



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2015116882, 04.10.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
04.10.2012 US 61/709,891

(43) Дата публикации заявки: 27.11.2016 Бюл. № 33

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 05.05.2015(86) Заявка РСТ:
US 2013/063480 (04.10.2013)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/055877 (10.04.2014)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городиский и Партнеры"

(71) Заявитель(и):

ИММУНОДЖЕН, ИНК. (US)

(72) Автор(ы):

**ЧЭНЬ Сяоси Кевин (US),
ЛИ Синьфан (US)**(54) **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПВДФ-МЕМБРАНЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ КОНЬЮГАТОВ КЛЕТОЧНО-СВЯЗЫВАЮЩИЙ АГЕНТ - ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ АГЕНТ**

(57) Формула изобретения

1. Способ получения очищенного конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент, включающий приведения в контакт смеси, содержащей конъюгат клеточно-связующий агент - цитотоксический агент и одной или несколько примесей с поливинилдифторидной (ПВДФ) мембраной для удаления по меньшей мере части примесей из смеси, тем самым обеспечивая получение очищенного конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что способ последовательно повторяют два, три или четыре раза.

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что способ дополнительно включает приведение в контакт смеси с ионообменной хроматографической мембраной для удаления по меньшей мере части примесей из смеси.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что смесь приводят в контакт с ПВДФ-мембраной перед приведением в контакт смеси с ионообменной хроматографической мембраной.

5. Способ по п. 3, отличающийся тем, что смесь приводят в контакт с ионообменной хроматографической мембраной перед приведением в контакт смеси с ПВДФ-мембраной.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что способ включает:

(а) приведение в контакт клеточно-связующего агента с цитотоксическим агентом

с образованием первой смеси, содержащей клеточно-связующий агент и цитотоксический агент, затем приведение в контакт первой смеси с бифункциональным сшивающим реагентом, содержащим линкер, в растворе, имеющем рН от примерно 4 до примерно 9, для получения второй смеси, содержащей конъюгат клеточно-связующий агент - цитотоксический агент, содержащий клеточно-связующий агент, химически связанный посредством линкера с цитотоксическим агентом, и одну или несколько примесей;

(b) приведение в контакт второй смеси с поливинилдифторидной (ПВДФ) мембраной для удаления по меньшей мере части примесей, тем самым обеспечивая получение очищенной второй смеси конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент; и

(c) обработку второй смеси после стадии (b) путем тангенциальной поточной фильтрации, селективного осаждения, неадсорбционной хроматографии, адсорбционной фильтрации, адсорбционной хроматографии или их комбинации, для дополнительной очистки конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент от примесей и, тем самым, получения очищенной третьей смеси конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент, где очищенная третья смесь содержит пониженное количество примесей по сравнению с очищенной второй смесью.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что стадию (b) последовательно повторяют два, три или четыре раза до стадии (c).

8. Способ по п. 6 или 7, отличающийся тем, что на стадии (c) используют адсорбционную хроматографию.

9. Способ по п. 6 или 7, отличающийся тем, что адсорбционную хроматографию выбирают из группы, состоящей из гидроксиапатитной хроматографии, гидрофобной хроматографии с индуцированием заряда (НСИС), хроматографии гидрофобных взаимодействий (НС), ионообменной хроматографии, ионообменной хроматографии в смешанном режиме, металл-аффинной хроматографии (ИМАС), хроматографии на сорбентах, содержащих биоспецифические красители, аффинной хроматографии, обращенно-фазовой хроматографии и их комбинаций.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что адсорбционная хроматография представляет собой ионообменную хроматографию.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что ионообменная хроматография представляет собой хроматографию на керамическом гидроксиапатите (СНТ).

12. Способ по п. 6 или 7, отличающийся тем, что на стадии (c) используют тангенциальную поточную фильтрацию.

13. Способ по п. 6 или 7, отличающийся тем, что приведение в контакт на стадии (a) осуществляют путем обеспечения клеточно-связующего агента в реакционном сосуде, прибавления цитотоксического агента в реакционный сосуд с образованием первой смеси, содержащей клеточно-связующий агент и цитотоксический агент, и затем прибавления бифункционального сшивающего реагента к первой смеси.

14. Способ по п. 6 или 7, дополнительно включающий выдерживание смеси между стадиями a-b или стадиями b-c для высвобождения нестабильно связанных линкеров из клеточно-связующего агента.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что смесь выдерживают в течение примерно 20 ч при температуре от примерно 2 до примерно 8°C.

16. Способ по п. 6 или 7, дополнительно включающий гашение второй смеси между стадиями (a)-(b) для гашения какого-либо непрореагировавшего цитотоксического агента и/или непрореагировавшего бифункционального сшивающего реагента.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что смесь гасят путем приведения в контакт второй смеси с реагентом-гасителем, который вступает в реакцию с свободным цитотоксическим агентом.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что реагент-гаситель выбирают из группы, состоящей из 4-малеимидомаляной кислоты, 3-малеимидопропионової кислоты, N-этилмалеимида, йодацетамида и йодацетамидопропионової кислоты.
19. Способ по п. 6 или 7, отличающийся тем, что способ дополнительно включает приведение в контакт смеси с ионообменной хроматографической мембраной между стадиями (а) и (b).
20. Способ по п. 6 или 7, отличающийся тем, что способ дополнительно включает приведение в контакт смеси с ионообменной хроматографической мембраной между стадиями (b) и (с).
21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что способ дополнительно включает:
- (а) приведение в контакт клеточно-связующего агента с бифункциональным сшивающим реагентом для ковалентного присоединения линкера к клеточно-связующему агенту и, тем самым, получения первой смеси, содержащей клеточно-связующие агенты, имеющие связанные с ними линкеры,
 - (b) обработку первой смеси методом тангенциальной поточной фильтрации, селективного осаждения, неадсорбционной хроматографии, адсорбционной фильтрации, адсорбционной хроматографии или их комбинации и, тем самым, получения очищенной первой смеси клеточно-связующих агентов, имеющих связанные с ними линкеры,
 - (с) конъюгации цитотоксического агента с клеточно-связующими агентами, имеющими связанные с ними линкеры, в очищенной первой смеси путем проведения реакции клеточно-связующих агентов, имеющих связанные с ними линкеры, с цитотоксическим агентом в растворе, имеющем рН от примерно 4 до примерно 9, для получения второй смеси, содержащей конъюгат клеточно-связующий агент - цитотоксический агент, которая содержит клеточно-связующий агент, химически связанный с цитотоксическим агентом посредством линкера, и одну или несколько примесей,
 - (d) приведение в контакт второй смеси с поливинилдифторидной (ПВДФ) мембраной для удаления по меньшей мере части примесей, тем самым обеспечивая получение очищенной второй смеси конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент; и
 - (е) обработку второй смеси после стадии (d) методом тангенциальной поточной фильтрации, селективного осаждения, неадсорбционной хроматографии, адсорбционной фильтрации, адсорбционной хроматографии или их комбинации, для дополнительной очистки конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент от примесей и, тем самым, получения очищенной третьей смеси конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент, где очищенная третья смесь содержит пониженное количество примесей по сравнению с очищенной второй смесью.
22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что стадию (d) последовательно повторяют два, три или четыре раза до стадии (е).
23. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что способ дополнительно включает приведение в контакт смеси с ионообменной хроматографической мембраной между стадиями (с) и (d).
24. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что способ дополнительно включает приведение в контакт смеси с ионообменной хроматографической мембраной между стадиями (d) и (е).
25. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что на стадиях (b) и (d) используют адсорбционную хроматографию.
26. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что на стадии (b) используют тангенциальную поточную фильтрацию и на стадии (d) используют адсорбционную хроматографию.

27. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что на стадии (b) используют адсорбционную хроматографию и на стадии (d) используют тангенциальную поточную фильтрацию.
28. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что адсорбционную хроматографию выбирают из группы, состоящей из гидроксипатитной хроматографии, гидрофобной хроматографии с индуцированием заряда (НСИС), хроматографии гидрофобных взаимодействий (НС), ионообменной хроматографии, ионообменной хроматографии в смешанном режиме, металл-аффинной хроматографии (ИМАС), хроматографии на сорбентах, содержащих биоспецифические красители, аффинной хроматографии, обращенно-фазовой хроматографии и их комбинаций.
29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что адсорбционная хроматография представляет собой ионообменную хроматографию.
30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что ионообменная хроматография представляет собой хроматографию на керамическом гидроксипатите (СНТ).
31. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что на стадиях (b) и (d) используют тангенциальную поточную фильтрацию.
32. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что на стадиях (b) и (d) используют неадсорбционную хроматографию.
33. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что раствор на стадии (c) содержит сахарозу.
34. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что раствор на стадии (c) содержит буферный агент, выбранный из группы, состоящей из цитратного буфера, ацетатного буфера, сукцинатного буфера и фосфатного буфера.
35. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что раствор на стадии (c) содержит буферный агент, выбранный из группы, состоящей из HEPPSO (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-гидроксипропансульфоновая кислота)), POPSO (пиперазин-1,4-бис-(2-гидроксипропансульфоновой кислоты) дегидрат), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота), HEPPS (EPPS) (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновая кислота), TES (N-[трис(гидроксиметил)метил]-2-аминоэтансульфоновая кислота) и их комбинаций.
36. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что способ дополнительно включает:
(f) выдерживание смеси между по меньшей мере одной из стадий a-b, стадий b-c, стадий c-d и стадий d-e для высвобождения нестабильно связанных линкеров из клеточно-связывающего агента.
37. Способ по п. 1, отличающийся тем, что способ включает:
(a) приведение в контакт клеточно-связывающего агента с бифункциональным сшивающим реагентом для ковалентного присоединения линкера к клеточно-связывающему агенту и, тем самым, получения первой смеси, содержащей клеточно-связывающие агенты, имеющие связанные с ними линкеры,
(b) конъюгации цитотоксического агента с клеточно-связывающими агентами, имеющими связанные с ними линкеры, в первой смеси путем проведения реакции клеточно-связывающих агентов, имеющих связанные с ними линкеры, с цитотоксическим агентом для получения второй смеси, содержащей конъюгат клеточно-связывающий агент - цитотоксический агент, содержащей клеточно-связывающий агент, химически связанный посредством линкера с цитотоксическим агентом, и одну или несколько примесей,
(c) проведение воздействия на вторую смесь с помощью поливинилдифторидной (ПВДФ) мембраны для удаления по меньшей мере части примесей, тем самым обеспечивая получение очищенной второй смеси конъюгата клеточно-связывающий агент - цитотоксический агент; и
(d) обработку очищенной второй смеси после стадии (c) методом тангенциальной

поточной фильтрации, селективного осаждения, неадсорбционной хроматографии, адсорбционной фильтрации, адсорбционной хроматографии или их комбинации для дополнительной очистки конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент от примесей и тем самым получения очищенной третьей смеси конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент, где очищенная третья смесь содержит пониженное количество примесей по сравнению с очищенной второй смесью.

38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что первую смесь не подвергают очистке между стадиями (a) и (b).

39. Способ по п. 37 или 38, отличающийся тем, что стадию (c) последовательно повторяют два, три или четыре раза до стадии (d).

40. Способ по п. 37 или 38, отличающийся тем, что способ дополнительно включает приведение в контакт с ионообменной хроматографической мембраной между стадиями (b) и (c).

41. Способ по п. 37 или 38, отличающийся тем, что способ дополнительно включает приведение в контакт смеси с ионообменной хроматографической мембраной между стадиями (c) и (d).

42. Способ по п. 37 или 38, отличающийся тем, что на стадии (d) используют адсорбционную хроматографию.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что адсорбционную хроматографию выбирают из группы, состоящей из гидроксипатитной хроматографии, гидрофобной хроматографии с индуцированием заряда (HCIC), хроматографии гидрофобных взаимодействий (HC), ионообменной хроматографии, ионообменной хроматографии в смешанном режиме, металл-аффинной хроматографии (IMAC), хроматографии на сорбентах, содержащих биоспецифические красители, аффинной хроматографии, обращенно-фазовой хроматографии и их комбинаций.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что адсорбционная хроматография представляет собой ионообменную хроматографию.

45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что ионообменная хроматография представляет собой хроматографию на керамическом гидроксипатите (СНТ).

46. Способ по п. 37 или 38, отличающийся тем, что на стадии (d) используют тангенциальную поточную фильтрацию.

47. Способ по п. 37 или 38, отличающийся тем, что на стадии (d) используют неадсорбционную хроматографию.

48. Способ по п. 37 или 38, отличающийся тем, что раствор на стадии (b) содержит сахарозу.

49. Способ по п. 37 или 38, отличающийся тем, что раствор на стадии (b) содержит буферный агент, выбранный из группы, состоящей из цитратного буфера, ацетатного буфера, сукцинатного буфера и фосфатного буфера.

50. Способ по п. 37 или 38, отличающийся тем, что раствор на стадии (b) содержит буферный агент, выбранный из группы, состоящей из HEPPSO (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-гидроксипропансульфоновая кислота)), POPSO (пиперазин-1,4-бис-(2-гидроксипропансульфоновой кислоты) дегидрат), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота), HEPPS (EPPS) (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновая кислота), TES (N-[трис(гидроксиметил)метил]-2-аминоэтансульфоновая кислота) и их комбинаций.

51. Способ по п. 37 или 38, отличающийся тем, что способ включает:

(e) выдерживание смеси между по меньшей мере одной из стадий a-b, стадий b-c и стадий c-d для высвобождения нестабильно связанных линкеров из клеточно-связующего агента.

52. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что одну или несколько примесей

выбирают из группы димеров цитотоксического агента, агрегатов конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент, свободного цитотоксического агента, неконъюгированного линкера и их смесей.

53. Способ по п. 51, отличающийся тем, что смесь содержит димеры цитотоксического агента в качестве примеси и некоторую часть димеров цитотоксического агента удаляют из смеси, обеспечивая получение очищенного конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что димер цитотоксического агента содержит DM1-DM1.

55. Способ по п. 53, отличающийся тем, что димер цитотоксического агента содержит DM1-MCC-DM1.

56. Способ по п. 53, отличающийся тем, что димер цитотоксического агента содержит DM1-DM1 и DM1-MCC-DM1.

57. Способ по п. 52, отличающийся тем, что смесь содержит агрегаты конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент в качестве примеси и некоторую часть агрегатов конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент удаляют из смеси, обеспечивая получение очищенного конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент.

58. Способ по п. 52, отличающийся тем, что смесь содержит свободный цитотоксический агент в качестве примеси и некоторую часть свободного цитотоксического агента удаляют из смеси, обеспечивая получение очищенного конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент.

59. Способ по п. 52, отличающийся тем, что смесь содержит неконъюгированный линкер в качестве примеси и некоторую часть неконъюгированного линкера удаляют из смеси, обеспечивая получение очищенного конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент.

60. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что рН смеси, которую подвергают воздействию с помощью ПВДФ-мембраны, имеет значение от примерно 4 до примерно 9.

61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что рН смеси имеет значение от примерно 7 до примерно 8.

62. Способ по п. 60, отличающийся тем, что рН смеси имеет значение от примерно 8 до примерно 9.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что рН смеси составляет примерно 8,5.

64. Способ по п. 60, отличающийся тем, что рН смеси имеет значение от примерно 4,5 до примерно 5,5.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что рН смеси составляет примерно 4,8.

66. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что по меньшей мере 50% одной или нескольких примесей удаляют из смеси.

67. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что по меньшей мере 75% одной или нескольких примесей удаляют из смеси.

68. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что по меньшей мере 90% одной или нескольких примесей удаляют из смеси.

69. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что ПВДФ-мембрану выбирают из группы, состоящей из мембраны с размером пор 0,22 мкм, мембраны с размером пор 0,45 мкм и двухслойной мембраны с размерами пор 0,45/0,22 мкм.

70. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что ПВДФ-мембрану подвергают гамма-облучению.

71. Способ по любому из пп. 6, 21 и 37, отличающийся тем, что приведение в контакт на стадии (а) происходит в растворе, имеющем рН от примерно 7 до примерно 9.

72. Способ по любому из пп. 6, 21 и 37, отличающийся тем, что раствор на стадии (а) содержит буферный агент, выбранный из группы, состоящей из цитратного буфера, ацетатного буфера, сукцинатного буфера и фосфатного буфера.

73. Способ по п. 71, отличающийся тем, что раствор на стадии (а) содержит буферный агент, выбранный из группы, состоящей из HEPPSO (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-гидроксипропансульфоновая кислота)), POPSO (пиперазин-1,4-бис-(2-гидроксипропансульфоновой кислоты) дегидрат), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота), HEPPS (EPPS) (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновая кислота), TES (N-[трис(гидроксиметил)метил]-2-аминоэтансульфоновая кислота) и их комбинаций.

74. Способ по любому из пп. 6, 21 и 37, отличающийся тем, что приведение в контакт на стадии (а) происходит при температуре от примерно 16 до примерно 24°C.

75. Способ по любому из пп. 6, 21 и 37, отличающийся тем, что приведение в контакт на стадии (а) происходит при температуре от примерно 0 до примерно 15°C.

76. Способ по любому из пп. 6, 21 и 37, отличающийся тем, что бифункциональный сшивающий реагент представляет собой кислотнo-лабильный линкер, дисульфидсодержащий линкер, фотолабильный линкер, пептидаза-лабильный линкер или эстераза-лабильный линкер.

77. Способ по любому из пп. 6, 21 и 37, отличающийся тем, что бифункциональный сшивающий реагент представляет собой дисульфидсодержащий расщепляемый линкер.

78. Способ по любому из пп. 6, 21 и 37, отличающийся тем, что бифункциональный сшивающий реагент представляет собой нерасщепляемый линкер.

79. Способ по любому из пп. 6, 21 и 37, отличающийся тем, что бифункциональный сшивающий реагент содержит фрагмент N-сукцинимидильного сложного эфира, фрагмент N-сульфосукцинимидильного сложного эфира, малеимидный фрагмент или галоацетильный фрагмент.

80. Способ по п. 77, отличающийся тем, что бифункциональный сшивающий реагент выбирают из группы, состоящей из N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноата (SPDB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноата (SPP) и N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)2-сульфобутаноата (сульфо-SPDB).

81. Способ по п. 78, отличающийся тем, что бифункциональный сшивающий реагент выбирают из группы, состоящей из N-сукцинимидил-4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилата (SMCC), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроата) (LC-SMCC), κ -малеимидоундекановой кислоты N-сукцинимидильного сложного эфира (KMUA), γ -малеимидомасляной кислоты N-сукцинимидильного сложного эфира (GMBS), β -малеимидопропилуксисукцинимидильного сложного эфира (BMPS), ϵ -малеимидокапроновой кислоты N-гидроксисукцинимидного сложного эфира (EMCS), м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидного сложного эфира (MBS), N-(α -малеимидоацетокси)сукцинимидного сложного эфира (AMAS), сукцинимидил-6-(β -малеимидопропионамидо)гексаноата (SMPH), N-сукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)бутирата (SMPB) и N-(п-малеимидофенил)-изоцианата (PMPI), сульфо-Mal, PEG₄-Mal и CX1-1.

82. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что клеточно-связующий агент выбирают из группы, состоящей из антител, интерферонов, интерлейкина 2 (IL-2), интерлейкина 3 (IL-3), интерлейкина 4 (IL-4), интерлейкина 6 (IL-6), инсулина, EGF, TGF- α , FGF, G-CSF, VEGF, MCSF, GM-CSF и трансферрина.

83. Способ по п. 82, отличающийся тем, что клеточно-связующий агент представляет собой антитело.

84. Способ по п. 83, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

85. Способ по п. 84, отличающийся тем, что антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело.

86. Способ по п. 82, отличающийся тем, что клеточно-связующий агент представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из huB4, huC242, трастузумаба, биватузумаба, сибротузумаба, huDS6, ритуксимаба, анти-CD33 антитела, анти-CD27L антитела, анти-Her2 антитела, анти-EGFR антитела, анти-EGFRvIII антитела, Кристо, анти-CD 138 антитела, анти-CD38 антитела, анти-EphA2 антитела, интегрин-нацеленного антитела, анти-CD37 антитела, антитела против фолатного рецептора, анти-Her3 антитела, антитела B-B4 и анти-IGFIR антитела.

87. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что цитотоксический агент выбирают из группы, состоящей из майтанзиноидов, таксанов и CC1065.

88. Способ по п. 87, отличающийся тем, что цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид.

89. Способ по п. 88, отличающийся тем, что майтанзиноид содержит тиольную группу.

90. Способ по п. 89, отличающийся тем, что майтанзиноид представляет собой N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанин (DM1) или N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтанин (DM4).

91. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что цитотоксический агент представляет собой DM1, бифункциональный сшивающий агент представляет собой SMCC и клеточно-связующий агент представляет собой антитело к huCD37-3.

92. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что цитотоксический агент представляет собой DM1, бифункциональный сшивающий агент представляет собой SMCC и клеточно-связующий агент представляет собой антитело к EGFR-7R.

93. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что цитотоксический агент представляет собой DM1, бифункциональный сшивающий агент представляет собой SMCC и клеточно-связующий агент представляет собой анти-EGFRvIII антитело.

94. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что цитотоксический агент представляет собой DM1, бифункциональный сшивающий агент представляет собой SMCC и клеточно-связующий агент представляет собой анти-CD27b антитело.

95. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что цитотоксический агент представляет собой DM1, бифункциональный сшивающий агент представляет собой SMCC и клеточно-связующий агент представляет собой трастузумаб.

96. Способ по п. 6 или 7, отличающийся тем, что способ дополнительно включает:

(а) приведение в контакт клеточно-связующего агента с цитотоксическим агентом с образованием первой смеси, содержащей клеточно-связующий агент и цитотоксический агент, затем приведение в контакт первой смеси с бифункциональным сшивающим реагентом, содержащим линкер, в растворе, имеющем pH от примерно 4 до примерно 9, для получения второй смеси, содержащей конъюгат клеточно-связующий агент - цитотоксический агент содержащей клеточно-связующий агент, химически связанный посредством линкера с цитотоксическим агентом, и одну или несколько примесей;

(b) приведение в контакт второй смеси с ПВДФ-мембраной для удаления по меньшей мере части примесей из смеси, тем самым обеспечивая получение очищенной второй смеси конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент;

(c) гашение очищенной второй смеси после стадии (b) для гашения какого-либо непрореагировавшего цитотоксического агента и/или непрореагировавшего бифункционального сшивающего реагента;

(d) приведение в контакт подвергнутой гашению смеси после стадии (c) с ПВДФ-

мембраной для удаления по меньшей мере части примесей из смеси, тем самым обеспечивая получение очищенной третьей смеси конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент;

(e) выдерживание очищенной третьей смеси для высвобождения нестабильно связанных линкеров из клеточно-связующего агента;

(f) необязательно, приведение в контакт очищенной третьей смеси после стадии (c) с ПВДФ-мембраной для удаления по меньшей мере части примесей из смеси, тем самым обеспечивая получение очищенной четвертой смеси конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент; и

(g) обработку очищенной четвертой смеси после стадии (f) путем тангенциальной поточной фильтрации, селективного осаждения, неадсорбционной хроматографии, адсорбционной фильтрации, адсорбционной хроматографии или их комбинации для дополнительной очистки конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент от примесей и тем самым получения очищенной третьей смеси конъюгата клеточно-связующий агент - цитотоксический агент, где очищенная третья смесь содержит пониженное количество примесей по сравнению с очищенной второй смесью.

97. Способ по п. 96, отличающийся тем, что вторая смесь со стадии (b) имеет рН примерно 8,5.

98. Способ по п. 97, отличающийся тем, что подвергнутая гашению смесь со стадии (d) имеет рН примерно 4,8.