



(12) PATENT

(11) 347360

(13) B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 31/395 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 33/04 (2006.01)

A61P 33/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

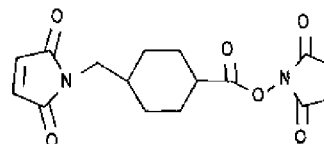
A61P 37/06 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20150450	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.10.12 PCT/US2004/030917
(22)	Inng.dag	2015.04.15	(85)	Videreføringsdag	2015.04.15
(24)	Løpedag	2004.10.12	(30)	Prioritet	2003.10.10, US, 60/509,901
(41)	Alm.tilgj	2006.04.21			
(45)	Meddelt	2023.09.25			
(62)	Avdelt fra	20061772, 2006.04.21			
(73)	Innehaver	ImmunoGen Inc., 830 Winter Street, MA02451-1477 WALTHAM, USA			
(72)	Oppfinner	Ravi V J Chari, 174 Winchester Street, MA02461 NEWTON, USA Rita Steeves, 68 Collincote Street, MA02180 STONEHAM, USA Walter A Blättler, 197 Mason Terrace, MA02446 BROOKLINE, USA Wayne Widdison, 7 Holden Road, MA02478 BELMONT, USA			
(74)	Fullmektig	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Cellebindingsmiddelmaytansinoid-konjugat med formel trastuzumab-SMCC-DM1 eller trastuzumab-SIABDM1, fremgangsmåte for fremstilling av disse og en in vitro fremgangsmåte for å styre maytansinoider til en valgt cellepopulasjon eller for å eliminere celler, samt anvendelse.			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 1354896 A1 CHARI RAVI V.J. ET AL.; "Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs"; Cancer Research, vol. 52, nr. 1, 1992, s. 127-131, ISSN 0008-5472. WO 0124763 A2, WO 02098883 A1			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse tilkjenner en fremgangsmåte for å målsøke maytansinoider til en valgt cellepopulasjon, fremgangsmåten omfatter å kontakte en cellepopulasjon eller et vev som er mistenkt for å inneholde den valgte cellepopulasjonen med et cellebindingsmiddelmaytansinoidkonjugat, der ett eller fleremaytansinoider er kovalent bundet til cellebindingsmidlet via en ikke-kløyybar linker og der cellebindingsmidlet binder til celler i den valgte cellepopulasjonen.

SMCC (suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboxylat)



Oppfinnelsens område

Den foreliggende oppfinnelse vedrører cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugater med formelen trastuzumab-*N*-succinimidyl-4-(maleimido-metyl)sykloheksankarboksylat (SMCC)-*N*^{2'}-deacetyl-*N*^{2'}-(3-merkpto-1-oksopropyl)-maytansin (DM1) eller trastuzumab-*N*-succinimidyl-4-(iodoacetyl)-aminobenzoat (SIAB)-DM1, sammensetninger omfattende disse og dets anvendelse ved behandling av tumorer.

Oppfinnelsen angår også fremgangsmåter for fremstilling cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugatene.

Oppfinnelsen angår videre *in vitro* fremgangsmåter for å styre maytansinoider til en valgt cellepopulasjon eller for å eliminere celler.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Maytansinoider er svært cytotoksiske legemidler. Maytansin ble først isolert av Kupchan et al., fra den østafrikanske busken *Maytenus serrata* og ble vist å være 100 til 1000 ganger mer cytotoksisk enn konvensjonelle kreftkjemoterapeutiske midler slik som metotreksat, daunorubicin og vinkristin (US patentskrift 3 896 111). Etter dette ble det oppdaget at enkelte mikrober også produserer maytansinoider, slik som maytansinol og C-3-estere av maytansinol (US patentskrift 4 151 042). Syntetiske C-3-estere av maytansinol og analoger av maytansinol har også blitt rapportert [Kupchan et al., 21 J. Med. Chem. 31-37 (1978); Higashide et al. 270 Nature 721-722 (1977); Kawai et al., 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984)]. Eksempler på analoger av maytansinol fra hvilke C-3-estere har blitt fremstilt inkluderer maytansinol med modifiseringer på den aromatiske ringen (for eksempel deklor) eller på C-9, C-14 (for eksempel hydroksylert metylgruppe), C-15, C-18, C-20 og C-4,5.

De naturlig forekommende og syntetiske C-3-estere kan bli klassifisert i to grupper:

(a) C-3-estere med enkle karboksylsyrer (US patentskrift 4 248 870, 4 265 814, 4 308 268, 4 308 269, 4 309 428, 4 322 348 og 4 331 598), og

(b) C-3-estere med derivater av *N*-metyl-*L*-alanin (US patentskrift 4 137 230 og 4 260 608; og Kawai et al., 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984)).

Estere i gruppe (b) ble funnet å være mye mer cytotoksiske enn estere i gruppe (a).

Maytansin er en mitotisk inhibitor. Behandling av L1210-celler *in vivo* med maytansin har blitt rapportert å føre til at 67 % av disse cellene akkumulerer ved mitose. Ubehandlede kontrollceller ble rapportert å vise en mitotisk indeks som strakk seg fra mellom 3,2 til 5,8 % (Sieber et al., 43 Bibl.Haematol. 495-500 (1976)). Eksperimenter med egg fra sjøpinnsvin og egg fra muslinger tyder på at maytansin inhiberer mitose ved å interferere med dannelsen av mikrotubuli via inhiberingen av polymeriseringen av mikrotubuliproteinet tubulin (Remilliar et al., 189 Science 1002-1005(1975)).

In vitro har murine P388-, L1210- og LY5178-leukemisuspensjoner blitt funnet å være inhibert av maytansin ved doser på 10^{-3} til 10^{-1} µg/ml, der P388-linjen er mest sensitiv. Maytansin er også blitt vist å være en aktiv inhibitor av *in vitro*-vekst av humane nasofaryngeale karsinomceller, og den humane akuttlymfoblastiske leukemilinen C.E.M. ble rapportert inhibert av konsentrasjoner så lave som 10^{-7} µg/ml (Wolpert-DeFillippes et al., 24 Biochem. Pharmacol. 1735-1738 (1975)).

Maytansin har også blitt vist å være aktivt *in vivo*. Tumorvekst i P388-lymphocyt-leukemisystemet ble vist å bli inhibert over et doseringsområde på 50 til 100 ganger, noe som tyder på en høy terapeutisk indeks, og vesentlig inhibitorisk aktivitet kunne også bli vist med L1210-museleukemisystemet, det humane Lewis lungekarsinomsystemet og det humane B-16-melanokarcinomsystemet (Kupchan, 33 Ped. Proc 2288-2295 (1974)).

Fordi maytansinoidene er svært cytotoksiske er det forventet at de kan bli benyttet i behandlingen av mange sykdommer, slik som kreft. Denne forventningen er fremdeles ikke realisert. Kliniske utprøvinger med maytansin var ikke fordelaktige på grunn av et antall bivirkninger (Issel et al., 5 Cancer Treat. Rev. 199-207 (1978)). Skadelige effekter på sentralnervesystemet og gastrointestinalsymptomer var ansvarlige for at noen pasienter motsatte seg ytterligere terapi (Issel på 204), og det så ut til at maytansin var assosiert med perifer nevropati som kan være kumulativ (Issel på 207).

I henhold til dette ble målsøkingsteknikker for selektivt å levere legemidler til målcellen benyttet. Både kløyvbare og ikke-kløyvbare linkere har blitt undersøkt for flere legemidler, men i de fleste tilfeller, inkludert tilfellet med maytansinoidet, har *in vitro*-cytotoksisitetstester avslørt at antistoff-legemiddelkonjugater sjelden oppnår det samme cytotoksiske potensial som de frie ukonjugerte legemidlene. Slik har det generelt blitt akseptert at for at målrettet levering av maytansinoider skal være effektivt så må bindingen mellom maytansinoid og cellebindingsmidlet være kløyvbar.

På feltet for immuntoksiner ble videre konjugater som inneholder linkere med disulfidbruer mellom monoklonale antistoffer og katalytisk aktive proteintoksiner vist å være mer cytotoksiske enn konjugater som inneholder andre linkere. Se Lambert et al., J. Biol. Chem. 12035-12041 (1985); Lambert et al., in Immunotoxins 175-209 (A. Frankel, ed. 1988) og Ghetie et al., 48 Cancer Res. 2610-2517 (1988). Dette ble tilskrevet den høye intracellulære konsentrasjonen av glutation som bidrar til den effektive kløyvingen av disulfidbindingen mellom et antistoffmolekyl og et toksin. Nylig ble et konjugat av maytansinoider bundet til anti-Her2-brystkreftantistoffet TA.1 via den ikke-kløyvbare linkeren SMCC vist å være 200 ganger mindre potent enn et konjugat av maytansinoider bundet til TA.1 via en linker som hadde en kløyvbar disulfidbinding (Chari et al., 52 Cancer Res. 127-133 (1992)).

Slik har cytotoksiske konjugater bundet via disulfidinnholdende kløyvbare linkere blitt søkt etter. Shen et al. beskriver konverteringen av metotreksat til

merkaptetoetyl-amidderivat etterfulgt av konjugering med poly-D-lysin via disulfidbinding (260 J. Biol. Chem. 10905-10908 (1985)). Fremstilling av et konjugat av det trisulfid-inneholdende toksiske legemidlet kalicheamycin med et antistoff ble også beskrevet (Menendez et al., Fourth International Conference on Monoclonal Antibody
 5 Immunoconjugates for Cancer, San Diego, Abstract 81 (1989)).

US patentskrift 5 208 020 og 5 416 064, tilkjennegis cytotoksiske konjugater som omfatter cellebindingsmidler bundet til spesifikke maytansinoider via kløyvbare linkere, slik som linkere inneholdende disulfidgrupper, linkere inneholdende syrelabile grupper, linkere inneholdende fotolabile grupper, linkere inneholdende peptidaselabile
 10 grupper og linkere inneholdende esteraselabile grupper.

US patentskrift 6 333 410 B1, tilkjenne gir en prosess for fremstilling og rensing av tiolinneholdende maytansinoider for binding til cellebindingsmidler, og US patentskrift 6 441 163 B1, tilkjenne gir en ett-trinns fremgangsmåte for fremstilling av cytotoksiske konjugater av maytansinoider og cellebindingsmidler, der linkeren er en
 15 disulfidinneholdende kløyvbar linker.

Vider beskriver US patentskrift 5 208 020 antistoff-maytansinoidkonjugater med ikke-kløyvbare linkere, der linkeren omfatter maleimidogruppe. Likevel inneholder referansen ingen eksperimentelle data som viser at slike konjugater er effektive i å behandle sykdom.

Patentdokumentene EP 1354896 A1, WO 0124763 A2, WO 02098883 A1 og publikasjonen Chari Ravi V.J. et al.; "Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs"; Cancer Research, vol. 52, nr. 1, 1992, s. 127-131, ISSN 0008-5472, beskriver cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugater, men beskriver ikke antistoffet trastazumab.

Det har nå uventet blitt funnet at cytotoksiske konjugater av maytansinoider og
 25 cellebindingsmidler bundet via ikke-kløyvbare linkere er ekstremt potente, og i mange tilfeller har de uventede fortrinn i forhold til konjugater av maytansinoider og cellebindingsmidler av kløyvbare linkere.

30 Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår et cellebindingsmiddel-maytansinoidkonjugat, kjennetegnet ved følgende formler:

trastuzumab-*N*-succinimidyl-4-(maleimidometyl)sykloheksankarboksylat (SMCC)-
N^{2'}-deacetyl-*N*^{2'}-(3-merkaptio-1-oksopropyl)-maytansin (DM1) eller trastuzumab-*N*-
 35 succinimidyl-4-(iodoacetyl)-aminobenzoat (SIAB)-DM1.

Oppfinnelsen angår også en sammensetning omfattende cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugatet ifølge oppfinnelsen og en bærer.

Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for fremstilling av cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugatet ifølge oppfinnelsen, hvor fremgangsmåten omfatter å:

(a) tilveiebringe cellebindingsmidlet

5 (b) modifisere cellebindingsmidlet med et kryssbindingsmiddel og

(c) konjugere det modifiserte cellebindingsmidlet med et maytansinoid eller et tiol-inneholdende maytansinoid for derved å tilveiebringe den ikke-kløyvbare linkeren mellom cellebindingsmidlet og maytansinoidet eller det tiol-inneholdende maytansinoidet for å fremstille konjugatet.

10 Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for fremstilling av cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugatet ifølge oppfinnelsen, hvor fremgangsmåten omfatter å:

(a) tilveiebringe maytansinoidet eller et tiol-inneholdende maytansinoid,

(b) modifisere maytansinoidet eller det tiol-inneholdende maytansinoidet med et
15 kryssbindingsmiddel for derved å danne en ikke-kløyvbar linker og

(c) konjugere det modifiserte maytansinoidet eller tiol-inneholdende maytansinoidet med cellebindingsmidlet for derved å tilveiebringe den ikke-kløyvbare linkeren mellom cellebindingsmidlet og maytansinoidet eller det tiol-inneholdende maytansinoidet for å fremstille konjugatet.

20 Oppfinnelsen angår også en *in vitro* fremgangsmåte for å styre maytansinoider til en valgt cellepopulasjon, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter å kontakte en cellepopulasjon eller et vev som er mistenkt for å inneholde den valgte cellepopulasjonen med et cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugat, der cellebindingdmiddelet-maytansinoid-konjugated har følgende formel: trastuzumab-SMCC-DM1 eller
25 trastuzumab-SIAB.

Oppfinnelsen angår også en *in vitro* fremgangsmåte for eliminering av celler, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter å kontakte cellene med et cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugat der cellebindingsmiddelet-maytansinoid-konjugated har følgende formel: trastuzumab-SMCC-DM1 eller trastuzumab-SIAB.

30 Oppfinnelsen angår også cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugatene med formelen _trastuzumab-SMCC-DM1 eller trastuzumab-SIAB-DM1, der cellene er sykdomsrammede eller infiserte celler fra tumorer, for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av nevnte tumore, der fremgangsmåten omfatter å administrere til et individ med behov for behandling en effektiv mengde av nevnte konjugatet.

35

Den foreliggende oppfinnelse og utførelsesformer derav er angitt i de etterfølgende patentkrav.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 viser strukturen til SMCC.

Figur 2 viser strukturen til DM1.

Figur 3 viser grafiske resultater av en FACS-bindingsanalyse som sammenligner huC242 antistoff med antistoff-maytansinoidkonjugatet huC252-SMCC-DM1.

5 Figur 4 viser grafisk cytotoxissiteten til huC252-SMCC-DM1.

Figur 5 viser størrelsesekklusjonskromatografi for huC252-SMCC-DM1.

Figurene 6A-C og figur 7 viser grafisk cytotoxissiteten til huC252-SMCC-DM1 sammenlignet med konjugater fremstilt med disulfidinnholdende linkere.

10 Figurene 8A-D viser grafisk cytotoxissiteten til SMCC-DM1-konjugater bundet til ulike cellebindingsmidler.

Figur 9 viser grafisk cytotoxissiteten til antistoff-maytansinoidkonjugat huC252-SMCC-DM1.

Figur 10A viser grafisk antitumoraktiviteten til huC252-SMCC-DM1 mot humane COLO205-kolonkreftxenograft i SCID-mus.

15 Figur 10B viser grafisk antitumoraktiviteten til huC252-SMCC-DM1 mot humane SNU16-magetumoxenograft i SCID-mus.

Figur 10C viser grafisk antitumoraktiviteten til transtuzumab-SMCC-DM1 mot humane MCF7-tumoxenograft i SCID-mus.

20 Figur 11 viser grafisk plasmauttømmingshastigheter for huC252-SMCC-DM1 sammenlignet med konjugater fremstilt med disulfidinnholdende linkere.

Figurene 12A-C viser grafisk resultatene fra akuttoksisitetsundersøkelser for huC252-SMCC-DM1 sammenlignet med konjugater fremstilt med disulfidinnholdende linkere.

25 Figur 13 viser varigheten av stopp i cellesyklus og celleødeleggelsesaktivitet vist av huC252-SMCC-DM1 sammenlignet med konjugater fremstilt med disulfidinnholdende linkere.

Figurene 14A-C viser den minimale tilskuereffektaktiviteten for huC242-SMCC-DM1 sammenlignet med konjugater fremstilt med disulfidinnholdende linkere.

30 Figur 15 viser representative strukturer for maleimidobaserte kryssbindingsmidler.

Figur 16 viser representative strukturer for haloacetylbaserte kryssbindingsmidler.

Figur 17 viser strukturen til antistoff-SMCC-DM1-konjugater.

Figur 18 viser strukturen til antistoff-SIAB-DM1-konjugater.

35 Figur 19 viser strukturen til antistoff-SMCC-DM4-konjugater.

Figur 20 viser strukturen til antistoff-SIAB-DM4-konjugater.

Figur 21 viser syntesen av maytansinoidcellebindingsmiddelkonjugat bundet via en ikke-S-inneholdende ikke-kløyvbare linker.

Figur 22 viser grafisk cytotoksisitet for huC242-ikke-S-inneholdende ikke-kløyyvbare linker-DM1.

Figur 23 viser grafisk resultatet for en FACs-analyse med huC242-ikke-S-inneholdende ikke-kløyyvbare linker-DM1.

5 Figur 24 viser grafisk resultatene for en HER2 ECD-platebindingsanalyse som sammenligner trastuzumabantistoff med antistoff-maytansinoidkonjugatet trastuzumab-SMCC-DM1.

Figur 25 viser grafisk cytotoksisiteten og spesifisiteten til trastuzumab-SMCC-DM1.

10 Figur 26 viser størrelseseksklusjonskromatografi for trastuzumab-SMCC-DM1.

Figur 27 viser grafisk resultatene for HER2 ECD- platebindingsanalyse som sammenligner trastuzumabantistoff med antistoff-maytansinoidkonjugatet trastuzumab-SIAB-DM1.

Figur 28 viser grafisk cytotoksisiteten og spesifisiteten til trastuzumab-SIAB-DM1.

15 Figur 29 viser størrelseseksklusjonskromatografi for trastuzumab-SIAB-DM1.

Detaljert beskrivelse

Fagområdet avslører at det er ekstremt vanskelig å modifisere eksisterende legemidler uten å minske deres cytotoksiske evne. Likevel viser US patenskrift
20 6 441 163 B1, 6 333 410 B1, 5 416 064 og 5 208 020 at sterke cytotoksiske midler kan bli dannet ved å binde maytansinoider til passende cellebindingsmidler via kløyyvbare linkere, spesielt kløyyvbare linkere som inneholder disulfidgruppe.

Cellebindingsmiddelmaytansinoidkonjugater tillater at hele den cytotoksiske virkningen til maytansinoidene blir benyttet på en målsøkt måte kun mot uønskede celler,
25 for derved å unngå bivirkninger som skyldes skade på de ikke-målsøkte friske cellene.

Foreliggende oppfinnelse har uventet oppdaget at maytansinoider som er bundet til cellebindingsmidler via ikke-kløyyvbare linkere er overlegne på flere måter med hensyn på maytansinoider som er bundet via kløyyvbare linkere. Når de blir sammenlignet med konjugater som inneholder kløyyvbare linkere viser konjugater med ikke-kløyyvbare linkere
30 spesielt ekvivalent antitumoraktivitet både *in vitro* og *in vivo*, men viser en markert minskning i plasmauttømmingshastighet og i toksisitet.

Konjugatene ifølge oppfinneslen har en eller flere maytansinoider bundet til et cellebindingsmiddel via en ikke-kløyyvbar linker. I en fremgangsmåte for å fremstille konjugatet blir et cellebindingsmiddel, for eksempel et antistoff, først modifisert med et
35 kryssbindingsreagens slik som SMCC. I et andre trinn blir en reaktiv maytansinoid som har en tiolgruppe, slik som DM1, reagert med det modifiserte antistoffet for å frembringe antistoff-maytansinoidkonjugater. Alternativt kan maytansinoidet bli modifisert med et kryssbindingsreagens før det blir reagert med et cellebindingsmiddel. Se for eksempel US patenskrift 6 441 163 B1.

Passende maytansinoider

Maytansinoider er velkjent på fagområdet og kan bli isolert fra naturlige kilder i henhold til kjente fremgangsmåter, fremstilt ved å benytte genetiske fremstillingsteknikker (se Yu et al., 99 PNAS 7968-7973 (2002)) eller fremstilt syntetisk i henhold til kjente fremgangsmåter.

Eksempler på passende maytansinoider inkluderer maytansinol og maytansinol-analoger. Eksempler på passende maytansinol-analoger inkluderer de som har en modifisert aromatisk ring og de som har modifiseringer på andre posisjoner.

Spesifikke eksempler på passende maytansinol-analoger som har en modifisert aromatisk ring inkluderer:

- (1) C-19-deklor (US patentskrift 4 256 746) (fremstilt ved LAH-reduksjon av ansamytocin-2),
- (2) C-20-hydroksy (eller C-20-demetyl)+/-C-19-deklor (US patentskrift 4 361 650 og 4 307 016) (fremstilt ved demetylering ved å benytte *Streptomyces* eller *Actinomyces* eller deklorinering ved å benytte LAH) og
- (3) C-20-demetyloksy, C-20-acyloksy (-OCOR), +/-deklor (US patentskrift 4 294 757) (fremstilt ved acylering ved å benytte acylklorider).

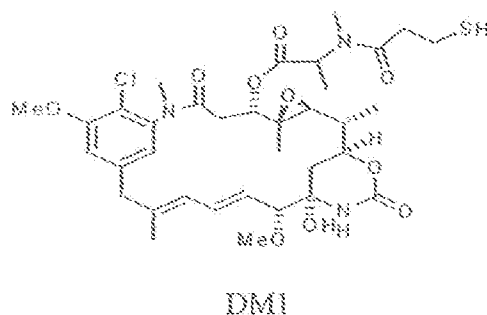
Spesifikke eksempler på passende maytansinol-analoger som har modifiseringer på andre posisjoner inkluderer;

- (1) C-9-SH (US patentskrift 4 424 219) (fremstilt ved reaksjon av maytansinol med H₂S eller P₂S₅,
- (2) C-14-alkoksymetyl(demetoksy/CH₂OR) (US patentskrift 4 331 598),
- (3) C-14-hydroksymetyl eller acyloksymetyl (CH₂OH eller CH₂OAc) (US patentskrift 4 450 254) (fremstilt fra *Nocardia*),
- (4) C-15-hydroksy/acyloksy (US patentskrift 4 364 866) (fremstilt ved konverteringen av maytansinol av *Streptomyces*),
- (5) C-15-metoksy (US patentskrift 4 313 946 og 4 315 929) (isolert fra *Trewia nudlflora*),
- (6) C-18-N-demetyl (US patentskrift 4 362 663 og 4 322 348) (fremstilt ved demetyleringen av maytansinol ved *Streptomyces*) og
- (7) 4,5-deoksy (US patentskrift 4 371 533) (fremstilt ved titantriklorid/LAH-reduksjon av maytansinol).

Mange posisjoner på maytansinol er kjent for å være nyttige som bindingsposisjonen, avhengig av typen av binding. For dannelse av en esterbinding er for eksempel C-3-posisjonen som har en hydroksygruppe, C-14-posisjonen som er modifisert med hydroksymetyl, C-15-posisjonen som er modifisert med en hydroksylgruppe og C-20-posisjonen som har en hydroksylgruppe alle passende. Likevel er C-3-posisjonen foretrukket og C-3-posisjonen til maytansinol er spesielt foretrukket.

Et foretrukket maytansinoid har en fri tiolgruppe. Spesielt foretrukne maytansinoider som omfatter en fri tiolgruppe inkluderer N-metylalanininnholdende estere og N-metylcysteininnholdende estere av maytansinol og er C-3-ester av maytansinol og dens analoger. Foretrukne estere inkluderer N-metylalanininnholdende estere og N-metylcysteininnholdende estere av maytansinol. Syntese av estere av maytansinol som har en fri tiolgruppe har tidligere blitt beskrevet, for eksempel i US patentskrift 5 208 020, Chari et al., 52 Cancer Res., 127-131 (1992), og Liu et al., 93 Proc Natl. Acad. Sci., 8618-8623 (1996). Videre tilveiebringer US patentskrift 6 333 410 B1, en forbedret fremgangsmåte for fremstilling og rensing av tiolinneholdende maytansinoider som er passende til binding til cellebindingsmidlet.

Konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse benytter det tiolinneholdende maytansinoidet DM1, formelt betegnet *N*^{2'}-deacetyl-*N*^{2'}-(3-merkaptopropyl)-maytansin. DM1 er representert ved den følgende strukturelle formel:

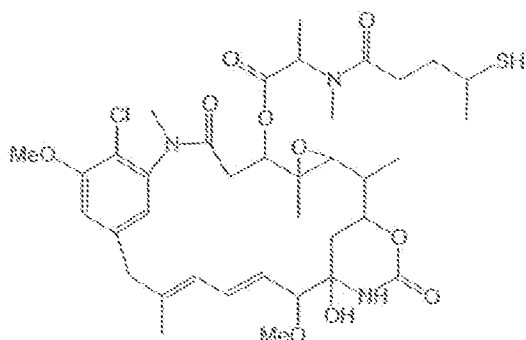


Syntesen av tiolinneholdende maytansinoid DM1 har tidligere blitt beskrevet (US patentskrift 5 208 020).

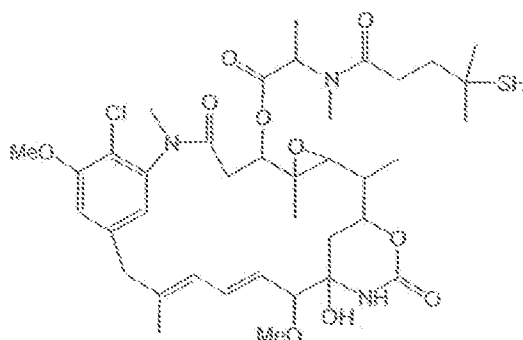
US patentsøknad 10/849 136, beskriver sterisk hindrede tiolinneholdende maytansinoider som bærer en eller to alkylsubstituenten på α -karbonet som bærer tiolfunksjonaliteten. I tillegg inneholder acylgruppen på den acylerte aminosyresidekjeden til maytansinoidet som bærer sulfhydrylgruppen en lineær kjedelengde på minst tre karbonatomer mellom karbonylgruppen på amidet og svovelatomet. Disse nye maytansinoidene er hensiktsmessige til anvendelse som beskrevet.

Syntesen av maytansinoidene som har sterisk hindret tiolgruppe kan bli beskrevet med referanse til US patensøknad 10/849 136, spesielt i figur 3.

Andre maytansinoider som omfatter en sidekjede som inneholder en sterisk hindret tiolbinding er maytansinoidene *N*^{2'}-deacetyl-*N*^{2'}-(4-merkaptopentyl)-maytansin (betegnet DM3) og *N*^{2'}-deacetyl-*N*^{2'}-(4-metyl-4-merkaptopentyl)-maytansin (betegnet DM4). DM3 og DM4 er gitt ved de følgende strukturformlene:



DM3



DM4

Cellebindingsmidler

Effektiviteten til de beskrevne konjugatene som terapeutiske midler avhenger av den gjennomtenkte utvelgelsen av et hensiktsmessig cellebindingsmiddel. Cellebindingsmidler kan være av en type som pr. i dag er kjent, eller som kommer til å bli kjent og inkluderer peptider og ikke-peptider. Generelt kan disse være antistoffer (spesielt monoklonale antistoffer), lymfokiner, hormoner, vekstfaktorer, vitaminer, nærings-transport-molekyler (slik som transferrin) eller ethvert annet cellebindingsmolekyl eller stoff som spesifikt binder et mål.

Mer spesifikke eksempler på cellebindingsmidler som kan bli benyttet inkluderer: polyklonale og monoklonale antistoffer, inkludert fullt humane antistoffer, enkeltkjedeantistoffer (polyklonale og monoklonale), fragmenter av antistoffer (polyklonale og monoklonale) slik som Fab, Fab', F(ab')₂ og Fv (Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983), Spring et al., 113 J. Immunol. 470-478 (1974), Nisonoff et al., 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960)), kimære antistoffer og antigenbindende fragmenter derav, domeneantistoffer (dAbs) og antigenbindingsfragmenter derav, inkludert kamelidantistoffer (Desmyter et al., 3 Nature Struct. Biol. 752, 1996), haiantistoffer kalt nye antigenreseptorer (IgNAR) (Greenberg et al., 374 Nature, 168, 1995, Standfield et al. 305 Science 1770-1773, 2004), interferoner (for eksempel alfa, beta, gamma), lymfokiner slik som IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, hormoner slik som insulin, TRH (tyrotropinfrigjørende hormon), MSH (melanocytstimulerende hormon), steroidhormoner slik som androgener og østrogener, vekstfaktor og kolonistimulerende faktorer slik som EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF og GM-CSF /Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984)) og vitaminer slik som folat.

Monoklonale antistoffteknikker tillater fremstillingen av ekstremt spesifikke cellebindingsmidler i form av spesifikke monoklonale antistoffer. Spesielt velkjent på

fagområdet er teknikker for å fremstille monoklonale antistoffer som blir produsert ved å immunisere mus, rotter, hamstere eller ethvert annet pattedyr med antigenet av interesse slik som den intakte målcellen, antigener som er isolert fra målcellen, hele virus, avkortede helevirus og virusproteiner slik som viruskappeproteiner. Sensitiviserte humane celler kan også bli benyttet. En annen fremgangsmåte for å fremstille monoklonale antistoffer er anvendelsen av fagbiblioteker av scFv (enkeltkjedevariable region), spesielt humant scFv (se for eksempel Griffiths et al., US patentskrift 5 885 793 og 5 969 108, McCafferty et al., WO 92/01047, Liming et al., WO99/06587). I tillegg kan overflatebehandlede antistoffer som er tilkjennegjort i US patenskrift 5 639 641 også bli benyttet, og det kan også humaniserte antistoffer.

Valg av hensiktsmessig cellebindingsmiddel er et valg som er avhengig av den spesielle cellepopulasjonen som skal bli målsøkt, men generelt blir humane monoklonale antistoffer foretrukket hvis et hensiktsmessig er tilgjengelig.

Det monoklonale antistoffet J5 er et murint IgG2a-antistoff som er spesifikt for vanlig akutt lymfoblastisk leukemiantigen (CALLA) (Ritz et al, 283 Nature 583-585 (1980)) og kan for eksempel bli benyttet hvis de målsøkte cellene uttrykker CALLA slik som i sykdommer med akutt lymfoblastisk leukemi.

Det monoklonale antistoffet MY9 er et murint IgG₁-antistoff som bindes spesifikt til CD33-antigenet (J.D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)) og kan bli benyttet hvis målcellene uttrykker CD33 som i sykdommer med akutt myelogen leukemi (AML).

Tilsvarende kan det monoklonale antistoffet anti-B4 som også blir kalt B4 og som er et murint IgG₁ som binder til CD19-antigenet på G-celler (Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)) bli benyttet hvis målcellene er B-celler eller sykdomsrammede celler som uttrykker dette antigenet slik som ved ikke-Hodgkins lymfom eller kronisk lymfoblastisk leukemi.

I tillegg kan det monoklonale antistoffet C242 som binder til CanAg-antigenet (US patentskrift 5 552 293) bli benyttet til å behandle CanAg-uttrykkende tumor, slik som kolorektalkreft, pankreaskreft, ikke-småcellet lungekreft og magekreft. HuC242 er en humanisert form av det monoklonale antistoffet C242 som er beskrevet i US patentskrift 5 552 293 og for hvilket hybridomen er deponert hos ECACC med identifiseringsnummer 90012601. En humanisert form kan bli fremstilt ved enten å benytte CDR-transplantasjonsmetodikk (US patentskrift 5 585 089, 5 693 761 og 5 693 762) eller overflateendringsmetodikken (US patentskrift 5 639 641). HuC242 kan også bli benyttet til å behandle CanAg-uttrykkende tumor, slik som ved kolorektalkreft, pankreaskreft, ikke-småcellet lungekreft og magekreft.

Videre kan antistoffet trastuzumab bli benyttet til å behandle brystkreft eller andre kreftformer, slik som prostatakreft og ovariekreft som uttrykker Her2-antigenet.

Anti-IFG-IR-antistoffer som binder til insulinvekstfaktorreseptor er også nyttige.

Ovariekreft og prostatakreft kan vellykket bli målsøkt med for eksempel et anti-MUC1-antistoff, slik som anti- HMFG-2 (Taylor-Papadimitriou et al., 28. Int. J. Cancer 17-21. 1981) eller hCTM01 (56 Cancer Res. 5179-5185, 1996) og et anti-PSMA (prostataspesifikk membranantigen), slik som J591 (Liu et al. 57 Cancer Res. 36329-3634, 1997).

Ikke-antistoffmolekyler kan også bli benyttet til å målsøke spesifikke cellepopulasjoner. For eksempel kan GM-CSF som binder til myeloide celler bli benyttet som et cellebindingsmiddel for å målsøke sykdomsrammede celler fra akutt myelogen leukemi. I tillegg kan IL-2 som binder til aktiverte T-celler bli benyttet til forebygging av transplantat-frastøtning, til terapi og forhindring av transplantat versus vertssykdom, og til behandling av akutt T-celleleukemi. MSH som binder til melanocytter kan bli benyttet i behandlingen av melanom. Folsyre kan bli benyttet for å målsøke folatreseptoren som ble uttrykt på ovarietumorer og andre tumorer. Epidermal vekstfaktor (EGF) kan bli benyttet til å målsøke skvamøse kreftformer slik som lungekreft og hode- og nakkekreft. Somatostatin kan bli benyttet til å målsøke nevroblastomer og andre tumortyper. Kreftformer i brystet og i testiklene kan bli vellykket målsøke med østrogen (eller østrogenanaloger) eller androgen (eller androgenanaloger) som cellebindingsmidler.

Kryssbindingsreagenser

Maytansinoidet blir bundet til cellebindingsmidlet ved hjelp av et kryssbindingsreagens som, når det blir reagert, danner en ikke-kløyvbar linker mellom maytansinoidet og cellebindingsmidlet.

Benyttet her er en "linker" enhver kjemisk enhet som binder et cellebindingsmiddel kovalent sammen med et maytansinoid. I enkelte tilfeller blir en del av linkeren tilveiebrakt ved maytansinoidet. For eksempel er DM1, som er et tiolinneholdende maytansinoid (figur 2), et derivat av det naturlige maytansinoidet maytansin og tilveiebringer en del av linkeren. Sidekjeden på C-3-hydroksylgruppen til maytansin ender i $-CO-CH_3$, sidekjeden til DM1 ender i $-CO-CH_2-CH_2-SH$. Derfor blir den endelige linken sammensatt fra to deler, kryssbindingsreagenset som er introdusert inn i cellebindingsmidlet og sidekjeden fra DM1.

Kløyvbare linkere er linkere som kan bli kløyvd under milde betingelser, det vil si betingelser der aktiviteten til maytansinoidlegemidlet ikke blir påvirket. Mange kjente linkere faller innenfor denne kategorien og er beskrevet nedenfor.

Disulfidinneholdene linkere er linkere som er kløyvbare via disulfidbyttning, som kan foregå ved fysiologiske betingelser.

Syrelabile linkere er linkere som er kløyvbare ved sur pH. Visse intracellulære avdelinger, slik som endosomer og lysosomer, har for eksempel en sur pH (pH 4-5), og tilveiebringer betingelser som er passende for å kløyve syrelabile linkere.

Linkere som er fotolabile er nyttige på kroppsoverflaten og i mange kroppshulrom som er eksponert for lys. Videre kan infrarødt lys trenge igjennom vev.

Noen linkere kan bli kløyd med peptidase. Kun visse peptider blir enkelt kløyd inne i eller på utsiden av celler, se for eksempel Touet et al., 79 Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 626-627 (1982) og Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Videre er peptidet sammensatt av α -aminosyrer og peptidbindinger, som kjemisk er amidbindinger mellom karboksylatet på en aminosyre og α -aminogruppen på en annen aminosyre. Andre amidbindinger, slik som bindingen mellom et karboksylat og ϵ -aminogruppen på lysin, er forstått å ikke være peptidbindinger og er ansett å være ikke-kløybare.

Enkelte linkere kan bli kløyet med esteraser. Igjen kan kun visse estere bli kløyd med esteraser som er tilstede på innsiden eller på utsiden av celler. Estere blir dannet ved kondenseringen av en karboksylsyre og en alkohol. Enkle estere er estere som er fremstilt med enkle alkoholer, slik som alifatiske alkoholer og små sykliske eller små aromatiske alkoholer. For eksempel fant oppfinneren av foreliggende oppfinnelse ingen esterase som kløyvet esteren på C-3-maytansin, siden alkoholkomponenten i esteren, maytansinol, er svært stor og kompleks.

En ikke-kløyvbar linker er enhver kjemisk enhet som er i stand til å binde et maytansinoid til et cellebindingsmiddel på en stabil kovalent måte og faller ikke under kategoriene som er fremlagt ovenfor som kløybare linkere. Slik er ikke-kløybare linkere vesentlig resistente overfor syreindusert kløyving, lysindusert kløyving, peptidaseindusert kløyving, esteraseindusert kløyving og disulfidbindingskløyving.

"Vesentlig resistent" overfor kløyving betyr at den kjemiske bindingen i linkeren eller som binder sammen linkeren i minst 80 %, fortrinnsvis minst 85 %, mer foretrukket minst 90 %, enda mer foretrukket minst 95 % og mest foretrukket minst 99 % av cellebindingsmiddelmaytansinoidkonjugatpopulasjonen forblir ikke-kløyvbar ved en syre, et fotolabilt kløyvingsmiddel, en peptidase, en esterase eller en kjemisk eller en fysiologisk forbindelse som kløyver den kjemiske bindingen (slik som en disulfidbinding) i en kløyvbar linker i innenfor noen få timer til flere dager med behandling med hvert av midlene som er beskrevet ovenfor.

Videre refererer "ikke-kløyvbar" til evnen til den kjemiske bindingen i linkeren eller som er bundet til linkeren i å motta kløyving indusert av en syre, et fotolabilt kløyvingsmiddel, en peptidase, en esterase eller en kjemisk eller en fysiologisk forbindelse som kløyver en disulfidbinding med betingelser der maytansinoidet eller cellebindingsmidlet ikke mister sin aktivitet.

En fagperson på området vil enkelt kunne skille mellom ikke-kløybare og kløyvbar linker.

Et eksempel på en passende kontroll for å teste hvorvidt en linker er vesentlig resistent overfor kløyving er en linker med en kjemisk binding, slik som en disulfidbinding som er utsatt for kløyving ved ethvert av midlene som er beskrevet ovenfor. Man kan

teste hvorvidt en linker er vesentlig resistent overfor kløyving ved å måle stabiliteten til konjugatene ved hjelp av ELISA, HPLC eller på annen hensiktsmessig måte, over en tidsperiode som strekker seg fra mellom et par timer til flere dager, typisk 4 timer til 5 dager. ELISA-analyse kan bli benyttet til å måle nivået av stabilt konjugat i plasma-konsentrasjonen.

Ikke-kløyvbare er også karakterisert ved at halveringstiden *in vivo* for konjugater som omfatter ikke-kløyvbare linkere generelt er omtrent 20 % høyere enn de for konjugater som omfatter kløyvbare linkere. I mus er halveringstiden *in vivo* for IgG-maytansinoidkonjugatene som er bundet sammen via ikke-kløyvbare linkere minst 4 dager.

Passende kryssbindingsmidler som danner ikke-kløyvbare linkere mellom maytansinoidet og cellebindingsmidlet er velkjente på fagområdet og kan danne ikke-kløyvbare linkere som omfatter et svovelatom (slik som DMCC) eller som er uten et svovelatom.

Kryssbindingsreagenser som danner ikke-kløyvbare linkere mellom maytansinoidet og cellebindingsmidlet omfatter en maleimido- eller haloacetylbasert enhet. ifølge den foreliggende oppfinnelse er slike ikke-kløyvbare linkere sagt å være avledet fra maleimido- eller haloacetylbasert enhet. Kryssbindingsreagenser som omfatter en maleimidobasert enhet inkluderer *N*-succinimidyl-4-(maleimidometyl)sykloheksan-karboksylat (SMCC), *N*-succinimidyl-4-(*N*-maleimidometyl)-sykloheksan-1-karboksy-(6-amidokaproat), som er en "langkjedet" analog av SMCC (LC-SMCC) κ -maleimido-undekansyre-*N*-succinimidoundekansyre-*N*-succinimidylester (KMUA), γ -maleimido-smørsyre-*N*-succinimidylester (GMBS), ϵ -maleimidokapronsyre-*N*-hydroksysuccinimidester (EMCS), *N*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroksysuccinimidester (MBS), *N*-(α -maleimidoacetoksy)-succinimidester (AMAS), succinimidyl-6-(β -maleimidopropionamido)heksanoat (SMPH), *N*-succinimidyl-4-(*p*-maleimidofenyl)-butyrat (SMPB), og *N*-(*p*-maleimidofenyl)isocyanat (PMPI) (se figur 15 for representative strukturer av maleimidobaserte kryssbindingsmidler). Disse kryssbindingsreagensene danner ikke-kløyvbare linkere som er avledet fra maleimidobaserte enheter.

Kryssbindingsreagenser som omfatter en haloacetylbasert enhet inkluderer *N*-succinimidyl-4-(jodacetyl)-aminobenzoat (SIAB), *N*-succinimidyljodacetat (SIA), *N*-succinimidylbromacetat (SBA) og *N*-succinimidyl-3-(bromacetamido)propionat (SBAP) (se figur 16 for representative strukturer av haloacetylbaserte kryssbindingsmidler). Disse kryssbindingsreagensene danner ikke-kløyvbare linkere som avledes fra haloacetylbaserte enheter.

Mens de aktive esterne beskrevet i figur 15 og 16 er sammensatt av *N*-succinimidyl- og sulfosuccinimidylestere, kan andre aktive esteres liks som *N*-hydroksyftalimidylestere,

N-hydroksysulfoftalimidylestere, ortonitrofenylestere, paranitrofenylestere, 2,4-dinitrofenyl-estere, 3-sulfonyl-4-nitrofenylestere, 3-karboksy-4-nitrofenylestere, pentafluorfenylestere og sulfonyltetrafluorfenylestere også bli benyttet.

Spesielt foretrukne kryssbindingsreagenser danner ikke-kløyyvbare linkere som ikke inneholder et svovelatom. Figur 21 viser et maytansinoidmolekyl som er derivatisert med et kryssbindingsreagens som er avledet fra en α,ω -dikarboksytsyre (en alkan- eller alkendisyre der alkanet eller alkenet har 3-24 karbonatomer). Når det reageres med cellebindingsmidlet vil kryssbindingsreagenset danne en ikke-svovelinneholdende ikke-kløyyvbar linker (ikke-S-inneholdende ikke-kløyyvbar linker).

Maytansinoidmolekylet i figur 21 ble fremstilt som følger. Først blir en monoester av adipinsyre (også kjent som heksandisyre eller 1,6-heksandikarboksytsyre) klargjort ved behandling med en ekvivalent med 2-trimetylsilyletanol i nærvær av de sykloheksylkarbodiimid. Aktivering av den gjenværende karboksylysyregruppen med isobutylklorformat etterfulgt av reaksjon med N-metyl-L-alanin tilveiebringer det acylerte N-metyl-L-alanin. Reaksjon med maytansinol i nærvær av disykloheksylkarbodiimid og sinkklorid etterfulgt av den beskyttende trimetylsilylgruppen med tetrabutylammoniumfluorid tilveiebringer maytansinoidesteren som bærer en fri karboksygruppe. Forestering av karboksygruppen ved reaksjon med sulfo-N-hydroksysuccinimid i nærvær av de sykloheksylkarbodiimid tilveiebringer den aktive esteren av maytansinol som kan reagere med et cellebindings-middel for å gi et ikke-kløyyvbart konjugat som ikke inneholder et svovelatom.

Syntese av cytotoksiske konjugater

Konjugater av cellebindingsmidler og maytansinoider kan bli dannet ved å benytte enhver teknikk som i dag er kjent eller som senere vil bli utviklet.

Fremgangsmåter for konjugering av cellebindingsmidler med maytansinoider involverer generelt to reaksjonstrinn. I en fremgangsmåte som er beskrevet i US patentskrift 5 208 020 kan et cellebindingsmiddel slik som et antistoff bli modifisert med et kryssbindingsreagens for å introdusere en eller flere, vanligvis 1-10 reaktive grupper. Det modifiserte cellebindingsmidler ble deretter reagert med en eller flere tiolinneholdende maytansinoider for å fremstille et konjugat.

Alternativt, slik som tilkjennegitt i US patentskrift 6 441 163 B1, kan et tiolinneholdende maytansinoid først bli modifisert med et kryssbindingsreagens, etterfulgt av reaksjon av det modifiserte maytansinoidet med et cellebindingsmiddel. For eksempel kan det tiolinneholdende maytansinoidet bli reagert med maleimidoforbindelsene som er beskrevet i figur 15 eller med haloacetylforbindelsene som er beskrevet i figur 16, for å gi en maytansinoidtioeter som bærer en aktiv succinimidyl- eller sulfosuccinimidylester. Reaksjon av disse maytansinoidene som inneholder en aktivert linker enhet med et

cellebindingsmiddel tilveiebringer en annen fremgangsmåte for å fremstille et ikke-kløyvbart cellebindingsmiddelmaytansinoidkonjugat.

I et annet eksempel, som tilkjennegitt ovenfor, kan et maytansinoid som ikke inneholder et svovelatom først bli derivatisert med et dikarboksylysyrebasert kryssbindingsreagens, etterfulgt av reaksjon med cellebindingsmidlet for å danne et konjugat der maytansinoidet er bundet til cellebindingsmidlet via en ikke-S-inneholdende ikke-kløyvbar linker.

Typisk er gjennomsnittlig 1-10 maytansinoider pr. antistoff bundet. Konjugatet kan bli rensset gjennom en Sephadex G-25-kolonne.

US patentskrift 5 208 020 og 6 441 163 B1 er herved innkorporert ved referanse.

Eksempler på konjugater er antistoff-maytansinoidderivater, antistofffragment-maytansinoidderivater, vekstfaktor-maytansinoidkonjugater slik som epidermal vekstfaktor (EGF)-maytansinoidderivater, hormon-maytansinoidkonjugater slik som melanocytstimulerende hormon (MSH)-maytansinoidderivater, tyroidstimulerende hormon (TSH)-maytansinoidderivater, østrogen-maytansinoidderivater, østrogenanalog-maytansinoidderivater, androgen-maytansinoidderivater, androgenanalog-maytansinoidderivater og vitamin-maytansinoidkonjugater slik som folatmaytansinoid.

Maytansinoidkonjugater av antistoffer, antistofffragmenter, proteinhormoner, proteinvekstfaktorer og andre proteiner ble fremstilt på samme måte. For eksempel kan peptider og antistoffer bli modifisert med de ikke-kløyvbare kryssbindingsreagensene som er nevnt ovenfor. En løsning av et antistoff i vandig buffer kan bli innkubert med et molart overskudd av et antistoffmodifiserende kryssbindingsreagens slik som succinimidyl-4-(N-maleimidometyl)-sykloheksan-1-karboksylat (SMCC), sulfo-SMCC, -maleimidobenzoyl-N-hydroksysuccinimidester (MBS), sulfo-MBS, succinimidyl-jodacetat eller N-succinimidyl-4-(jodacetyl)-aminobenzoat (SIAB *N*-succinimidyl-4-(*N*-maleimidometyl)-sykloheksan-1-karboksy-(6-amidokaproat) som er en "langkjedet" analog av SMCC (LC-SMCC), sulfo-LC-SMCC, κ -maleimidoundekansyre-*N*-succinimidylester (KMUA), sulfo-KMUA, γ -maleimido-smørsyre-*N*-succinimidylester (GMBS), sulfo-GMBS, ε -maleimidkapronsyre-*N*-hydroksy-succinimidester (EMCS), sulfo-EMCS, *N*-(α -maleimidacetoksy)-succinimidester (AMAS), sulfo-AMAS, succinimidyl-6-(β -maleimidopropionamido)heksanoat (SMPH), sulfo-SMPH, *N*-succinimidyl-4-(*p*-maleimidofenyl)-butyrat (SMPB), sulfo-SMPH, *N*-(*p*-maleimidofenyl)-isocyanat (PMPI), *N*-succinimidyl-4-(jodacetyl)-aminobenzoat (SIAB), *N*-succinimidyl-jodacetat (SIA), *N*-succinimidylbromacetat (SBA) og *N*-succinimidyl-3-(bromacetamido)-propionat (SBAP), som beskrevet i litteraturen. Se Yoshitake et al., 101 Eur. J. Biochem. 395-399 (1979), Hashida et al., J. Applied Biochem. 56-63 (1984), og Liu et al., 18 690-697 (1979), Uto et al., 138 J. Immunol. Meth. 87-94 (1991), Rich et al., 18 J. Med. Chem. 1004-1010 (1975), Kitagawa and Aikawa, 79 J. Biochem. (Tohyo) 233-236 (1976), Tanimori et al., 62 J. Immunol. Meth. 123-128 (1983), Hashida et al., 6 J. Appl. Biochem. 56-63 (1984),

Thorpe et al., 140 Eur. J. Biochem. 63-71 (1984), Chrisey et al., 24 Nucl. Acid Res. 3031-3039 (1996), Annunziato et al., 4 Bioconjugate Chem. 212-218 (1993), Rector et al., 24 J. Immunol. Meth. 321-336 (1978), and Inman et al., 2 Bioconjugate Chem. 458-463 (1991).

5 Det modifiserte antistoffet ble deretter behandlet med det tiolinneholdende maytansinoidet (1,26 molar ekvivalent/maleimido eller jodacetylgruppe) for å fremstille et konjugat. Blandingene blir innkubert over natten ved omtrent 4 °C. Antistoff-maytansinoidkonjugatene blir rensset ved hjelp av gelfiltrering gjennom en Sephadex-G-25- kolonne. Antallet maytansinoidmolekyler bundet pr. antistoffmolekyl kan bli bestemt
10 ved spektrofotometrisk å måle forholdet mellom absorbensene ved 252 nm og 280 nm. Typisk blir et gjennomsnitt på 1-10 maytansinoider pr. antistoff bundet.

En foretrukket fremgangsmåte er å modifisere antistoffet med succinimidyl-4-(N-maleimidometyl)-sykloheksane-1-karboksylat (SMCC) for å introdusere maleimidogrupper etterfulgt av reaksjon av det modifiserte antistoffet med et tiolinneholdende maytansinoid
15 for å gi et tioeterbundet konjugat. Igjen fører dette konjugatet til 1-10 legemiddelmolekyler pr. antistoffmolekyl. Eksempler på antistoff-maytansinoidkonjugater er vist i figurene 17-20.

Likeledes kan for eksempel østrogen- og androgencellebindingsmidler slik som østradiol og androstendiol bli forestret på C-17-hydroksygruppen ved reaksjon med en
20 hensiktsmessig beskyttet tiolgruppe inneholdende karboksylklorid slik som 3-S-acetylpropanoylklorid. Andre fremgangsmåter for forestring kan også bli benyttet som beskrevet i litteraturen (Haslam, 36 Tetrahedron 2400-2433 (1980)). Det beskyttede eller frie tiolinneholdende androgenet eller østrogenet kan deretter bli reagert med et tiol-inneholdende maytansinoid for å fremskaffe konjugater. Konjugatene kan bli rensset ved
25 hjelp av kolonnekromatografi på silikagel eller ved hjelp av HPLC.

En spesielt foretrukket fremgangsmåte er å modifisere maytansinoid med et kryssreagens som fører til en binding som ikke inneholder noen svovelatomer, etterfulgt av reaksjon av det modifiserte maytansinoidet med et antistoff for å fremstille konjugatet.

30 Terapeutisk effektivitet for cytotoksiske konjugater

Cellebindingsmiddelmaytansinoidkonjugater kan bli evaluert for deres evne til å undertrykke proliferasjon for ulike cellelinjer *in vitro*. For eksempel kan cellelinjer slik som den humane kolonkarsinomlinjen COLO205, den humane melanomcellelinjen A375, den humane myeloidleukemicellelinjen HL60, den humane brystkarsinomcellelinjen
35 SKBR3 eller den humane epidermoide karsinomcellelinjen KB blir benyttet for undersøkelsen av cytotoksitet for disse konjugatene. Celler som skal bli evaluert kan bli eksponert for forbindelsene i 24 timer og den overlevende fraksjonen av celler kan bli målt i direkte analyse ved hjelp av kjente fremgangsmåter. (Se for eksempel Goldmacher et al., 135 J. Immunol. 3648-3651 (1985), og Goldmacher et al., 102 J. Cell

Biol. 1312-1319 (1986).) IC₅₀-verdier kan deretter bli beregnet fra resultatene av analysen.

Høy cytotoxiskitet kan bli definert som oppvisning av en toksisitet som har en IC₅₀ (den inhiberende konsentrasjonen av et toksisk stoff som gir en overlevelsesfraksjon på 0,5) på omtrent 10⁻⁸ M eller mindre når det blir målt *in vitro* med SKBR3-celler ved en 24 timers eksponering overfor legemidlet.

In vitro-styrken og målspesifisitet for antistoff-maytansinoidkonjugatene er vist i figur 4. Konjugater av huC242 med DM1 ved å benytte kryssbindingsreagenset SMCC er svært potente når det gjelder å ødelegge antigenpositive SKBR3-celler med en IC₅₀-verdi på 3,5 x 10⁻¹² M. I motsetning til dette er antigennegative A375-celler omtrent 800 ganger mindre sensitive, noe som viser at maytansinoidkonjugater ifølge foreliggende oppfinnelse er svært potente og spesifikke.

huC242-SMCC-DM1-konjugatet var like sterkt eller sterkere sammenlignet med konjugater som var fremstilt med disulfidinneholdende linkere i klonogene (figur 6A-C) og i indirekte cytotoxissitetsanalyser (figur 7). Disse resultatene var uventede basert på tidligere publiserte data som viser at et anti-Her2-antistoff konjugert til maytansinoider via SMCC ikke viste noen spesifikk aktivitet (Chari et al., 52 Cancer Res. 127-133 (1992)).

Aktivitet for konjugater fremstilt med SMCC-ikke-kløyybar linker er ikke begrenset til huC242-konjugater. Spesifikk aktivitet *in vitro* ble også observert med SMCC-DM1-konjugater av trastuzumab, som er et anti-Her2-antistoff, My9-6 som er et anti-CD33-antistoff, KS77 som er et anti-EGFR-antistoff og N901 som er et anti-CD56-antistoff (figur 8A-D og 25).

I tillegg er ikke konjugater med ikke-kløyybare linkere som viser spesifikk aktivitet *in vitro* begrenset til SMCC-linkeren. Et huC242-konjugat av DM1 som er syntetisert med den ikke-kløyybare linkeren SIAB viste sterk og antigenspesifikk cytotoxiskitet i klonogene analyser *in vitro* (figur 9). Videre var et trastuzumabkonjugat av DM1 som var syntetisert med SIAB også cytotoxisk i klonogene analyser (figur 28). Videre viste et huC242-ikke-S-inneholdende ikke-kløyybart linker-DM1-konjugat også sterk og antigenspesifikk cytotoxiskitet i klonogene analyser *in vitro* (figur 22).

Antistoffkonjugater med DM1 som benytter SMCC-linkeren viser antitumor-effektivitet mot humane tumorxenografts i mus (figur 10A-C). Som vist i figur 10A ble først markert inhibering av tumorvekst observert ved behandling av COLO205-kolontumorxenografts med huC242-SMCC-DM1. I dette eksperimentet ble en gruppe på fem dyr som bar på etablerte, subkutane tumorer behandlet med huC242-SMCC-DM1 ved en dosering på 150 µg/kg med konjugert DM1. Tumorstørrelser ble målt periodisk og benyttet i en graf mot tid etter tumorinokulering. Alle de fem behandlede dyrene hadde fullstendig remisjon, selv om tre dyr deretter fikk tilbakefall ved ulike tidspunkter, mens to dyr forble tumorfrie inntil avslutningen av eksperimentet (figur 10 A). Som vist i figur 10B ble i tillegg denne antitumoraktiviteten observert ved konjugatdoser som ikke har

noen effekt på musekroppsvekt, som er et mål for legemiddeltoksisitet. I dette eksperimentet ble tre grupper på fem dyr hver som hver bar på etablerte, subkutane SNU-tumorer behandlet med huC242-SMCC-DM1 ved doser på henholdsvis 15 µg/kg, 30 µg/kg og 60 µg/kg med konjugert DM1. Tumorstørrelser ble målt periodisk og benyttet i en graf mot tid etter tumorinokulering. HuC242-SMCC-DM1 viste en doseavhengig antitumoreffekt. Resultatene viser at behandling av mus som bærer COLO205-kolonkarsinomtumorenograft med huC242-SMCC-DM1-konjugat førte til fullstendig tilbakedannelse av tumorer, der noen mus forble uten påvisbare tumorer i over to måneder etter behandling (figur 10A). Igjen ble denne aktiviteten oppnådd ved en konjugatkonsentrasjon som ikke viste noen effekt på musekroppsvekt. Et trastuzumab-SMCC-DM1-konjugat viste også signifikant tumortilbakedannelse i en musetumorenograftmodell med MCF-7-brystkarsinomcellelinjen (figur 10C).

Plasmauttømming av antistoff-maytansinoidkonjugat syntetisert med den ikke-kløyvbare linker SMCC er svært sen og sammenlignbar med uttømmingen av antistoff alene. Dette står i skarp kontrast til plasmauttømming av konjugater som er fremstilt med relativt labile disulfidbindinger slik som huC242-SPP-DM1. For eksempel er halveringstiden for uttømming av SMCC-konjugatet omtrent 320 timer, mens halveringstiden for SPP-konjugatet er i området 40-50 timer (figur 11). Likevel er uttømmingen av antistoff-komponenten for hver type av konjugat identisk, noe som tyder på at forskjellen i målt konjugatuttømming skyldes tapet av maytansinoid fra antistoffkonjugatet i tilfellet for SPP-DM1-konjugatet. Den ikke-kløyvbare SMCC-bindingen er derfor mye mer motstandsdyktig overfor maytansinoidlinkerkløyvingsaktiviteter som foreligger *in vivo* enn SPP-DM1-konjugatet. Videre fører den minskede uttømmingshastigheten for de SMCC-bundne konjugatene sammenlignet med SPP-DM1-konjugatene til en nesten 5 gangers økning i total maytansinoideksponering for dyret som målt ved arealet under kurven (AUC). Denne økte eksponeringen kan ha vesentlig påvirkning på legemiddeleffektivitet i noen tilfeller.

Maytansinoidkonjugater som er fremstilt med ikke-kløyvbare linkere slik som SMCC viser en uventet økt tolererbarhet i mus sammenlignet med konjugater som er fremstilt med kløyvbare disulfidlinkere. En akutt toksisitetstest med en enkel intravenøs dose ble utført i CD-1-hunnmus. En sammenligning av tolererbarheten for et huC242-SMCC-DM1-konjugat (ikke-kløyvbart) med huC242-konjugater som er fremstilt med linkere inneholdende kløyvbare disulfidbindinger ble utført ved å overvåke døden for mus (figur 12A og B) og tegn på toksisitet (12C og D) over en serie på 4 eskalerende doser av hvert konjugat. Den maksimaltolererte dosen (MTD) for SMCC-DM1-konjugatet var høyere enn den høyeste dosen som ble testet (150 mg/kg) mens MTD for det disulfidbundne konjugatet SPP-DM1 var i området på 45-90 mg/kg. Ved 150 mg/kg overlevde alle musene i den SMCC-DM1-dannede gruppen mens dødelig toksisitet ble observert for alle musene i den SPP-DM1-behandlede gruppen ved 96 timer etter behandling.

Maytansinoidkonjugater er antatt å påføre sin celleødeleggende aktivitet via inhiberingen av mikrotubulipolymerisering. Denne inhiberingen av mikrotubulipolymerisering fører til en stopp av cellesyklusen prinsipielt ved G2/M. Den antigenavhengige stoppingen av celler på G2/M ved hjelp av antistoff-maytansinoidkonjugater kan bli overvåket ved hjelp av flowcytometri-analyse (figur 13). Behandling av COLO205-celler med huC242-SPP-DM1 eller huC242-SMCC-DM1-konjugater fører til en fullstendig G2/M-stopp ved 6-10 timer. Ved 30 timer etter behandling unnslipper likevel noen av cellene som er stoppet ved behandling ved det disulfidbundne huC242-SPP-DM1-konjugatet fra cellesyklusstopp og begynner på nytt celledeling. Overraskende unnslipper ikke celler som er behandlet med det ikke-kløyybare konjugatet fra cellesyklusblokkeringen på dette senere tidspunktet. Forskjellen i varigheten for aktiviteten til disse to konjugatene er også reflektert i prosentandelen av døde celler ved 30 timers tidspunktet, som vurdert ut fra en fargestoffeksklusjonsanalyse ved å benytte trypanblått. Disse resultatene viser en uventet varighet for de molekylære hendelsene som er induisert ved behandling ved de ikke-kløyybare SMCC-linkerkonjugatene.

Et ytterligere aspekt ved konjugater som er fremstilt med ikke-kløyybare linkere sammenlignet med konjugater som har kløyybare disulfidlinkere er fraværet av aktivitet mot antigenegative celler når det er i nærhet til antigenpositive celler, betegnet her som tilskuereffekten. Det betyr at konjugatene som er fremstilt med ikke-kløyybare linkere har minimal tilskueraktivitet. Både huC242-SPP-DM1 (kløyybare) og huC242-SMCC (ikke-kløyybare)-konjugater viser sterk celleødeleggende aktivitet mot den antigenpositive COLO205-cellelinjen og har ingen aktivitet mot den antigenegative cellelinjen Namalwa når de blir dyrket separat (figur 14A-C). Likevel avslører behandling av kokulturer av COLO205- og namalwa-celler med huC242-SPP-DM1 dramatisk celleødeleggende aktivitet av konjugatet mot selv de antigenegative namalwa-cellene. I motsetning til dette viser ikke huC242-SMCC-DM1-konjugatet noen slik tilskueraktivitet ved disse betingelsene. Ingen celleødeleggende aktivitet mot namalwa-celler blir observert med huC242-SMCC-DM1-konjugatet selv når det blir dyrket sammen med de antigenpositive COLO205-cellene. Denne minimale tilskueraktiviteten for det ikke-kløyybare konjugatet, som målt i denne *in vitro*-analysen, kan bidra til den økte tolerabiliteten for konjugat med ikke-kløyybare linkere observert i akuttoksisitetsundersøkelser.

Resultater fra eksperimentene ovenfor viser at maytansinoidkonjugatene med ikke-kløyybare linkere ifølge foreliggende oppfinnelse innehar sterkt forbedret antitumoraktivitet sammenlignet med tidligere beskrevne cellebindingsmiddelmaytansinoidkonjugater.

Anvendelser

Konjugatene som er beskrevet ovenfor kan bli benyttet i en *in vitro* fremgangsmåte for å styre maytansinoider til en valgt cellepopulasjon, der fremgangsmåten omfatter å kontakte en cellepopulasjon eller et vev som er mistenkt for å inneholde den valgte cellepopulasjonen med et cellebindingsmiddel-
 5 maytansinoidkonjugat, der en eller flere maytansinoider er bundet til cellebindingsmidlet via en ikke-kløyvbar linker og cellebindingsmidlet binder til celler i den valgte cellepopulasjonen.

De ovenfor beskrevne konjugatene kan også bli benyttet i en *in vitro* fremgangsmåte for å ødelegge celler, der fremgangsmåten omfatter å kontakte cellene
 10 med et cellebindingsmiddelmaytansinoidkonjugat, der en eller flere maytansinoider er kovalent bundet til cellebindingsmidlet via en ikke-kløyvbar linker og cellebindingsmidlet binder til cellene.

Eksempler på medisinske tilstander som kan bli behandlet inkluderer, men er ikke begrenset til, ondartede krefttyper av enhver type inkludert for eksempel kreft i
 15 lunge, bryst, tykktarm, prostata, nyre, pankreas, ovarier og lymfatiske organer, autoimmune sykdommer slik som systemisk lupus, revmatoid artritt og multipel sklerose, transplantatavstøtninger slik som nyretransplantasjons-frastøtning, levertransplantasjonsfrastøtning, lungetransplantasjonsfrastøtning, hjerte-transplantasjonsfrastøtning og benmargstransplantasjonsfrastøtning, transplantat versus
 20 vertssykdom, virusinfeksjoner slik som CMV-infeksjon, HIV-infeksjon, AIDS osv., og parasittinfeksjoner slik som giardiasis, amoebiasis, schistosomiasis, og andre som bestemt av en fagperson på området.

Fremgangsmåtene kan bli utøvd *in vitro* eller *in vivo*.

De ovenfor beskrevne konjugatene kan bli benyttet i en fremgangsmåte ved
 25 anvendelse *in vitro* for å behandle for eksempel autologe benmargceller før deres transplantasjon inn i den samme pasienten for å ødelegge sykdomsrammede eller maligne celler, benmargceller eller andre vev før deres transplantasjon for å ødelegge T-celler og andre lymfoide celler og forhindre transplantat versus vertssykdom (GVHD), cellekultur for å ødelegge alle celler bortsett fra ønskede varianter som ikke uttrykker
 30 målantigenet, eller cellekulturer for å ødelegge variantceller som uttrykker uønsket antigen, der fremgangs-måten omfatter å behandle cellene med en effektiv mengde av et cellebindingsmiddel-maytansinoidkonjugat, der ett eller flere maytansinoider er kovalent bundet til cellebindings-midlet via en ikke-kløyvbar linker og cellebindingsmidlet binder til cellene som skal bli ødelagt.

35 Betingelsene for klinisk og ikke-klinisk *in vitro*-anvendelse kan egentlig bli bestemt av en fagperson på området.

For eksempel kan behandling bli utført som følger. Benmarg kan bli høstet fra pasienten eller annet individ og deretter bli innkubert i medium inneholdende serum til hvilket det er tilsatt det cytotoksiske middel ifølge oppfinnelsen, konsentrasjonsområdet

fra omtrent 10 pM til 1 nM i omtrent 30 minutter til omtrent 48 timer ved omtrent 37 °C. De eksakte betingelsene for konsentrasjon og tid for innkubering, det vil si dosen, kan enkelt bli bestemt av en fagperson på området. Etter innkubering kan benmargscellen bli vasket med et medium inneholdende serum og ført tilbake i pasienten intravenøst i henhold til kjente fremgangsmåter. I tilfeller der pasienten mottar annen behandling slik som i en omgang med ablativ kjemoterapi eller totalkroppsbestråling mellom tidspunktet for høsting av marg og reinfeksjon av behandlede celler kan de behandlede margcellene bli lagret frosne i flytende nitrogen ved å benytte standard medisinsk utstyr.

For klinisk *in vivo*-anvendelse kan det cytotoksiske midlet bli tilført som en løsning eller et lyofilisert pulver som er testet for sterilitet og for endotoksinnivåer. Eksempler på passende protokoller for konjugatadministrering er som følger. Konjugater kan bli gitt ukentlig i fire uker som en intravenøs bolus hver uke. Bolusdoser kan bli gitt i 50 til 500 ml normalt fysiologisk saltvann til hvilket 5 til 10 ml humant serumalbumin kan bli tilsatt. Doseringer vil være 10 mg til 2 000 pr. administrering intravenøst (i området 100 ng til 20 mg/kg pr. dag). Etter fire uker med behandling kan pasienten fortsette å motta behandling på en ukentlig basis.

Spesifikk *in vivo*-kliniske protokoller med hensyn på administreringsmåte, eksipienser, fortynningsmidler, doseringer, tider osv. kan bli bestemt av en fagperson på området etter som den kliniske situasjonen krever.

Hvis ønskelig kan andre aktive midler slik som andre antitumormidler bli administrert sammen med konjugatet.

Nye konjugater, preparater og fremgangsmåter for å fremstille konjugatene

Mens noen konjugater er antistoffer av maytansinoider som er bundet med en ikke-kløyybar linker er kjente, så er andre nye. Derfor blir det tilveiebrakt et cellebindings-middelmaytansinoidkonjugat som har minst ett maytansinoid bundet til et cellebindings-middel via en ikke-kløyybar linker, gitt at linkerens ikke omfatter en gruppe som er avledet fra et kryssbindingsmiddel som er valgt fra gruppen som består av: succinimidyl-4-(N-maleimidometyl)-sykloheksan-1-karboksylat (SMCC), sulfo-SMCC, m-maleimidobenzoyl-N-hydroksysuccinimidester (MBS), sulfo-MBS og succinimidyl-jodacetat når cellebindingsmidlet er et antistoff.

De nye konjugatene kan bli fremstilt og benyttes som beskrevet ovenfor.

Preparatet omfatter cellebindingsmiddelmaytansinoidkonjugatet og en bærer.

Bæreren kan være en farmasøytisk akseptabel bærer, fortynningsmiddel eller eksipiens.

Passende farmasøytisk akseptable bærere, fortynningsmidler og eksipienser er velkjente og kan bli bestemt av fagfolk på området slik den kliniske situasjonen krever dette.

Eksempler på passende bærere, fortynningsmidler og/eller eksipienser: (1) Dulbeccos fosfatbufrede saltløsning, pH omtrent 7,4, inneholdende eller ikke inneholdende omtrent 1 mg/ml til 25 mg/ml humant serumalbumin, (2) 0,9 % fysiologisk saltløsning (0,9 vekt/volum NaCl) og (3) 5 % (vekt/volum) dekstrose og kan også
5 inneholde en antioksidant slik som tryptamin og et stabiliserende middel slik som Tween-20.

For disse nye konjugatene blir også syntesefremgangsmåter tilveiebrakt.

En av fremgangsmåtene for fremstilling av cellebindingsmiddelmaytansinoid-konjugatet omfatter:

- 10 (a) tilveiebringe cellebindingsmidlet
(b) modifisere cellebindingsmidlet med et kryssbindingsmiddel og
(c) konjugere det modifiserte cellebindingsmidlet med et maytansinoid eller et tiolinneholdende maytansinoid for derved å tilveiebringe den ikke-kløyvbare linkeren mellom cellebindingsmidlet og maytansinoidet eller det tiolinneholdende maytansinoidet
15 for å fremstille konjugatet.

En annen fremgangsmåte for å fremstille cellebindingsmiddelmaytansinoid-konjugatet omfatter:

- (a) tilveiebringe maytansinoidet eller et tiolinneholdende maytansinoid,
(b) modifisere maytansinoidet eller det tiolinneholdende maytansinoidet med et
20 kryssbindende middel for derved å danne en ikke-kløyvbar linker og
(c) konjugere det maytansinoidet eller det tiolinneholdende maytansinoidet med cellebindingsmidlet for derved å tilveiebringe den ikke-kløyvbar linkeren mellom cellebindingsmidlet og maytansinoidet eller det tiolinneholdende maytansinoidet for å fremstille konjugatet.

25 En ytterligere prosess for fremstilling av cellebindingsmiddelmaytansinoid-konjugatet omfatter:

- (a) tilveiebringe maytansinoidet
(b) modifisere maytansinoidet for å tilveiebringe et ikke-svovelinneholdende maytansinol som har en aktiv ester og
30 (c) konjugere det modifiserte maytansinoidet med cellebindingsmidlet for derved å tilveiebringe en ikke-S-inneholdende-ikkekløyvbar linker mellom cellebindingsmidlet og maytansinol for å fremstille konjugatet.

Disse fremgangsmåtene er beskrevet i detalj ovenfor og i US-patentene som er referert til
35 her.

EKSEMPLER

Oppfinnelsen vil nå bli illustrert med referanser til eksempler. Hvis ikke annet er understreket er alle prosentandeler, forhold, deler osv. etter vekt. Eksempel 2 og 3 illustrerer oppfinnelsen, de andre eksemplene er referanse eksempler.

Bufferne som ble benyttet i de følgende eksperimentene var: 50 mM kaliumfosfat (KPi)/50 mM natriumklorid (NaCl)/2 mM etylendiamitetraeddiksyre (EDTA), pH 6,5 (buffer A), 1x fosfatbufret fysiologisk saltvann (PBS), pH 6,5 (buffer B), og 0,1 M KPi-buffer/2 mM EDTA ved pH 7,5 (analysebuffer).

SMCC (produkt nr. 22360, M.W. 334,33 g/mole) og SIAB (produkt nr. 22329, M. W. 412,15 g/mole) ble kjøpt fra Pierce. huC242-antistoffet er en humanisert form av det monoklonale antistoffet C242, beskrevet i US patentskrift 5 552 293, der hybridomet er deponert med ECACC-identifikasjonsnummer 90012601). Tastuzumabantistoff ble fremskaffet fra Genentech. DM1 (fri tiolform, M.W. 737,5 g/mole) ble fremstilt som beskrevet tidligere i US patentskrift 5 208 020 og 6 333 410 B1.

Kromatografi ble utført ved å benytte kromatografikolonner som ble kjøpt fra Amersham Biosciences (Sephadex G25 NAP-25 forhåndspakkede kolonner (Amersham 17-0852-02), HiPrep 26/10 avsaltingskolonner, Sephadex G25 fine resin, 3 sammenbundet i serie (Amersham 17-5087-01)). TSK-GEL G3000SWXL-kromatografikolonner (TOSOH Bioscience, 08541) ble også benyttet med TSK Column Guard SWxl (TOSOH Bioscience 08543).

Løsningsmidler som ble benyttet i de følgende eksperimentene var dimetylsulfoksid (DMSO), dimetylacetamid (DMA), etanol (EtOH) og 100 mM Ellmans reagens (DTNB, tilgjengelig fra Cayman Chemical) i DMSO.

EKSEMPEL 1A - REFERANSEEKSEMPEL

Fremstilling av huC242-SMCC-DM1-konjugat

a. Fremstilling og måling av huC242-antistoff

Konsentrasjonen av antistoff ble målt ved å benytte en ekstinksjonskoeffisient på $1,48 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ ved 280 nm og en molekylvekt på 147 000 g/mole.

b. Fremstilling og måling SMCC-stokkløsning

En 20 mM løsning av SMCC (6,69 mg/ml) ble fremstilt i dimetylsulfoksid (DMSO). Løsningen ble fortynnet 1/40 i analysebuffer og absorbansen til prøvene ble målt ved 302 nm. Konsentrasjonen av stokkløsningen ble beregnet til å benytte en ekstinksjonskoeffisient på $602 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

c. Fremstilling og måling DM1-stokkløsning

En 10 nM løsning av DM1 (fri tiolform) ble fremstilt i dimetylacetamid (DMA)

(7,37 mg/ml) (figur 2). Absorbansen i fortynningene av stokkløsningen i etanol (EtOH) ble målt ved 280 nm. Konsentrasjonen i stokk-DM1 ble beregnet ved å benytte en ekstinksjonskoeffisient på $5\,700\text{ M}^{-1}$ ved 280 nm. Konsentrasjonen av frie sulfhydryl- eller tiolgrupper (-SH) i stokk-DM1-preparatet ble benyttet ved å bruke Ellmans reagens (DTNB). Fortynninger av stokkløsningen ble fremstilt i analysebuffer til 3 % (volum/volum) DMA og deretter ble 100 nM DTNB i DMSO (1/100 volum) tilsatt. Økningen i absorbans ved 412 nm ble målt mot en nullprøve og konsentrasjonen ble beregnet ved å benytte en ekstinksjonskoeffisient på $14\,150\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Konsentrasjonen av -SH som fremkom fra Ellman-analysen ble benyttet til å representere DM1-stokk-konsentrasjonen i beregninger for konjugeringsbetingelser.

d. Modifisering av huC242 med SMCC-kryssbinder

Antistoffet ble splittet i to prøver, en ble modifisert ved å benytte et 7,5 gangers molart overskudd av SMCC-kryssbinder, den andre med et 8,5 gangers molart overskudd av SMCC-kryssbinder. Prøver ble reagert ved 8 mg/ml antistoff. Reaksjonene ble utført i buffer A (95 % volum/volum) med DMSO (5 % volum/volum) i 2 timer ved romtemperatur under omrøring.

e. G25-kromatografi for å fjerne overskudd av SMCC

huC242-SMCC-reaksjonsblandingene ble gelfiltrert gjennom $1,5 \times 4,9$ cm forhåndspakkede kolonner med Sephadex G25-resin balansert i buffer A. Påsetnings- og elueringsvolumet var i henhold til produsentens instruksjoner. Det eluerte, modifiserte, antistoffet ble analysert for å bestemme konsentrasjonen av antistoffet ved å benytte ekstinksjonskoeffisienten som er beskrevet overfor. Utbyttet av modifisert antistoff var 74,6 % for reaksjonen med 7,5 ganger molart overskudd av SMCC og 81,6 % for reaksjonen med 8,5 ganger molart overskudd av SMCC.

f. Konjugering av huC242-SMCC med DM1

De modifiserte antistoffprøvene ble reagert med et 1,7 gangers overskudd av DM1 i forhold til linker (ved å anta 5 linkere pr. antistoff). Reaksjonen ble utført ved en antistoffkonsentrasjon på 2,5 mg/ml i buffer A (97 % volum/volum) med DMA (3 % volum/volum). Etter tilsetning av DM1 ble reaksjonen innkubert ved romtemperatur i omtrent 20 timer under omrøring.

g. Konjugeringsrensing ved hjelp av G25-kromatografi

Konjugeringsreaksjonsblandingene ble gelfiltrert via $1,5 \times 4,9$ cm forhåndspakkede kolonner med Sephadex G25-resin balansert i buffer B. Påsetnings- og elueringsvolumene var i overensstemmelse med produsentens instruksjoner. Antallet DM1-molekyler som er bundet pr. mol huC242 ble bestemt ved å måle absorbans i det

eluerte materialet ved både 252 nm og 280 nm. Forholdet DM1/antistoff for SMCC-prøven med 7,5 ganger molart overskudd ble funnet å være 3,54 og forholdet for SMCC-prøven med 8,5 ganger molart overskudd ble funnet å være 3,63.

Konjugeringstrinnutbyttene var henholdsvis 83,7 % og 75,4 %. Begge konjugater ble slått sammen, sterilfiltrert og analysert på nytt for legemiddel- og antistoffkonsentrasjoner. Den sammenslåtte prøven ble tilordnet Lot # 1713-146C og analysert for binding, cytotoksisitet, spesifisitet, omfang av aggregering og fritt legemiddelinnhold.

Tabell 1. Karakteristika for huC242-SMCC-DM1

Referansenummer	Sluttprotein kons. (mg/ml)	Slutt-DM1 kons. (µg/ml)	DM1/Ab
1713-146C	1,77	26,96	3,05

EKSEMPEL 1B - REFERANSEEKSEMPEL

***In vitro*-testing av huC242-SMCC-DM1**

a. Binding

Bindingsaffinitetene for huC242-antistoff og huC242-SMCC-DM1 ble sammenlignet ved å benytte en indirekte fremgangsmåte på COLO205-celler, der 5×10^3 celler per brønn ble benyttet, med en primær inkubering på is i tre timer. Resultatene er vist i figur 3. Det nakne antistoffet bandt med en KD på $5,1 \times 10^{-10}$ M og den konjugerte versjonen bandt med en KD på $5,52 \times 10^{-10}$ M. Slik ser det ikke ut til at konjugering med DM1 endrer bindingsaffiniteten for hu242.

b. Cytotoksisitet og spesifisitet

In vitro-cytotoksisiteten og -spesifisiteten til huC242-SMCC-DM1-konjugat ble undersøkt ved å benytte en klonogen analyse med kontinuerlig eksponering. Resultatene er vist i figur 4. huC242-SMCC-DM1 var effektivt i å ødelegge de antigenpositive SKBR3-cellene ($IC_{50} = 3,5 \times 10^{-12}$ M). Spesifisitet ble vist ved å sammenligne IC_{50} -verdien for mål-SKBR3-celler med den for den antigennegative cellelinjen, A375, der IC_{50} for konjugatet var større en $3,0 \times 10^{-9}$ M.

c. Størrelseseksklusjonskromatografianalyse

Konjugatet ble analysert ved å benytte en TSK3000 størrelseseksklusjonskolonne (figur 5). Topp 4 representerer monomerfraksjonen av konjugatet mens tidligere topper representerer multimer og senere topper representerer fragment. Arealet under hver

kurve delt på totale topparealer representerer toppens bidrag til prøven. Konjugatprøven ble funnet å være 96,0 % monomer.

d. *Fritt legemiddel*

5 Prosentandelen av fritt legemiddel ble målt ved hjelp av ELISA og ble funnet å være 4,4 %.

EKSEMPEL 2A

Fremstilling av trastuzumat-SMCC-DM1-konjugat

10 Trastuzumabantistoff ble fremskaffet fra Genentech for konjugering til DM1 ved å benytte det ikke-kløyvbare, heterobifunksjonelle, kryssbindingsreagenset SMCC. Buffer ble byttet på antistoffet fra 50 mM kaliumfosfat/2 mM EDTA, pH 6,0 til 50 mM kaliumfosfat/50 mM natriumklorid/2 mM EDTA, pH 6,5 (buffer A). Antistoffet ble deretter reagert med et 7,5 ganger molart overskudd av SMCC-linker og rensset ved hjelp av
15 Sephadex-G25-resin før det ble konjugert med DM1. Det endelige konjugatet ble igjen rensset med Sephadex-G25-resin. Det resulterende konjugatet inneholdt 3,1 M med DM1 pr. mol antistoff.

a. *Fremstilling og måling av trastuzumabantistoff*

20 Trastuzumabantistoff i 50 mM kaliumfosfat/2 mM EDTA, pH 6,0 buffer ble passert over en Sephadex-G25-kolonne som var balansert med buffer A og eluert inn i buffer A. Alle bufferne som ble benyttet i dette eksperimentet ble testet for å være sikker på at de var fri for endotoksin ved å benytte en kromogen Lymulus-amoebocyte-lysat (LAL)-fremgangsmåte (Cambrex). Konsentrasjonen av antistoff ble målt ved å benytte en
25 ekstinksjonskoeffisient på $1,45 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ved 280 nm og en molekylvekst på 145 423 g.

b. *Fremstilling og måling av SMCC-stokkløsning*

30 En 20 mM løsning av SMCC (6,69 mg/ml) ble fremstilt i DMSO. Løsningen ble fortynnet 1/40 i analysebuffer og absorbansen til prøven ble målt ved 203 nm. Konsentrasjonen av stokkløsningen ble beregnet ved å benytte en molar ekstinksjonskoeffisient på $602 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

c. *Fremstilling og måling av DM1-stokkløsning*

35 En 10 mM løsning av DM1 (fri tiolform) ble fremstilt i DMA (7,37 mg/ml) (figur 2). Absorbansen til fortynninger av stokkløsningen i EtOH ble målt ved 280 nm. Konsentrasjonen av DM1-stokkløsning ble beregnet ved å benytte en molar ekstinksjonskoeffisient på $5\,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ved 280 nm. Konsentrasjonen av fri-SH i DM1-stokkløsningen ble målt ved å benytte Ellmans reagens (DTNB). Fortynninger av

stokkløsningen ble fremstilt i analysebuffer og laget til 3 % (volum/volum) DMA og deretter ble 100 nM DTNB i DMSO (1/100 volum) tilsatt. Økningen i absorbans ved 412 nm ble målt mot en nullprøve og konsentrasjonen ble beregnet ved å benytte en ekstinksjonskoeffisient på $14\,159\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Konsentrasjonen av -SH som fremkom fra Ellman-analysen ble benyttet til å representere DM1 til stokkløsningskonsentrasjonen i beregninger for konjugeringsbetingelser.

d. Modifisering av trastuzumab med SMCC-kryssbinder

Antistoffet ble modifisert ved å benytte et 7,5 gangers molart overskudd av SMCC ved 20 mg/ml antistoff. Reaksjonen ble utført i buffer A (95 % volum/volum) med DMSO (5 % volum/volum) i 2 timer ved romtemperatur under omrøring.

e. G25-kromatografi for å fjerne overskudd av SMCC

Trastuzumab-SMCC-reaksjonsblandingen ble gelfiltrert gjennom 1,5 x 4,9 cm forhåndspakket kolonne med Sephadex-G25-resin balansert til buffer A. Påsettings- og elueringsvolumene var i henhold til produsentens instruksjoner (Amersham Biosciences). Konsentrasjonen av den modifiserte antistoffløsningen ble analysert spektrofotometrisk ved å benytte ekstinksjonskoeffisienten som er beskrevet ovenfor. Utbyttet av modifisert antistoff var 88 % basert på proteinkonsentrasjon.

f. Konjugering av trastuzumab- SMCC med DM1

Det modifiserte antistoffet ble reagert med et 1,7 gangers overskudd av DM1 i forhold til linker (ved å anta 5 linkere pr. antistoff). Reaksjonen ble utført ved 10 mg/ml antistoffkonsentrasjon i buffer A (94 % volum/volum) med DMA (6 % volum/volum). Etter tilsetning av DM1 ble reaksjonen innkubert ved romtemperatur i 16, 5 timer under omrøring.

g. Konjugeringsrensing ved hjelp av G25-kromatografi

Konjugeringsreaksjonsblandingen ble gelfiltrert gjennom en 1,5 x 4,9 cm forhåndspakket kolonne med Sephadex-G25-resin balansert i buffer B. Påsettings- og elueringsvolumene var i henhold til produsentens instruksjoner (Amersham Biosciences). Antallet DM1-molekyler bundet pr. mol med trastuzumab ble bestemt ved å måle absorbans ved både 252 nm og 280 nm for det eluerte materialet. Forholdet DM1/antistoff ble funnet å være 3,13 og konjugeringstrinnutbyttet var 95,7 %. Det totale utbyttet av konjugert trastuzumab var 84 % basert på utgangsantistoffet. Det resulterende konjugatet ble analysert for binding, cytotoksitet, spesifisitet, omfang av aggregering og fritt legemiddelinnehold.

Tabell II. Karakteristika for trastuzumab-SMCC-DM1

Referansenummer	Sluttprotein kons. (mg/ml)	Slutt-DM1 kons. (µg/ml)	DM1/Ab
1762-14	6,71	106	3,13

EKSEMPEL 2B

In vitro-testing av trastuzumat-SMCC-DM1

Bindingsundersøkelser viste at konjugeringen av antistoff til DM1 ikke påvirket den tilsynelatende K_D , både nakent trastuzumabantistoff og trastuzumat-SMCC-DM1-konjugat hadde den samme bindingsaffiniteten til ECD-plater ($5,5 \times 10^{-11}$ M). Evaluering av *in vitro*-cytotoksiteten for prøven viste at trastuzumab-SMCC-DM1-konjugatet både er svært toksisk (IC_{50} $3,6 \times 10^{-12}$ M på antigenpositiv cellelinje) og spesifikt (IC_{50} større enn $3,0 \times 10^{-9}$ M på antigennegativ cellelinje).

a. Binding

Bindingsaffiniteten til trastuzumabantistoff og trastuzumat-SMCC-DM1 ble sammenlignet ved å benytte HER2-ECD-platebindingsanalysen tilveiebrakt av Genetech. Resultatene er vist i figur 24. Både det nakne antistoffet og den konjugerte versjonen begynner med en tilsynelatende K_D på $5,5 \times 10^{-11}$ M. Slik endrer ikke konjugering med DM1 bindingsaffiniteten til trastuzumab.

b. Cytotoksitet og spesifisitet

In vitro-cytotoksiteten og spesifisiteten til trastuzumab-SMCC-DM1-konjugatet ble evaluert ved å benytte en klonogen analyse med kontinuerlig eksponering. Resultatene er vist i figur 25. Trastuzumab-SMCC-DM1 var effektiv til å ødelegge de antigenpositive SKBR3-cellene (IC_{50} $1,6 \times 10^{-12}$ M). Spesifisitet ble vist når IC_{50} ble sammenlignet for mål-SKBR3-cellene og den antigennegative cellelinjen A375, der IC_{50} for konjugatet var større enn $3,0 \times 10^{-9}$ M.

c. Størrelseseksklusjonskromatografianalyse

Konjugatet ble analysert ved å benytte en TSK3000 størrelseseksklusjonskolonne (figur 26). Topp 1 representerer multimer, topp 2 representerer dimer og topp 3 representerer monomer. Arealet under hver kurve delt på totale topparealer representerer toppens bidrag til prøven. Konjugatprøven ble funnet å være 95,3 % monomer (figur 26).

d. Analyse av fritt legemiddel

Prosentandelen av fritt legemiddel ble målt ved hjelp av ELISA og funnet å være 3,4 %.

e. Endotoksinnivå

Konjugatet ble testet ved å benytte en kromatografisk LAL-test og funnet å inneholde 0,03 EU/mg.

EKSEMPEL 3A

Fremstilling av trastuzumat-SIAB-DM1-konjugat

Trastuzumabantistoff ble fremskaffet fra Genetech for konjugering til DM1 ved å benytte den ikke-kløyvbare heterobifunksjonelle kryssbinderen SIAB. Antistoffet ble reagert med 7,0 ganger molart overskudd av SIAB-linker ved pH 6,5 og rensset ved hjelp av Sephadex-G25F-resin. Antistoffinneholdende fraksjoner ble slått sammen og reagert med DM1 over natt ved standard konjugeringsbetingelser med pH 6,5 og romtemperatur, men i mørke. Et volum ble fjernet fra reaksjonsrøret og analysert for å bestemme inkorporering av DM1. Volumet ble målt etter en NAP-5-filtrering til å ha kun 1,4 legemidler/Ab. Et ytterligere 8 ganger overskudd av SIAB ble tilsatt til reaksjonen i 2 timer og deretter ble pH økt til 8 rett før tilsetningen av ytterligere 1,5 ganger overskudd av DM1/SIAB. Reaksjonen ble tillatt å fortsette og ble rensset ved å benytte Sephadex-G25F-resin. Det resulterende konjugatet inneholdt 3,42 mol DMI pr. mol antistoff.

a. Måling av trastuzumabantistoff

Konsentrasjonen av antistoff ble målt ved å benytte en ekstinksjonskoeffisient på $1,45 \text{ ml mg}^{-1} \text{ i cm}^{-1}$ ved 280 nm og en molekylvekt på 145 423 g.

b. Fremstilling og måling av SIAB-stokkløsning

En 18 mM løsning av SIAB (7,2 mg/ml) ble fremstilt i DMSO. En bølgelengdeskanning av løsningen fortynnet i pH 4-buffer ble registrert kun for informasjonshensikter.

c. Fremstilling og måling av DM1-stokkløsning

En løsning av DM1 (fri tiolform) på omtrent 30 mM ble fremstilt i DMA. Konsentrasjonen av fri -SH i DM1-stokkløsningen ble målt ved å benytte Ellman-reagens (DTMB). Fortynninger av stokkløsningen ble klargjort i analysebufferen og gjort til 3 % (volum/volum) DMA, og deretter ble 100 mM DTNV i DMSO (1/100 volum) tilsatt. Økningen i absorbans ved 412 nm ble målt mot en nullprøve og konsentrasjonen ble beregnet ved å benytte en molar ekstinksjonskoeffisient på $14\,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Konsentrasjonen av -SH som fremkom fra Ellman-analysen ble benyttet til å representere DM1-stokkkonsentrasjon i beregninger for konjugeringsbetingelser.

d. Modifisering av trastuzumab med SIAB-kryssbinder

Antistoffet ble modifisert ved å benytte et 7,0 ganger molart overskudd av SIAB ved 20 mg/ml antistoff. Reaksjonen ble utført i buffer A (95 % volum/volum) med DMSO (5 % volum/volum) i 2 timer ved romtemperatur under omrøring i mørke.

e. G25-kromatografi for å fjerne overskudd av SIAB

Trastuzumab-SIAB-reaksjonsblandingen ble gelfiltrert gjennom HiPrep 26/10 avsaltingskolonner balansert i buffer A. Det så ut til å være en interferens ved 280 nm fra SIAB-reagenset slik at utbyttet av modifisert antistoff ble antatt å være 100 % og en modifisering med 5 linkere/antistoff ble antatt for bestemmelse av mengden av DM1 i konjugeringsreaksjonen.

f. Konjugering av trastuzumab-SIAB med DM1

Det modifiserte antistoffet ble reagert med en 1,7 ganger overskudd av DM1 i forhold til linker ved å anta 100 % utbytte og 5 kryssbindere/antistoff som nevnt ovenfor. Konsentrasjonen av antistoff i reaksjonen ble beregnet til å være 12,5 mg/ml og reaksjonen ble utført i buffer A (97 % volum/volum) med DMA (3 % volum/volum). Etter tilsetning av DM1 ble reaksjonen innkubert ved romtemperatur i mørke i 16,5 timer under omrøring.

g. Konjugeringsreaksjonsanalyse

Et volum på 0,25 ml fra reaksjonsblandingen ble fjernet og gelfiltrert gjennom en forhåndspakket G25-Sephadexkolonne balansert i buffer B. Antallet DM1-molekyler bundet pr. mol med trastuzumab ble bestemt ved å måle absorbans ved både 252 nm og 280 nm i det eluerte materialet. Forholdet DM1/antistoff var kun 1,4.

h. Ytterligere modifiserings-/konjugeringsreaksjon

Et ytterligere 8 gangers molart overskudd av SIAB ble tilsatt og tillatt å innkubere i 2 timer ved romtemperatur. Et 1,5 ganger molart overskudd av DM1 i forhold til SIAB ble tilsatt og pH i reaksjonen ble økt til 8 med tilsetning av 1 N NaOH. Reaksjonen ble innkubert ved romtemperatur i mørke og gelfiltrert gjennom en kolonne med G25F-resin balansert i buffer B.

i. Sammenslåing og karakterisering av konjugat

Proteininnholdende fraksjoner ble slått sammen, filtrert og målt ved absorbans ved 252 og 280 nm. Prøver av konjugatet ble testet for endotoksinnivå, binding, spesifikk og ikke-spesifikk cytotoxiskitet, prosentmonomer og fritt legemiddelnivå.

Tabell III. Karakteristika for trastuzumab-SIAB-DM1

Referansenummer	Sluttprotein kons. (mg/ml)	Slutt-DM1 kons. (µg/ml)	DM1/Ab
1806-32	5,62	97,3	3,42

EKSEMPEL 3B**5 In vitro-testing av trastuzumab-SIAB-DM1**

Bindingsundersøkelser viste at konjugering av antistoff til DM1 ikke påvirket den åpenbare K_D , både nakent trastuzumab og trastuzumab-SIAB-DM1 hadde tilsvarende bindingsaffiniteter ($1,2 \times 10^{-10}$ M Ab og $1,9 \times 10^{-10}$ M åpenbar K_D -konjugat). Evaluering av *in vitro*-cytotoksisteten til prøven viste at trastuzumab-SIAB-DM1-konjugatet både er svært toksisk ($IC_{50} = 5 \times 10^{-12}$ M på antigenpositiv cellelinje SKBR3) og spesifikt (IC_{50} større enn $3,0 \times 10^{-9}$ M på antigennegativ cellelinje A375).

a. Binding

Bindingsaffiniteten til trastuzumabantistoff og trastuzumab-SIAB-DM1 ble sammenlignet ved å benytte HER2-ECD-platebindingsanalysen tilveiebrakt av Genentech. Resultatene er vist i figur 27. Naken trastuzumab og trastuzumab-SIAB-DM1 hadde tilsvarende bindingsaffiniteter ($1,2 \times 10^{-10}$ M for antistoffet og $1,9 \times 10^{-10}$ M åpenbar K_D for konjugatet).

20 b. Cytotoksitet og spesifisitet

Evaluering av *in vitro*-cytotoksisteten for prøven viste at trastuzumab-SIAB-DM1-konjugatet både er svært toksisk ($IC_{50} = 5 \times 10^{-12}$ M på antigenpositiv cellelinje SKBR3) og spesifikt (IC_{50} større enn $3,0 \times 10^{-9}$ M på antigennegativ cellelinje A375). Se figur 28.

25 c. Størrelsesseksklusjonskromatografianalyse

Konjugatet ble analysert ved å benytte en TSK3000-størrelsesseksklusjonskolonne (figur 29). Topp 1 representerer dimer og topp 2 representerer monomer. Arealet under hver kurve delt på totalt toppareal representerer toppens bidrag til prøven. Konjugatprøven ble funnet å være 96,4 % monomer (figur 29).

30

d. Fritt legemiddel

Prosentandelen av fritt legemiddel ble målt ved ELISA og ble funnet å være 0,35 %.

35 e. Endotoksinnivå

Konjugatet ble testet ved å benytte en kromatografisk LAL-test og funnet å

inneholde >0,04 EU/mg.

EKSEMPEL 4 - REFERANSEEKSEMPEL

Konjugering av huC242 med et kryssbindingsmiddel som danner en ikke-S-inneholdende ikke-kløyvbar linker

a. Syntese

En stokkløsning av kryssbindingsreagenset (se figur 21 for struktur) ble klargjort i DMA, uløselig presipitat ble spunnet vekk og konsentrasjonen i den gjenværende løsningen ble bestemt til å benytte en ekstinksjonskoeffisient på $\epsilon^{280} = 5\,700\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ som er ekstinksjonen for DM1 ved denne bølgelengden. Siden den reelle ekstinksjonskoeffisienten for dette materialet ikke har blitt målt er dette kun et estimat på konsentrasjonen. Det bør bli påpekt at forholdet $\epsilon^{252}/\epsilon^{280}$ for DM1 er 4,7 (i EtOH) mens $\epsilon^{252}/\epsilon^{280}$ for kryssbindingsreagensløsningen (i pH 7,5 buffer) ble målt til 1,42, noe som verken tyder på ulike ekstinksjoner eller urenheter.

Konjugeringsreaksjonen ble utført i en skala på 2 mg ved å benytte 2,8 mg/ml huC242-antistoff i 16 % DMA i buffer E, pH 7,5 (buffer E = 50 mM natriumfosfat, 150 mM NaCl, 10mM EDTA). Basert på den estimerte kryssbindingsreagenskonsentrasjonen i stokkløsningen ble 30 ekvivalenter med kryssbinder/antistoff benyttet (et tidligere eksperiment som benyttet 10 eq med kryssbinder/antistoff produserte et konjugat med kun 0,9 DM1/antistoff). Reaksjonen ble tillatt å gå i 3 timer og deretter ble konjugatet renset ved passering gjennom en Nap-10 (G25)-kolonne. Etter filtrering (Millex GV filter, 0,2 μm porestørrelse), hadde konjugatet 2,56 DM1/antistoff (Lot # 1749-119A, antistoffgjenvinning = 78 %). Et volum av konjugatet ble undersøkt ved HPLC (HiPrep-kolonne) for fritt DM1 og en DM1-topp ble observert ved 12,09'. Prøven ble derfor dialysert i buffer B for å bli kvitt denne toppen og deretter bli analysert på nytt. Den endelige konjugatprøven (Lot # 1749-124A) hadde ikke noe fritt DM1 ifølge HPLC og hadde 1,84 DM1/antistoff. SEC-HPLC ble utført på konjugatet for å vise at det var 97 % monomert antistoff.

b. Cytotoksisitet og binding

Oppfinnerne utførte bindings- og cytotoksisitetsundersøkelser på det huC242-ikke-S-inneholdende ikke-kløyvbare linker-DM1-konjugatet. Først ble bindingsaffinitetene til huC242-antistoff, huC242-SMNP-DM3 og huC242-ikke-S-inneholdende, ikke-kløyvbar linker-DM1 sammenlignet ved å benytte en indirekte fremgangsmåte på COLO205-celler. 5×10^3 celler per brønn ble benyttet, med en primær inkubering på is i tre timer. Resultatene er vist i figur 23, som viser at det huC242-ikke-S-inneholdende ikke-kløyvbare linker-DM1-konjugatet hadde en omtrent to ganger høyere tilsynelatende dissosieringskonstant i forhold til fritt antistoff (se figur 23). I tillegg hadde det huC242-

ikke-S-inneholdende ikke-kløyvbare linker-DM1-konjugatet en *in vitro*-cytotoksisitet som var sammenlignbar med huC242-SMNP-DM3 (IC_{50} til det ikke-S-inneholdende ikke-kløyvbare linkerkonjugatet = $7,0 \times 10^{-12}$ M) (se figur 22).

PATENTKRAV

1. Cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugat som har følgende formel:

trastuzumab-*N*-succinimidyl-4-(maleimidometyl)sykloheksankarboksylat (SMCC)-

5 *N*^{2'}-deacetyl-*N*^{2'}-(3-merkpto-1-oksopropyl)-maytansin (DM1) eller trastuzumab-*N*-succinimidyl-4-(iodoacetyl)-aminobenzoat (SIAB)-DM1.

2. Cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugat ifølge krav 1,

hvor cellebindingsmidlet binder til celler som er valgt fra gruppen som består av

10 brystkreftceller, ovariekreftceller, ikke-småcellet lungekreftceller og bukspyttkjertelkreftceller.

3. Cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugat ifølge krav 1,

hvor cellebindingsmidlet binder til brystkreftceller.

15

4. Cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugat ifølge krav 1,

hvor cellebindingsmidlet binder til tumorceller.

5. Sammensetning omfattende cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugatet ifølge

20 ethvert av kravene 1 til 4 og en bærer.

6. Fremgangsmåte for fremstilling av cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugatet ifølge krav 1, hvor fremgangsmåten omfatter å:

(a) tilveiebringe cellebindingsmidlet

25

(b) modifisere cellebindingsmidlet med et kryssbindingsmiddel og

(c) konjugere det modifiserte cellebindingsmidlet med et maytansinoid eller et tiol-inneholdende maytansinoid for derved å tilveiebringe den ikke-kløyyvbare linkerens mellom cellebindingsmidlet og maytansinoidet eller det tiol-inneholdende maytansinoidet for å fremstille konjugatet.

30

7. Fremgangsmåte for fremstilling av cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugatet ifølge krav 1, hvor fremgangsmåten omfatter å:

(a) tilveiebringe maytansinoidet eller et tiol-inneholdende maytansinoid,

(b) modifisere maytansinoidet eller det tiol-inneholdende maytansinoidet med et

35

kryssbindingsmiddel for derved å danne en ikke-kløyyvbar linker og

(c) konjugere det modifiserte maytansinoidet eller tiol-inneholdende maytansinoidet med cellebindingsmidlet for derved å tilveiebringe den ikke-kløyyvbare linkerens mellom cellebindingsmidlet og maytansinoidet eller det tiol-inneholdende maytansinoidet for å fremstille konjugatet.

8. *In vitro* fremgangsmåte for å styre maytansinoider til en valgt cellepopulasjon, karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter å kontakte en cellepopulasjon eller et vev som er mistenkt for å inneholde den valgte cellepopulasjonen med et
5 cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugat, der cellebindingdmiddelet-maytansinoid-konjugated har følgende formel: trastuzumab-SMCC-DM1 eller trastuzumab-SIAB.

9. *In vitro* fremgangsmåte for eliminering av celler, karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter å kontakte cellene med et
10 cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugat der cellebindingsmiddelet-maytansinoid-konjugated har følgende formel: trastuzumab-SMCC-DM1 eller trastuzumab-SIAB.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 8 eller 9, hvor cellebindingsmidlet binder til tumorceller eller celler som uttrykker Her-2-antigenet.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 8 eller 9, hvor cellebindingsmidlet binder til celler utvalgt fra gruppen bestående av brystkreftceller, ikke-småcellet lungekreftceller og bukspyttkjertelkreftceller.

12. Cellebindingsmiddel-maytansinoid-konjugat som har følgende formel: trastuzumab-SMCC-DM1 eller trastuzumab-SIAB-DM1, der cellene er sykdomsrammede eller infiserte celler fra tumorer, for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av
20 nevnte tumorer, der fremgangsmåten omfatter å administrere til et individ med behov for behandling en effektiv mengde av nevnte konjugatet.

13. Konjugat ifølge krav 12, hvor tumorene er valgt fra gruppen som består av brystkreft, ikke-småcellet lungekreft, bukspyttkjertelkreftceller og ovariekreft.

FIG. 1

SMCC (suksinimidyl-4-(*N*-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat)

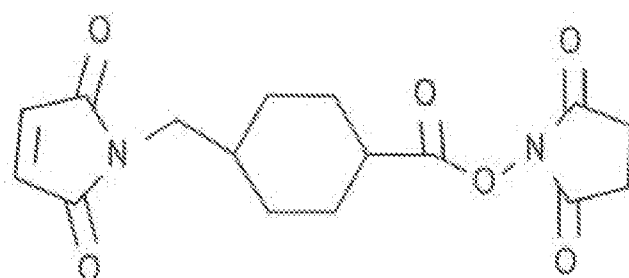


FIG. 2

DM1 (liolert maytansinoid)

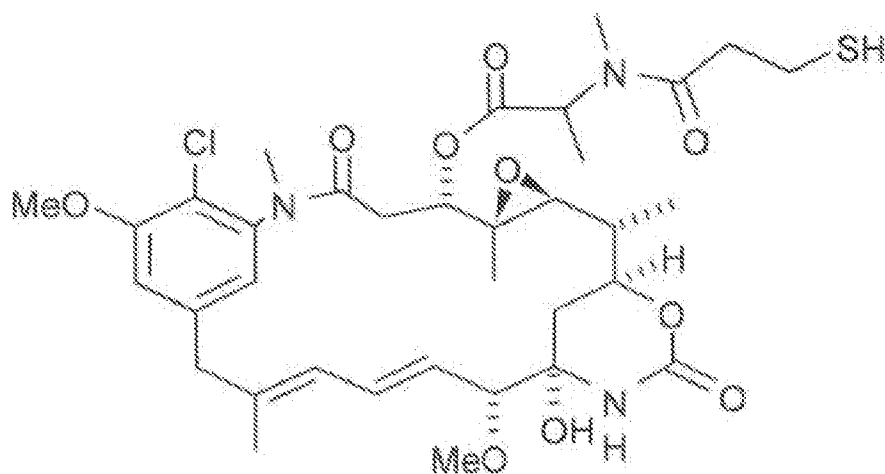


FIG. 3

FACS-bindingsanalyse av huC242-antistoff
og huC242-konjugat for COLO 205-celler

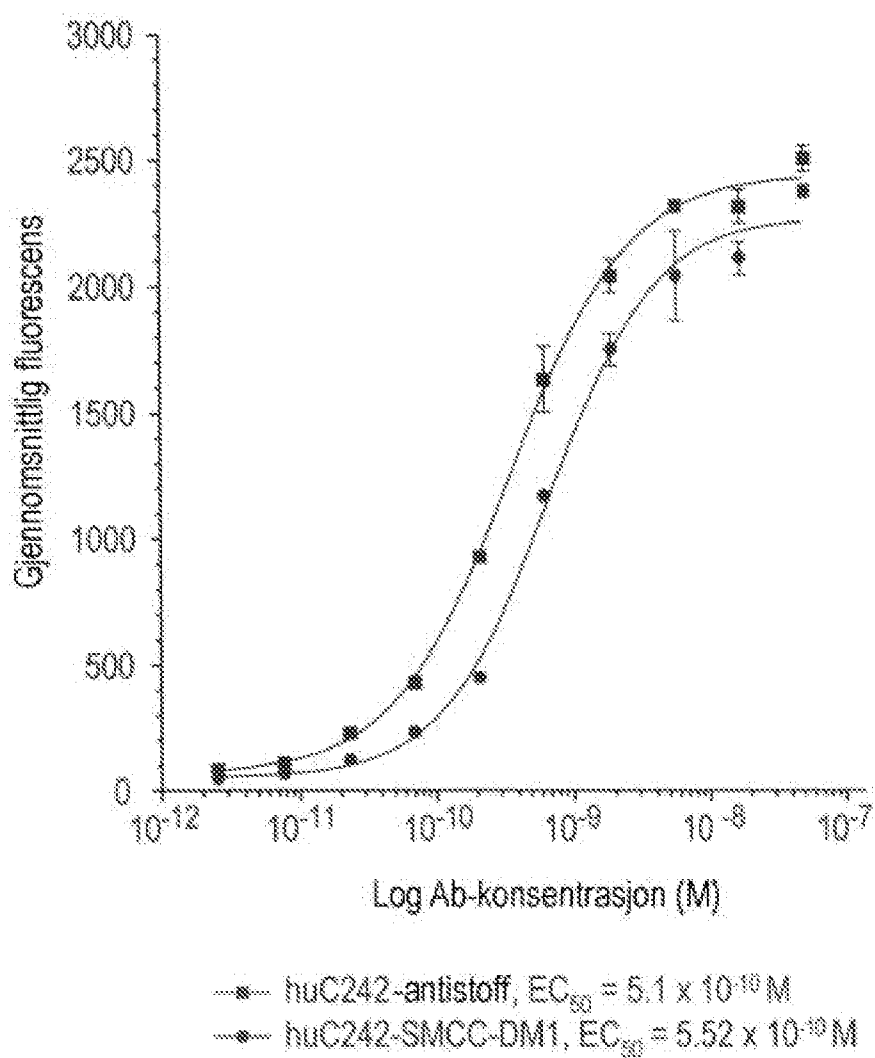


FIG. 4

Potensitetsevaluering av huC242-SMCC-DM1,
kontinuerlig eksponering, klonogen analyse

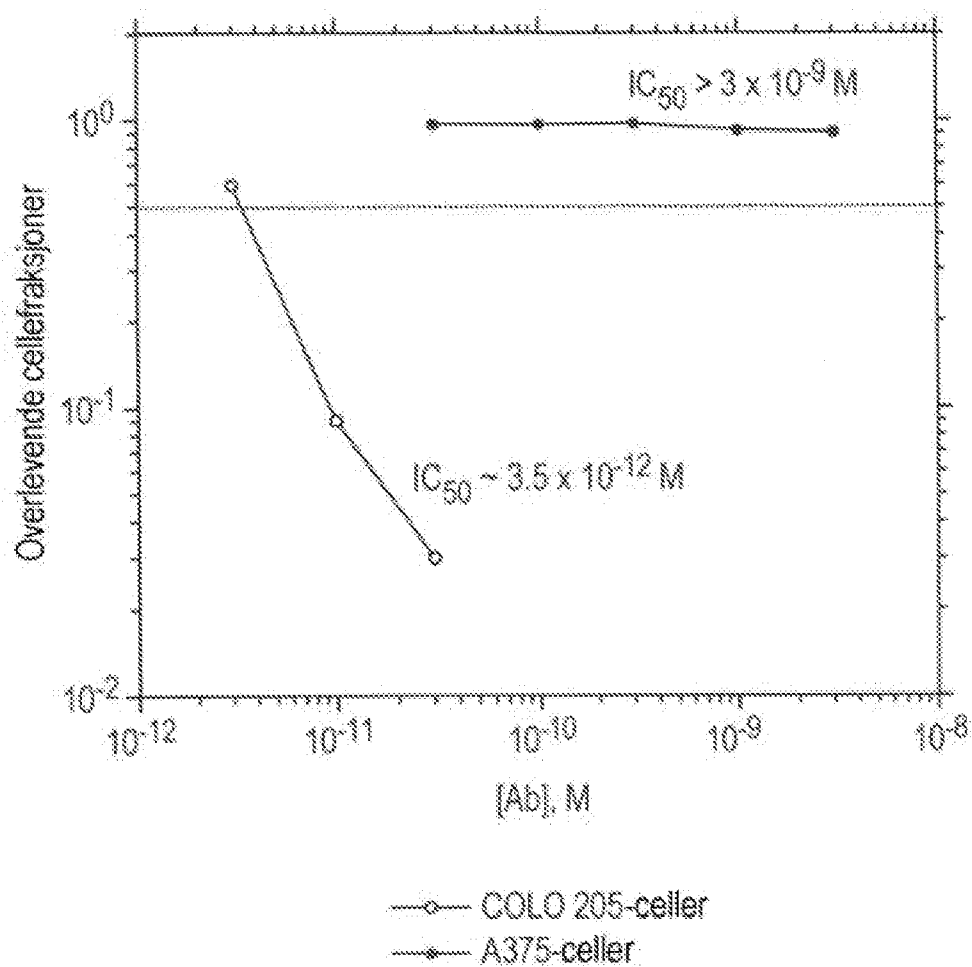


FIG. 5

Størrelsesekslusionskromatografi av huC242-SMCC-DM1

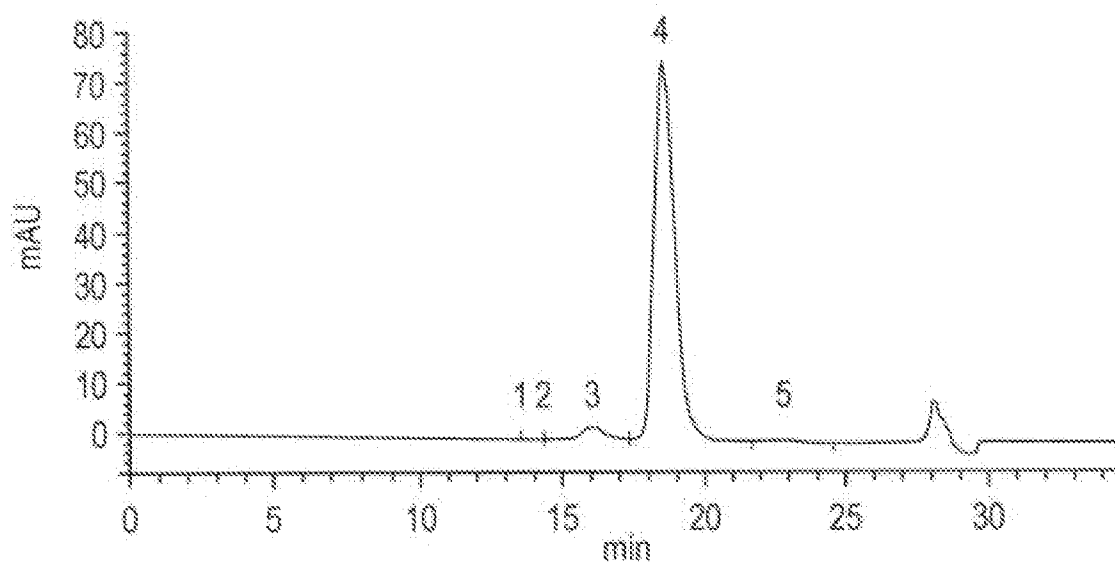


FIG. 6A

Cytotoksitet av huC242-SMCC-DM1
vs. COLO 205 (+) and A375 (-)
Kontinuerlig esponering, klonogen analyse

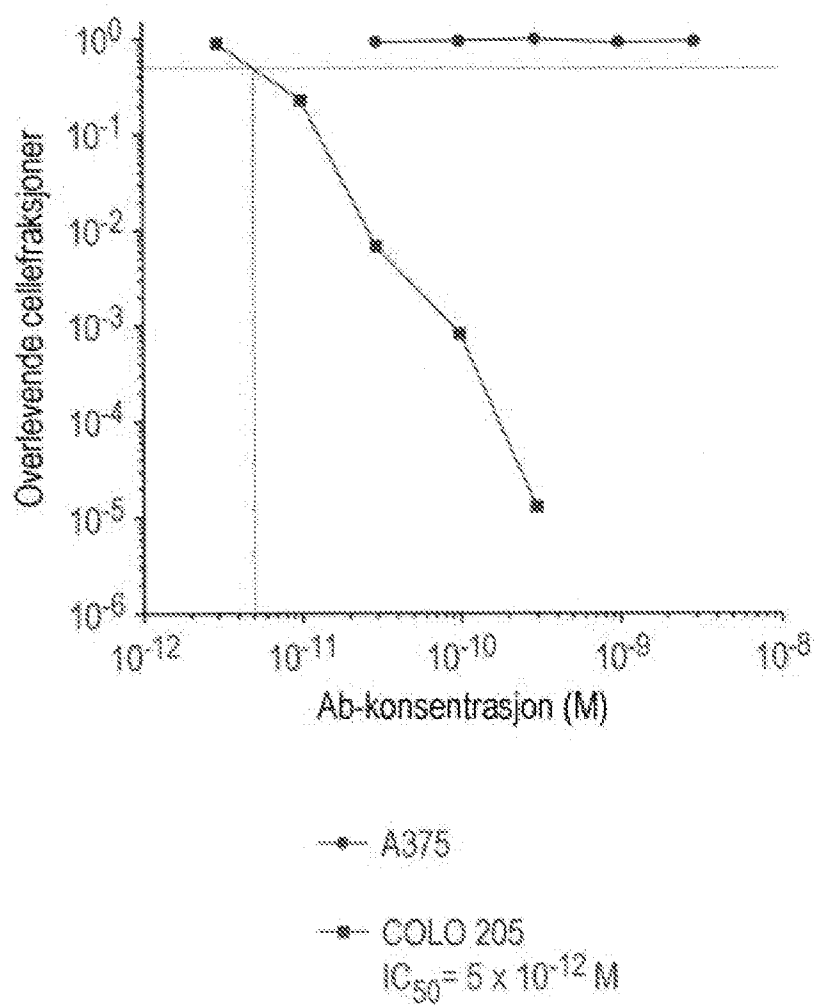
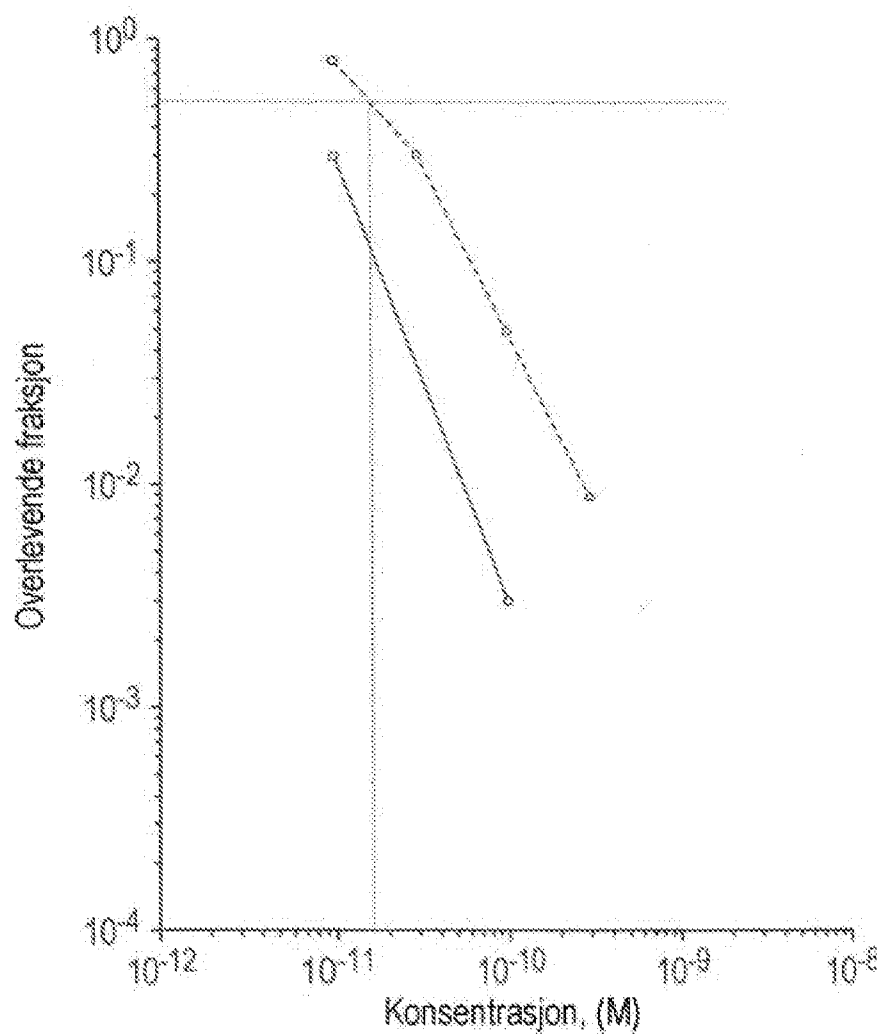


FIG. 6B

Cytotoksitet av huC242-konjugater vs. COLO 205-celler
24 timers eksponering, klonogen analyse



--- huC242-SPP-DM1
--- huC242-SMCC-DM1

FIG. 6C

Cytotoksitet av huC242-konjugater vs. COLO 205-celler
4 timers eksponering, klonogen analyse

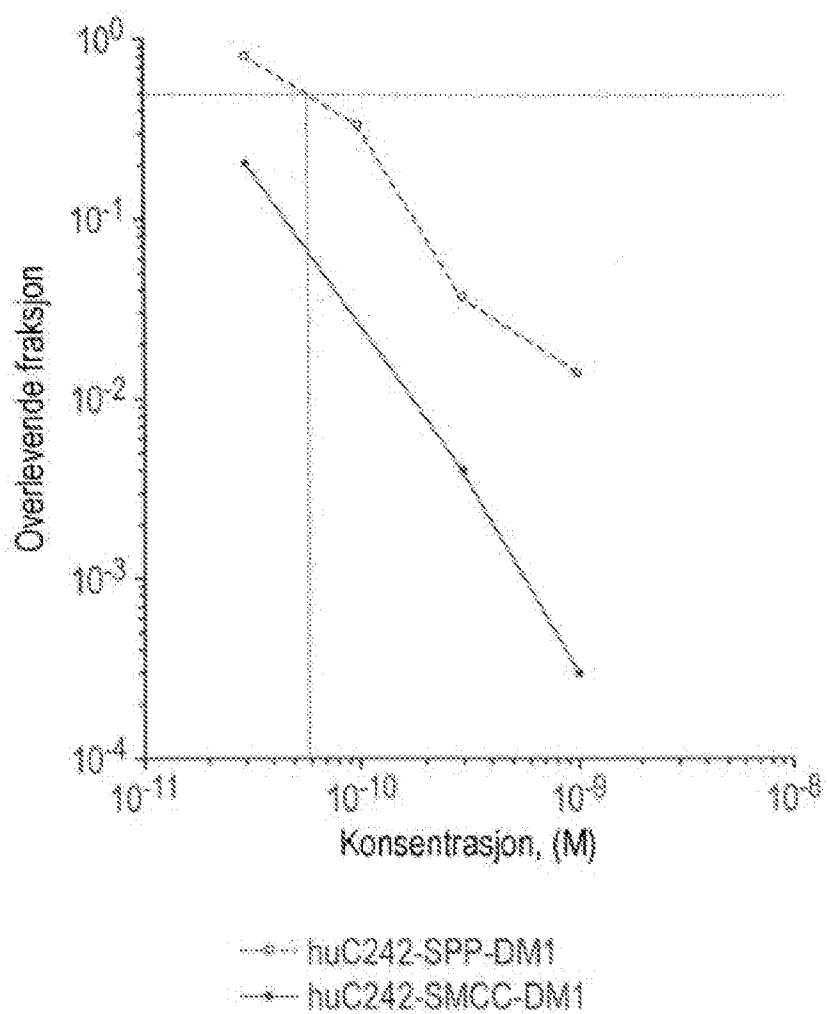


FIG. 7

In vitro-cytotoksitet av huC242-SMCC-DM1-konjugate vs. COLO 205(+)- og Namalwa(-)-celler
5 dagers inkubasjon, MTT-analyse

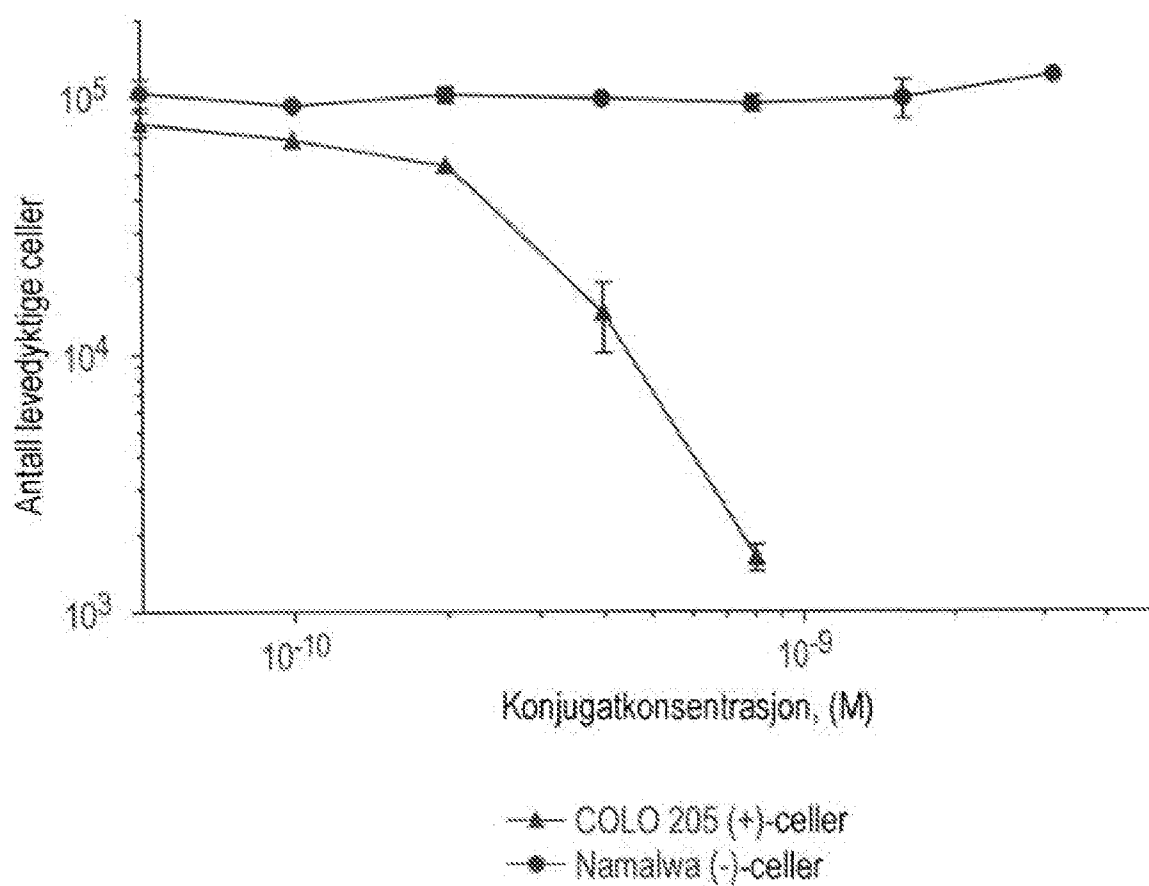
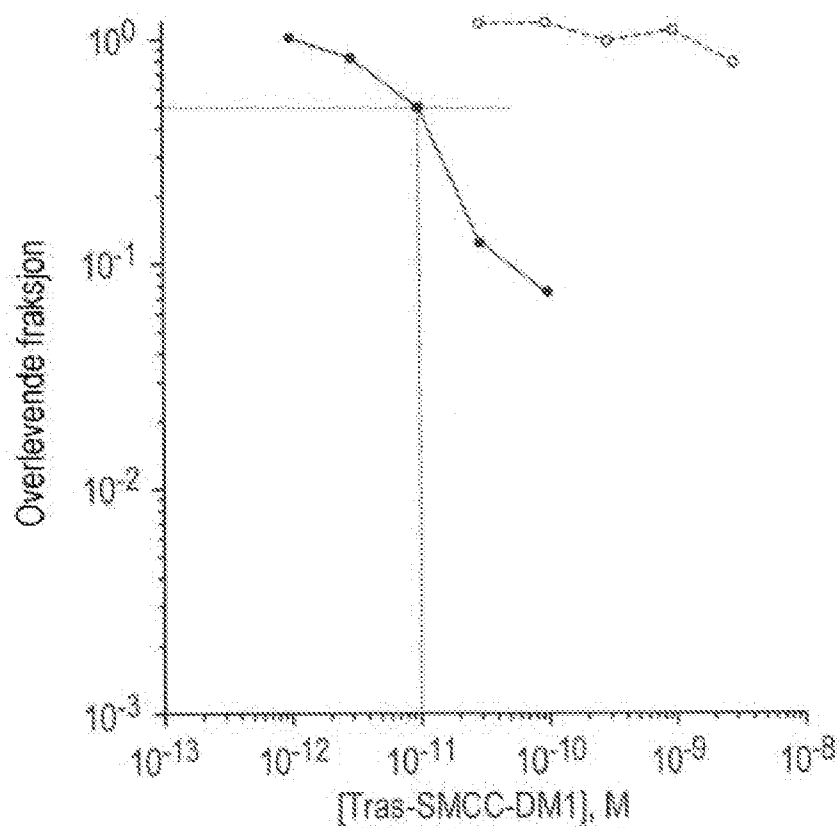


FIG. 8A

Cytotoksitet av
trastuzumab-SMCC-DM1
vs. SKBR3- og A375-celler



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

FIG. 8B

Potensitetsevaluering av My9-6-SMCC-DM1 vs. THP-1-celler
Kontunuerlig eksponering, klonogen analyse

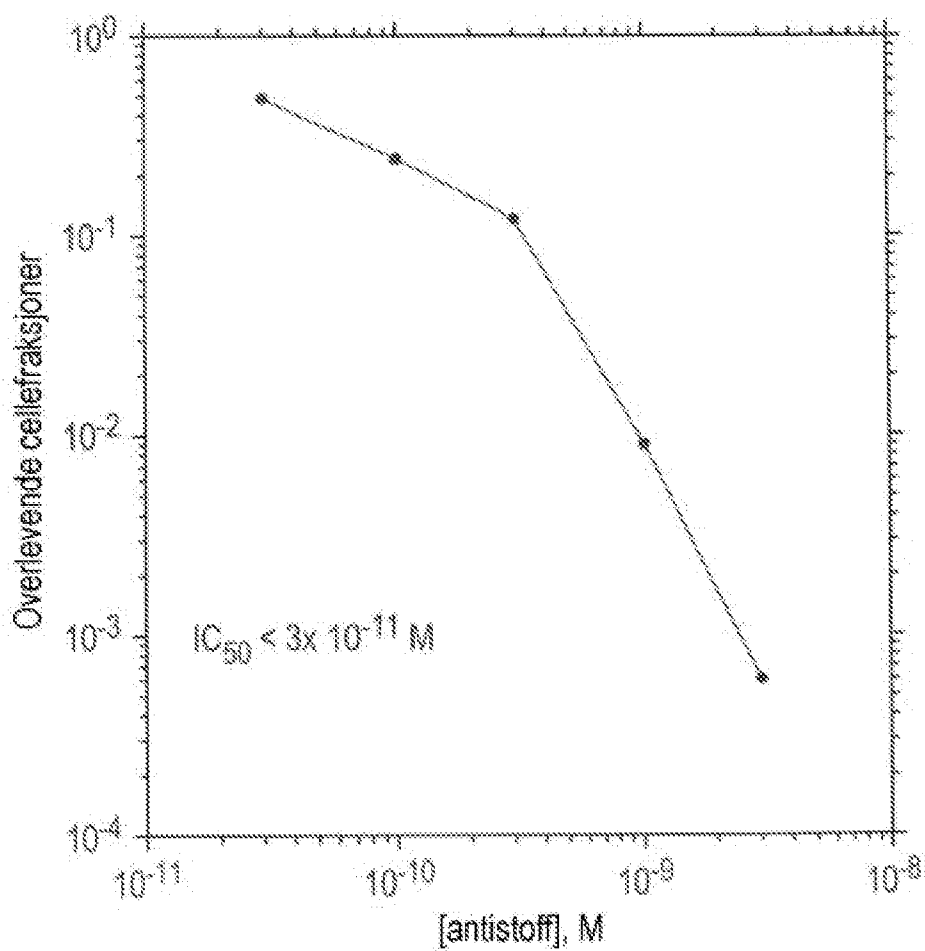


FIG. 8C

Cytotoksisitet av KS77-SMCC-DM1
vs. A431(+)- og A375(-)-celler
Kontinuerlig eksponering, klonogenisk analyse

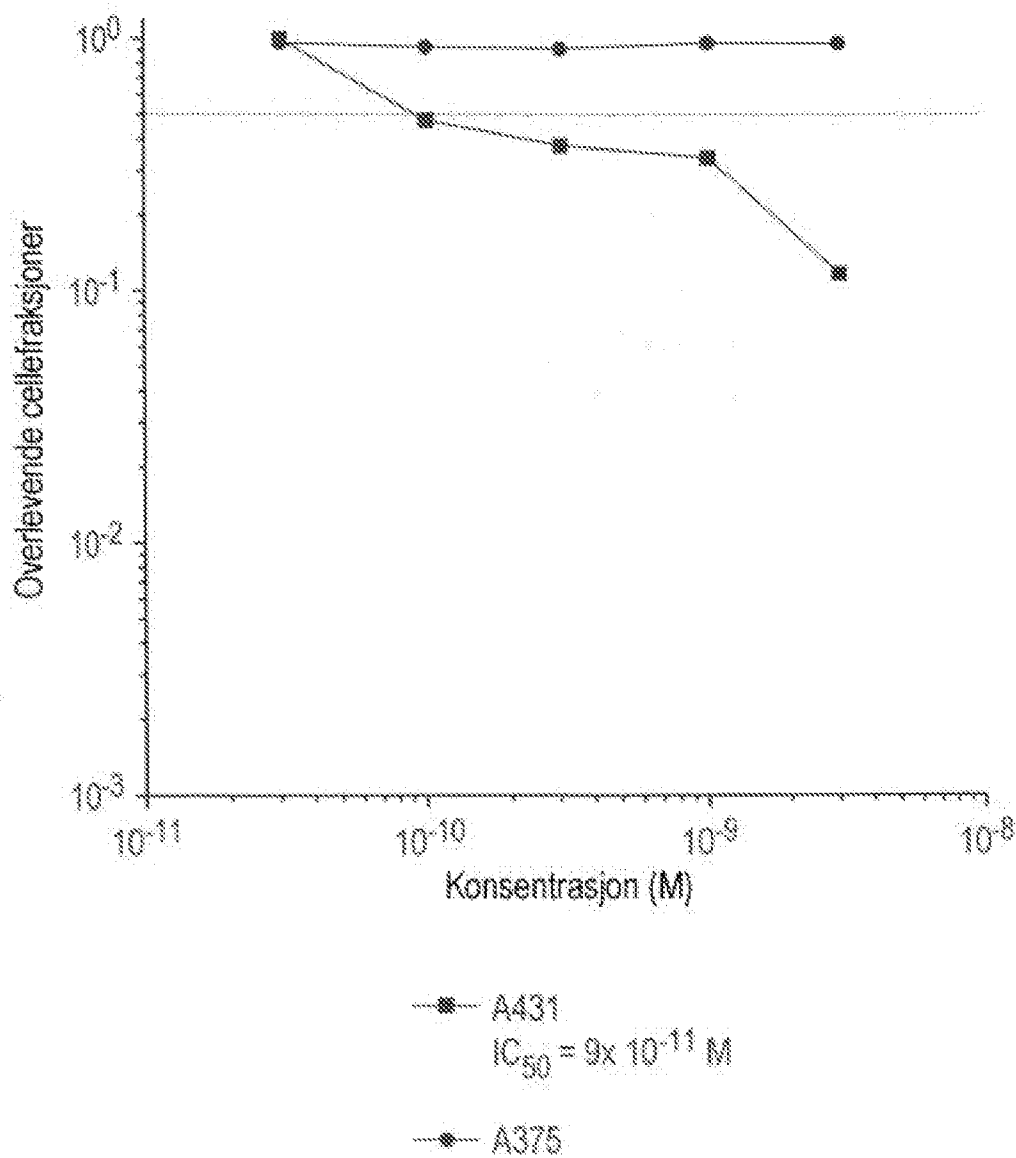
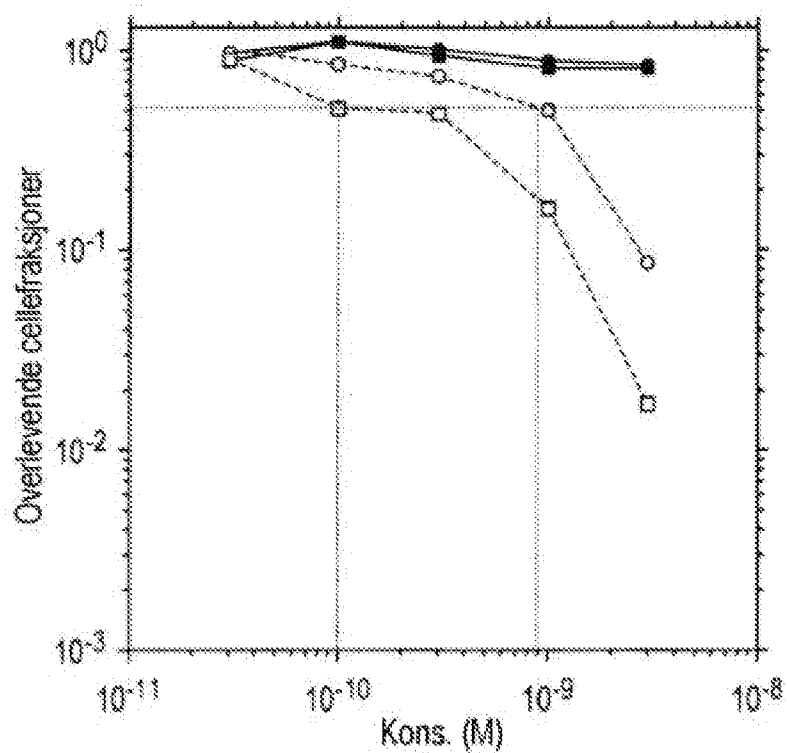


FIG. 8D

Cytotoksitet av N901-SMCC-DM1-
konjugater vs. CHD-163(+) og A431(-)
Kontinuerlig eksponering, klonogen analyse



--□-- CHD-163
 $IC_{50} = 1.0 \times 10^{-10}$

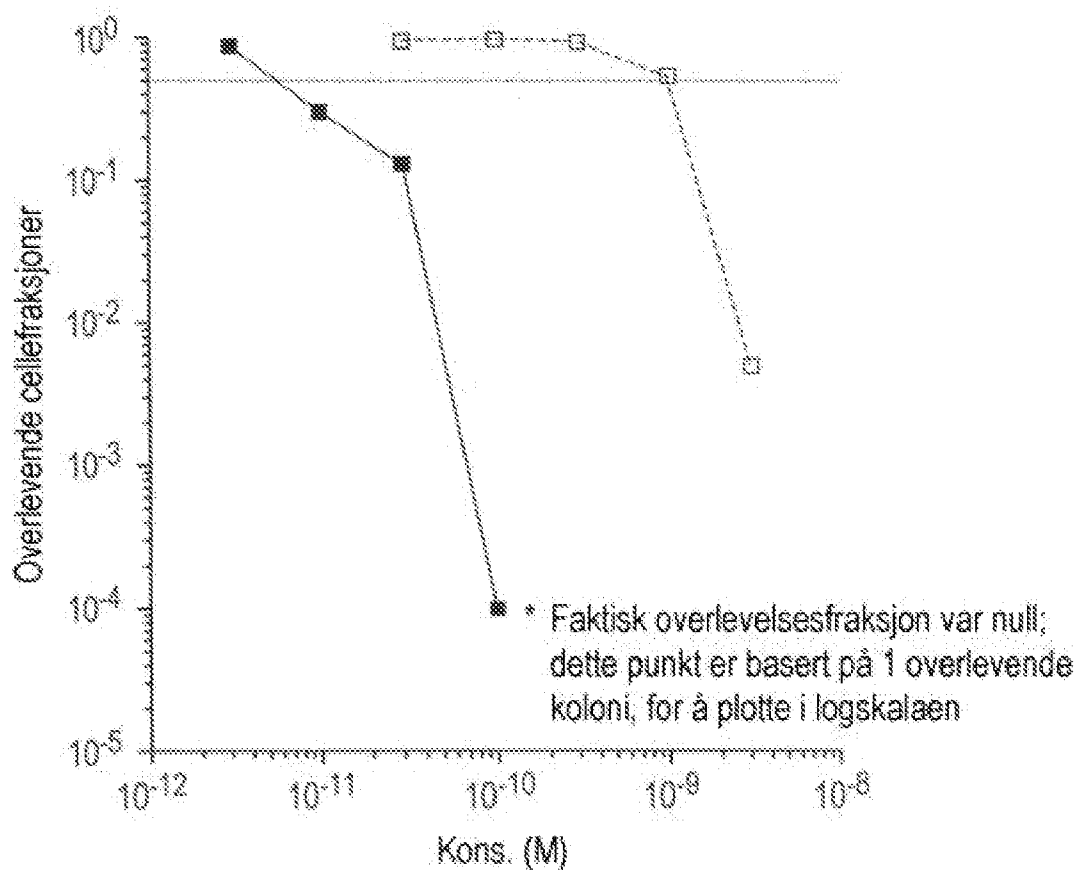
--●-- A431
 $IC_{50} > 3.0 \times 10^{-9}$

--○-- CHD-163
 $IC_{50} = 9.0 \times 10^{-10}$

--●-- A431
 $IC_{50} > 3.0 \times 10^{-9}$

FIG. 9

Potensitesevaluering av
huC242-SIAB-DM1 vs.
COLO 205(+)- og A375(-)celler
Kontinuerlig eksponering, klonogen analyse



—■— COLO 205
 $IC_{50} = 5.6 \times 10^{-12} \text{ M}$

---□--- A375
 $IC_{50} = 1 \times 10^{-9} \text{ M}$

FIG. 10A

Antitumoraktivitet av huC242-SMCC-DM1
mot Colo 205 human koloncancer-
xenografter i SCID-mus

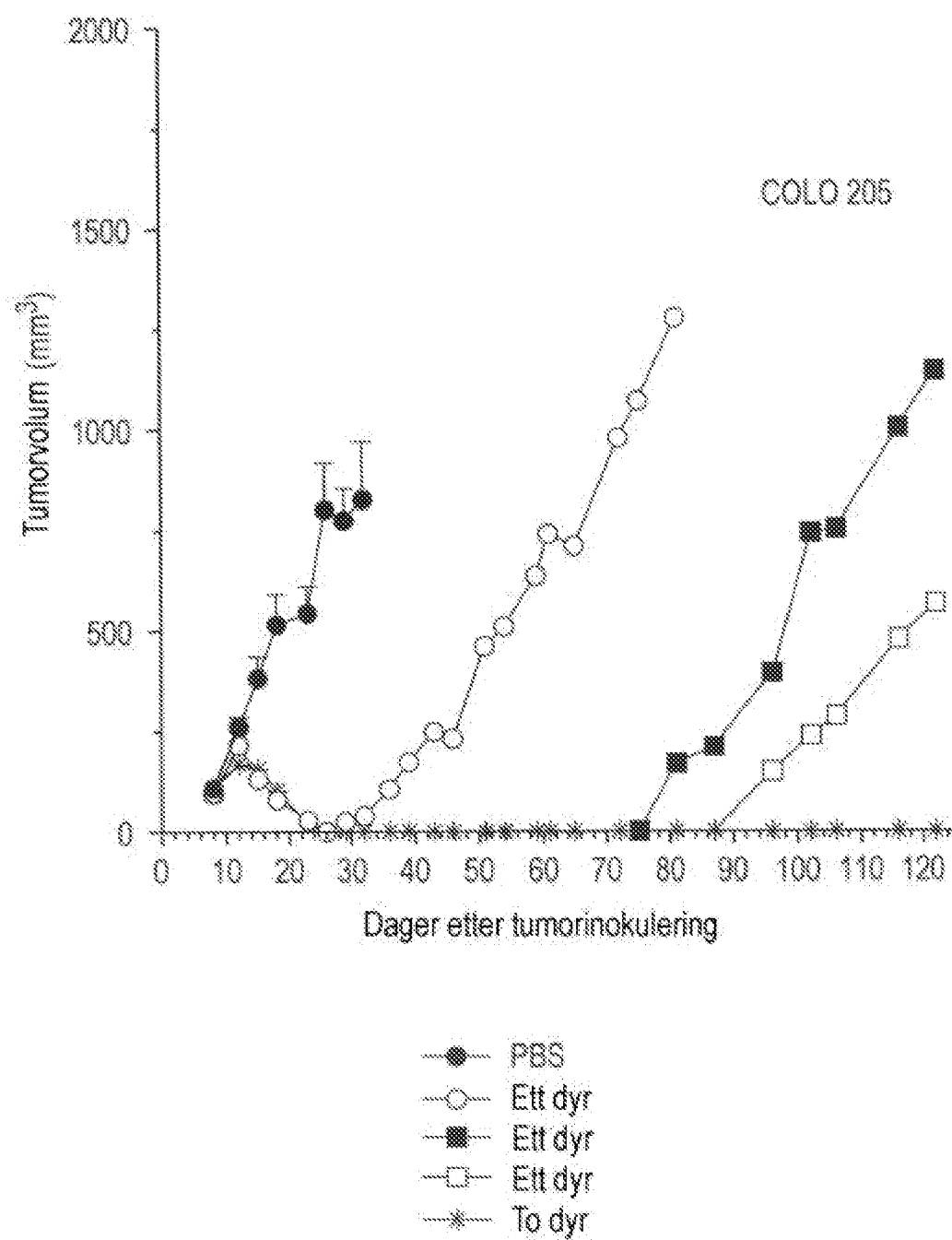


FIG. 10B

Antitumoraktivitet i huC242-SMCC-DM1
mot SNU 16 human-gastriske tumor-
xenografter i SCID-mus

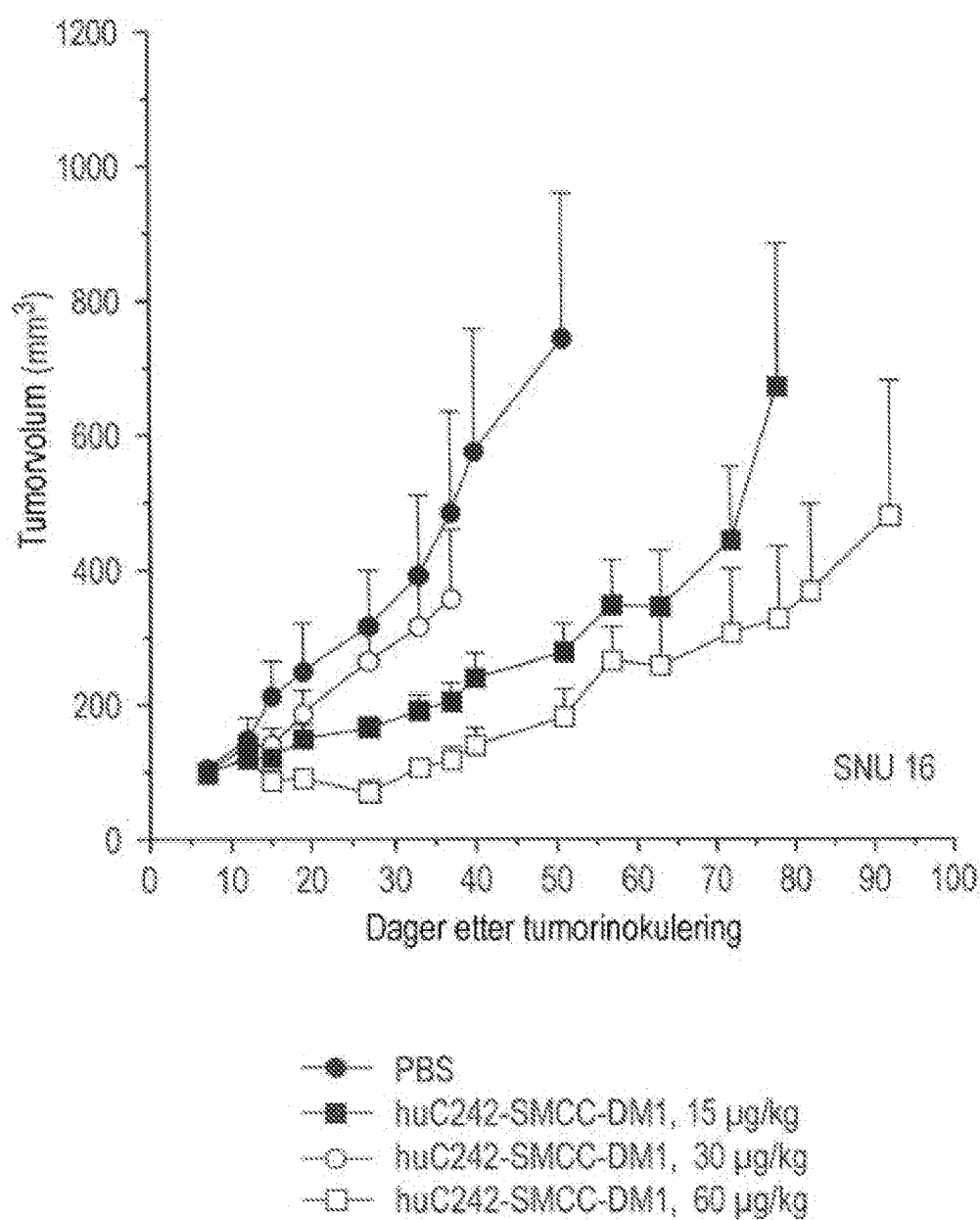


FIG. 10C

Antitumoraktivitet til
trastuzumab-SMCC-DM1 mot
MCF7-xenografter i CB.17 SCID-mus

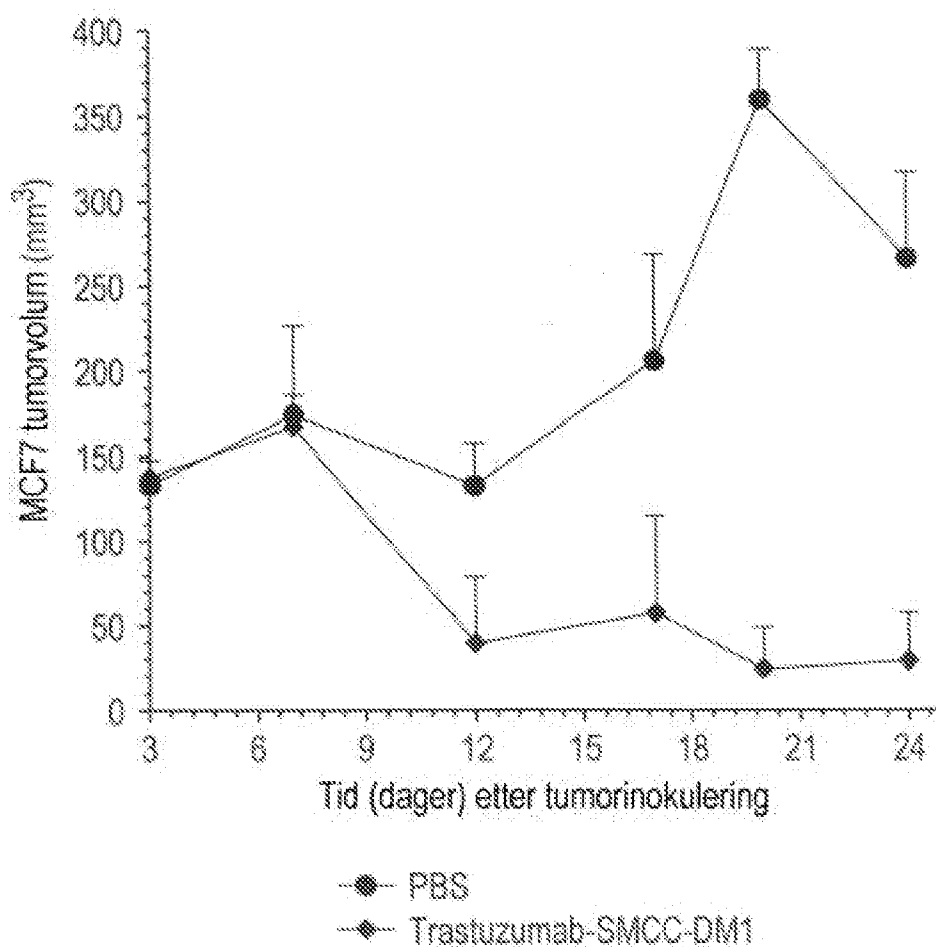
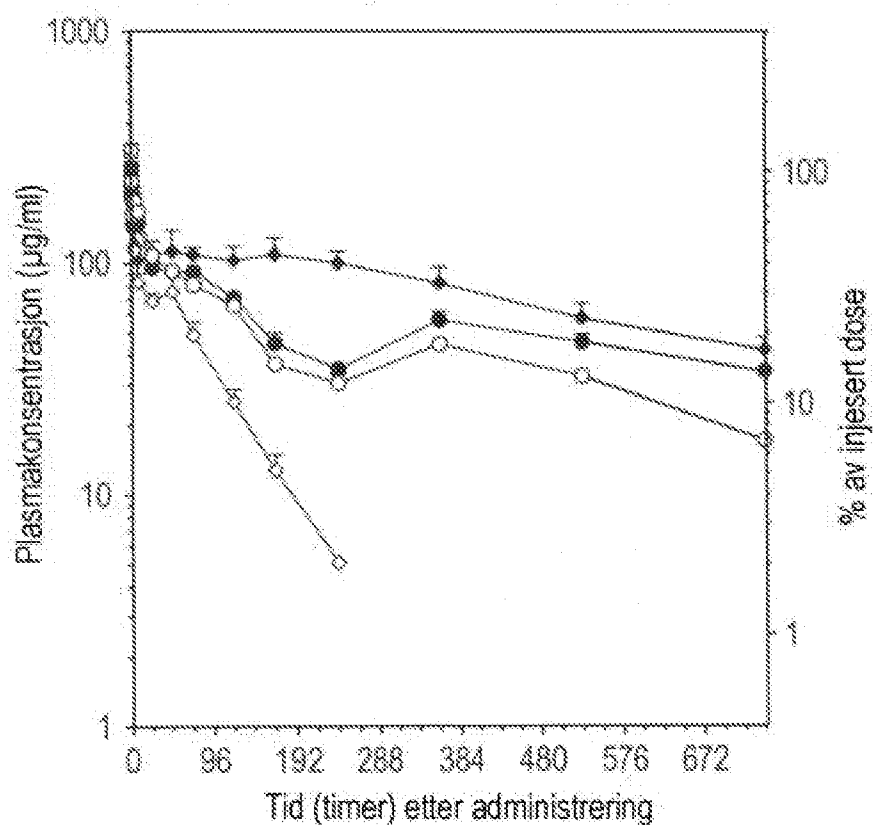


FIG. 11

Farmakokinetiske studier av huC242-SPP-DM1- og huC242-SMCC-DM1-konjugater i CD-1-mus. Plasma clearance-kurver og farmakokinetiske parametere



◇ huC242-SPP-DM1-konjugat ◇ huC242-SMCC-DM1-konjugat
 ◆ huC242-SPP-DM1-antistoff ◆ huC242-SMCC-DM1-antistoff

Immunkonjugat	DM1/AB	C _{max} µg/ml	t _{1/2} timer	AUC Time, µg/ml	CL ml/time/kg	V _{ss} ml/kg
huC242-SMCC-DM1	3.17	312.2	318.3	40374.2	0.3	112.5
huC242-SMCC		262.9	533.7	65953.9	0.2	119.6
huC242-SPP-DM1	3.28	191.4	49.8	9205.7	1.1	92.6
huC242-SPP		212.5	499.2	89345.7	0.1	78.2

FIG. 12A

Overlevelse av CD-1-mus behandlet
med huC242-SPP-DM1

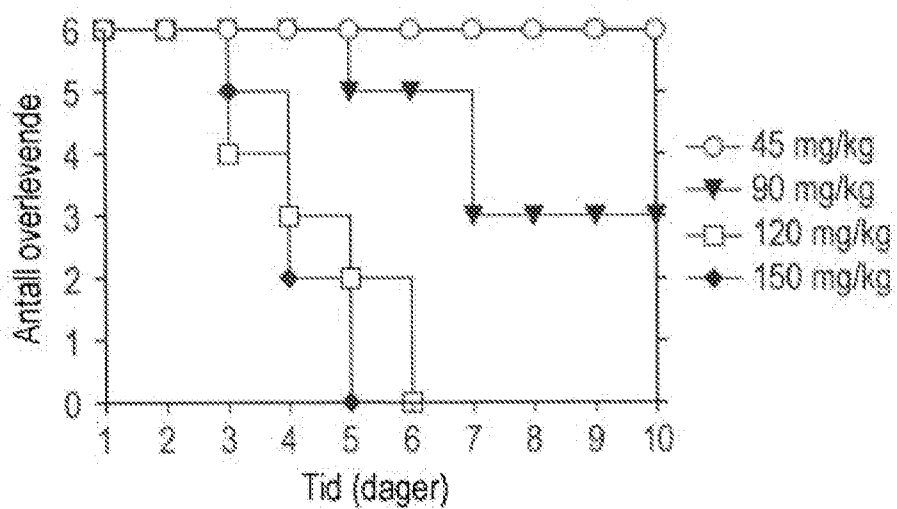


FIG. 12B

Overlevelse av CD-1-mus behandlet
med huC242-SMCC-DM1

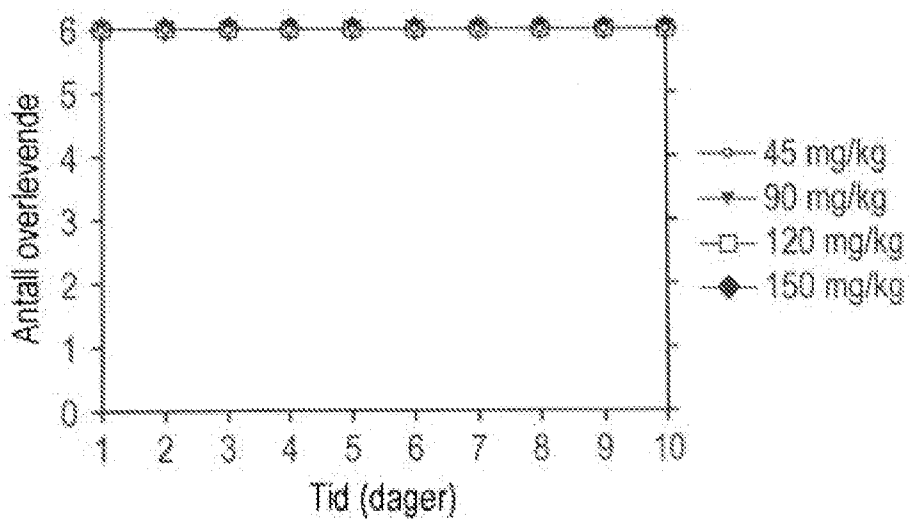


FIG. 12C

Kroppsvekt til CD-1 mus behandlet
med huC242-SPP-DM1

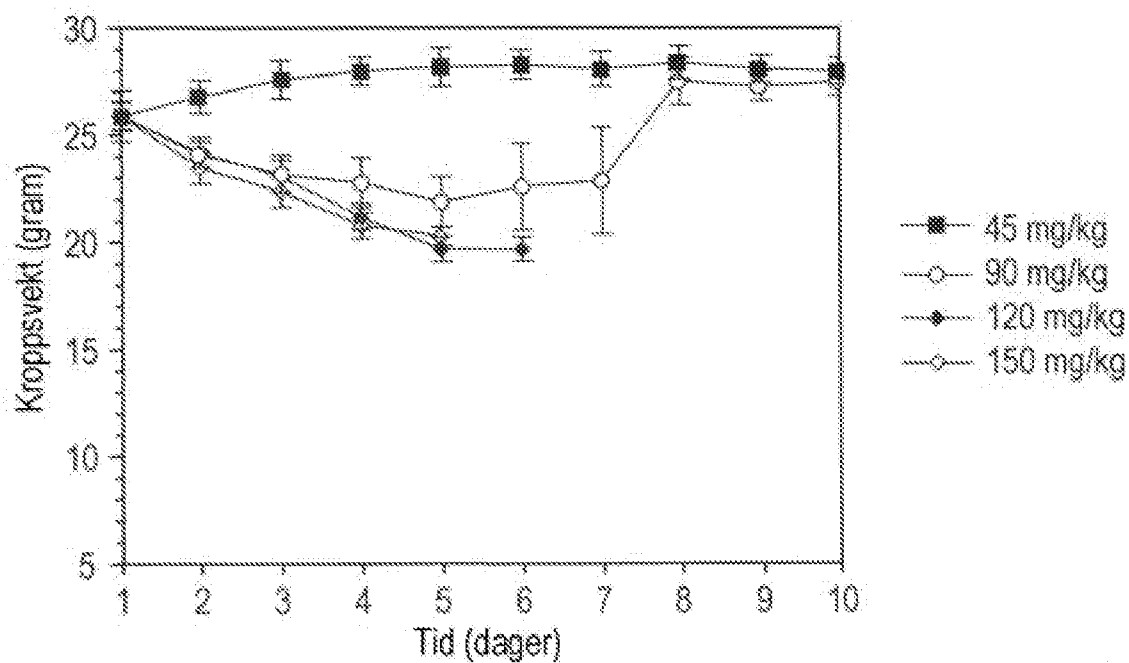


FIG. 12D

Kroppsvekt til CD-1 mus behandlet
med huC242-SMCC-DM1

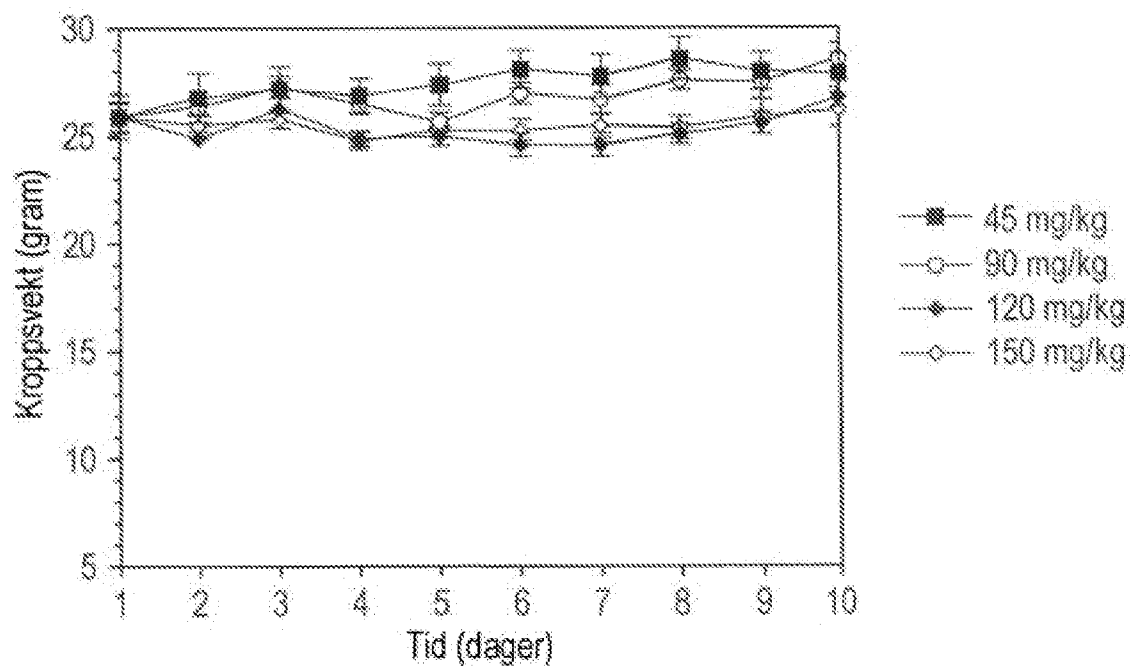
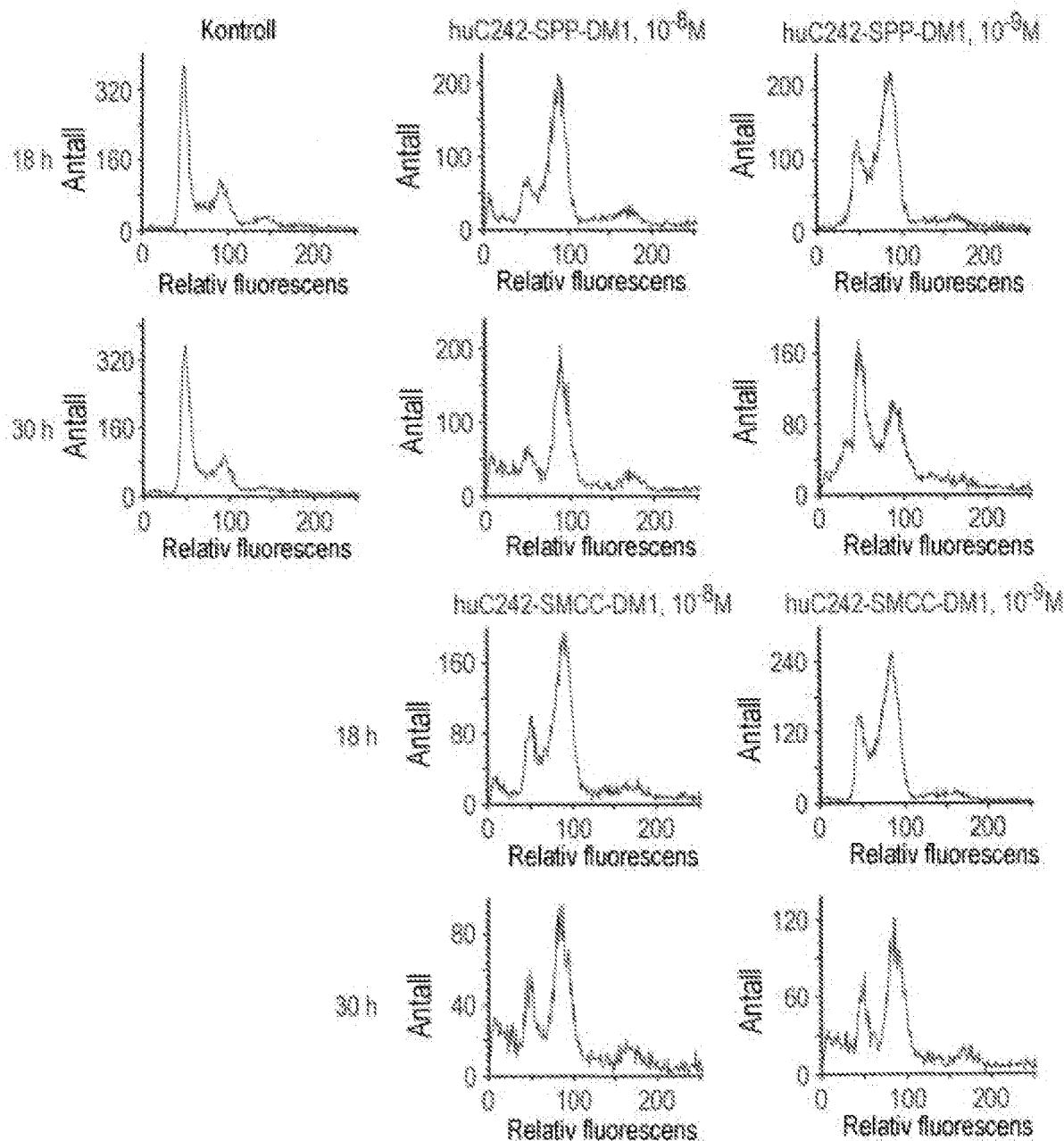


FIG. 13

Sammenligning av in vitro cellyklusstans-aktivitet
mellom huC242-SPP-DM1- og huC242-SMCC-DM1-konjugater



			Cellyklusstansaktivitet		Celledrap-aktivitet
Konjugat	Konsentrasjon	Cellelinje	18 timer	30 timer	30 timer
C242-SPP-DM1	1×10^{-9} M	Colo205	+++	+++	
	1×10^{-9} M	Colo205	+++	++	25%
C242-SMCC-DM1	1×10^{-8} M	Colo205	+++	+++	
	1×10^{-9} M	Colo205	+++	+++	33-37%

FIG. 14A

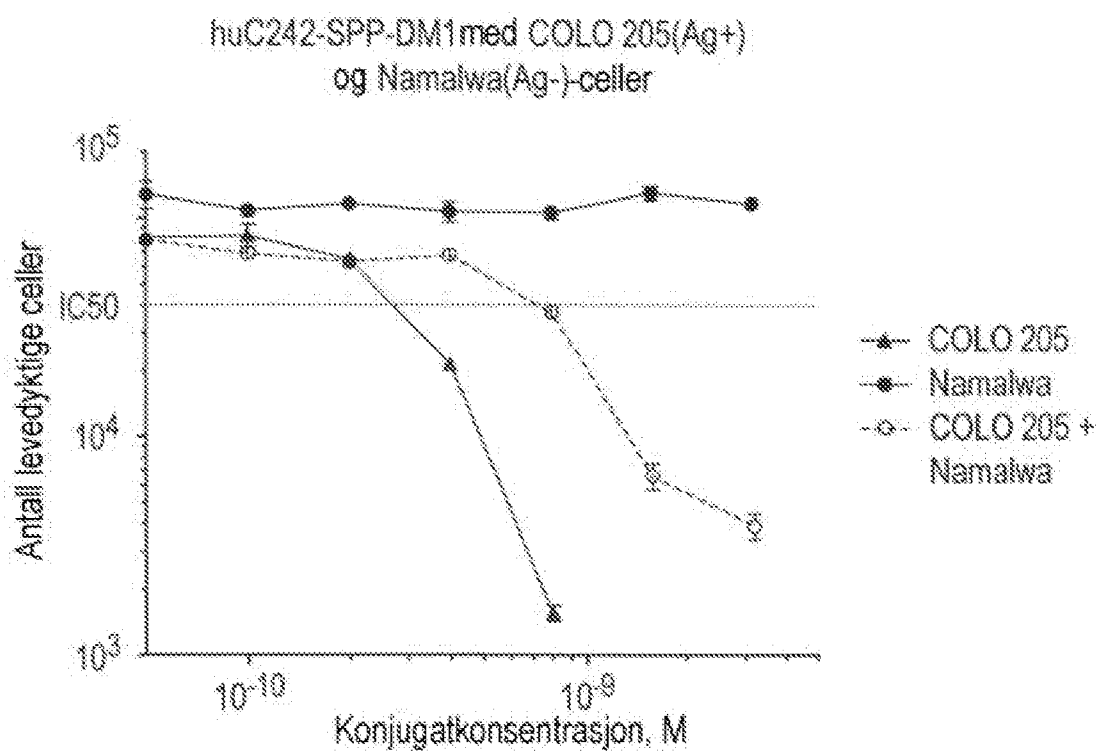


FIG. 14B

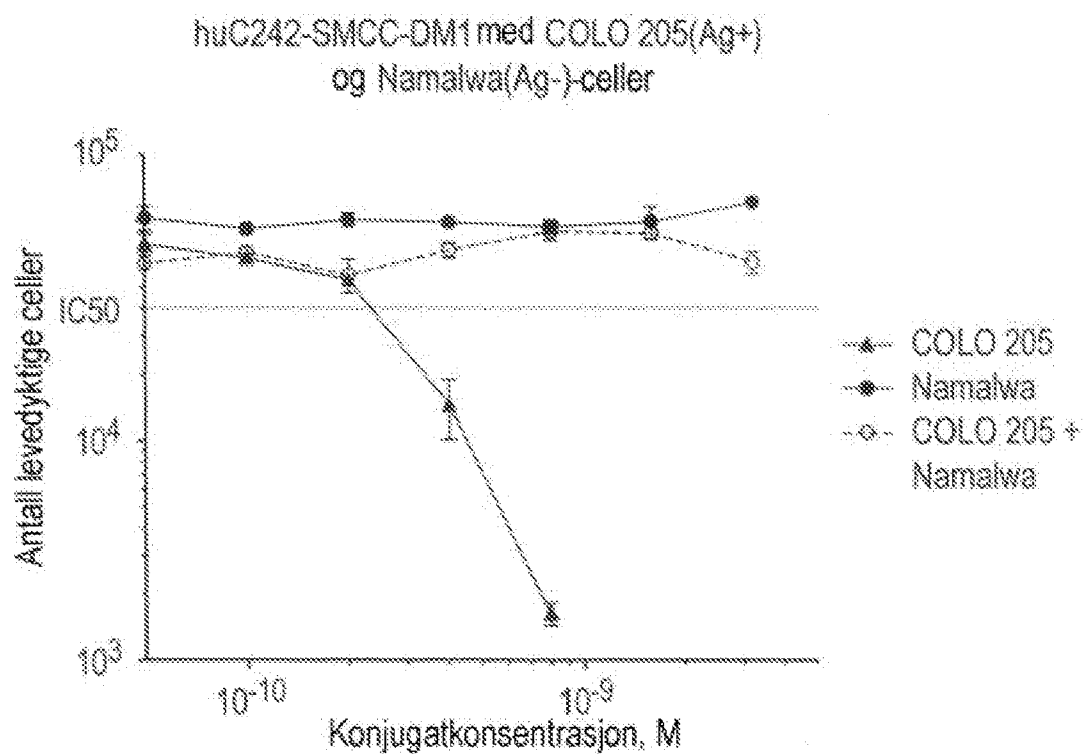


FIG. 14C

Konsentrasjon av huC242-konjugater: 8×10^{-10} M

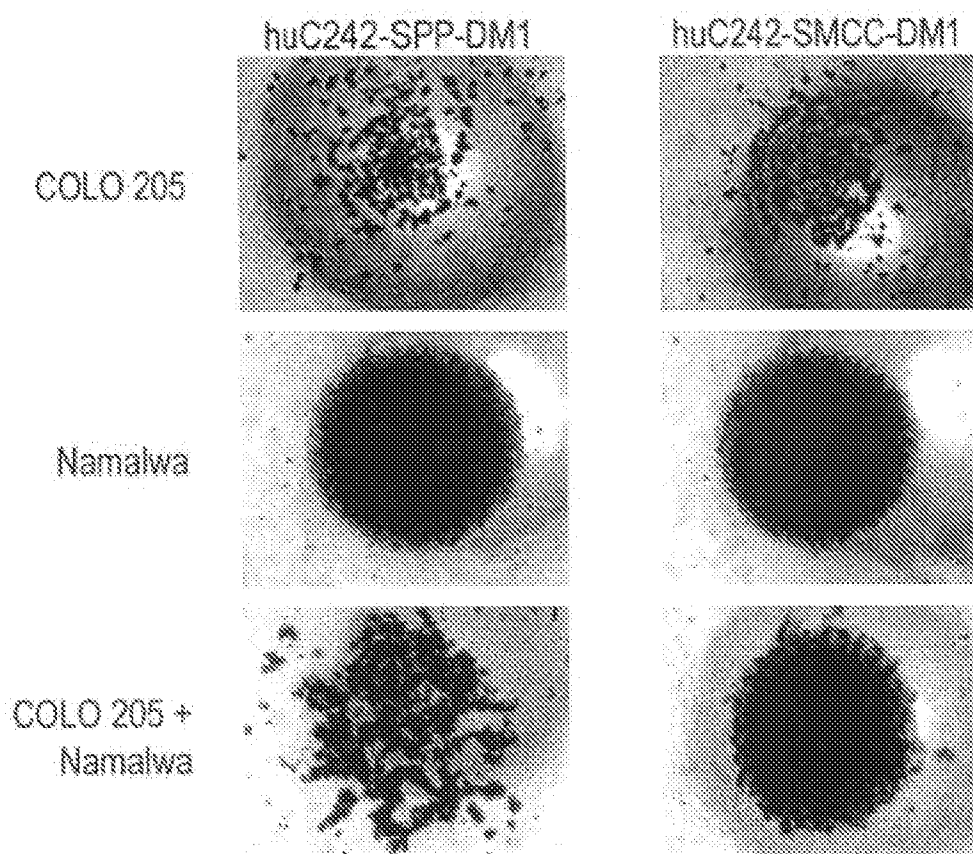


FIG. 15

Representative strukturer til maleimido-baserte kryssbindingsmidler

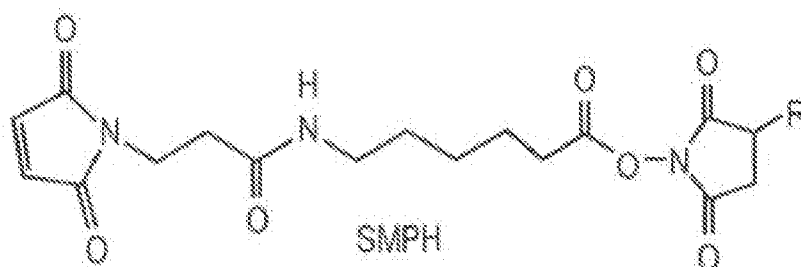
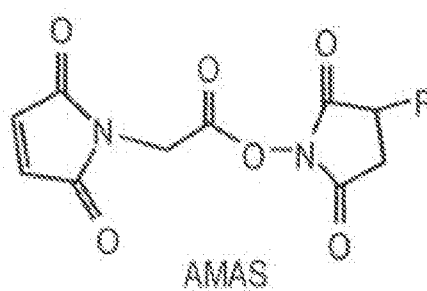
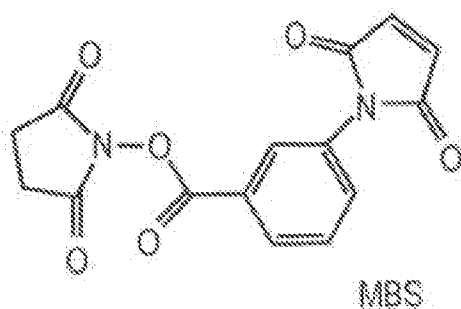
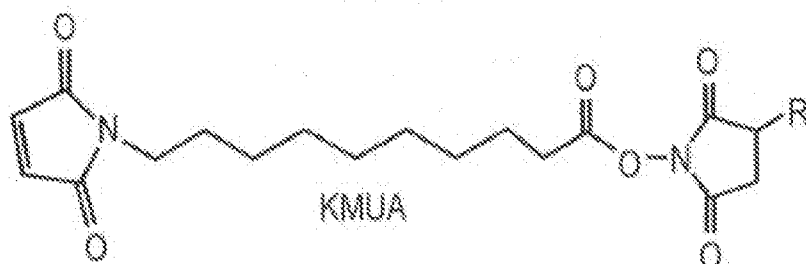
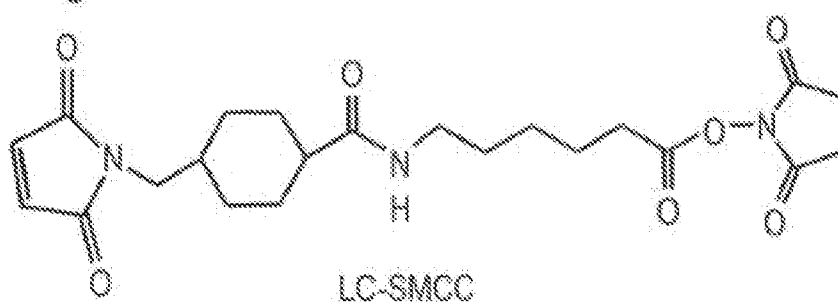
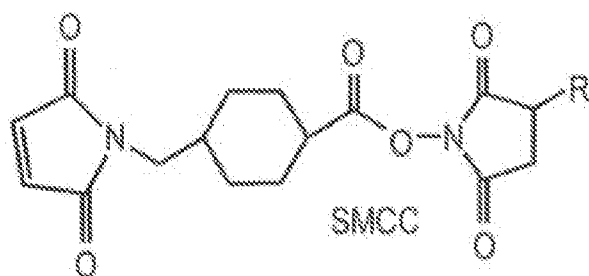
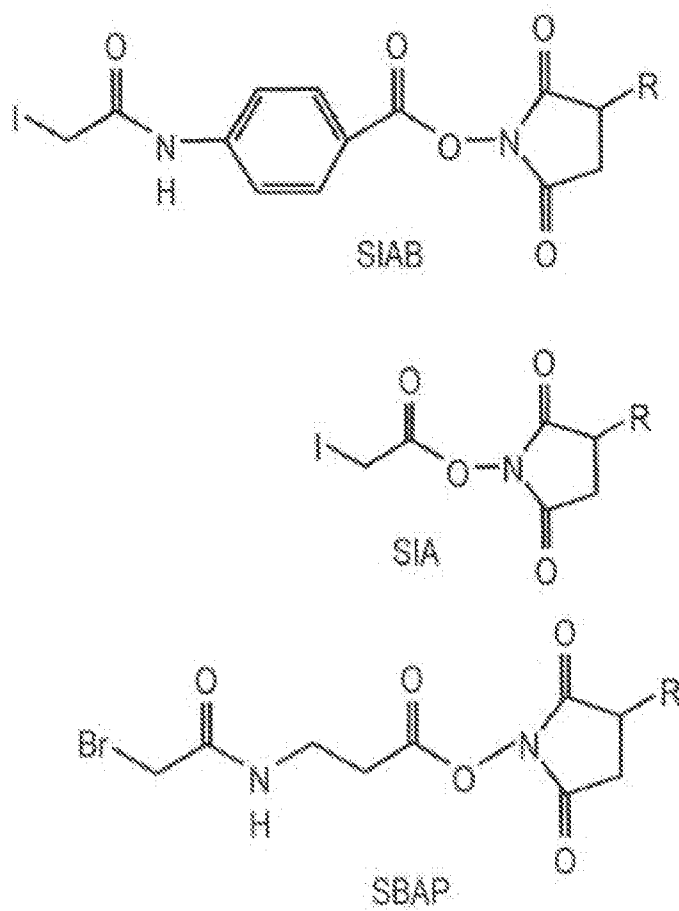
I alle tilfeller R = H or SO_3^-

FIG. 16

Representative strukturer av haloacetylbaserte kryssbindingsmidler



I alle tilfeller R = H or SO₃⁻

FIG. 17

Struktur ti DM1 og antistoff-DM1-konjugater fra maleimido-derivatiserte antistoffer. SMCC kryssbindingsreagenset ble brukt som eksempel

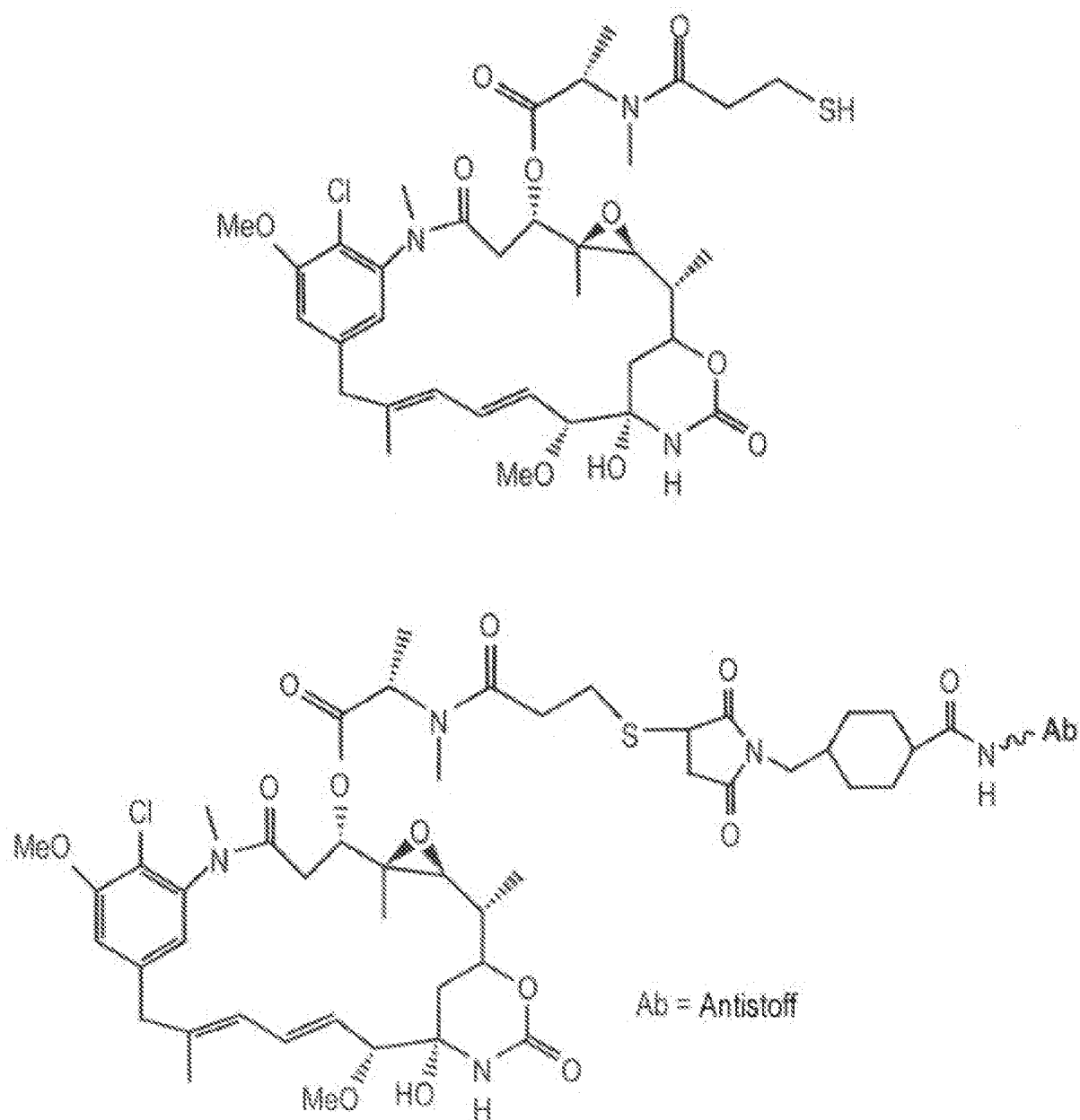


FIG. 18

Strukturer til antistoff-DM1-konjugater fra haloacetyl-derivatiserte antistoffer.
SIAB-kryssbindingsreagens (toppstruktur) og SIA-reagens
(bunnstruktur) ble anvendt som eksempel

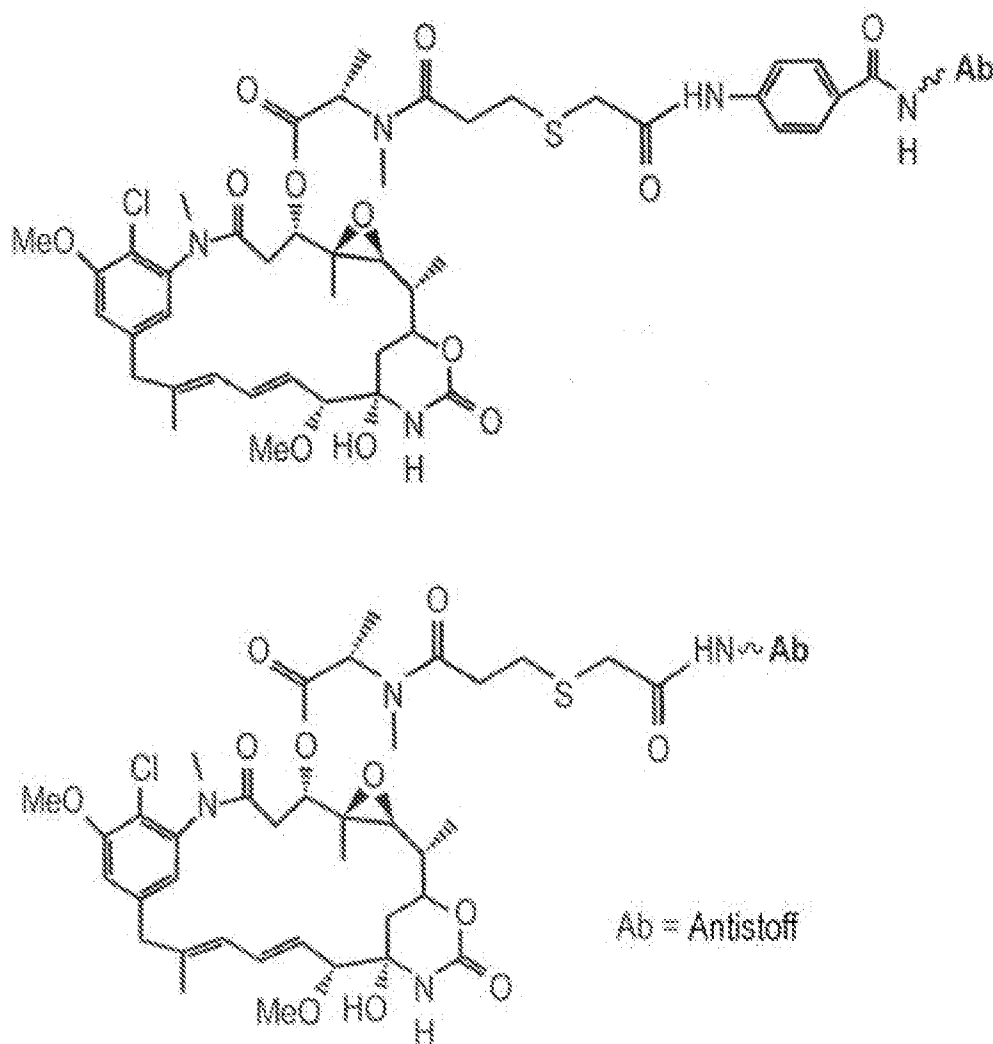
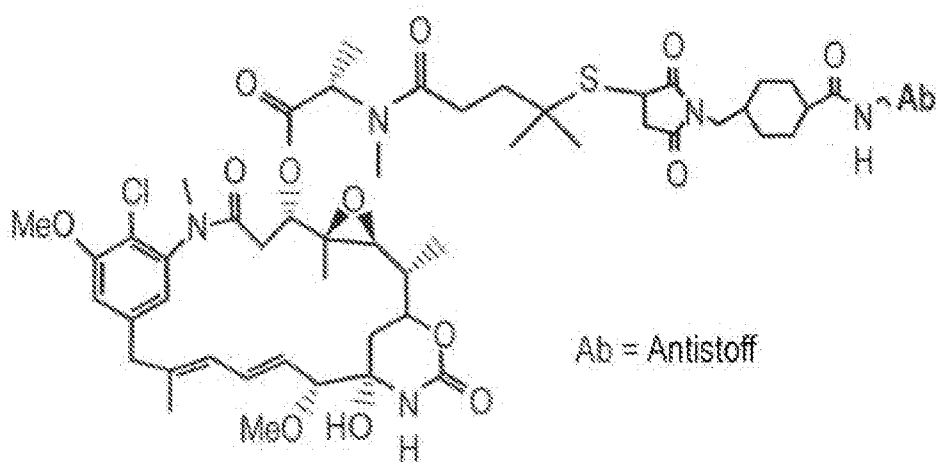
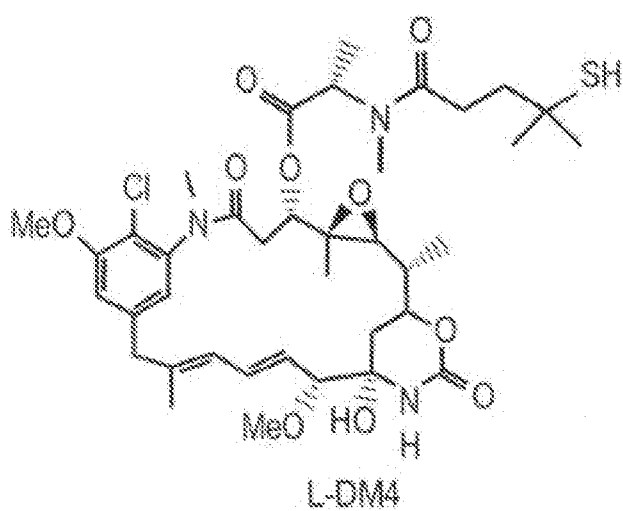


FIG. 19

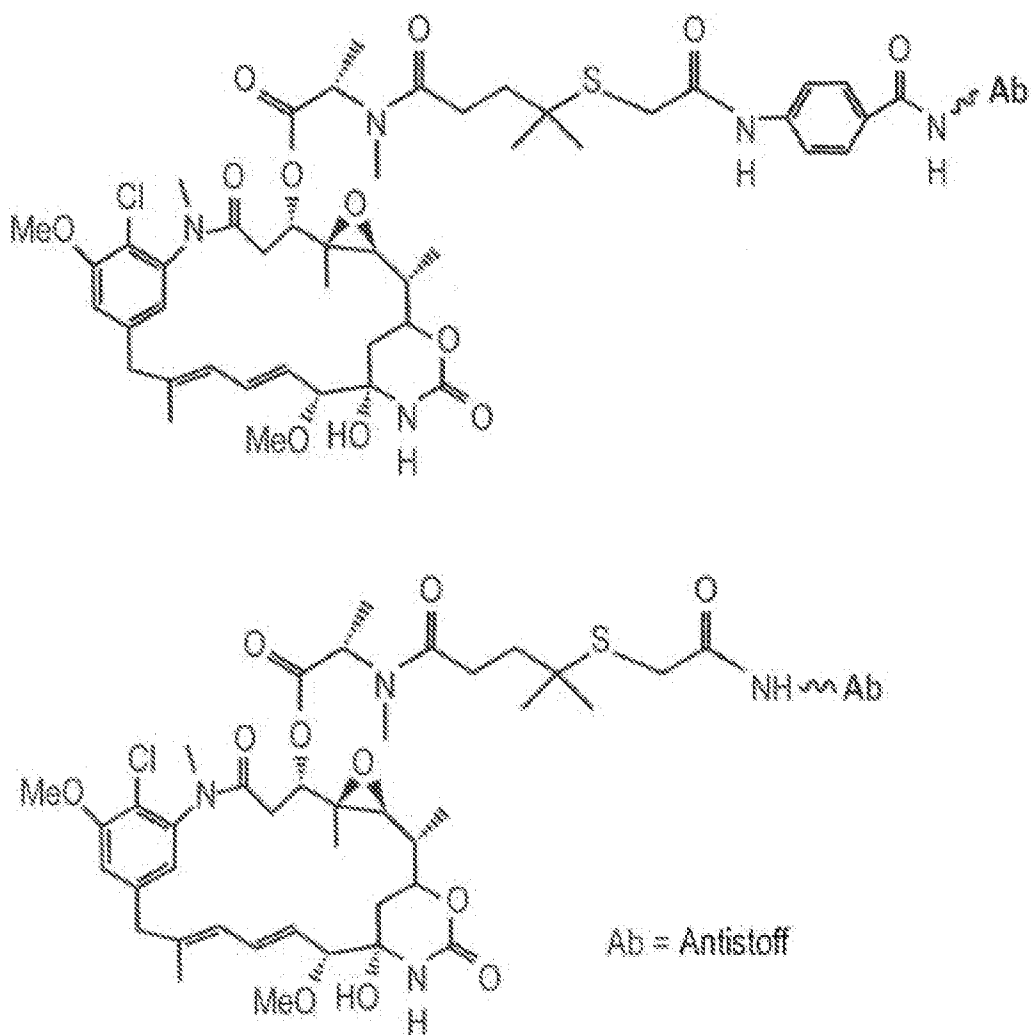
Strukturer til DM4- og antistoff-DM4-konjugater avledet fra maleimido-derivatiserte antistoffer. SMCC-kryssbindingsreagens ble anvendt som eksempel.



Antistoff-DM4-konjugat

FIG. 20

Strukturer til antistoff-DM4-konjugater fra haloacetyl-derivatiserte antistoffer. SIAB kryssbindingsreagens (toppstruktur) og SIA-reagenset (bunnstruktur) ble anvendt som et eksempel



Ingen svovellinker

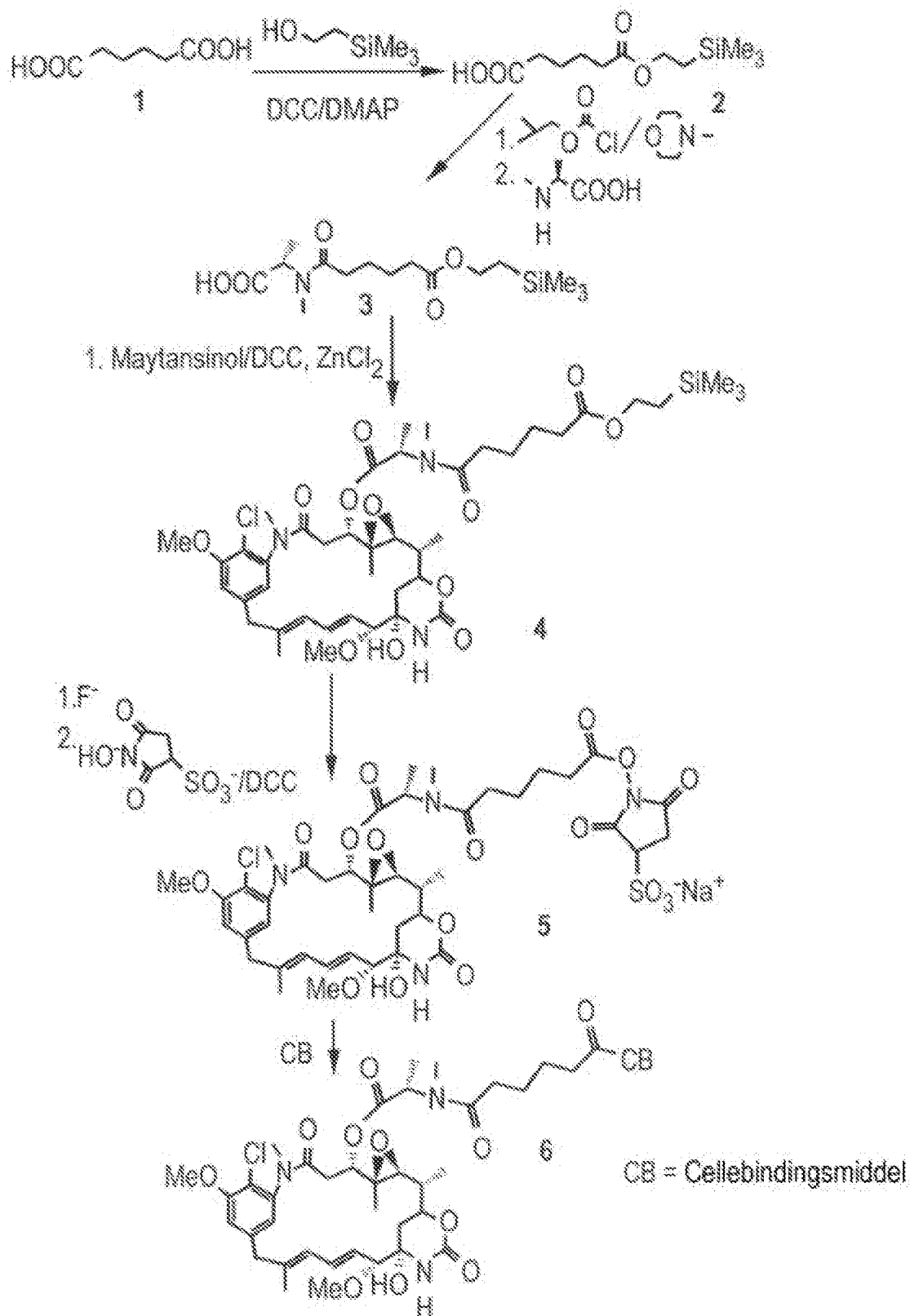
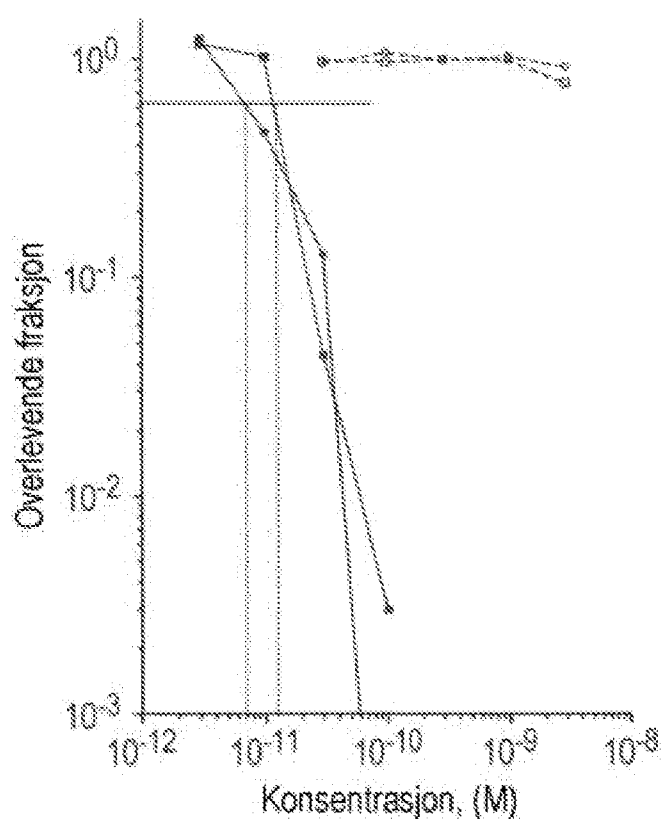


FIG. 22

Cytotoksisitet til HuC242-non-S-inneholdende ikke-kløyvbar linker-DM1 og hC242-SMNP-DM3 vs. COLO 205- og A375-celler
Kontinuerlig eksponering "Clonogenic" analyse



— huC242-non-S-inneholdende ikke-kløyvbar linker - DM1 /
COLO 205, $IC_{50} = 7.0 \times 10^{-12} \text{ M}$

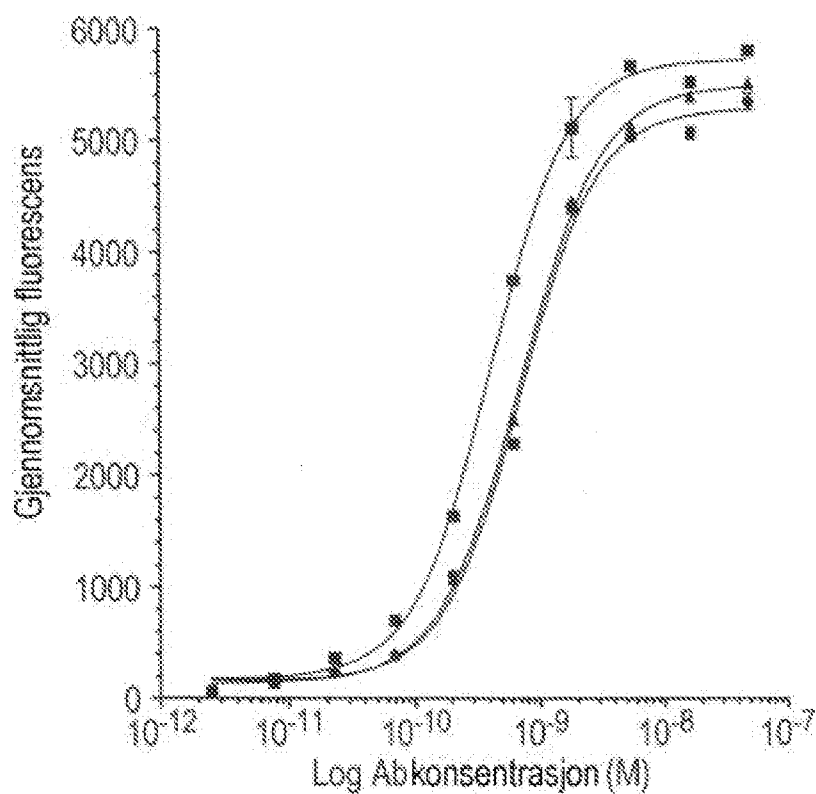
— hC24-SMNP-DM3 / COLO 205, $IC_{50} = 1.3 \times 10^{-11} \text{ M}$

- - huC242-non-S-inneholdende ikke-kløyvbar linker - DM1 /
A375, $IC_{50} > 3 \times 10^{-9} \text{ M}$

- - hC24-SMNP-DM3 / A 375, $IC_{50} > 3 \times 10^{-9} \text{ M}$

FIG. 23

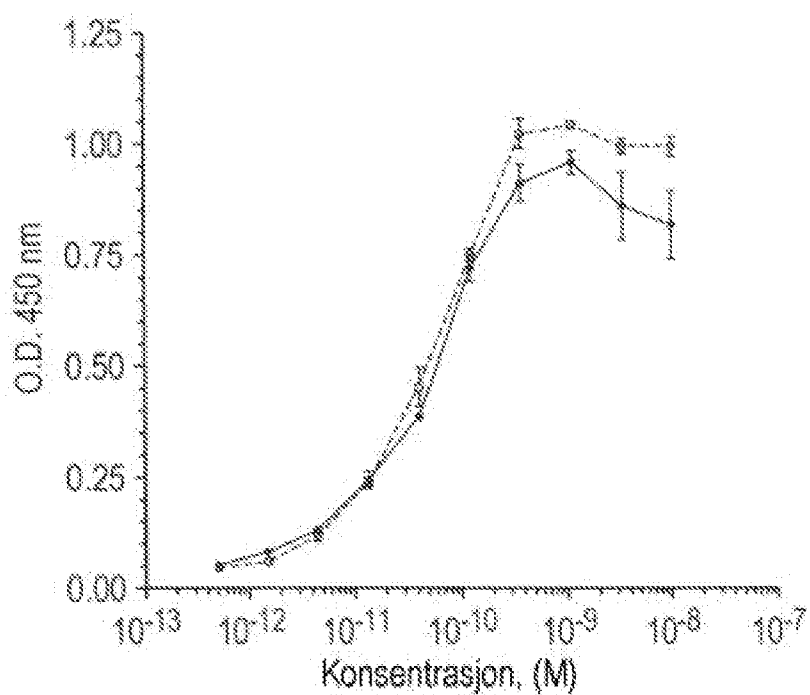
FACS-bindingsanalyse av huC242-non-S-inneholdende ikke-kløyvbar linker-DM1 og huC242-SMNP-DM3 til COLO 205-celler



- huC242
 $EC_{50} = 4.12 \times 10^{-10} \text{ M}$
- ▲ huC242-non-S-inneholdende ikke-kløyvbar linker - DM1
 $EC_{50} = 7.04 \times 10^{-10} \text{ M}$
- ◆ huC242-SMNP-DM3
 $EC_{50} = 7.08 \times 10^{-10} \text{ M}$

FIG. 24

ELISA: Binding av
Trastuzumab-SMCC-DM1 og
Trastuzumab-antistoff til ECD-
blodplater belagt på 0,3 ng/brønn



—●— Trastuzumab-DM1, $K_D = 5.5 \times 10^{-11}$ M
—○— Trastuzumab Ab, $K_D = 5.5 \times 10^{-11}$ M

33/37

33/37

FIG. 25

Cytotoksitet av Trastuzumab-SMCC-DM1 vs. SK BR 3- og A 375-celler
kontinuerlig eksponering "Clonogenic" analyse

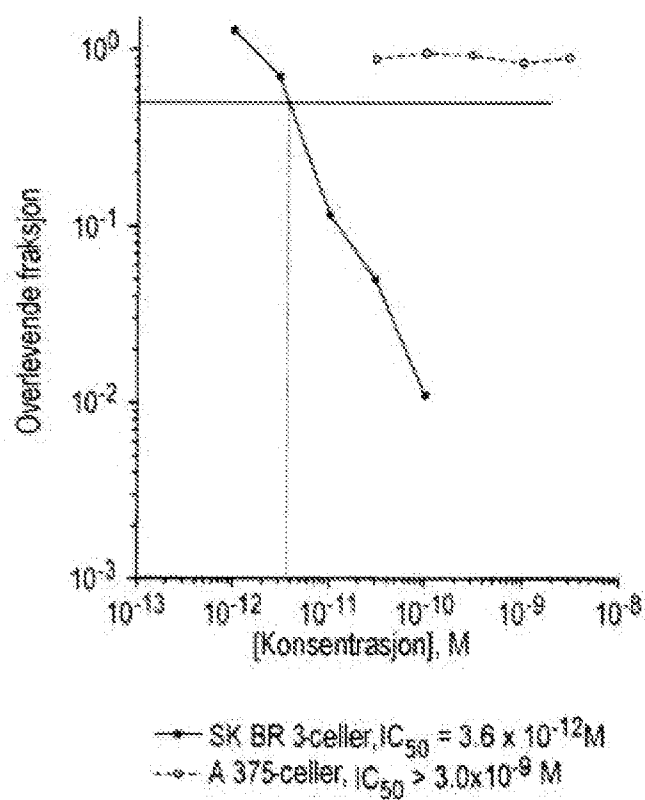


FIG. 26

Størrelseseksklusionskromatografi for Trastuzumab-SMCC-DM1

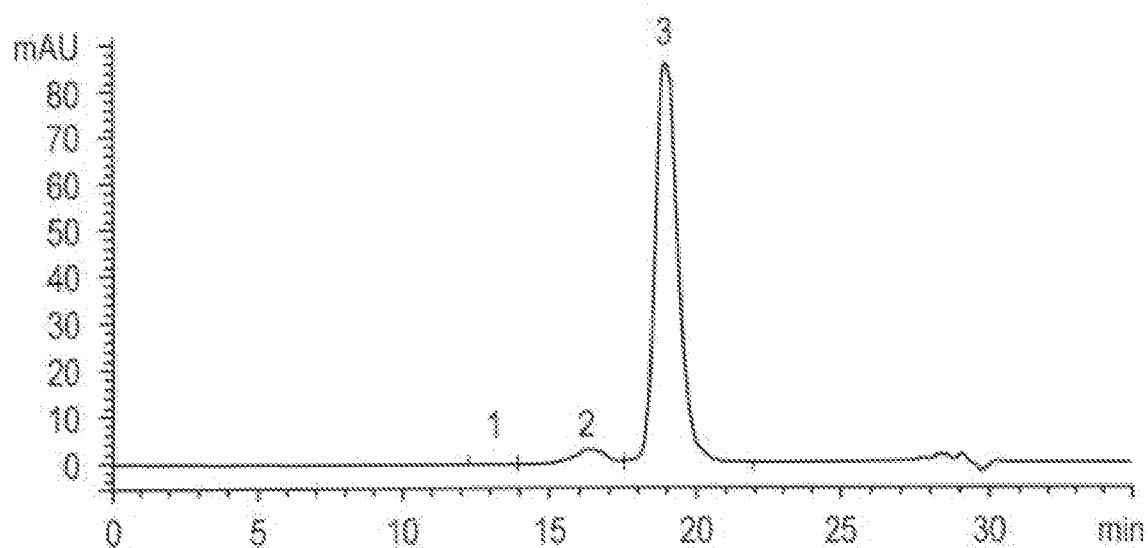
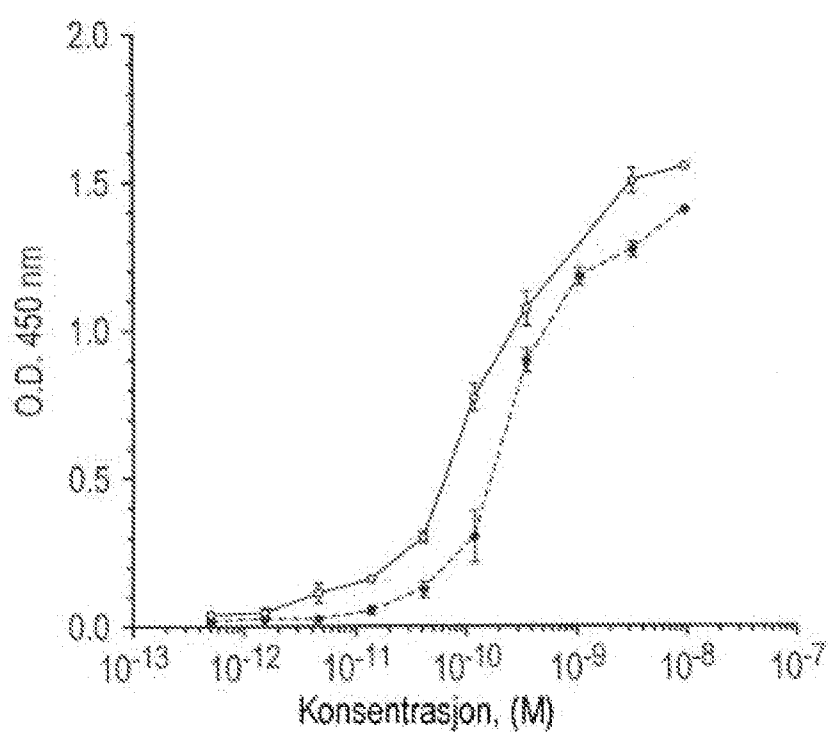


FIG. 27

ELISA: Binding av
Trastuzumab-SIAB-DM1 og
Trastuzumab-antistoff til en ECD-
blodplate belagt på 0,3 ng/brønn



—●— Trastuzumab-SIAB-DM1, $K_D = 1.9 \times 10^{-10}$ M
—○— Trastuzumab antistoff, $K_D = 1.2 \times 10^{-10}$ M

FIG. 28

Cytotoksitet til
Trastuzumab-SIAB-DM1
vs. SKBR- og A 375-celler
kontinuerlig eksponering
"Clonogenic" analyse

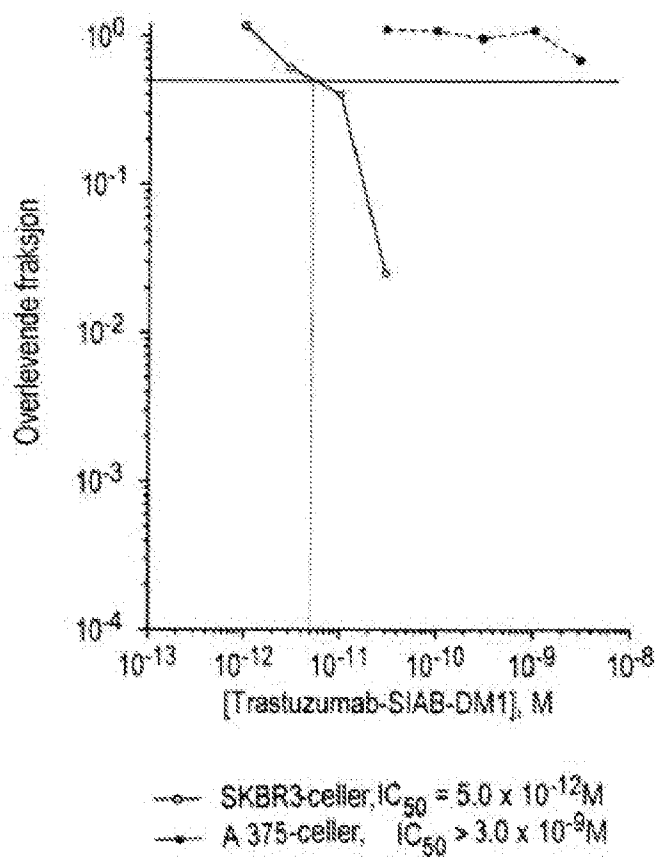


FIG. 29

Størrelseseksklusionskromatografi for Trastuzumab-SIAB-DM1

