cell binding agent is an antibody, which process comprises the steps as listed in claim 1. Excluding the subject matter of invention 2.

2. claims: 1-9,14-28, 33-41 in part

A process for preparing a conjugate comprising a cell binding agent chemically coupled to a drug wherein the cell binding agent is selected from the group consisting of interferons, interleukin 2, interleukin 3, interleukin 4, interleukin 6, insulin, EGF, TGF, FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF, transferrin, which process comprises the steps as listed in claim 1. Excluding the subject matter of invention 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/031653

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03057163	A2	17-07-2003	AU 2003201824 A1 24-07-2003 EP 1467758 A2 20-10-2004 JP 2005532258 T 27-10-2005
WO 02098897	A2	12-12-2002	CA 2447695 A1 12-12-2002 EP 1392360 A2 03-03-2004 JP 2004532639 T 28-10-2004 MX PA03010804 A 22-11-2004
WO 03102132	A2	11-12-2003	AU 2003265235 A1 19-12-2003 CA 2478925 A1 11-12-2003 EP 1501369 A2 02-02-2005 JP 2005524092 T 11-08-2005
WO 02094325	A2	28-11-2002	BG 108366 A 30-09-2004 BR 0209862 A 08-06-2004 CA 2443438 A1 28-11-2002 CN 1509187 A 30-06-2004 CZ 20033477 A3 12-05-2004 EE 200300568 A 15-04-2004 EP 1258255 A1 20-11-2002 HR 20030932 A2 30-04-2004 HU 0400046 A2 28-04-2004 JP 2004529963 T 30-09-2004 MX PA03010432 A 02-04-2004 NO 20035108 A 17-11-2003 NZ 530167 A 28-10-2005 PL 365480 A1 10-01-2005 SK 15582003 A3 06-04-2004 YU 91503 A 25-05-2006 ZA 200307364 A 20-04-2004
WO 0124763	A2	12-04-2001	AU 775373 B2 29-07-2004 AU 7988500 A 10-05-2001 CA 2385528 A1 12-04-2001 EP 1229934 A2 14-08-2002 JP 2003528034 T 24-09-2003 US 2006233811 A1 19-10-2006
WO 2004103272	A2	02-12-2004	AU 2004240541 A1 02-12-2004 BR PI0410748 A 27-06-2006 CA 2525130 A1 02-12-2004 EP 1651162 A2 03-05-2006 KR 20060003120 A 09-01-2006 MX PA05011811 A 17-02-2006
WO 2005094882	A	13-10-2005	NONE
WO 2005117986	A2	15-12-2005	AU 2005249490 A1 15-12-2005 CA 2567520 A1 15-12-2005 EP 1753463 A2 21-02-2007
WO 2005077090	A2	25-08-2005	US 2005175619 A1 11-08-2005

163
176

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-019768- -00000-0000

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



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente: ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudia M. Nova Cortes

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

266
127

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D^a ALEMAN DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No.	8 19768
	Solicitud internacional	PCT/US2006/031653
	Fecha inicio fase nacional	24/03/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	- 4970

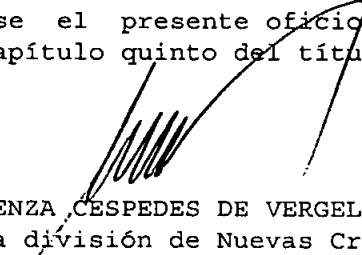
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se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

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

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

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

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


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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 11 ABR. 2008
adpall