

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

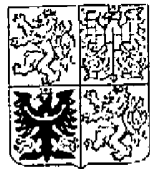
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3939-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10. 05. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 07.06.95

(31) Číslo prioritní přihlášky: 95/475005

(33) Země priority: US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 03. 98**
(Věstník č. 3/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/06738**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/40261**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 47/48

(71) Přihlášovatel:

AMERICAN CYANAMID COMPANY, Madison,
NJ, US;

ný, pufovaný roztok a ko-rozpouštědlo
obsahující t-butanol.

(72) Původce:

Kunstmann Martin Paul, Pearl River, NY,
US;

Hollander Irwin Jack, Monsey, NY, US;

Hamann Philip, Garnerville, NY, US;

Kunz Arthur, New City, NY, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsoby přípravy monomerních konjugátů
nosiče a derivátu calicheamicinu**

(57) Anotace:

Způsob přípravy monomerních konjugátů calicheamicinového derivátu a nosiče s obsahem účinné látky, vysokým výtěžkem a sníženou aglomerací. Tyto konjugáty se připraví inkubací calicheamicinového derivátu a proteinového nosiče v nenukleofilním, s proteiny slučitelném, pufovaném roztoku, který má vhodné pH, pohybující se od 4,0 do 8,5, a obsahuje ko-rozpouštědlo zvolené ze skupiny zahrnující propylenglykol, ethanol, DMSO a jejich kombinace a přísadu, obsahující alespoň jednu karboxylovou kyselinu s 6 až 18 atomy uhlíku, při teplotě pohybující se přibližně v teplotním rozmezí od 25°C do 37°C a přibližně 15 minut až 24 hodina čištění konjugátu připraveného v kroku (1 za vzniku monomerního konjugátu. Alternativně lze konjugáty připravit inkubací calicheamicinového derivátu a proteinového nosiče v roztoku obsahujícím nenukleofilní, s proteiny slučitel-

CZ 3939-97 A3

Způsoby přípravy monomerních konjugátů nosiče a derivátu calicheamicinu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobů přípravy monomerních konjugátů nosiče a derivátu calicheamicinu.

Dosavadní stav techniky

Od objevení metodologie přípravy monoklonových protilátek, která byla publikována v sedmdesátých letech (G. Köhler a C. Milstein, Nature 256:495 (1975)), se provedla celá řada pokusů, jejichž cílem bylo selektivní použití těchto proteinů pro výrobu cílených protinádorových činidel působících proti nádorům. (Například viz T. Ghose a A. H. Blair, CRC Critical Rev. Drug Carrier Systems 3:263, 1987, G.A. Koppel, Bioconjugate Chem. 1:13, 1990, a J. Upeslakis a L. Hinman, Ann. Rep. Med. Chem. 23:151, 1988.) Ačkoliv vývoj v této oblasti stále pokračuje, nejklasičtější protinádorová činidla produkují konjugáty protilátek, která jsou z celé řady důvodů relativně neúčinná. Mezi důvody jejich neúčinnosti patří nedostatečná účinnost při chemoterapii.

Účinná rodina antibakteriálních a protinádorových činidel, známých jako calicheamiciny nebo jako komplex LL-E33288, je popsána v patentu US 4,970,198 (1990). Nejúčinnější činidla jsou označena jako γ_1' a zde budou označována pouze jako gama. Tyto sloučeniny obsahují methyltrisulfid, který může reagovat s vhodnými thiolky za

vzniku disulfidů při současném zavádění funkční skupiny, jakou je hydrazid nebo další funkční skupiny, která se používá pro navázání calicheamicinového derivátu na nosič. Příklady této reakce s calicheamiciny jsou uvedeny v patentu US 5,053,394, který rovněž popisuje cílené formy calicheamicinů.

Faktorem, který omezoval použití výše zmíněných konjugátů je jejich zvýšená tendence tvořit agregáty, ve kterých se množství calicheamicinového derivátu, který je konjugován s nosičem (tj. obsah účinné látky) zvýšené. Je žádoucí navázat na nosič množství účinné látky, které odpovídá zachycení afinity nosného proteinu, protože vyšší množství účinné látky zvyšuje inherentní potenci konjugátu.

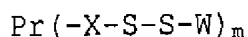
Přítomnost agregátu, který musí být odstraněn při terapeutických aplikacích, rovněž problematizuje výrobu těchto konjugátů v průmyslovém měřítku a snižují výtěžek produktů. Množství calicheamicinu, naneseného na nosném proteinu (koncentrace účinné látky), množství agregátu, který vzniká v průběhu konjugační reakce a výtěžek konečného vyčištěného monomerního konjugátu, který lze získat, jsou tedy na sobě závislé. Proto je třeba udělat kompromis mezi vyšší koncentrací účinné látky nanesené na nosiči a výtěžkem konečného monomeru, který se provede tak, že se nastaví množství reakčního calicheamicinového derivátu, které se přidalo do konjugační reakce.

Tendence calicheamicinových derivátů tvořit agregáty je problémem zejména v případě, kdy se provádějí konjugační reakce se spojkami (vazebnými činidly), popsány v evropské patentové přihlášce č. 0689845. V tomto případě se velké procento vyprodukovaných konjugátů bude nacházet ve formě agregátů, což představuje závažný problém, spojený s čištěním v případě terapeutického podání. V případě

některých nosičů je zcela nemožné připravit konjugáty, ani s rozumnými koncentracemi účinné látky, s výjimkou laboratorního měřítka. Proto je velmi potřebné vyvinout způsoby konjugace cytotoxických účinných látek, například calicheamicinů, na nosiče, které by minimalizovaly stupeň agregace a umožňovaly tedy připravit produkt co možná nejvyšší koncentrací účinné látky v rozumném výtěžku. Aktuální koncentrace účinné látky, potřebná pro dosažení dobré biologické účinnosti, množství agregátu, které může být ještě během čištění úspěšně odstraněno a konečný výtěžek konjugátu, který lze získat je potřeba stanovit jednotlivě, případ od případu.

Podstata vynálezu

Konjugáty calicheamicinových derivátů a nosiče podle vynálezu mají obecný vzorec



ve kterém

Pr znamená proteinový nosič,

X znamená vaznou skupinu, která představuje produkt libovolné reakční skupiny, která může reagovat s proteinovým nosičem,

W znamená calicheamicinový radikál, vytvořený odstraněním přirozeně se vyskytující methyltri-sulfidové skupiny; a

m znamená číslo od 0,5 do 15.

Způsob přípravy monomerních konjugátů calicheamicinového derivátu a nosiče s vysokým obsahem účinné

látky, vysokým výtěžkem a sníženou tendencí aglomerovat podle vynálezu zahrnuje:

(1) inkubací calicheamicinového derivátu a proteinového nosiče v nenukleofilním, s proteiny slučitelném, pufrovaném roztoku, který má vhodné pH, pohybující se od 4,0 do 8,5, přičemž tento roztok dále obsahuje (a) ko-rozpouštědlo zvolené ze skupiny zahrnující propylenglykol, ethanol, DMSO a jejich kombinace a (b) aditivo, obsahující alespoň jednu karboxylovou kyselinu s 6 až 18 atomy uhlíku, přičemž inkubace se provádí při teplotě pohybující se přibližně v teplotním rozmezí od 25°C do 37°C a přibližně 15 minut až 24 hodin; a

(2) čištění konjugátu připraveného v kroku (1) za vzniku monomerních konjugátů.

Alternativní provedení způsobu přípravy monomerních konjugátů calicheamicinového derivátu a nosiče s vyšší koncentrací účinné látky a výtěžkem a sníženou tendencí aglomerovat podle vynálezu zahrnuje:

(1) inkubací calicheamicinového derivátu a proteinového nosiče v nenukleofilním, s proteiny slučitelném, pufrovaném roztoku, který má vhodné pH pohybující se od 4,0 do 8,5, přičemž tento roztok dále obsahuje jako ko-rozpouštědlo t-butanol, přičemž inkubace se provádí při teplotě pohybující se přibližně v teplotním rozmezí od 25°C do 37°C a přibližně 15 minut až 24 hodin; a

(2) čištění konjugátu připraveného v kroku (1) za vzniku monomerních konjugátů.

Konjugáty podle vynálezu zahrnují terapeutické činidlo spojené s vaznou látkou, která obsahuje libovolnou reakční skupinu, která reaguje s proteinovým cíleným nosičem. Použití příslušných ko-rozpouštědel a aditiv podporuje vznik monomerní formy, která je opakem aglomerátu těchto konjugátů a umožňuje přítomnost vyšší koncentrace účinné látky v produktu a dosažení vyššího výtěžku produktu bez zvýšené aglomerace. Monomerní forma má terapeutickou hodnotu.

Nosiče

Nosiči podle vynálezu jsou výhodně proteinové nosiče. Nosnými molekulami jsou růstové faktory, protilátky, fragmenty protilátek a jejich geneticky nebo enzymaticky připravené protičásti, zde označené jednotlivě nebo jako skupina nosičů. Podstatnou vlastností nosiče je jeho schopnost rozpoznat antigen nebo receptor, související s nežádoucími buňkami. Příklady nosičů uvádí patent US 5,053,394 a tyto nosiče jsou rovněž vhodné pro vynález. Výhodnými nosiči pro předložený vynález jsou lidské nebo humanizované protilátky.

Specifické příklady zde použitých nosičů jsou protilátky P67,6, A33, CT-M-01 (rovněž známé jako 7F11C7) a Waldmanova protilátka „anti-Tac“. Tyto protilátky se zde používají ve dvou formách: myší formě, označené pomocí „m“ (např. m-P67,6) a geneticky připravené, humanizované formě, označené pomocí „h“ (např. h-P67,6). Základní technologie humanizace protilátky je popsána Winterem v patentu US 5,225,539 (1993) a Adairem v PCT publikaci WO 91/09967 (1991). m-P67,6 je popsán I.D. Bernsteinem a kol. v I. Clin. Invest 79:1153 (1987) a I.D. Bernsteinem a kol., J. Immunol. 128:867-881 (1992) a rozpoznává antigen CD33,

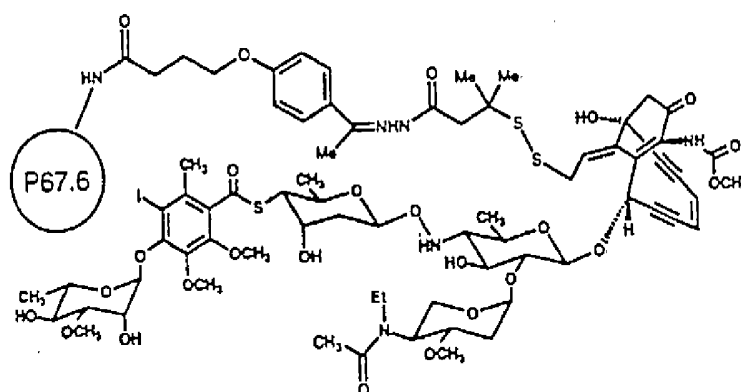
který je prevalentní v určitých lidských myeloidních nádorech, zejména u akutní nelymfocytární leukémie (ANLL). Další protilátkou, která může být použita je MOPC-21, která je necílenou protilátkou, a její konjugáty se použijí jako kontrolní vzorky, na jejichž základě jsou posuzovány cílené účinky konjugátu ostatních protilátek. Tato myší protilátka je popsána F. Melchersem v Biochem. J. 119: 765-772 (1970).

Evropská patentová přihláška 068945 popisuje DNA kódující a předpovězené sledy aminokyselin různých oblastí, zejména h-P67,6, které jsou pro vynález zvláště výhodné. Rámcem pro tuto protilátku je EU rámec pro lidský IgG₄, viz ~~Gottlieb a kol., Biochemistry 9:3115, 1970.~~ Protilátka se připraví za použití obecné strategie popsané v PCT publikaci WO 91/09967.

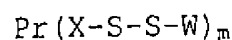
Protilátka m-CT-M-01 je popsána v evropské patentové přihlášce 86401482,4/0208615 a rozlišuje polyepitelový mucinový (PEM) antigen, přítomný v mnoha lidských pevných nádorech, zejména nádorech plicních, žaludečních a nádorech vaječníků. Humanizovaná verze této protilátky, h-CT-M-01, je popsána v PCT publikaci WO 93/06231 (1993). Protilátka m-A33 je popsána v patentu US 5,160,723 a 5,431,897 a představuje myší protilátku, která rozpozná glykoproteinový antigen, přítomný ve střevních rakovinových buňkách. Humanizovaná verze této protilátky, h-A33, je popsána v PCT patentové přihlášce WO 94/13805 (23. června 1994). Anti-Tac popisuje T. A. Waldman a kol. v J. Immunol. 126:1393 (1981), a představuje myší protilátku, reagující s IL-2 receptorem, který se nalézá na aktivovaných a funkčně dospělých T buňkách, včetně abnormálně aktivovaných leukemických buněk.

Terapeutická činidla

Terapeutickými činidly, která jsou vhodná pro předložený vynález, jsou cytotoxická antibiotika, která se váží na DNA a přerušují ji. Výhodnými cytotoxickými činidly jsou calicheamiciny, kterými jsou methyltrisulfidová protinádorová antibiotika. Příklady calicheamicinů, vhodných pro předložený vynález, jsou popsány například v patentu US 5,053,394. Viz rovněž patent US 4,671,958; 4,970,198; 5,037,651; a 5,079,233. Výhodnými calicheamiciny jsou gama calicheamicin N-acetyl gama calicheamicinů. Struktura N-acetyl gama-calicheamicinu v konjugované formě je znázorněna níže.

Konjugáty calicheamicinového derivátu a nosiče

Konjugáty podle vynálezu mají obecný vzorec



ve kterém

Pr znamená proteinový nosič,

X znamená vaznou skupinu, která představuje produkt libovolné reakční skupiny, která může reagovat s proteinovým nosičem,

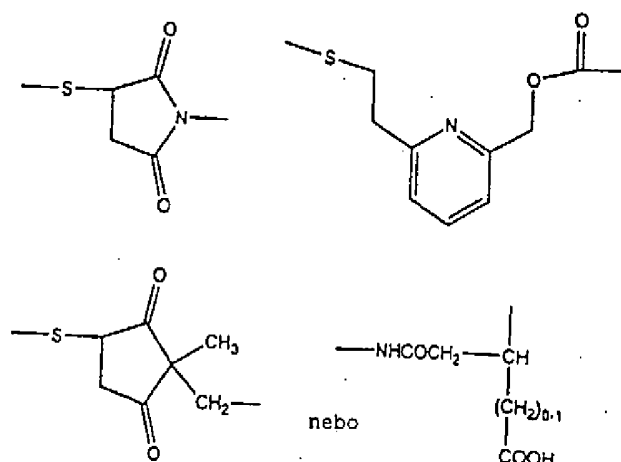
W znamená calicheamicinový radikál vytvořený odstraněním přirozeně se vyskytující methyltrisulfidové skupiny; a

m znamená číslo od 0,5 do 15.

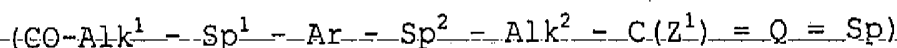
Výhodně má X obecný vzorec Z-Sp, ve kterém:

Sp znamená divalentní nebo trivalentní radikál s přímým nebo větveným řetězcem a s 1 až 18 atomy uhlíku, cykloalkylový nebo heterocykloalkylový radikál, divalentní nebo trivalentní cykloalkylalkylový nebo heterocykloalkylalkylový radikál s 1 až 18 atomy uhlíku nebo divalentní nebo trivalentní nenasycený alkylový radikál se 2 až 18 atomy uhlíku, ve kterých je heteroatomem výhodně furyl, thienyl, N-methylpyrrolyl, pyridinyl, N-methylimidazolyl, pyrimidinyl, chinolyl, isochinolyl, N-methylkarbazoyl, aminokourmarinyl nebo fenazinyl a pokud Sp znamená trivalentní radikál, potom může být dále substituován dialkylaminoskupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, nižší alkoxyskupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, hydroxyskupinou nebo nižšími alkylthioskupinami s 1 až 5 atomy uhlíku; a

Z	znamená	-NHC(=O)-,	-CH=NNHC(=O)-,
-CH ₂ NHNHC(=O)-,		-CH=NNHC(=O)NH-,	-CH ₂ NHNHC(=O)NH-,
-CH=NNHC(=S)NH-,		-CH ₂ NHNHC(=S)NH-,	-CH=N-, -CH ₂ NH-,
-OC(=O)-, -SS-,			



Alternativně má X obecný vzorec



ve kterém

Alk^1 a Alk^2 znamenají nezávisle vazbu nebo větvený nebo nevětvený alkylenový řetězec s 1 až 10 atomy uhlíku;

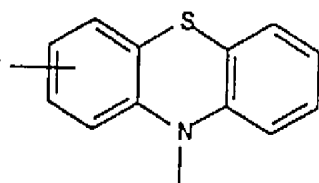
Sp^1 znamená vazbu, $-\text{S}-$, $-\text{O}-$, $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{NR}'-$, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}-$ nebo $-\text{X}-\text{Ar}'-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{Z}$, ve kterých X, Y a Z znamenají nezávisle vazbu, $-\text{NR}'-$, $-\text{S}-$ nebo $-\text{O}-$ pod podmínkou, že pokud n znamená 0, potom alespoň jedno Y a Z musí znamenat vazbu a Ar' znamená 1,2-, 1,3- nebo 1,4-fenylen případně substituovaný jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitroskupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$ nebo $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$ pod podmínkou, že pokud Alk^1 znamená vazbu, potom Sp^1 znamená vazbu;

n znamená celé číslo od 0 do 5;

R' znamená větvený nebo nevětvený řetězec s 1 až 5 atomy uhlíku případně substituovaný jednou nebo dvěma skupinami $-\text{OH}$, alkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku,

thioalkoxyskupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitroskupinami, dialkylaminoskupinami s 1 až 3 atomy uhlíku, nebo trialkylammonium- A^- s 1 až 3 atomy uhlíku v alkylovém zbytku, ve kterém A^- znamená farmaceuticky přijatelný aniont doplňující sůl;

Ar znamená 1,2-, 1,3- nebo 1,4-fenylem případně substituovaný jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku alkokyskupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxyskupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitroskupinami, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, $-S(CH_2)_nCONHR'$, ve kterých n a R' mají výše definovaný význam nebo 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6- nebo 2,7-naftyliden nebo



příčemž každý naftyliden nebo fenothiazin je případně substituován jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku, alkokyskupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxyskupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitroskupinami, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, nebo $S(CH_2)_nCONHR'$, ve kterých mají n a R' výše definovaný význam pod podmínkou, že pokud Ar znamená fenothiazin, Sp^1 znamená vazbu navázanou pouze na dusík;

Sp^2 znamená vazbu, $-S-$ nebo $-O-$, pod podmínkou, že pokud Alk^2 znamená vazbu, potom Sp^2 znamená rovněž vazbu;

Z^1 znamená atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo fenylovou skupinu případně substituovanou jednou, dvěmi nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku alkoxy skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, nebo $S(CH_2)_nCONHR'$, ve kterých mají n a R' výše definovaný význam;

Sp znamená divalentní nebo trivalentní radikál s přímým nebo větveným řetězcem a s 1 až 18 atomy uhlíku, cykloalkylový nebo heterocykloalkylový radikál, divalentní nebo trivalentní cykloalkylalkylový nebo heterocykloalkylalkylový radikál s 1 až 18 atomy uhlíku nebo divalentní nebo trivalentní nenasycený alkylový radikál se 2 až 18 atomy uhlíku, ve kterých je heteroatomem výhodně furyl, thienyl, N-methylpyrrolyl, pyridinyl, N-methylimidazolyl, pyrimidinyl, chinolyl, isochinolyl, N-methylkarbazoyl, aminokourmarinyl nebo fenazinyl a pokud Sp znamená trivalentní radikál, potom může být dále substituován dialkylaminoskupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, nižší alkoxy skupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, hydroxy skupinou nebo nižšími alkylthioskupinami s 1 až 5 atomy uhlíku; a

Q znamená $=NHNCO-$, $=NHNCS-$, $=NHNCONH-$, $=NHNCSNH-$ nebo $=NHO-$.

Výhodně Alk^1 znamená větvený nebo nevětvený alkylenový řetězec s 1 až 10 atomy uhlíku; Sp' znamená vazbu, $-S-$, $-O-$, $-CONH-$, $-NHCO-$ nebo $-NR'$, ve kterém má R' již definovaný význam pod podmínkou, že pokud Alk^1 znamená vazbu, potom Sp^1 znamená rovněž vazbu;

Ar znamená 1,2-, 1,3- nebo 1,4-fenylen případně substituovaný jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$, ve kterých n a R' mají výše definovaný význam nebo 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6- nebo 2,7-naftyliden, přičemž každý z těchto naftilidenů může být případně substituován jednou, dvěma nebo třemi skupinami alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$ nebo $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$.

Z^1 znamená alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku nebo fenyl případně substituovaný jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, nebo $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$;

Alk^2 a Sp^2 znamenají společně vazbu; a

Sp a Q mají poslední definované významy.

Calicheamicinové deriváty mohou být například navázány na lysinový zbytek protilátky. Lysinové navázání, které je popsáno v patentu US 5,053,394, poskytuje konjugáty, které jsou za normálních fyziologických podmínek stabilní vůči hydrolýze.

Patent US 5,053,394 je dalším patentem, který popisuje konjugáty, v nichž nukleofilní calicheamicinový derivát, například hydrazid, reaguje za mírně kyselých podmínek s

jodistanem oxidovanými Sacharidy na protilátce. Tato reakce produkuje Schiffovu bázi nebo její deriváty, například hydrazon, který lze dále, pokud je to žádoucí, redukovat například pomocí kyanoborohydridu za vzniku hydrolyticky stabilního konjugátu.

Evropská patentová přihláška 0689845 popisuje další vazebná činidla, která lze použít spolu s nukleofilními činidly, zejména hydrazidy, a příbuznými nukleofily připravenými z calicheamicinů. Tato vazebná činidla se používají v případech (např. P67,6), kdy se dosáhne lepší účinnosti tím, že je vazba vytvořena mezi účinnou látkou a vazebným činidlem hydrolyzovatelná. Tato vazebná činidla obsahují dvě funkční skupiny. Jednou skupinou je zpravidla karboxylová kyselina, která se použije pro reakci s nosičem. Kyselinová funkční skupina, pokud se správně aktivuje, může vytvořit amidovou vazbu s volnou aminoskupinou použitého nosiče, například s aminem v bočním řetězci lysinu nosiče monoklonálního protilátky. Další funkční skupinou je obecně karbonylová skupina, tj. aldehyd nebo keton, který bude reagovat s vhodně modifikovaným terapeutickým činidlem. Karbonylové skupiny mohou reagovat s hydrazidovou skupinou na účinné látce za vzniku hydrazonové vazby. Tato vazba je hydrolyzovatelná na cílené buňce, čímž se dosáhne uvolnění terapeutického činidla z konjugátu.

Nejvýhodnějším dvoufunkčním vazebným činidlem, použitelným v rámci vynálezu, je kyselina 4-(4-acetylfenoxy)butanová (AcBut). Toto vazebné činidlo umožní připravit výhodný produkt, ve kterém je konjugát tvořen gama calicheamicinem nebo N-acetyl gama calicheamicinem funkcionalizovaným uvedením do reakce s hydrazidem kyseliny 3-merkpto-3-methylbutanové, vazebné činidlo, jakým je

kyselina 4-(4-acetylfenoxy)butanová (AcBut), a cílený nosič lidské nebo humanizované monoklonální protilátky.

Monomerní konjugace

Přirozená hydrofobní povaha calicheamicinů činí problémy při přípravě monomerních konjugátů s dobrou koncentrací účinné látky a rozumnými výtěžky, které jsou nezbytné pro klinické aplikace. Zvýšená hydrofobicita vazby, kterou poskytují vazebná činidla, například AcBut vazebné činidlo, kterou popisuje evropská patentová přihláška 0689845 stejně, jako zvýšená kovalentní vzdálenost separující terapeutické činidlo z monoklonální protilátky (MoAb), obnovují tento problém.

Ke vzniku agregace konjugátů calicheamicinu a nosiče s vyššími koncentracemi účinné látky dochází v důsledku hydrofobní povahy calicheamicinů. Aby se získalo rozumné množství monomerního produktu, je třeba často omezit koncentraci účinné látky. V některých případech, například pokud se při použití reakčních podmínek, popsaných v patentu US 5,053,394, použijí konjugáty, popsané v evropské patentové přihlášce 0689845, je často nemožné, z důvodu nadbytečné agregace, připravit konjugáty v použitelném výtěžku a s koncentrací účinné látky, použitelnou pro terapeutické aplikace. Tyto reakční podmínky zahrnují použití DMF jako ko-rozpouštědla při konjugační reakci. Je tedy třeba vyvinout způsoby, které by umožnily připravit produkt s vyššími koncentracemi účinné složky a vyšším výtěžkem bez toho, že by u nich docházelo k agregaci a inherentní ztrátě materiálu.

Pro humanizované nosiče zahrnující neomezujičím způsobem proteiny, například lidské nebo humanizované

monoklonální protilátky, které se použijí pro zacílení cytotoxických terapeutických činidel, například P67,6, a další humanizované, zde popsané, monoklonální protilátky se zjistilo, že použití nenukleofilního, s proteinem slučitelného, pufovaného roztoku obsahujícího (i) propylenglykol (PG) jako ko-rozpouštědlo a (ii) aditivum obsahující alespoň jednu karboxylovou kyselinu a 6 až 18 atomy uhlíku, poskytne monomerní konjugáty calicheamicinu a nosiče s vyšším obsahem účinné látky a vyšším výtěžkem a sníženou tendencí aglomerovat, které mají vynikající účinnost. Výhodnými kyselinami jsou kyseliny se 7 až 12 atomy uhlíku a nejvýhodnější kyselinou je kyselina oktanová (kaprylová) (CA). Výhodnými pufovacími roztoky pro konjugáty, připravené z OSu esterů nebo dalších srovnatelně účinných esterů, jsou fosfátem pufovaný solný roztok (PBS) nebo kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová (Hepesův pufr), zatímco výhodnými pufovacími roztoky pro konjugáty, připravené ze zoxidovaných sacharidů protilátek, je octan sodný. Pufovaný roztok, použitý v těchto konjugačních reakcích, nemůže obsahovat volné aminy nebo nukleofily. Přijatelné pufrы pro další typy konjugátů není pro odborníka v daném oboru obtížné určit. Alternativně se rovněž zjistilo, že použití nenukleofilního, s proteinem slučitelného pufovaného roztoku, obsahujícího pouze t-butanol bez dalšího aditiva, umožňuje produkovat monomerní konjugáty nosiče a calicheamicinového derivátu s vyšším obsahem účinné látky, vyšším výtěžkem a sníženou tendencí aglomerovat.

Množství ko-rozpouštědla, použité podle vynálezu, představuje množství, účinné pro monomerní konjugaci a odborník v daném oboru může toto množství stanovit na základě svých zkušeností a vědomostí, bez nutnosti provádět

další experimenty. Množstvím aditiva je množství, účinné pro zlepšení monomerní konjugace. Rovněž toto množství může odborník v daném oboru stanovit bez nutnosti provádět další experimenty. Do konjugační reakce, jejímž cílem je připravit monomerní konjugáty calicheamicinového derivátu a nosiče s vyšším obsahem účinné látky ve větším výtěžku a se sníženou tendencí aglomerovat, se přidá přibližně 10 obj. % až 60 obj. %, výhodně přibližně 10 obj. % až 40 obj. % a nejvýhodněji přibližně 30 obj. % propylenglykolu (PG), vztaženo k celkovému objemu roztoku, a aditivum, obsahující alespoň jednu karboxylovou kyselinu s 6 až 18 atomy uhlíku, výhodně kyselinu kaprylovou v množství, pohybujícím se přibližně v rozmezí od 20 mM do 100 mM, výhodně od 40 mM do 90 mM a nejvýhodněji přibližně od 60 mM. Část PG ko-rozpouštědla nebo celé PG ko-rozpouštědlo se použije pro přenesení účinné látky do konjugační směsi. Pokud se pro přenos účinné látky použije 10 obj. % ko-rozpouštědla nebo méně, vztaženo k celkovému objemu konjugační směsi, je případně možné nahradit toto množství ko-rozpouštědla ethanolem nebo DMSO.

Alternativně lze koncentraci karboxylové kyseliny s 6 až 18 atomy uhlíku, výhodně kyseliny kaprylové, zvýšit na 150 až 300 mM a ko-rozpouštědlo může být nakapáno do 1 až 10 % propylenglykolu, ethanolu nebo DMSO a výhodné je, pokud se použije 200 mM kyselina kaprylová a 5 % propylenglykol nebo ethanol.

U dalšího provedení se může do konjugační reakce, jejímž cílem je připravit monomerní konjugáty calicheamicinového derivátu a nosiče s vyšším obsahem účinné látky ve větším výtěžku a se sníženou tendencí aglomerovat, přidat přibližně 10 obj. % až 25 obj. %, .

výhodně přibližně 15 obj. % t-butanolu, vztaženo k celkovému objemu roztoku.

V předcházejících reakcích se koncentrace MoAb pohybuje přibližně v rozmezí od 1 do 15 mg/ml a koncentrace účinné složky, například AcBut calicheamicinu, činí přibližně 0,025 až 1 mg/ml. Reakce se provádějí v PBS nebo acetátovém pufru při pH přibližně 4,0 až 8,5, v závislosti na typu připravovaného konjugátu při teplotě, pohybující se přibližně v teplotním rozmezí od 25°C (pokojová teplota) do 37°C, po dobu přibližně 15 minut až 24 hodin. Konjugáty lze izolovat a čistit běžně používanými metodami, například za použití HPLC nebo FPLC nebo SEPHACRYLu S-200. Vyčištěné konjugáty jsou monomerní a obsahují přibližně 2 až 6 molů MoAb/mol účinné látky.

Přidání ko-rozpouštědla a/nebo aditiva může způsobit změnu pH hodnoty pufrovaného roztoku, takže může být nezbytné upravit pH hodnotu tak, aby se ocitla v rozmezí přibližně od 4,0 do 8,5. Hodnota pH pufrovaného roztoku, výhodně obsahující ko-rozpouštědlo a aditivum, by se měla výhodně pohybovat přibližně v rozmezí od 7,0 do 8,5 pro konjugáty připravené z OSu esterů, nebo přibližně v rozmezí od 4,0 do 6,5 pro konjugáty, připravené ze zoxidovaných sacharidů protilátky, pH pufrovaného roztoku obsahujícího ko-rozpouštědlo a aditivum, by mělo mít výhodně hodnotu 7,7 pro konjugáty připravené z OSu esterů, nebo přibližně 5,5 pro konjugáty připravené ze zoxidovaných sacharidů protilátky. Určení přijatelných pH rozmezí pro další typy konjugátů nepředstavuje pro odborníka v daném oboru žádný problém.

Zjistilo se, že použití dalších kombinací výše zmíněných aditiv pro myši monoklonální protilátky zvyšuje

obsah účinné látky a výtěžek monomerního konjugátu a je zřejmé, že pro dosažení optimálních výsledků může libovolný konkrétní proteinový nosič vyžadovat určité malé změny, pokud jde o reakční podmínky nebo volbu aditiv.

Příklady provedení vynálezu

Cílem níže uvedených pracovních příkladů je blíže ilustrovat předložený vynález bez toho, že by byl jakkoliv omezen. rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen přiloženými patentovými nároky.

Příklad 1

Konjugace v DMF: Různé varianty DMF koncentrace, poměru účinné látky a proteinu a použitých pufrů

První řada experimentů se prováděla za použití N-acetyl gama calicheamicinu funkcionalizovaného uvedením do reakce s hydrazidem kyseliny 3-merkapt-3-methylbutanové navázané na spojce, kterou je kyselina 4-(4-acetylfenoxy)butanová, a aktivovaného jako OSu ester (zde označen jako AcBut calicheamicin) jak na myším, tak lidském P67,6 při různých DMF koncentracích, poměrech účinné látky a proteinu a pufrách. Výsledky ukázaly, že tyto „standardní“ podmínky poskytují monomerní konjugát s obsahem účinné látky 1,5 až 3 moly účinné látky/mol proteinu, ve 20 až 30 % výtěžku, přičemž tento nízký výtěžek byl způsoben ztrátou materiálu ve formě

aglomerátu. Tyto výsledky ukázaly na potřebu změnit reakční podmínky.

Do proteinového roztoku 4,5 až 5 mg/ml proteinu v PBS pufru (50 mM fosforečnanu sodného), 100 mM NaCl, pH 7,4) se přidalo 6 molárních ekvivalentů účinné látky v DMF (3,3 mg/ml) spolu s další částí DMF, která doplnila konečnou koncentraci DMF na 25 %. Tato směs se inkubovala přes noc za mírného protřepávání při pokojové teplotě. Konjugovaný protein se následně čistil v případě objemu menšího než 0,5 ml pomocí FPLC Superose a v případě větších objemů pomocí SEPHACRYL S-200.

Tento způsob a tyto podmínky poskytly v případě mP67,6 (průmyslové měřítko) 32 % proteinový výtěžek monomeru s obsahem účinné látky 1,9 M/M a v případě hP67,6 26 % výtěžek monomerního proteinu s obsahem účinné látky 2,9 M/M. Takže i když je obsah účinné látky na monomeru přijatelný, lze náročnost čištění a nízké výtěžky, způsobené ztrátou materiálu v důsledku agregace, považovat za nepřijatelné pro další vývoj a pro průmyslové měřítko.

Rovněž se provedla studie, jejímž úkolem bylo porovnat závislost obsahu účinné látky na výtěžku monomeru v 30 % DMF za použití hP67,6 v PBS pH 7,4 a různých ekvivalentů (5 až 9,5 M/M) účinné látky. Všechny vzory se inkubovaly přes noc při pokojové teplotě a přemístily do PBS v PD10 sloupcích a posléze se u vzorků spektrofotometricky stanovil proteinový výtěžek a obsah účinné látky. Vzorky se dále analyzovaly pomocí HPLC na Zorbaxu GF-250 v 0,2M fosforečnanu sodném, pH 7, a Superose 12 v PBS, pH 7,4. Potom následovalo čištění na FPLC Superose v PBS. Výsledky: maximální dosažitelný obsah účinné látky dosahoval 3 až 3,5 M/M, ale výtěžek byl příliš nízký (<20%).

Dále se provedlo podobné studium objemů účinné látky, ale s tou výjimkou, že se namísto PBS pufru použil Hepesův pufr (100 mM, pH 7). Získané výsledky: nebyly pozorovány žádné rozdíly s tou výjimkou, že se zdálo, že se přítomný agregát vysrážel nebo nalepil na kolonu a proto se již dále v průběhu konečného čištění neobjevil. Dále následovala, jak již bylo uvedeno v předcházejícím případě, studie obsahu účinné látky, ale tato studie se prováděla za použití 0,5 M NaClO₄, který se přidal do pufru a který představoval možné solubilizační činidlo pro účinnou látku. Výsledky: nebylo dosaženo žádného přínosu.

Další studie se prováděly spíše než v PBS v Hepesově pufru (50 mM, pH 7,4). Výsledky: nebylo dosaženo žádného přínosu.

Příklad 2

Optimalizace humanizovaných protilátek

Pokusy týkající se štěpení agregátů

V tomto bodě nebylo zjištěno žádné zlepšení oproti původní metodologii. Byla přezkoumávána možnost, zda je možné použít podmínky, které způsobují redukci množství agregátu na zvýšení obsahu účinných složek a/nebo zvýšení výtěžku čištěného monomeru. Protože všechno naznačovalo tomu, že agregované konjugáty byly asociativní, nekovalentní a pravděpodobně způsobené hydrofobními interakcemi, rozhodlo se, že studie jejich vlastností by byla pouze informativní. Takže první pokusy byly zaměřeny na nalezení aditiva, které by mohlo rozbít již vytvořené agregáty. Rovněž byla vzata v úvahu skutečnost, že aditivum

s touto vlastností by mohlo v případě, že by se použilo v průběhu konjugace, rovněž sloužit jako činidlo, bránící vzniku agregátů (a tak zvyšovalo výtěžek monomeru). Použitá reakční činidla byla zvolena na základě posudku, vypracovaného Federálním orgánem, pověřeným sledováním bezpečnosti a účinnosti léčiv a rovněž aditiv, která lze v léčivech použít na základě jejich možného účinku na rozpustnost hydrofobních částí a/nebo na základě jejich slučitelnosti s proteiny. Tyto studie vedly k identifikaci tří potenciálně použitelných aditiv.

Pro rozštěpení agregátů se použilo dvanáct permutací různých aditiv. Frakce agregátu, získaná z hp67,6-AcBut calicheamicinového konjugačního čistění, která obsahovala ~25 % dimeru se zahustila na 0,7 mg/ml proteinu. Do jednotlivých podílů dimerem obohaceného hp67,6-AcBut se přidala různá aditiva: PBS, 0,3M glycinu, 0,2M glycinu + 2 % maltozy, 0,1M glycinu + 0,1M histidinu, 1 % pluronického F-68, 80 mM kyseliny kaprylové (kyseliny oktanové), 40 mM kyseliny kaprylové; 6 mM N-acetyltryptofanu, 1% benzylakoholu, 0,5% benzoátu sodného, 33% propylenglykolů a 25% glycerolu. Každý ošetřený podíl se inkuboval při pokojové teplotě přes noc a následně analyzoval gelovou filtrací HPLC na Zorbaxu GF-250 a Superose 12 za použití dvou detektorů při 280 a 333 nm. Analýza se provedla jak pro poměr agregátu (neboli dimeru) ku monomeru, tak pro celkový izolovaný monomer. Výsledky: ukázalo se, že propylenglykol (PG) kyseliny kaprylové a glycerol jsou lepšími aditivy než ostatní aditiva, pokud jde o snižování dimeru bez toho, že by došlo ke snížení výtěžku proteinů. Jmenovaná aditiva snížila obsah agregátů o 50 až 90 %, zatímco ostatní aditiva neměla většinou žádný efekt.

Příklad 3Konjugace za použití protiagregačních činidel

Na základě těchto výsledků se PG, CA a glycerol použily v průběhu konjugace. Kromě toho se vyzkoušely rovněž isopropanol a t-butanol. Isopropanol a t-butanol, pokud se použily s proteiny jako ko-rozpouštědla v nízkých procentických koncentracích, neměly žádné škodlivé účinky (osobní pozorování).

Konjugace hP67,6 na AcBut-calicheamicinu se provedla v přítomnosti 25 % PG, 80 mM CA, 25 % glycerolu, 25 % isopropanolu (IPA), 25 % t-butanolu, nebo 25 % PG + 80 mM CA. Všechny pokusy se prováděly za použití 3,25 mg/ml proteinu v PBS, pH 7,4 a 6 molů účinné látky na mol MoAb. Všechny konjugace se porovnály s kontrolní konjugací, prováděnou v 25 % DMF, zatímco všechny testované roztoky obsahovaly ~5 % DMF ze zásoby účinné látky. Kontrolní konjugace se provedla za použití 4 M/M účinné látky v 25 % PG nebo 25 % DMF. Všechny vzorky se inkubovaly přes noc při pokojové teplotě, přemístily do PBS v PD10 kolonách a analyzovaly pomocí spektrometrie, jejímž cílem bylo stanovit obsah účinné látky a proteinový výtěžek. Vzorky se dále analyzovaly pomocí HPLC na Zorbaxu a Superose. Konjugáty, vzniklé v průběhu konjugační reakce, se čistily na FPLC Superose. Výsledky: Zdá se, že všechna tato aditiva jsou přínosná s výjimkou glycerolu (nízký obsah účinné látky). Pokud jde o výtěžek konjugátu, obsah účinné látky a minimalizaci agregátu, zdá se, že PG + CA jsou lepší.

Dále následovala řada studií testujících kombinaci CA s dalšími aditivy, optimalizaci PG koncentrace a přímá srovnání s t-BuOH.

Vzhledem k tomu, že se, jak již bylo diskutováno výše, zdá, že CA přidané do PG zvyšuje proteinový výtěžek a obsah účinné látky a minimalizuje agregaci, prováděla se konjugace na hP67,6 za použití PG, t-BuOH nebo IPA (v každém případě 25 %), přičemž v každém případě se provedl pokus s CA a bez CA (80 mM), aby se zjistilo, zda může CA přinést spolu s dalšími aditivy synergický výsledek. Výsledky: t-BuOH a CA byly v použitých koncentracích slučitelné, zatímco IPA nepřinesl tak dobrý výsledek jako PG, pokud jde o zvýšení výtěžku a snížení agregátu.

Cílem provedených konjugací, ve kterých se použilo 10, 15 nebo 20 % a CA při 40 nebo 80 mM, bylo optimalizovat PG + PA podmínky. Analýza se provedla stejným způsobem jako v předcházejících případech. Výsledky: kombinace 20 % PG a 80 mM CA, která poskytla nejlepší výsledky, produkovala více než 60 % proteinu s obsahem účinné látky 3 až 3,8. Závěr: t-BuOH byl stejně účinný jako kombinace PG a CA a proto se více pokusů věnovalo potvrzení těchto pozorování a optimalizaci podmínek pro použití t-BuOH.

Konjugáty se připravovaly spolu s hP67,6 v PBS za použití 5 až 20 % t-BuOH a 6 až 10 ekvivalenty účinné látky. Výsledky: 10 % t-BuOH se zdálo být dostatečným množstvím pro 6 ekvivalentů účinné látky pro přípravu konjugátů s obsahem 2,3 M/M a s malým obsahem agregátu v surovém produktu. Ukázalo se, že Hepesův pufr jako náhrada PBS není přínosný.

Dále se provedly konjugace srovnávající kombinaci propylenglykolu (PG) při 20 % a 80 mM kyseliny kaprylové (CA) s 15 % t-BuOH. Porovnávající aditiva se testovala s 6, 9 a 12 moly účinné látky na mol hP67,6 v PBS. Výsledky: kombinace PG + CA se zdála být lepší ve smyslu proteinového výtěžku při přípravě produktu s vyšším obsahem účinné látky, zatímco v případě přípravy produktů s nižším obsahem účinné látky poskytla obě testovaná aditiva přibližně stejné výsledky.

Na tomto místě je třeba uvést, že použití 20 % PG spolu s 80 mM CA se jevílo jako poněkud lepší aditivum než 15 % t-BuOH, ale obě testovaná aditiva představovala ~~podstatné zlepšení oproti známým podmínkám. Nicméně~~ zatímco t-BuOH nemá na pH proteinu v PBS žádný vliv, u při PG poklesne pH ze 7,4 na přibližně 6,9. K tomuto zjištění se dospělo na základě zjištění délky trvání jednotlivých reakcí, zatímco t-BuOH reakce byly ukončeny během 1 až 3 hodin, PG/CA reakce trvaly přes noc.

Příklad 4

Konjugace PG/CA při různých pH hodnotách

V tomto příkladu se provedla řada konjugací s 30 % PG/80 mM a s nebo bez nastavení pH hodnoty na 7,4. Konjugace se rovněž provedly za použití 25 % vs. 30 % t-BuOH, v nepřítomnosti DMF. Výsledky: pH nastavení přispívá k lepšímu zabudování účinné látky.

Je zřejmé, že konjugace v PG + CA s pH nastaveným na 7,4 poskytuje mnohem lepší výsledky než konjugace v t-BuOH pro generování konjugátů s vysokým obsahem účinné látky.

Pro obsahy ~2 M/M, tyto dva způsoby poskytují podobné výtěžky, ale zatímco obsahy účinné látky se při zvyšování poměru účinné látky ku proteinu zvyšovaly, výtěžky se v případě použití t-BuOH podstatně snížily až na 25 % výtěžku, dosaženého při použití kombinace PG a CA (například obsah 5 M/M).

Příklad 5

Přípravy v průmyslovém měřítku

V tomto příkladu se provedly zkušební přípravy v průmyslovém měřítku (za použití 20 až 40 mg proteinu spíše než 0,5 až 1 mg na vzorek použitý pro experimentální měřítko). Cílem tohoto pokusu bylo určit průmyslové využití nových podmínek a vyrábět konjugáty s širokým rozmezí obsahů účinné látky. Tyto konjugáty se analyzovaly *in vivo* na xenoimplantátových nádorech s cílem potvrdit oprávněnost aditiv při produkci konjugátů, které jsou účinné, a toho, že konjugáty s vyšším obsahem účinné látky jsou účinnější než konjugáty s nižším obsahem účinné látky.

Příprava pH67, 6-AcBut v průmyslovém měřítku se provedla (30 mg použitého proteinu) za použití pouze 4 molárních ekvivalentů účinné látky a 20 % PG/80 mM CA, 5 % DMF a pH nastaveného na 7,5. Za těchto podmínek vzniklo daleko méně agregátu než při použití známých způsobů přípravy. Konečný čistý monomer obsahoval 1,9 M/M účinné látky a proteinový výtěžek představoval 67 %.

Pro získání konjugátů s vyšším obsahem účinné látky se použily stejné podmínky jako v předcházejícím případě ale s tou výjimkou, že se namísto 4 molárních ekvivalentů účinné

látky použilo 9 molárních ekvivalentů. Tím se dosáhlo pouze o něco větší agregace, ale získal se monomerní konjugát s obsahem účinné látky 3,2 M/M a proteinovým výtěžkem pouze o něco nižším, přibližně 60 %.

Přípravy v průmyslovém měřítku (30 mg proteinu) se sice podstatně zlepšily oproti původním výsledkům, ale stále poskytovaly o 30 až 40 % menší obsah účinné látky než by se dalo očekávat na základě výsledků dosažených v laboratorním měřítku. Předpokládalo se, že tento problém způsobilo mírné zvýšení množství DMF použité v průmyslovém měřítku. Takže se provedl nespočet laboratorních studií s vyššími koncentracemi DMF, jejichž úkolem bylo potvrdit zmíněnou domněnku.

Příklad 6

Vliv malých množství DMF během konjugace

Konjugace se prováděly v 10 % t-BuOH s 4 M/M účinné látky a koncentracemi DMF zvolenými z rozmezí od 1 % do 7 %. Zásobu účinné látky zde tvořilo 10 mg/ml DMF, které umožnilo použít nižší koncentrace DMF v průběhu konjugace. Výsledky: zdálo se, že zvýšení množství DMF způsobuje nižší zabudování účinné látky.

Konjugace v laboratorním měřítku se provedly za použití 6,4 M/M účinné látky a 30 % PG/80 mM CA, ale za použití 0 až 8 % DMF vs. 25 % t-BuOH se 2 % a 8 % DMF. Zásoby účinné látky se připravily v PG s cílem lépe kontrolovat koncentraci DMF. Výsledky: zjistilo se, že DMF zvyšuje agregaci (a snižuje tedy monomerní výtěžek) jak v případě PG/CA, tak v případě t-BuOH (více v kombinaci

PG/CA), přičemž pro konjugaci byla opět lepší kombinace PG/CA než t-BuOH.

Potom se provedla příprava v průmyslovém měřítku bez DMF, aby se potvrdily výsledky laboratorních pokusů. Konjugace začala při 30 % PG/80 mM CA a 6,1 M/M účinné látky. Provedené testy ukázaly, že tyto podmínky umožňují získat produkt s obsahem účinné látky 3,2 M/M, který se očekával na základě testů, prováděných v laboratorním měřítku, což potvrdilo potřebu vyloučit DMF jako ko-rozpouštědlo z reakční směsi.

Tato konjugace se ošetřila dalšími třemi ekvivalenty účinné látky, které produkovaly konečný čistý monomer s obsahem účinné látky 4,4 M/M a proteinovým výtěžkem 46 %.

Takže celkem se uskutečnily tři konjugace v průmyslovém měřítku, které poskytly konjugáty s 1,9, 3,2 a 4,4 moly účinné látky na mol proteinu, které se hodnotily *in vitro* a *in vivo*. Kombinace PG a CA se ukázala jako nejlepší reakční aditivo, zatímco DMF byl pro reakci nežádoucí.

Příklad 7

Konečná optimalizace

Za účelem nalezení optimálních koncentrací PG a CA, optimální hodnoty pH, pořadí přidání a vhodných náhrad DMF jako rozpouštědel pro účinnou látku se provedla celá řada testů.

Všechny konjugace, prováděné v laboratorním měřítku, se provedly ve 30 % PG/80 mM CA, ale s měnícím se pořadím

přidání MoAb, PG, CA a zásobní účinné látky připravené v PG, EtOH nebo DMSO. Výsledky: nejlepším pořadím přidání bylo pořadí MoAb, potom PG, následně CA (nastavené pH) a následně zásobní účinné látky připravené v PG, EtOH a DMSO se ukázaly jako přijatelné alternativní náhrady PG pro zásobní účinnou látku.

Studie konjugace se prováděly za použití 40, 55, 75 a 80 mM CA, a ve všech případech se použilo 25 % PG. Výsledky: zjistilo se, že nejlepších výsledků lze dosáhnout při 55 mM CA, pokud jde o proteinový výtěžek a obsah účinné látky.

Další konjugační studie se provedly za použití 40, 50, 60 a 70 mM CA s 25 % PG. Výsledky: Zjistilo se, že nejlepší výsledky poskytuje 60 mM CA, pokud jde o proteinový výtěžek a obsah účinné látky.

Rovněž se provedly konjugační studie s 25 % PG + 80 mM CA a 0,2 nebo 4 % DMF. Tyto studie se provedly proto, aby se ukázalo, zda-li jsou škodlivé i nízké koncentrace DMF. Výsledky: nebyly pozorovány žádné velké rozdíly, z čehož lze usuzovat, že problematické jsou pouze koncentrace vyšší než 4 %.

Dále se provedly konjugace s různou rychlostí míchání v průběhu konjugace. Výsledky: nebyly pozorovány žádné rozdíly.

Další konjugace se prováděly s účinnou látkou přidanou v EtOH namísto v PG. Výsledky: nebyly pozorovány žádné podstatnější změny oproti použití účinné látky v PG.

Řada konjugací se provedla v PG/CA a 6 M/M účinné látky za nastavení různých pH hodnot. Vývoj reakce a obsah

účinné látky se sledoval měřením reakčních složek a produktů hydrolýzy (pomocí RP-HPLC). Výsledky: všechny experimenty ukázaly, že čím vyšší je pH hodnota, tím rychlejší je reakce, přičemž doba reakce se pohybovala v rozmezí od 12 hodin při pH 7 až do doby kratší než 45 minut při pH 8,5. Určilo se, že pH vyšší než 7,5 produkuje nejvyšší výtěžek a obsah účinné látky.

Stejný postup za použití PG/CA aditiv se použil pro konjugaci AcBut-calicheamicinu na dva další humanizované MoAbs, CT-M-01 a A33. Při použití těchto humanizovaných MoAbs se získaly podobné obsahy účinné látky a výtěžky jako při použití humanizovaného P67,6 a to jak v laboratorním, tak v průmyslovém měřítku.

Příklad 8

AcBut-calicheamicin se konjugoval na 5 mg humanizované CT-M-01 monoklonální protilátky v přítomnosti 25 % propylenglykolu (PG) a 80 % kyseliny kaprylové. Reakce se prováděla přes noc (přibližně 24 hodin) při pokojové teplotě (25°C). Produkt se analyzoval pomocí HPLC.

Výsledky: získalo se 75 % monomeru s obsahem účinné látky 1,9 M/M.

Příklad 9

AcBut-calicheamicin se konjugoval na 36,6 mg hCT-M-01 monoklonální protilátky v přítomnosti 30 % PG a 60 mM CA. Reakce se prováděla 2 hodiny přibližně při 25°C. Produkt se analyzoval pomocí HPLC.

Výsledky: 60 % monomeru s obsahem účinné látky 2,2 M/M.

Příklad 10

AcBut-calicheamicin se konjugoval na 1 mg humanizované A33 MoAb v přítomnosti 30 % PG a 60 mM CA.

Výsledky: získalo se přibližně 50 % monomeru s obsahem účinné látky 1,8 M/M. Poslední experiment nám ukázal, že hA33 je složitým proteinem, pokud jde o práci s ním, vzhledem ke zvýšené tendenci jeho konjugátů tvořit agregáty.

Příklad 11

AcBut-calicheamicin se konjugoval na 50 mg hP67 v přítomnosti 200 mM a 5 % ethanolu (ze zásobní účinné látky). Inkubace trvala 2 hodiny při 25°C.

Výsledky: získalo se ~95 % monomeru s obsahem účinné látky 2,1 M/M a proteinovým výtěžkem 65 %.

Zjistilo se tedy, že dobré výsledky lze získat, pokud se podstatně zvýší koncentrace CA a sníží množství ko-rozpouštědla.

Příklad 12Konečný postup pro humanizované protilátky

Na základě všech výše zmíněných výsledků se doporučil následující konečný postup pro vývoj hP67,6 konjugace na AcBut-calicheamicin: použilo se pět zásobních roztoků: hP67,6 při ~6,5 mg/ml v PBS (50 mM fosforečnanu sodného, 100 mM NaCl, pH 7,4), propylen glykol (PG), 1M NaOH, 1M kyseliny kaprylové (CA) v PBS, pH 7,4, a účinná látka v PG (~6 mg/ml). Konečné koncentrace během konjugace byly následující: 30 % PG (5 % PG bylo ze zásobní účinné látky), 60 mM CA, přibližně 4 mg/ml p67,6 a 6 molů účinné látky na mol hP67,6. PG se přidal do hP67,6 a důkladně promíchal. Dále se přidala CA a směs se opět důkladně promíchala. Alternativně se CA přidala do 200 mM konečné koncentrace a 5 % PG (nebo EtOH) se získalo z přidání účinné látky (AcBut-calicheamicinu). Přidáním přibližně 10 ml NaOH/ml roztoku se nastavilo pH 7,7 až 7,8. Posléze se přidala účinná látka a roztok se intenzívně míchal. Roztok se inkuboval při 25°C za stálého protřepávání 3 hodiny. Po inkubaci následovala filtrace přes filtry Millex HV, která měla odstranit nerozpustný materiál. Konjugát se následně čistil pomocí gelové filtrace na SEPHACRYL S-200 v PBS (pH 7,4) za použití méně než přibližně 1 % zatížení, pro malé konjugace, <0,5 ml, se použila Superose 12 FPLC v PBS. Konečný monomerní (<4 % dimeru) konjugát byl připraven v proteinovém výtěžku vyšším než 60 % a obsah účinné látky činil >2,5 molů účinné látky/mol proteinu.

Tento postup se zdál být účinný u tří testovaných humanizovaných MoAbs: A33, CT-M-01 a p67,6, které představují dva různé isotypy (IgG₁, IgG₄, resp. IgG₄).

Příklad 13Optimalizace podmínek pro myši protilátky

Pokud se stejné postupy aplikovaly na myši MoAbs, potom poskytly určitá zlepšení oproti použití DMF jako jediného ko-rozpouštědla, ale byly obecně méně účinné proti agregaci než v případě humanizovaných protilátek, jak bude patrné z následujících příkladů. Výsledky získané pro jednotlivé MoAb se značně liší, což opět ukazuje, že nejlepší konjugační postup je pro každý konjugát calicheamicinu a nosiče jiný, ale že varianty obecných postupů podle vynálezu vykazují ve všech testovaných případech podstatná zlepšení oproti výsledkům dosaženým za použití DMF jako jediného ko-rozpouštědla.

Výše popsané konjugační postupy využívající kombinaci PG/CA poskytly produkty s následujícími obsahy účinné látky:

<u>MoAb</u>	<u>Obsah účinné látky (M/M)</u>
Anti-Tac	0,7
M5/114	1,2
Campath II	1,4
MN-1	1,2
LC-1	1,0
LK-26	1,2
TH-69	1,0
A33	1,1

Při koncentraci 20 až 40 % se získaly pouze nízké proteinové výtěžky. Pokud se mA33 konjugovalo za použití 8 M/M účinné látky, potom konečný obsah v monomeru činil pouze 1,1 až 1,3 M/M. Konjugát protilátky Anti-Tac s obsahem 0,7 M/M se rekonjugoval v přítomnosti 20 % t-BuOH, protože toto aditivum bylo nejlepším aditivem, pokud jde o zlepšení zabudování účinné látky do konjugátu. Tato rekonjugace zvýšila obsah účinné látky na 2,0 M/M, ale ve výtěžku pouhých 23 %.

Konjugace za použití PG + t-BuOH

Ačkoliv PG/CA systém poskytoval pouze mírné zlepšení v kombinaci s výše zmíněnými MoAbs, použití t-BuOH/(t-Bu/PG)

PG se zdálo býti slibné. Následující studie popisují konjugace, ve kterých se použily PG a t-BuOH v kombinaci. To vedlo k závěru, že PG/t-BuOH systém je více vhodný pro zmíněné myší MoAbs, zatímco systém PG/CA je lepší pro humanizované MoAbs, které byly analyzovány.

Konjugace se prováděly s různými variantami koncentrací t-BuOH a PG. Zjistilo se, že PG je v přítomnosti AcBut calicheamicinu a t-BuOH použitelný, pro rozpouštění konjugačních roztoků, pro celou řadu myších MoAbs. Pokud se Anti-Tac konjuguje ve 20 % t-BuOH, 10 % PG a 6 M/M účinné látky, potom se získá 40 % monomeru s obsahem účinné látky 1,3 M/M. Pokud se konjugace provede v 15 % t-BuOH, 15 % PG a 6,7 M/M účinné látky, potom se získá 50 % produktu s obsahem účinné látky 1,4 M/M, což je mírné zlepšení oproti předcházejícímu pokusu, ale podstatně lepší výsledek v porovnání s přibližně 20 % výtěžkem produktu s obsahem účinné látky 0,7 M/M, který se získal v PG/CA. Pokud se použily stejné podmínky, ale koncentrace proteinu

se zvýšila na 2,8 mg/ml (u přibližně 2 mg/ml), potom se konečný obsah účinné látky zvýšil na 2,2 M/M.

V případě mA33, proteinu, o kterém se ví, že práce s ním je často problematická, nebyly nalezeny podmínky, které by mohly přinést podstatně vyšší obsah účinné látky než 1,0 M/M, ale výše popsaná kombinace t-BuOH a PG (s 8 M/M účinné látky) poskytla konjugát v 60 % výtěžku a to dokonce i v průmyslovém měřítku. Tři IgG₁ myší MoAbs (u kterých se předpokládá, že budou podobně chemicky reagovat) MOPC, M44 a M67, pokud konjugovaly za v podstatě identických podmínek (15 % t-BuOH, 10 až 20 % PG, 6,7 M/M účinné látky) produkovaly monomer s obsahem účinné látky přibližně 1,0, ale ve výtěžku pohybujícím se od 14 do 45 %. V případě MOPC zvýšení proteinové koncentrace na 2,8 mg/ml (jako v případě Anti-Tac) a za použití 8 M/M účinné látky v 15 % t-BuOH, 20 % PG pufrovém systému zvýšilo obsah účinné látky na 1,7 M/M při přibližně 50 % výtěžku.

Konečný postup pro myší protilátky

Na základě této řady konjugací se určil doporučený postup pro konjugaci těchto myších MoAbs, který se podstatně lišil od postupu, navrženého pro testované humanizované protilátky. Kromě toho se získané optimální proteinové výtěžky a obsahy účinné látky v případě jednotlivých testovaných myších MoAbs značně lišily, což naznačuje, že určitá optimalizace podmínek může být pro nalezení nejlepších podmínek pro libovolný proteinový nosič žádoucí.

Jako pufr se použil PBS při pH 7,4, ale MoAb zásobní roztok obsahoval 4 až 5,5 mg/ml. Jako další ko-rozpouštědlo se použil t-BuOH, ale nikoliv CA. Zásobní roztok účinné

látky (8 až 10 mg/ml) se připravil v DMSO nebo DMF. Konečné reakční podmínky představovaly 15 % t-BuOH, přibližně 20 % propylenglykolu (nebo více, pokud je to nezbytné pro vyčištění roztoku), 2 až 4 % DMSO (ze zásobního roztoku účinné látky) a 6 až 8 molů účinné látky na mol proteinu. Konjugaci předcházela inkubace při 25°C za stálého míchání, která trvala 3 až 20 hodin. Čištění se provádělo stejným způsobem jako v případě výše popsanych humanizovaných konjugátů. Konečné proteinové výtěžky se pohybovaly v rozmezí od 25 % do 60 % a obsahy účinné látky se pohybovaly od 1 do 2,2 molů účinné látky na mol MoAb, v závislosti na jednotlivých MoAb.

Příklad 14

Vliv t-BuOH na sacharidové konjugáty

MOPC-21 se oxidoval v pH 5,5 acetátovém pufru pomocí 15 mM NaJO₄ 45 minut při pokojové teplotě. Pufrovaný MOPC-21 se posléze přemístil do čerstvého acetátového pufru, čímž se měla odstranit vyčerpaná oxidační činidla. Část této zoxidované protilátky se ošetřila disulfidem, který vznikl jako výsledný produkt uvedení N-acetyl gama-calicheamicinu do reakce s hydrazidem kyseliny 3-merkapt-3-methylbutanové (GAD), v přítomnosti 15 % DMF. Druhá část se ošetřila stejnou koncentrací GAD v přítomnosti 5 % DMF a 15 % t-BuOH. Obě reakce se nechaly probíhat 17 hodin při pokojové teplotě. V obou případech došlo k výměně pufru, jehož cílem bylo dosažení pH 7,4 PBS. Množství agregátu v případě konjugační reakce s t-BuOH bylo nižší, než v případě reakce s pouhým DMF (4,1 % vs. 7,3 %). Po vyčištění pomocí gelové vylučovací chromatografie obsahoval konjugát,

který byl připravený reakcí používající pouze DMF, 3,2 M/M účinné látky a 3 % zbytkového agregátu, zatímco konjugát, který se připravil v přítomnosti t-BuOH obsahoval 5,1 M/M účinné látky a zbytkový agregát byl nezjistitelný.

Příklad 15

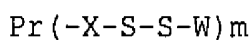
Vliv PG/CA na vznik nehydrolyzovatelného konjugátu

h-CT-M-01 se ošetřil OSu esterem disulfidu, získaného jako produkt uvedení N-acetyl gama-calicheamicinu do reakce s kyselinou 4-merkapt-4-methylpentanovou, v přítomnosti 15 % DMF v Hepesově pufru. Druhá konjugace se provedla za použití 30 % PG a 80 mM CA namísto DMF. Obě reakce se nechaly probíhat 2 hodiny při pokojové teplotě. V obou případech došlo k výměně pufru, jehož cílem bylo dosažení pH 7,4 PBS. Ačkoliv množství agregátu (přibližně 2 %) a obsah účinné látky (3,95 M/M s DMF vs. 4,12 M/M s PG + CA) bylo v případě obou reakcí srovnatelné, v případě reakce používající PG + CA se dosáhlo vyššího výtěžku (60 % vs. 50 %).

V závěru je třeba uvést, že výše uvedená příkladná provedení mají pouze ilustrativní charakter a nikterak neomezuji rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen přiloženými patentovými nároky.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy monomerních konjugátů calicheamicinového derivátu a nosiče s vysokým obsahem účinné látky, vysokým výtěžkem a sníženou aglomerací, které mají obecný vzorec



ve kterém

Pr znamená proteinový nosič,

X znamená spojku, která představuje produkt libovolné reakční skupiny, která může reagovat s proteinovým nosičem,

W znamená calicheamicinový radikál, vytvořený odstraněním přirozeně se vyskytující methyltri-sulfidové skupiny; a

m znamená číslo od 0,5 do 15,

v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(1) inkubaci calicheamicinového derivátu a proteinového nosiče v nenukleofilním, s proteiny slučitelném, pufovaném roztoku, který má vhodné pH, pohybující se od 4,0 do 8,5, přičemž tento roztok dále obsahuje (a) ko-rozpouštědlo zvolené ze skupiny zahrnující propylenglykol, ethanol, DMSO a jejich kombinace a (b) přísadu, obsahující alespoň jednu karboxylovou kyselinu s 6 až 18 atomy uhlíku, přičemž inkubace se provádí při teplotě

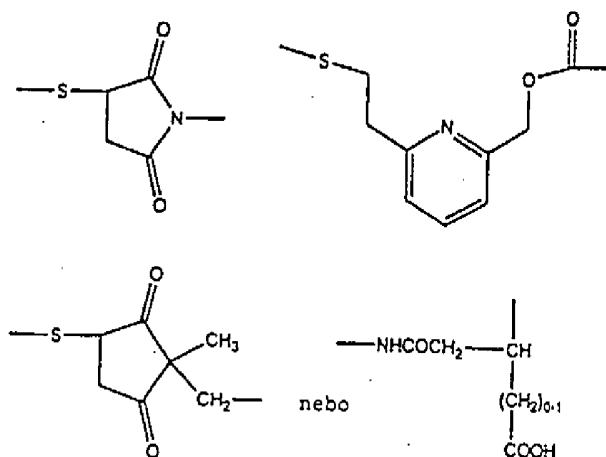
pohybující se přibližně v teplotním rozmezí od 25°C do 37°C a přibližně 15 minut až 24 hodin; a

(2) čištění konjugátu připraveného v kroku (1) za vzniku monomerních konjugátů.

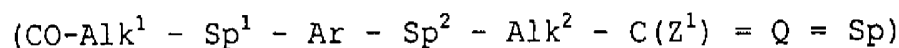
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m , že X má obecný vzorec Z-Sp, ve kterém

Sp znamená divalentní nebo trivalentní radikál s přímým nebo větveným řetězcem a s 1 až 18 atomy uhlíku, cykloalkylový nebo heterocykloalkylový radikál, divalentní nebo ~~trivalentní~~ ~~cykloalkylalkylový~~ nebo ~~heterocyklo-~~ ~~alkylalkylový~~ radikál s 1 až 18 atomy uhlíku nebo divalentní nebo trivalentní nenasycený alkylový radikál se 2 až 18 atomy uhlíku, ve kterých je heteroatomem výhodně furyl, thienyl, N-methylpyrrolyl, pyridinyl, N-methylimidazolyl, pyrimidinyl, chinolyl, isochinolyl, N-methylkarbazoyl, aminokourmarinyl nebo fenazinyl a pokud Sp znamená trivalentní radikál, potom může být dále substituován dialkylaminoskupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, nižší alkoxy skupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, hydroxyskupinou nebo nižšími alkylthioskupinami s 1 až 5 atomy uhlíku; a

Z	znamená	-NHC(=O)-,	-CH=NNHC(=O)-,
-CH ₂ NHNHC(=O)-,		-CH=NNHC(=O)NH-,	-CH ₂ NHNHC(=O)NH-,
-CH=NNHC(=S)NH-,		-CH ₂ NHNHC(=S)NH-,	-CH=N-,
-OC(=O)-,		-SS-,	



3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m ,
že X má obecný vzorec



ve kterém

Alk^1 a Alk^2 znamenají nezávisle vazbu nebo větvený
nebo nevětvený alkylenový řetězec s 1 až 10 atomy uhlíku;

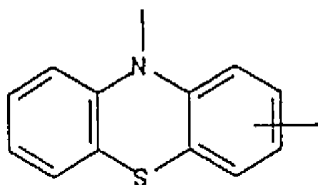
Sp^1 znamená vazbu, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, -NR'-, -N(CH₂CH₂)₂N- nebo -X-Ar'-Y-(CH₂)_n-Z, ve kterých X, Y a Z znamenají nezávisle vazbu, -NR'-, -S- nebo -O- pod podmínkou, že pokud n znamená 0, potom alespoň jedno Y a Z musí znamenat vazbu a Ar' znamená 1,2-, 1,3- nebo 1,4-fenylen případně substituovaný jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR' nebo -S(CH₂)_nCONHR' pod podmínkou, že pokud Alk^1 znamená vazbu, potom Sp^1 znamená vazbu;

n znamená celé číslo od 0 do 5;

R' znamená větvený nebo nevětvený řetězec s 1 až 5 atomy uhlíku případně substituovaný jednou nebo dvěma skupinami -OH, alkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku,

thioalkoxyskupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitroskupinami, dialkylaminoskupinami s 1 až 3 atomy uhlíku, nebo trialkylammonium- A^- s 1 až 3 atomy uhlíku v alkylovém zbytku, ve kterém A^- znamená farmaceuticky přijatelný aniont doplňující sůl;

Ar znamená 1,2-, 1,3- nebo 1,4-fenýlen případně substituovaný jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku alkokyskupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxyskupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitroskupinami, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, $-S(CH_2)_nCONHR'$, ve kterých n a R' mají výše definovaný význam nebo 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6- nebo 2,7-naftyliden nebo



příčemž každý naftyliden nebo fenothiazin je případně substituován jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku, alkokyskupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxyskupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitroskupinami, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, nebo $S(CH_2)_nCONHR'$, ve kterých mají n a R' výše definovaný význam pod podmínkou, že pokud Ar znamená fenothiazin, Sp^1 znamená vazbu navázanou pouze na dusík;

Sp^2 znamená vazbu, $-S-$ nebo $-O-$, pod podmínkou, že pokud Alk^2 znamená vazbu, potom Sp^2 znamená rovněž vazbu;

Z^1 znamená atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo fenylovou skupinu případně substituovanou jednou, dvěmi nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku alkoxykupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxykupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitroskupinami, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, nebo $S(CH_2)_nCONHR'$, ve kterých mají n a R' výše definovaný význam;

Sp znamená divalentní nebo trivalentní radikál s přímým nebo větveným řetězcem a s 1 až 18 atomy uhlíku, cykloalkylový nebo heterocykloalkylový radikál, divalentní nebo trivalentní cykloalkylalkylový nebo heterocykloalkylalkylový radikál s 1 až 18 atomy uhlíku nebo divalentní nebo trivalentní nenasycený alkylový radikál se 2 až 18 atomy uhlíku, ve kterých je heteroatomem výhodně furyl, thienyl, N-methylpyrrolyl, pyridinyl, N-methylimidazolyl, pyrimidinyl, chinolyl, isochinolyl, N-methylkarbazoyl, aminokourmarinyl nebo fenazinyl a pokud Sp znamená trivalentní radikál, potom může být dále substituován dialkylaminoskupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, nižší alkoxykupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, hydroxykupinou nebo nižšími alkylthioskupinami s 1 až 5 atomy uhlíku; a

Q znamená $=NHNCO-$, $=NHNCS-$, $=NHNCONH-$, $=NHNCSNH-$ nebo $=NHO-$.

4. Způsob podle nároku 3, v y z n a č e n ý t í m, že Sp' znamená vazbu, $-S-$, $-O-$, $-CONH-$, $-NHCO-$ nebo $-NR'$, ve kterém má R' již definovaný význam pod podmínkou, že pokud Alk^1 znamená vazbu, potom Sp^1 znamená rovněž vazbu;

Ar znamená 1,2-, 1,3- nebo 1,4-fenylen případně substituovaný jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$, ve kterých n a R' mají výše definovaný význam nebo 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6- nebo 2,7-naftyliden, přičemž každý z těchto naftilidenů může být případně substituován jednou, dvěma nebo třemi skupinami alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$ nebo $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$;

Z^1 znamená alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku nebo fenyl případně substituovaný jednou, dvěma, třemi nebo čtyřmi alkylovými skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, nebo $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$; a

Alk^2 a Sp^2 znamenají společně vazbu.

5. Způsob podle nároku 4, v y z n a č e n ý t í m , že Sp^1 znamená $-\text{O}-$, Alk^1 znamená alkylen se 3 atomy uhlíku, Ar znamená 1,4-fenylen a Z^1 znamená alkyl s 1 atomem uhlíku.

6. Způsob podle nároku 3, v y z n a č e n ý t í m , že Q znamená $=\text{NHNCO}-$ a Sp znamená $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$.

7. Způsob podle nároku 2, v y z n a č e n ý t í m ,
že Z znamená -NHC(=O)- a Sp znamená $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{C(CH}_3)_2\text{-}$.

8. Způsob podle nároku 2, v y z n a č e n ý t í m ,
že Z znamená -CH=NNHC(=O)- a Sp znamená $\text{-CH}_2\text{C(CH}_3)_2\text{-}$.

9. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m ,
že calicheamicinový derivát obsahuje gama calicheamicin
nebo N-acetyl gama calicheamicinový derivát.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č e n ý t í m ,
že calicheamicinový derivát je přítomen v kroku (1) v
množství pohybujícím se přibližně od 0,025 mg/ml do
1,0 mg/ml.

11. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m ,
že proteinový nosič obsahuje humanizovanou monoklonální
protilátku.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č e n ý t í m ,
že humanizovaná monoklonální protilátka je přítomna v kroku
(1) v množství pohybujícím se přibližně v rozmezí od
1 mg/ml do 15 mg/ml.

13. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že přísada je v kroku (1) přítomna v množství pohybujícím se přibližně v rozmezí od 20 do 300 mM.

14. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že ko-rozpouštědlo obsahuje propylenglykol v množství pohybujícím se přibližně v rozmezí od 10 % do 60 %, vztaženo k celkovému objemu roztoku.

15. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že přísada v kroku (1) obsahuje kyselinu oktanovou v množství pohybujícím se přibližně v rozmezí od 20 mM do 100 mM.

16. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že ko-rozpouštědlem v kroku (1) je polypropylenglykol v množství tvořícím 30 % objemu roztoku a přísada v kroku (1) obsahuje kyselinu oktanovou v množství 60 mM.

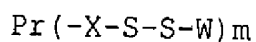
17. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že ko-rozpouštědlo je přítomno v kroku (1) v množství pohybujícím se přibližně v rozmezí od 1 % do 10 % objemu roztoku a přísada v kroku (1) obsahuje kyselinu oktanovou v množství pohybujícím se přibližně v rozmezí od 150 mM do 300 mM.

18. Způsob podle nároku 17, v y z n a č e n ý t í m, že zmíněným ko-rozpouštědlem je ethanol.

19. Způsob podle nároku 18, v y z n a č e n ý t í m, že ethanol je přítomen v kroku (1) v množství představujícím 5 % objemu roztoku a kyselina oktanová je v kroku (1) přítomna v množství 200 mM.

20. Způsob podle nároku 17, v y z n a č e n ý t í m, že ko-rozpouštědlem v kroku (1) je propylenglykol, který je přítomen v množství představujícím 5% objemu roztoku a kyselina oktanová je v kroku (1) přítomna v množství 200 mM.

21. Způsob přípravy monomerních konjugátů calicheamicinového derivátu a nosiče s vyšší koncentrací účinné látky a výtěžkem a sníženou tendencí aglomerovat, které mají obecný vzorec



ve kterém

Pr znamená proteinový nosič,

X znamená spojku, která představuje produkt libovolné reakční skupiny, která může reagovat s proteinovým nosičem,

W znamená calicheamicinový radikál, vytvořený odstraněním přirozeně se vyskytující methyltri-sulfidové skupiny; a

m znamená číslo od 0,5 do 15,

v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

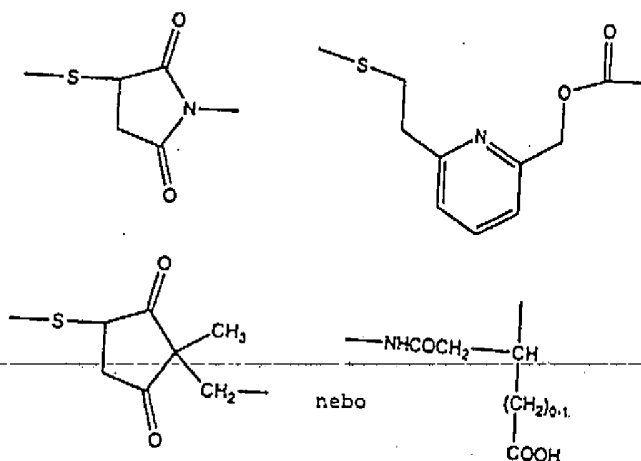
(1) inkubaci calicheamicinového derivátu a proteinového nosiče v nenukleofilním, s proteiny slučitelném, pufovaném roztoku, který má vhodné pH pohybující se od 4,0 do 8,5, přičemž tento roztok dále obsahuje jako ko-rozpouštědlo t-butanol, přičemž inkubace se provádí při teplotě pohybující se přibližně v teplotním rozmezí od 25°C do 37°C a přibližně 15 minut až 24 hodin; a

(2) čištění konjugátu připraveného v kroku (1) za vzniku monomerních konjugátů.

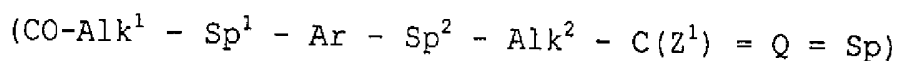
22. Způsob podle nároku 21, v y z n a č e n ý t í m , že X má obecný vzorec Z-Sp, ve kterém

Sp znamená divalentní nebo trivalentní radikál s přímým nebo větveným řetězcem a s 1 až 18 atomy uhlíku, cykloalkylový nebo heterocykloalkylový radikál, divalentní nebo trivalentní cykloalkylalkylový nebo heterocykloalkylalkylový radikál s 1 až 18 atomy uhlíku nebo divalentní nebo trivalentní nenasycený alkylový radikál se 2 až 18 atomy uhlíku, ve kterých je heteroatomem výhodně furyl, thienyl, N-methylpyrrolyl, pyridinyl, N-methylimidazolyl, pyrimidinyl, chinolyl, isochinolyl, N-methylkarbazoyl, aminokourmarinyl nebo fenazinyl a pokud Sp znamená trivalentní radikál, potom může být dále substituován dialkylaminoskupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, nižší alkoxy skupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, hydroxyskupinou nebo nižšími alkylthioskupinami s 1 až 5 atomy uhlíku; a

Z znamená $-\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{CH}=\text{NNHC}(=\text{O})-$,
 $-\text{CH}_2\text{NHNHC}(=\text{O})-$, $-\text{CH}=\text{NNHC}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NHNHC}(=\text{O})\text{NH}-$,
 $-\text{CH}=\text{NNHC}(=\text{S})\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NHNHC}(=\text{S})\text{NH}-$, $-\text{CH}=\text{N}-$, $-\text{CH}_2\text{NH}-$,
 $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{SS}-$,



23. Způsob podle nároku 21, v y z n a č e n ý t í m,
 že X má obecný vzorec



ve kterém

Alk^1 a Alk^2 znamenají nezávisle vazbu nebo větvený
 nebo nevětvený alkylenový řetězec s 1 až 10 atomy uhlíku;

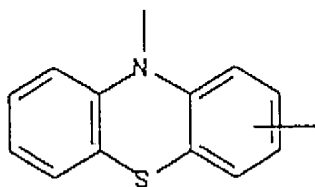
Sp^1 znamená vazbu, $-\text{S}-$, $-\text{O}-$, $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{NR}'-$,
 $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}-$ nebo $-\text{X-Ar}'-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{Z}$, ve kterých X, Y a Z
 znamenají nezávisle vazbu, $-\text{NR}'-$, $-\text{S}-$ nebo $-\text{O}-$ pod
 podmínkou, že pokud n znamená 0, potom alespoň jedno Y a Z
 musí znamenat vazbu a Ar' znamená 1,2-, 1,3- nebo
 1,4-fenylen případně substituovaný jednou, dvěma nebo třemi
 alkylovými skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, alkoxy skupinami

s 1 až 4 atomy uhlíku, thioalkoxyskupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$ nebo $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$ pod podmínkou, že pokud Alk^1 znamená vazbu, potom Sp^1 znamená vazbu;

n znamená celé číslo od 0 do 5;

R' znamená větvený nebo nevětvený řetězec s 1 až 5 atomy uhlíku případně substituovaný jednou nebo dvěma skupinami $-\text{OH}$, alkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, dialkylaminoskupinami s 1 až 3 atomy uhlíku, nebo trialkylammonium- A^- s 1 až 3 atomy uhlíku v alkylovém zbytku, ve kterém A^- znamená farmaceuticky přijatelný aniont doplňující sůl;

Ar znamená 1,2-, 1,3- nebo 1,4-fenylen případně substituovaný jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku alkoxy skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$, ve kterých n a R' mají výše definovaný význam nebo 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6- nebo 2,7-naftyliden nebo



příčemž každý naftyliden nebo fenothiazin je případně substituován jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 5 atomy

uhlíku, thioalkoxyskupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitroskupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, nebo $\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$, ve kterých mají n a R' výše definovaný význam pod podmínkou, že pokud Ar znamená fenothiazin, Sp^1 znamená vazbu navázanou pouze na dusík;

Sp^2 znamená vazbu, $-\text{S}-$ nebo $-\text{O}-$, pod podmínkou, že pokud Alk^2 znamená vazbu, potom Sp^2 znamená rovněž vazbu;

Z^1 znamená atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku nebo fenylovou skupinu případně substituovanou jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku alkoxykupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxyskupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitroskupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, nebo $\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$, ve kterých mají n a R' výše definovaný význam;

Sp znamená divalentní nebo trivalentní radikál s přímým nebo větveným řetězcem a s 1 až 18 atomy uhlíku, cykloalkylový nebo heterocykloalkylový radikál, divalentní nebo trivalentní cykloalkylalkylový nebo heterocykloalkylalkylový radikál s 1 až 18 atomy uhlíku nebo divalentní nebo trivalentní nenasycený alkylový radikál se 2 až 18 atomy uhlíku, ve kterých je heteroatomem výhodně furyl, thienyl, N-methylpyrrolyl, pyridinyl, N-methylimidazolyl, pyrimidinyl, chinolyl, isochinolyl, N-methylkarbazoyl, aminokourmarinyl nebo fenazinyl a pokud Sp znamená trivalentní radikál, potom může být dále substituován dialkylaminoskupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, nižší alkoxykupinou s 1 až 5 atomy uhlíku, hydroxyskupinou nebo nižšími alkylthioskupinami s 1 až 5 atomy uhlíku; a

Q znamená =NHNCO-, =NHNCS-, =NHNCONH-, =NHNCSNH- nebo =NHO-.

24. Způsob podle nároku 23, v y z n a č e n ý t í m, že Sp' znamená vazbu, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO- nebo -NR', ve kterém má R' význam definovaný v nároku 23 pod podmínkou, že pokud Alk¹ znamená vazbu, potom Sp¹ znamená rovněž vazbu;

Ar znamená 1,2-, 1,3- nebo 1,4-fenylen případně substituovaný jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR', -S(CH₂)_nCONHR', ve kterých n a R' význam definovaný v nároku 23 nebo Ar znamená 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6- nebo 2,7-naftyliden, přičemž každý z těchto naftilidenů může být případně substituován jednou, dvěma, třemi nebo čtyřmi skupinami alkylovými skupinami s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, atomy halogenu, nitro skupinami, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' nebo -S(CH₂)_nCONHR';

Alk² znamená větvený nebo nevětvený alkylenový řetězec s 1 až 10 atomy uhlíku;

Z¹ znamená alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku nebo fenyl případně substituovaný jednou, dvěma nebo třemi alkylovými skupinami s 1 až 5 atomy uhlíku, alkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku, thioalkoxy skupinami s 1 až 4 atomy uhlíku,

atomy halogenu, nitroskupinami, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$,
 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$, nebo $\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$;

Alk^2 a Sp^2 znamenají společně vazbu.

25. Způsob podle nároku 24, v y z n a č e n ý t í m,
 že Sp^1 znamená $-\text{O}-$, Alk^1 znamená alkylen se 3 atomy uhlíku,
 Ar znamená 1,4-fenylen a Z^1 znamená alkyl s 1 atomem
 uhlíku.

26. Způsob podle nároku 23, v y z n a č e n ý t í m,
 že Q znamená $=\text{NHNCO}-$ a Sp znamená $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$.

27. Způsob podle nároku 22, v y z n a č e n ý t í m,
 že Z znamená $-\text{NHC}(=\text{O})-$ a Sp znamená $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$.

28. Způsob podle nároku 22, v y z n a č e n ý t í m,
 že Z znamená $-\text{CH}=\text{NNHC}(=\text{O})-$ a Sp znamená $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$.

29. Způsob podle nároku 21, v y z n a č e n ý t í m,
 že calicheamicinový derivát obsahuje gama calicheamicin
 nebo N-acetyl gama calicheamicinový derivát.

30. Způsob podle nároku 29, v y z n a č e n ý t í m,
 že calicheamicinový derivát je přítomen v kroku (1) v

množství pohybujícím se přibližně od 0,025 mg/ml do 1,0 mg/ml.

31. Způsob podle nároku 21, v y z n a č e n ý t í m, že proteinový nosič obsahuje humanizovanou monoklonální protilátku.

32. Způsob podle nároku 31, v y z n a č e n ý t í m, že humanizovaná monoklonální protilátka je přítomna v kroku (1) v množství pohybujícím se přibližně v rozmezí od 1 mg/ml do 15 mg/ml.

33. Způsob podle nároku 21, v y z n a č e n ý t í m, že t-butanol je přítomen v kroku (1) v množství pohybujícím se přibližně v rozmezí od 10 % do 25 %, vztaženo k celkovému objemu roztoku.

34. Způsob podle nároku 21, v y z n a č e n ý t í m, že t-butanol je přítomen v kroku (1) v množství představujícím 15 % objemu roztoku.

~~Zastupuje:~~