

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA : COMERCIO

Registación : 84103443 00000000

Folios: 275

Fecha (AÑO): 2004-10-29 17:53:12

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

②

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **WYETH HOLDINGS CORPORATION**

Dirección: Five Giralda Farms, Madison,
NJ 07940, Estados Unidos de América

Nacionalidad o domicilio: Madison, Estado de
New Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: MAINE,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5o.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

**INVENTOR(ES)
(72)**

Nombre: **Kunz Arthur, Moran Justin Keith, Rubino Joseph Thomas, Jain Neera,
Vidunas Eugene Joseph, Simpson John McLean, Robbins Paul David,
Merchant Nishith, DiJoseph John Francis, Ruppen Mark Edward, Damle Nitin
Krishnaji y Popplewell Andrew George**

Dirección: 11 Jennifer Drive, New City, NY 10958; 882 Sierra Vista Lane, Valley Cottage, NY 10989; 4
Sunrise Way, Towaco, NJ 07082; 6 Capral Lane, New City, NY 10958; 30 Witte Drive, Middletown,
NY 10940, 417 Maple Avenue, Upper Nyack, NY 10960; 403 Aster Street, Upper Nyack, NY 10960;
115 E. Harriet Avenue, Palisades Park, NJ 07650; 571 Linden Avenue, Woodbridge, NJ 07095; 6 Lea
Court Gamerville, NY 10923; 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458 y 77 Grosvenor
Road, Staines, Middlesex TW 18 2RN

Nacionalidad o Domicilio: **ESTADOS UNIDOS DE AMERICA Y GRAN BRETAÑA**

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2003/013910

Fecha 02/05/03

Publicación Internacional No. WO 2003/092623 A3

Fecha 13/11/03

⑥ Título (54)

"CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

⑧ **Prioridad**

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

US

02/05/02

60/377,440

⑨

Comprobante de Pago No. 04 - 83.985

Fecha: Octubre 26 de 2004

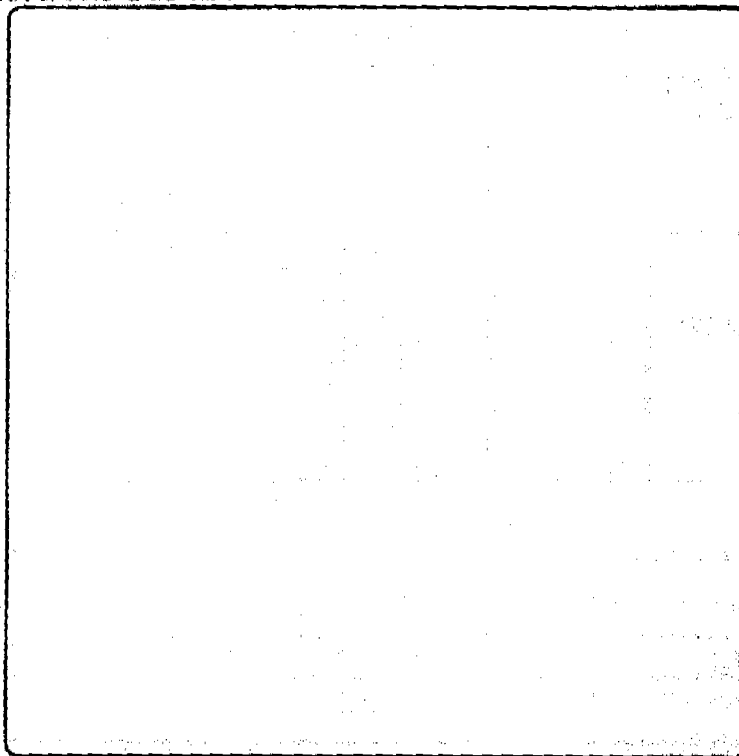
⑩

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la fase de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción; Publicación con su traducción; Opinión Escrita y Respuesta a la Opinión Escrita con su s traducciones, Solicitud de Examen Preliminar Internacional; Dibujos y Listado de Secuencias.

⑪

FIGURA CARACTERISTICA:



NIT : 800.760995-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radiacion : 04199443 00000000

Folios: 275

RECIBO OFICIAL DE PAGA : 04 - 80.990

Fecha (AMM): 2004-10-29 17:53:15

FECHA : OCTUBRE 29 DE 2004

Tramite : 311 PCT-PATENT 379 FASE NAOI 411 PRESENTA

Dependencia: 3628 DIVISION DE NUEVAS CREDITACIONES

XXXX C O N T A B I L I D A D X XXXX

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VAL. PAGO
LUCREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-10119-S	001007ab	26/10/2004	3.225,000.00

XXXX D E B I T O S XXXX

CONT. DEBITADO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 00005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL	422,000.00

SOM: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CADA APLICADO AL EXPERIENTE No. 

Se echan folios 3-5
extracto y tinturas
8/4 2004-11-18

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente AM100788	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/US03/13910	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 02 Mayo 2003 (02.05.2003)	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 02 Mayo 2002 (02.05.2002)
Solicitante WYETH HOLDINGS CORPORATION		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 3 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al **lenguaje**, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ la búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. Respecto a una secuencia de **ácido nucleótido y/o amino revelado** en la solicitud internacional, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la lista de la secuencia:

☒ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.

☒ presentada junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.

☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.

☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.

☐ se ha proporcionado la afirmación de que el listado de secuencias escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.

☐ se ha proporcionado la afirmación de que la información registrada en forma legible por computador es idéntica al listado de la secuencia escrita.

2. ☐ **Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse** (Ver Recuadro I).

3. ☐ **Falta unidad de invención** (ver Recuadro II).

4. Respecto al **título**,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así:

CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA

5. Respecto al **resumen**,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. La figura de los **dibujos** que se publicará con el resumen es la Figura No.

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

☒ Ninguna de las figuras.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.

PCT/US03/13910

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/00; C12N 15/63

US CL : 530/333, 391.7, 391.1, 388.85, 387.3; 424/130.1, 133.1, 156.1, 178.1

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CIB) o según la clasificación nacional y la CIB

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

US CL : 530/333, 391.7, 391.1, 388.85, 387.3; 424/130.1, 133.1, 156.1, 178.1

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	US 5,712,374 A (KUNTSMANN ET AL) 27 Enero 1998 (27/01/98), ver documento completo, especialmente columna 1-2, 6, Ejemplos.	1-5, 10-32, 37-44, 48-53, 58-98, 106-206
Y	US 6,183,744 B1 (GOLDENBERG) 06 Febrero 2001 (06/02/01), ver documento completo, especialmente columna 1, columna 3, columna 4.	1-5, 10-32, 37-44, 48-53, 58-98, 106-206
Y	WO 91/09967 A1 (CELLTECH LIMITED) 11 Julio 1991 (11/07/91), ver documento completo, especialmente resumen, página 6-10.	50-53
Y	YELTON et al. Afinidad de maduración del anticuerpo anti-carcinoma BR96 por mutagenesis basada en codones. The Journal of Immunology. 1995, Vol. 155, páginas 1994-2004, especialmente páginas 1999-2003.	10, 37, 106

☐ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☐ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

° Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

02 Octubre 2003 (02.10.2003)

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

10 DIC 2003

Nombre y dirección de correo de ISA/US

Buzón PCT, Atc: ISA/US

Comisionado para Patentes

P.O. Box 1450

Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 872-9306

Funcionario Autorizado

Larry R. Helms

Teléfono No. (703) 308-0196

Forma PCT/ISA/210 (hoja segunda) (Julio 1998)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
WILLIAM H. CALNAN
WYETH
PATENT LAW DEPARTMENT
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of Mailing (day/month/year)		10 DEC 2003
Applicant's or agent's file reference AM100788		FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US03/13910		International filing date (day/month/year) 02 May 2003 (02.05.2003)
Applicant WYETH HOLDINGS CORPORATION		

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

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

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

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

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

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

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

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer - <i>Helicia D. Roberts for</i> Larry R. Helms Telephone No. (703) 308-0196
---	---

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

(See notes on accompanying sheet)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AM100788	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US03/13910	International filing date (day/month/year) 02 May 2003 (02.05.2003)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 02 May 2002 (02.05.2002)
Applicant WYETH HOLDINGS CORPORATION		

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

This international search report consists of a total of 2 sheets.



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

1. Basis of the Report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.



None of the figures

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/13910

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/00; C12N 15/63												
US CL : 530/333, 391.7, 391.1, 388.85, 387.3; 424/130.1, 133.1, 156.1, 178.1												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)												
U.S. : 530/333, 391.7, 391.1, 388.85, 387.3; 424/130.1, 133.1, 156.1, 178.1												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	US 5,712,374 A (KUNTSMANN ET AL) 27 January 1998 (27/01/98), see entire document, especially column 1-2, 6, Examples.	1-5, 10-32, 37-44, 48-53, 58-98, 106-206										
Y	US 6,183,744 B1 (GOLDENBERG) 06 February 2001 (06/02/01), see entire document, especially column 1, column 3, column 4.	1-5, 10-32, 37-44, 48-53, 58-98, 106-206										
Y	WO 91/09967 A1 (CELLTECH LIMITED) 11 July 1991 (11/07/91), see entire document, especially abstract, page 6-10.	50-53										
Y	YELTON et al. Affinity maturation of the BR96 anti-carcinoma antibody by codon-based mutagenesis. The Journal of Immunology. 1995, Vol. 155, pages 1994-2004, especially pages 1999-2003.	10, 37, 106										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report										
02 October 2003 (02.10.2003)		10 DEC 2003										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Larry R. Helms</i> Telephone No. (703) 308-0196										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/13910

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, WEST, PIR, SWISPROT, GENESEQ

Search terms: inventor name, conjugate, antibody, purification, monomeric, cytotoxic, CD22, anti-CD22, CD20, humanized, SEQ
ID NO1-6, 13, 15, 16, 19, 27, 28, 30, calicheamicin, lymphoma

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE
PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Bureau Internacional



(43) Fecha de Publicación

13 de Noviembre de 2003 (13.11.2003)

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2003/092623 A3

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: **A61K 39/395**,
C07K 16/00, C12N 15/63

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2003/013910

(22) Fecha de Registro Internacional: 2 Mayo 2003 (02.05.2003)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
60/377,440 2 Mayo 2002 (02.05.2002) US

(71) Solicitante: (para todos los Estados designados excepto Estados
Unidos de América), **WYETH HOLDINGS CORPORATION**
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventores; y

(75) Inventores/Solicitudes (únicamente para Estados Unidos
de América): **KUNZ, Arthur** [US/US]; 11 Jennifer Drive,
New City, NY 10956 (US). **MORAN, Justin, Keith**
[US/US]; 682 Sierra Vista Lane, Valley Cottage, NY 10989
(US). **RUBINO, Joseph, Thomas** [US/US]; 4 Sunrise Way,
Towaco, NJ 07082 (US). **JAIN, Neera** [CA/US]; 6 Capral
Lane, New City, NY 10956 (US). **VIDUNAS, Eugene, Joseph**
[US/US]; 30 Witte Drive, Middletown, NY 10940 (US). **SIMP-
SON, John, McLean** [US/US]; 417 Maple Avenue, Upper
Nyack, NY 10960 (US). **ROBBINS, Paul, David** [US/US]; 403
Aster Street, Upper Nyack, NY 10960 (US). **MERCHANT,
Nishith** [US/US]; 115 E. Harriet Avenue, Palisades Park, NJ
07650 (US). **DIJOSEPH, John, Francis** [US/US]; 571 Linden

Avenue, Woodbridge, NJ 07095 (US) **RUPPEN, Mark, Edward**
[US/US]; 6 Lea Court Garnerville, NY 10923 (US). **DAMLE, Nitin,
Krishnaji** [US/US]; 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ
07458 (US). **POPPLEWELL, Andrew, George** [GB/GB]; 77
Grosvenor Road, Staines, Middlesex TW 18 2RN (GB).

(74) Agente: **CALNAN, William, H. Et al.**; Wyeth, Patent Law
Department, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(81) Estados Designados (nacionales): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (regionales): Patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Patente de Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— con reporte de búsqueda internacional

(88) Datos de la publicación del reporte de la búsqueda internacional:

18 Marzo 2004

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas
Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada
emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título:

"CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE
CALIQUEAMICINA"

(57) Extracto: Se describen método para preparar conjugados de fármaco citotóxico monomérico/portador con una
carga de fármaco importantemente mayor que la de los procedimientos previamente reportados y que reduce la
agregación y la fracción de conjugado inferior (LCF). Los conjugados de derivado de fármaco citotóxico/anticuerpo,
composiciones que comprenden los conjugados y usos de los conjugados también se describen. Los conjugados de
derivado de caliqueamicina monoméricos/anticuerpo anti-CD22, composiciones que comprenden los conjugados y
usos de los conjugados también se describen.

WO 2003/092623 A3

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 November 2003 (13.11.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/092623 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/395,
C07K 16/00, C12N 15/63

Lea Court, Garnerville, NY 10923 (US). DAMLE, Nitin,
Krishnaji [US/US]; 53 Stevenson Lane, Upper Saddle
River, NJ 07458 (US). POPPLEWELL, Andrew, George
[GB/GB]; 77 Grosvenor Road, Staines, Middlesex TW18
2RN (GB).

(21) International Application Number:
PCT/US2003/013910

(22) International Filing Date: 2 May 2003 (02.05.2003)

(74) Agents: CALNAN, William, H. et al.; Wyeth, Patent Law
Department, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/377,440 2 May 2002 (02.05.2002) US

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

(71) Applicant (*for all designated States except US*): WYETH
HOLDINGS CORPORATION [US/US]; Five Giralda
Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): KUNZ, Arthur
[US/US]; 11 Jennifer Drive, New City, NY 10956 (US).
MORAN, Justin, Keith [US/US]; 682 Sierra Vista Lane,
Valley Cottage, NY 10989 (US). RUBINO, Joseph,
Thomas [US/US]; 4 Sunrise Way, Towaco, NJ 07082
(US). JAIN, Neera [CA/US]; 6 Capral Lane, New City,
NY 10956 (US). VIDUNAS, Eugene, Joseph [US/US];
30 Witte Drive, Middletown, NY 10940 (US). SIMP-
SON, John, McLean [US/US]; 417 Maple Avenue,
Upper Nyack, NY 10960 (US). ROBBINS, Paul, David
[US/US]; 403 Aster Street, Upper Nyack, NY 10960
(US). MERCHANT, Nishith [US/US]; 115 E. Harriet
Avenue, Palisades Park, NJ 07650 (US). DIJOSEPH,
John, Francis [US/US]; 571 Linden Avenue, Woodbridge,
NJ 07095 (US). RUPPEN, Mark, Edward [US/US]; 6

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

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
18 March 2004

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

(54) Title: CALICHEAMICIN DERIVATIVE-CARRIER CONJUGATES

(57) Abstract: Methods for preparing monomeric cytotoxic drug/carrier conjugates with a drug loading significantly higher than in previously reported procedures and with decreased aggregation and low conjugate fraction (LCF) are described. Cytotoxic drug derivative/antibody conjugates, compositions comprising the conjugates and uses of the conjugates are also described. Monomeric calicheamicin derivative/anti-CD22 antibody conjugates, compositions comprising the conjugates and uses of the conjugates are also described.

WO 2003/092623 A3

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT
OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

(PCT Rules 59.3(e) and 61.1(b), first sentence
and Administrative Instructions, Section 601(a))

To:
WILLIAM H. CALNAN
WYETH
PATENT LAW DEPARTMENT
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NEW JERSEY 07940

RECEIVED
MAR 30 2004

Date of mailing
(day/month/year)

26 MAR 2004

Applicant's or agent's file reference
AM100788

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US03/13910

International filing date (day/month/year)
02 May 2003

Priority date (day/month/year)
02 May 2002

Applicant
WYETH HOLDINGS CORPORATION

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application:

12 NOV 2003

2. That date of receipt is:

- ☒ the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b)).
- ☐ the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(e)).
- ☐ the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404), received the required corrections.

3. ☐ **ATTENTION:** That date of receipt is **AFTER** the expiration of 19 months from the priority date. Consequently, the election(s) made in the demand does (do) not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)). Therefore, the acts for entry into the national phase must be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 22). For details, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

☐ (If applicable) This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on:

4. Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau.

Name and mailing address of the IPEA/
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 703-305-3230

Form PCT/IPEA/402 (July 1998)

Authorized officer

Theodosia Simpkins

Telephone No. 703-305-3676

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ US

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated).

For International Preliminary Examining Authority use only

Identification of IPEA		Date of receipt of DEMAND
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference AM100788
International application No. PCT/US03/13910	International filing date (day/month/year) 02 MAY 2003 (02/05/2003)	(Earliest) Priority date (day/month/year) 02 MAY 2002 (02/05/2002)
Title of invention CALICHEAMICIN DERIVATIVE-CARRIER CONJUGATES		
Box No. II APPLICANT(S)		
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) Wyeth Holdings Corporation a corporation of the State of Maine Five Giralda Farms Madison, New Jersey 07940-0874 United States of America		Telephone No. (973) 660-7676
		Facsimile No. (973) 660-7973
		Teleprinter No.
		Applicant's registration No. with the Office Customer No. 25291
State (that is, country) of nationality: United States of America		State (that is, country) of residence: United States of America
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) KUNZ, Arthur 11 Jennifer Drive New City, New York 10956 United States of America		
State (that is, country) of nationality: United States of America		State (that is, country) of residence: United States of America
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) MORAN, Justin Keith 682 Sierra Vista Lane Valley Cottage, New York 10989 United States of America		
State (that is, country) of nationality: United States of America		State (that is, country) of residence: United States of America
☒ Further applicants are indicated on a continuation sheet.		

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.*Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

RUBINO, Joseph Thomas
4 Sunrise Way
Towaco, New Jersey 07082
United States of America

State *(that is, country)* of nationality:
United States of America

State *(that is, country)* of residence:
United States of America

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

JAIN, Neera
6 Capral Lane
New City, New York 10956
United States of America

State *(that is, country)* of nationality:
Canada

State *(that is, country)* of residence:
United States of America

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

VIDUNAS, Eugene Joseph
30 Witte Drive
Middletown, New York 10940
United States of America

State *(that is, country)* of nationality:
United States of America

State *(that is, country)* of residence:
United States of America

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

SIMPSON, John McLean
417 Maple Avenue
Upper Nyack, New York 10960
United States of America

State *(that is, country)* of nationality:
United States of America

State *(that is, country)* of residence:
United States of America

☒ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

ROBBINS, Paul David
403 Amster Street
Upper Nyack, New York 10960
United States of America

State (that is, country) of nationality:
United States of America

State (that is, country) of residence:
United States of America

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

MERCHANT, Nishith
115 E. Harriet Avenue
Palisades Park, New Jersey 07650
United States of America

State (that is, country) of nationality:
United States of America

State (that is, country) of residence:
United States of America

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

DIJOSEPH, John Francis
571 Linden Avenue
Woodbridge, New Jersey 07095
United States of America

State (that is, country) of nationality:
United States of America

State (that is, country) of residence:
United States of America

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

RUPPEN, Mark Edward
6 Lea Court
Garnerville, New York 10923
United States of America

State (that is, country) of nationality:
United States of America

State (that is, country) of residence:
United States of America

☒ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

DAMLE, Nitin Krishnaji
53 Stevenson Lane
Upper Saddle River, New Jersey 07458
United States of America

State (that is, country) of nationality:
United States of America

State (that is, country) of residence:
United States of America

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

POPPELWELL, Andrew George
77 Grosvenor Road
Staines, Middlesex TW18 2 RN
Great Britain

State (that is, country) of nationality:
Great Britain

State (that is, country) of residence:
United States of America

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCEThe following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation.
The address must include postal code and name of country.)BARNHARD, Elizabeth M.; GORDON, Alan M.; MATTHEWS, Gale F.;
WEBSTER, Darryl L
Wyeth
Patent Law Department
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940
United States of America

Telephone No.

(973) 660-7681

Facsimile No.

(973) 660-7973

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

31088; 30637; 32269; 34276

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.**Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION****Statement concerning amendments:***

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filedthe description ☒ as originally filed
☐ as amended under Article 34the claims ☒ as originally filed
☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)
☐ as amended under Article 34the drawings ☒ as originally filed
☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)). (This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: ENGLISH☒ which is the language in which the international application was filed.☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.☐ which is the language of publication of the international application.☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.**Box No. V ELECTION OF STATES**

The applicant hereby elects all eligible States (that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)

excluding the following States which the applicant wishes not to elect:

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | |
|--|---|--------|
| 1. translation of international application | : | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | sheets |
| 5. letter | : | sheets |
| 6. other (specify) | : | sheets |

For International Preliminary Examining Authority use only

received not received

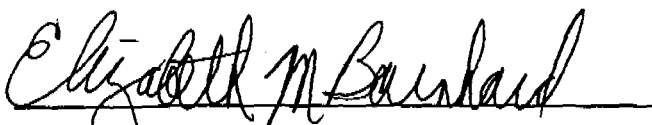
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|--|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listing in computer readable form |
| 3. ☐ original general power of attorney | 7. ☐ other (specify): |
| 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: | |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand)



Elizabeth M. Barnhard
Agent for Applicants

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.

☐ The applicant has been informed accordingly.

4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.

5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

Procedente de la
AUTORIDAD EXAMINADORA PRELIMINAR INTERNACIONAL

PCT

OPINION ESCRITA
(Regla 66 del PCT)

Para:
ELIZABETH M. BARNHARD
WYETH
PATENT LAW DEPARTMENT
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940

Fecha de envío
(día/mes/año): 17 JUN 2004

Referencia de archivo del solicitante o apoderado:

AM100788

VENCIMIENTO DE CONTESTACION dentro de 1 meses/días a partir de la fecha de envío anterior.

No. de solicitud internacional:

PCT/US03/13910

Fecha de presentación internacional (día/mes/año):

02 Mayo 2003 (02.05.2003)

Fecha de prioridad (día/mes/año):

02 Mayo 2002 (02.05.2002)

Clasificación de Patente Internacional (IPC) o clasificación nacional e IPC:

IPC(7): A61K 39/395; C07K 16/00; C12N 15/63 y US Cl.: 530/333, 391.7, 391.1, 388.85, 387.3; 424/130.1, 133.1, 156.1, 178.1

Solicitante:

WYETH HOLDINGS CORPORATION

1. Esta opinión escrita es la Primera (primera, etc.) redactada por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional.

2. Este reporte contiene indicaciones y páginas correspondientes que se relacionan con los siguientes ítems:

- I ☒ Base de la opinión
- II ☐ Prioridad
- III ☐ No se establece opinión con respecto a novedad, paso o etapa inventiva y aplicabilidad industrial
- IV ☐ Carencia de unidad de la invención
- V ☒ Declaración justificada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a novedad, etapa o paso inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que apoyan tal declaración.
- VI ☐ Ciertos documentos citados
- VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional
- VIII ☐ Ciertas observaciones en la solicitud internacional

3. Mediante la presente el solicitante está invitado a responder a esta opinión

¿Cuándo? Véase el límite de tiempo indicado anteriormente. ~~El solicitante puede, antes de la expiración de que el límite de tiempo, solicitar a esta Autoridad que conceda una extensión, véase Regla 66.2(d).~~

¿Cómo? Al presentar una respuesta por escrito, acompañada, en donde sea apropiado, por enmiendas, de acuerdo a la Regla 66.3. Para la forma y la lengua de las enmiendas, véanse Reglas 66.8 y 66.9.

También Para una oportunidad adicional para presentar estas enmiendas, véase la Regla 66.4. Para la obligación del examinador a considerar las enmiendas y/o argumentos, véase la Regla 66.4bis. Para una comunicación informal con el examinador, véase la Regla 66.6.

Si no se presenta respuesta, el reporte de examen preliminar internacional será establecido en base a esta opinión.

4. La fecha final en la cual el reporte de examen preliminar internacional debe ser establecido de acuerdo a la Regla 69.2 es: 02 Septiembre 2004 (02.09.2004).

Nombre y dirección de correspondencia de la IPEA/US

Buzón PCT, Atc: IPEA/US
Comisionado para Patentes
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 872-9306

Funcionario Autorizado

Larry R. Helms

Teléfono No. (571) 272-1600

OPINIÓN ESCRITA

No. de solicitud internacional

PCT/US03/13910

I. Base de la opinión

1. Con respecto a los **elementos** de la solicitud internacional:*

- ☒ La solicitud internacional como se presentó originalmente
- ☒ La descripción:
 Páginas 1-78, como originalmente se presentaron
 Páginas NINGUNA, presentadas con la demanda
 Páginas NINGUNA, presentada con la carta de _____
- ☒ Las reivindicaciones:
 Páginas 79-117, como originalmente se presentaron
 Páginas NINGUNA, según se enmendaron (junto con cualquier declaración) de conformidad con el Artículo 19
 páginas NINGUNA, presentadas con la demanda
 páginas NINGUNA, presentadas con la carta de _____
- ☒ Los dibujos:
 Páginas 1-35, como originalmente se presentaron
 Páginas NINGUNA, presentados con la demanda
 Páginas NINGUNA, presentados con la carta de _____
- ☒ La secuencia que enumera parte de la descripción:
 Páginas 1-32, como originalmente se presentaron
 Páginas NINGUNA, presentadas con la demanda
 Páginas NINGUNA, presentadas con la carta de _____

2. Con respecto al **idioma**, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o proporcionados por esta Autoridad en el lenguaje en que se presentó la publicación internacional, a menos que se indique lo contrario bajo este punto.

Estos elementos estuvieron disponibles o proporcionados por esta Autoridad en el siguiente lenguaje _____ que es:

- ☐ El lenguaje de una traducción proporcionada para los propósitos de búsqueda internacional (bajo la Regla 23.1(b)).
- ☐ El lenguaje de una publicación de la solicitud internacional (bajo la Regla 48.3(b)).
- ☐ El lenguaje de una traducción proporcionada para los propósitos de examen preliminar internacional (bajo las Reglas 55.2 y/o 55.3).

3. Con respecto a cualquier **secuencia nucleótida y/o de aminoácido** descrita en la solicitud internacional, el examen preliminar internacional se llevó a cabo sobre la base de la lista de secuencias:

- ☒ Contenido en la solicitud internacional en forma escrita.
- ☒ Presentado junto con la solicitud internacional en la forma legible por computadora.
- ☐ Proporcionado subsecuentemente a esta Autoridad en forma escrita.
- ☐ Proporcionado subsecuentemente a esta Autoridad en la forma legible por computadora.
- ☐ Se ha proporcionado la declaración de que la lista de secuencias escrita proporcionada subsecuentemente no va más allá de la descripción en la solicitud internacional como se presentó.
- ☐ Se ha proporcionado la declaración de que la información registrada en la forma legible por computadora es idéntica a la lista de secuencias escrita.

4. ☐ Las enmiendas han resultado en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas: NINGUNA
- ☐ las reivindicaciones, Nos.: NINGUNA
- ☐ los dibujos, hojas: NINGUNA

5. ☐ Este reporte se ha establecido como si (algunas de) las enmiendas no se hubieran hecho, dado que se han considerado que van más allá de la descripción como se presentó (Regla 70.2 (c));

* Hojas de reemplazo que se han presentado a la Oficina de Recepción en respuesta a una invitación bajo el Artículo 14 se refieren en esta opinión como "presentadas originalmente".

OPINIÓN ESCRITA

V. Declaración justificada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a la Novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y Explicaciones que apoyan tal declaración.

1. AFIRMACION

Novedad (N)	Reivindicaciones 1-206	SI
	Reivindicaciones NINGUNA	NO
Nivel Inventivo (IS)	Reivindicaciones 6-9, 33-36, 45-47, 54-57, 59, 99-105	SI
	Reivindicaciones 1-5, 10-32, 37-44, 48-53, 58, 60-98, 106-206	NO
Aplicabilidad Industrial (IA)	Reivindicaciones 1-206	SI
	Reivindicaciones NINGUNA	NO

2. CITAS Y EXPLICACIONES

Las reivindicaciones 1-5, 10-32, 37-44, 48-53, 58, 60-98, 106-206 carecen de paso inventivo bajo el Artículo 33(3) PCT siendo obvia por la Patente Kuntsmann et al (Patente US 5,712,374) según Goldenburg (Patente US 6,183,744) y WO 91/09967 y Yelton et al (*The Journal of Immunology*) 155: 1994-2004, 1995)

Las reivindicaciones se resumen como un método para producir un conjugado portador/fármaco citotóxico monomérico con una baja fracción del conjugado (LCF) que comprenda la adición del fármaco; la incubación del fármaco en un buffer/tamponador a un pH 7-9; que la solución tenga un ácido carboxílico C6-C8 de aproximadamente 35° grados y 15-24 horas; el conjugado tenga una carga de 4-10%; el LCF menor al 10%; y que el portador sea un anticuerpo humanizado anti-CD22 y la purificación sea un HIC; además está reivindicado el conjugado y el fármaco es caliqueamicina, métodos para producir composiciones liofilizadas, métodos de tratamiento de leucemia y el uso de la terapia CHOPP en combinación y que el anticuerpo sea humanizado y tenga sustituciones en posiciones específicas y esté madurado en afinidad.

Kuntsmann et al muestra métodos para preparar conjugados portadores de caliqueamicina monomérica en donde el método comprenda la adición de un fármaco citotóxico a un anticuerpo y la incubación del fármaco en un buffer/amortiguador a un pH7-9 y que la solución tenga un ácido carboxílico C6-C8 de aproximadamente 35° grados y 15-24 horas; que el conjugado tenga una carga de 4-10% y un LCF menor de 10% de anticuerpos humanizados. Kuntsmann et al no muestra al anticuerpo anti-CD22 o el cómo tratar linfomas, leucemia o sustituciones de residuos específicos en el anticuerpo o maduración de afinidad. Estas deficiencias están compensadas en las enseñanzas de Goldenburg, WO 91/09967 y Yelton et al.

Goldenburg muestra un anticuerpo anti-CD22 para la terapia contra linfomas y leucemia y el anticuerpo puede ser usado en combinación con CHOPP.

WO 91/09967 enseña métodos de humanización y sustituciones en residuos específicos para mejorar el enlace de antígenos.

Yelton et al muestra maduración de afinidad para mejorar la afinidad de anticuerpos.

Hubiera sido muy obvio producir un método para preparar conjugados de fármacos citotóxicos que comprendan anticuerpo anti-CD22 que hayan aumentado el enlace y un fármaco de caliqueamicina y un anticuerpo humanizado y la producción del conjugado con un LCF por debajo del 10% y la carga de 4-10% por peso teniendo en cuenta las referencias.

Según las referencias de Kuntsmann et al muestra que una de las disposiciones ordinarias en la técnica hubiera estado motivada y hubiera tenido una expectativa razonable de éxito de producir el conjugado monomérico, ya que las condiciones de carga y conjugación y cosolventes y aditivos están determinados sin una experimentación no debida y hubiera sido obvio optimizar las condiciones para obtener monómeros y solo conjugados porque este es el objetivo del paciente, obtener monómeros con una alta carga de fármaco y con un rendimiento mayor a 90% y hubiera sido obvio obtener tres conjugados que sean todos conjugados y sin ningún anticuerpo libre en la preparación. Adicionalmente, hubiera sido obvio humanizar y madurar la afinidad del anticuerpo porque estas técnicas se llevan a cabo en los anticuerpos para la terapia y tal como lo mostró Goldenburg el anticuerpo anti-CD22 es usado para terapia humana y hubiera sido obvio humanizarlo por las razones expuestas en WO 91/09967. Adicionalmente, hubiera sido obvio combinar la terapia con CHOPP porque ésta también se llevo a cabo para el tratamiento del cáncer tal como lo enseñó Goldenburg.

Las reivindicaciones 6-9,33-36, 45-47, 54-57, 59 y 99-105 cumplen el criterio especificado en el PCT Artículo 33(2)-(3) porque la técnica anterior no muestra, ni sugiere la invención reivindicada.

Las reivindicaciones 1-206 cumplen con el criterio especificado en el PCT, Artículo 33(4) y por lo tanto tiene aplicabilidad industrial porque el objeto reivindicado puede hacerse o usarse en la industria.

OPINIÓN ESCRITA

No. de solicitud internacional

PCT/US03/13910

Casilla Suplementaria

(Para ser usada cuando el espacio en cualquier cuadro anterior no sea suficiente)

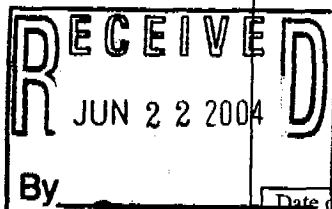
LIMITE DE TIEMPO:

El límite del tiempo para la respuesta de una Opinión Escrita no se puede prolongar, 37 CFR 1.484(d). Cualquier respuesta recibida después de la caducidad del límite del tiempo especificado en la Opinión Escrita no se tendrá en cuenta al preparar el Reporte de Examen Preliminar Internacional.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
ELIZABETH M. BARNHARD
WYETH
PATENT LAW DEPARTMENT
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940



PCT

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

Applicant's or agent's file reference

AM100788

Date of Mailing
(day/month/year)

17 JUN 2004

REPLY DUE

within 1 months/days from
the above date of mailing

International application No.

PCT/US03/13910

International filing date (day/month/year)

02 May 2003 (02.05.2003)

Priority date (day/month/year)

02 May 2002 (02.05.2002)

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

IPC(7): A61K 39/395; C07K 16/00; C12N 15/63 and US Cl.: 530/333, 391.7, 391.1, 388.85, 387.3; 424/130.1, 133.1, 156.1, 178.1

Applicant

WYETH HOLDINGS CORPORATION

1. This written opinion is the first (first, etc.) drawn by this International Preliminary Examining Authority.

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

- I ☒ Basis of the opinion
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2 (a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

DOCKETED
DUE DATE
STAT DATE
BY:

8/17/04
MDG/23/04

3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. ~~The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension. See rule 66.2(d).~~

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4.
For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4 bis.
For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: 02 September 2004 (02.09.2004)

Name and mailing address of the IPEA/US

Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 872-9306

Authorized officer

Larry R. Helms

Telephone No. (571) 272-1600

F. Roberts for

Form PCT/IPEA/408 (cover sheet)(July 1998)

RECEIVED

JUN 25 2004

ELIZABETH M. BARNHARD

WRITTEN OPINION

International Application No.

PCT/US03/13910

25

I. Basis of the opinion

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-78, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 79-117, as originally filed
 pages NONE, as amended (together with any statement) under Article 19
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages 1-35, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
 pages 1-32, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the written opinion was drawn on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in printed form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages NONE
- ☐ the claims, Nos. NONE
- ☐ the drawings, sheets/~~fig~~ NONE

5. ☐ This opinion has been drawn as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed."

24

WRITTEN OPINION

International application No.
PCT/US03/13910

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

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims <u>1-206</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>6-9, 33-36, 45-47, 54-57, 59, 99-105</u>	YES
	Claims <u>1-5, 10-32, 37-44, 48-53, 58, 60-98, 106-206</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-206</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

Claims 1-5, 10-32, 37-44, 48-53, 58, 60-98, 106-206 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Kuntsmann et al (US Patent 5,712,374) in view of Goldenburg (US Patent 6,183,744) and WO 91/09967 and Yelton et al (The Journal of Immunology 155:1994-2004, 1995).

The claims are summarized as a method of producing a monomeric cytotoxic drug/carrier conjugate with low conjugate fraction (LCF) comprising adding drug, incubating the drug in buffer at pH 7-9 and the solution has a C6-C8 carboxylic acid from about 35 degrees and 15-24 hours and the conjugate has a loading of 4-10% and LCF less than 10% and the carrier is a antiCD22 antibody and is humanized and the purification is a HIC, further claimed is the conjugate and the drug is calicheamicin, methods of producing lyophilized compositions, methods of treatment of leukemia and lymphoma and using CHOPP therapy in combination, and the antibody is humanized and has substitutions at specified positions and is affinity matured.

Kuntsmann et al teach methods to prepare monomeric calicheamicin carrier conjugates wherein the method comprises adding the cytotoxic drug to an antibody and incubating the drug in buffer at pH 7-9 and the solution has a C6-C8 carboxylic acid from about 35 degrees and 15-24 hours and the conjugate has a loading of 4-10% and LCF less than 10% and humanized antibodies. Kuntsmann et al does not teach the anti-CD22 antibody or treating lymphoma or leukemia or substitutions at specific residues in the antibody or affinity maturation. These deficiencies are made up for in the teachings of Goldenburg, WO 91/09967 and Yelton et al

Goldenburg teach an antiCD22 antibody for therapy against lymphomas and leukemia and the antibody can be used in combination with CHOPP.

WO 91/09967 teach humanization methods and substitutions at specific residues to improve binding of antigens.

Yelton et al teach affinity maturation to increase affinity of antibodies.

It would have been obvious to produce a method of preparing a monomeric cytotoxic drug conjugate comprising an antiCD22 antibody that has increased binding and a drug of calicheamicin and humanize the antibody and produce the conjugate with a LCF below 10% and the loading of 4-10% by weight in view of the references.

One of ordinary skill in the art would have been motivated to and had a reasonable expectation of success to have produce the monomeric conjugate in view of the references because Kuntsmann et al teach that conditions of loading and conjugation and cosolvent and additives are determined without undue experimentation and it would be obvious to optimize the conditions to get monomers and only conjugates because that is the objective of the patent to obtain monomers with high drug loading and yield of higher than 90% and it would be obvious to obtain those conjugates that are all conjugated and no free antibody in the preparation. In addition, it would have been obvious to humanize and affinity mature the antibody because these techniques are performed on antibodies for therapy and as taught by Goldenburg the anti-CD22 antibody is used for human therapy and it would have been obvious to humanize it for the reasons in WO 91/09967. In addition it would have been obvious to combine the therapy with CHOPP because this was also performed for the treatment of cancer as taught by Goldenburg.

Claims 6-9, 33-36, 45-47, 54-57, 59, and 99-105 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3) because the prior art does not teach or fairly suggest the claimed invention.

Claims 1-206 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

WRITTEN OPINION

International application No.
PCT/US03/13910

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

TIME LIMIT:

The time limit set for response to a Written Opinion may not be extended. 37 CFR 1.484(d). Any response received after the expiration of the time limit set in the Written Opinion will not be considered in preparing the International Preliminary Examination Report.

CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA

Resumen - Objeto y Finalidad de la Invención

Se describen métodos para preparar conjugados de fármaco citotóxico monomérico/portador con una carga de fármaco importantemente mayor que la de los procedimientos previamente reportados y que reduce la agregación y la fracción de conjugado inferior (LCF). Los conjugados de derivado de fármaco citotóxico/anticuerpo, composiciones que comprenden los conjugados y usos de los conjugados también se describen. Los conjugados de derivado de caliqueamicina monoméricos/anticuerpo anti-CD22, composiciones que comprenden los conjugados y usos de los conjugados también se describen.

CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a métodos para la producción de conjugados de portador/fármaco citotóxico monomérico (los "conjugados") con una carga superior de fármaco y una fracción de conjugado bajo substancialmente reducida (LFC, por sus siglas en inglés). Particularmente, la invención se refiere a conjugados de caliqueamicina monoméricos del anticuerpo anti-CD22. La invención también se refiere a conjugados de la invención, a métodos de purificación de los conjugados, a composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados y a usos de los conjugados.

Antecedentes de la Invención

Los conjugados de fármacos desarrollados para la farmacoterapia sistémica son agentes citotóxicos específicos del objetivo. El concepto involucra el acoplamiento de un agente terapéutico a una molécula portadora con especificidad para una población definida de células objetivo. Los anticuerpos con alta afinidad para los antígenos son una elección natural como porciones de direccionamiento. Con la disponibilidad de anticuerpos monoclonales de alta afinidad, los prospectos de la terapéutica para direccionamiento de anticuerpos han sido prometedores. Las sustancias tóxicas que se han conjugado con los anticuerpos monoclonales incluyen toxinas, fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, modificadores de respuesta biológica y radionúclidos^{es}. Los conjugados de toxina y anticuerpos se denominan frecuentemente

inmunotoxinas, mientras que los inmunoconjugados consisten de anticuerpos y de fármacos de alto peso molecular tales como el metotrexato y la adriamicina se denominan quimioinmunoconjugados. Los inmunomoduladores contienen modificadores de la respuesta biológica que se sabe que tienen funciones reguladoras tales como linfocinas, factores de crecimiento y factor del veneno de cobra (CVF, por sus siglas en inglés) que activa el complemento. Los radioinmunoconjugados consisten de isótopos radioactivos, que se pueden usar como terapéuticos para exterminar células por su radiación o usarse para la formación de imágenes. El suministro específico mediado por anticuerpos de los fármacos citotóxicos a células de tumor, se espera que no solamente aumente su eficacia antitumor, sino que también evite la absorción no dirigida por los tejidos normales incrementado así sus índices terapéuticos.

La presente invención se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo como un vehículo de direccionamiento y que tienen especificidad para determinantes antigénicas en la superficie de las células malignas conjugadas a un fármaco citotóxico. La invención se refiere a conjugados de anticuerpo a fármaco citotóxico en donde el anticuerpo tiene especificidad para las determinantes antigénicas para las malignidades B, trastornos linfoproliferativos y trastornos inflamatorios crónicos. La presente invención también se refiere a métodos para la producción de inmunoconjugados y sus usos terapéuticos.

Se han aprobado diversos terapéuticos basados en anticuerpos para el tratamiento de una diversidad de enfermedades que incluyen cáncer y artritis reumatoide,

para el uso clínico, o están en ensayos clínicos para una diversidad de malignidades que incluyen malignidades de células B tales como el linfoma que no es de Hodgkin. Uno de tales terapéuticos basados en anticuerpos es el rituximab, (RituxanTM) un anticuerpo humano quimérico no etiquetado γ_1 (región +my1V), que es específico para el antígeno de superficie celular CD20 que se expresa en las células B. Estos terapéuticos basados en anticuerpos se soportan en la citotoxicidad mediada por el complemento (CDCC) o la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) contra las células B o en el uso de radionúclidos tales como ^{131}I o ^{90}Y , que tienen problemas asociados de preparación y de uso para los médicos y los pacientes. Consecuentemente, hay una necesidad para la generación de inmunoconjugados que puedan superar los inconvenientes de la terapéutica actual basada en anticuerpos para tratar una diversidad de malignidades que incluyen malignidades hematopoyéticas como el linfoma que no es de Hodgkin (NHL), que se puede producir fácilmente o eficientemente y que se pueden usar repetidamente sin inducir una respuesta inmune.

Los inmunoconjugados que comprenden un miembro de la familia potente de agentes antibacterianos y antitumor, conocidos colectivamente como caliqueamicinas o el complejo LL-E33288 (ver patente de E.U.A No. 4,970,198 (1990)), se desarrollaron para el tratamiento de mieloma. La más potente de las caliqueamicinas se designa γ_1 , que se hace referencia aquí simplemente como gamma. Estos compuestos contienen un metil trisulfuro que pueden reaccionar con tioles adecuados para formar bisulfuros, al mismo tiempo al introducir un grupo funcional tal como una

hidrazida u otro grupo funcional que sea útil en la colocación de un derivado de caliqueamicina a un portador (ver patente de E.U.A No. 5,053,394). El uso de los conjugados del portador/derivado de caliqueamicina monomérico en el desarrollo de terapias para una amplia variedad de cánceres se ha limitado por la disponibilidad de agentes de direccionamiento específicos (portadores), así como por las metodologías de conjugación que resultan en la formación de agregados de proteínas cuando se incrementa la cantidad del derivado de caliqueamicina que se conjuga al portador (esto es, la carga de fármacos). Ya que una carga mayor de fármaco incrementa la potencia inherente del conjugado, es deseable tener la mayor cantidad del fármaco cargada en el portador, que sea consistente con la retención de la afinidad de la proteína portadora. La presencia de la proteína agregada que puede ser no específicamente tóxica e inmunogénica, y por lo tanto se debe retirar para aplicaciones terapéuticas, hace al proceso de escalamiento para la producción de estos conjugados más difícil y disminuye el rendimiento de los productos. La cantidad de caliqueamicina cargada en la proteína portadora (la carga de fármacos), la cantidad de agregado que se forma en la reacción de conjugación, y el rendimiento del conjugado final monomérico purificado que se puede obtener, todo se relaciona. Por lo tanto se debe hacer un compromiso entre una carga mayor de fármaco y el rendimiento del monómero final al ajustar la cantidad del derivado reactivo de caliqueamicina que se agrega a la reacción de conjugación.

La tendencia de los conjugados de fármacos citotóxicos, especialmente los conjugados de

caliqueamicina, para agregarse es especialmente problemática cuando se efectúan las reacciones de conjugación con los enlazadores descritos en la patente de E.U.A No. 5,877,296 y la patente de E.U.A No. 5,773,001 que se incorporan aquí en su totalidad. En este caso, un gran porcentaje de los conjugados producidos están en forma agregada y es bastante difícil purificar conjugados hechos por estos procesos originales (procesos CMA) para uso terapéutico. Para algunas proteínas portadoras, los conjugados con cargas aun modestas son virtualmente imposibles de hacer excepto a una escala pequeña. Consecuentemente, existe una necesidad crítica de mejorar los métodos para conjugar los fármacos citotóxicos tales como las caliqueamicinas, a portadores que minimizan la cantidad de agregación y con ello permiten una carga de fármaco tan alta como sea posible con un rendimiento razonable de producto.

Previamente, se describieron métodos de conjugación para la preparación de un derivado/portador de caliqueamicina monomérico con una agregación disminuida y una carga/rendimiento de fármacos superior (ver patente de E.U.A No. 5,712,374 y patente de E.U.A No. 5,714,586, incorporada en la presente en su totalidad). Aunque estos procesos resultaron en preparaciones de conjugados con un contenido de agregados substancialmente reducido, se descubrió después que produjo conjugados que contienen niveles indeseablemente altos (45-65% de área CLAR en %) de una fracción conjugada baja (LCF), una fracción que consiste principalmente del anticuerpo no conjugado. La presencia de LCF en el producto es un uso ineficiente del anticuerpo ya que contiene al fármaco citotóxico. También

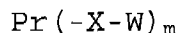
puede competir con el conjugado portador de caliqueamicina para el objetivo y reducir potencialmente el direccionamiento del último, resultando en una eficacia reducida del fármaco citotóxico. Por lo tanto, es deseable un proceso de conjugación mejorado que resultaría en niveles significativamente inferiores del LCF y que tengan niveles aceptables de agregación sin alterar significativamente las propiedades físicas del conjugado.

Breve Descripción de la Invención

La presente invención se refiere a métodos para la producción de conjugados de portador/derivado de un fármaco citotóxico monomérico (los conjugados) con una carga superior y una fracción de conjugado baja substancialmente reducida (LCF). Particularmente, la invención se refiere a la producción de conjugados de portador con derivado de caliqueamicina monomérico, a los conjugados, a las composiciones a un método de purificación de los conjugados y al uso de los conjugados. Más particularmente, la invención se refiere a métodos para la producción de un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con un derivado de caliqueamicina monomérico (CMC-544).

En una modalidad, la presente invención describe un proceso de conjugación mejorado para la producción de los conjugados, que resulta en niveles significativamente inferiores de LCF debajo del 10% sin alguna alteración importante de las propiedades físicas o químicas. La invención también describe una mejora adicional a los procesos de conjugación la cual resulta no solamente en una reducción importante en los niveles de LCF, sino también resulta en una reducción importante en la agregación a

partir de procesos previamente descritos, y produce una carga de fármaco substancialmente aumentada. Los conjugados de la presente invención tienen la fórmula:



en donde:

Pr es un portador proteínico.

X es enlazador que comprende un producto de cualquier grupo reactivo que puede reaccionar con un portador proteínico.

W es un fármaco citotóxico;

m es la carga promedio para un producto de conjugación purificado tal que el fármaco citotóxico constituye 7-9% del conjugado en peso y

$(-\text{X}-\text{W})_m$ es un derivado de fármacos citotóxico.

Los conjugados de la presente invención, en una modalidad, se generan por el método de la invención que comprende las etapas de (1) agregar el derivado de fármaco citotóxico al portador proteínico en donde el derivado de fármacos citotóxico tiene 4.5-11% en peso del portador proteínico; (2) incubar el derivado de fármaco citotóxico y un portador proteínico en una solución amortiguadora compatible con proteínas, no nucleofílica que tenga un pH en el intervalo del alrededor de 7 hasta 9 para producir un conjugado portador/fármaco citotóxico monomérico, en donde la solución comprende además (a) un cosolvente orgánico y (b) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico $\text{C}_6\text{-C}_{18}$ o su sal y en donde la incubación se efectúa a una temperatura que va desde alrededor de 30°C a alrededor de 35°C por un periodo de tiempo en el intervalo desde alrededor de 15 minutos hasta 24 horas y (3) someter al conjugado producido en la etapa (2) a un proceso de

separación cromatográfica para separar el derivado de fármacos citotóxico monomérico/conjugados del portador proteínico con una carga en el intervalo de 4-10% de peso del fármaco citotóxico y con una fracción baja conjugada (LFC) debajo de 10 por ciento a partir del portador proteínico no conjugado, derivado de fármaco citotóxico y conjugados agregados.

En un aspecto de la invención, el portador proteínico del conjugado se selecciona de un grupo que consiste de hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, imitadores de anticuerpos y sus contrapartes preparadas por ingeniería genéticamente o enzimáticamente.

En una modalidad, el portador proteínico es un anticuerpo. En una modalidad preferida el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab y un fragmento F(ab)2.

En otra modalidad el anticuerpo humanizado se dirige contra el antígeno de superficie celular CD22.

En una modalidad preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR y comprende una región variable de cadena ligera 5/44-gL1 (SEQ ID NO: 19), y una región variable de cadena pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO: 27).

En otra modalidad preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que contiene una cadena ligera que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 28.

Todavía en otra modalidad preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 30.

En otra modalidad preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 30.

En otra modalidad el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que es un anticuerpo variante que se obtiene por un protocolo de maduración de afinidad y tiene una especificidad aumentada para el CD22.

En otro aspecto, el fármaco citotóxico usado para generar el conjugado portador/fármaco citotóxico monomérico de la presente invención, es un inhibidor de la polimerización de tubulina, un agente de alquilación que se enlaza y fragmenta el ADN, una síntesis de proteínas inhibidoras o un inhibidor de la tirosina cinasa.

En una modalidad, el fármaco citotóxico se selecciona de caliqueamicina, tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, esperamicinas, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifen, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemiasterlinas, y maitansinoides.

En una modalidad, preferida el fármaco citotóxico es caliqueamicina. En una modalidad particularmente preferida, la caliqueamicina en una caliqueamicina gamma o un derivado de caliqueamicina gamma de N acetilo.

Todavía en otro aspecto el fármaco citotóxico se funcionaliza con 3-mercapto-3-metil butanoil hidrazida y se

conjuga a un portador proteínico por medio de la ligadura hidrolizable que puede liberar el fármaco citotóxico del conjugado después de enlazarse y entrar en las células objetivo.

En una modalidad preferida de este aspecto, la ligadura hidrolizable es ácido 4-(4-acetilfenoxi) butanoico (AcBut).

Todavía en otro aspecto de la invención se usa ácido octanoico o su sal, o ácido decanoico, o su sal como un aditivo durante el proceso de conjugación para disminuir la agregación e incrementar la carga de fármaco.

Todavía en otro aspecto de la invención los conjugados de la invención se purifican por un proceso de separación cromatográfica.

En una modalidad, el proceso de separación cromatográfica usado para separar el conjugado portador derivado de fármaco monomérico es una cromatografía de exclusión de tamaño (SEC).

En otra modalidad, el proceso de separación cromatográfica usado para separar el conjugado de portador derivado fármaco monomérico es cromatografía CLAR, FPLC o Sephacryl S-200.

En una modalidad preferida el proceso de separación cromatográfica usado para separar el conjugado de portador y derivado de fármaco monomérico en una cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). En una modalidad particularmente preferida, HIC se efectúa usando un medio cromatográfico de flujo rápido de fenil sefarosa 6, butil sefarosa 4 en un medio cromatografico de flujo rápido, medio cromatografico de flujo rápido de octil sefarosa 4, medio cromatografico de éter de Toyopearl 650M, medio HIC

Macro-Prep de metilo o un medio HIC Macro-Prep de t-butilo. En una modalidad más particularmente preferida la HIC se efectúa usando un medio de flujo rápido de butil sefarosa 4.

En otro aspecto, la invención se dirige a un conjugado portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico producido por el método de la invención. En una modalidad preferida de este aspecto el fármaco citotóxico usando es caliqueamicina y el portador usado es un anticuerpo.

En otra modalidad preferida el anticuerpo se selecciona de un grupo que consiste de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, una anticuerpo de cadena sencilla o fragmento Fab y un fragmento F(ab)2. En un aspecto más particularmente preferido, se usa un anticuerpo humanizado dirigido contra el antígeno de superficie celular CD22.

En una modalidad el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR, y comprende una región variable de cadena ligera 5/44-gL1 (SEQ ID NO: 19) y una región variable de cadena pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO: 27).

En otra modalidad, el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR, que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 28.

En una modalidad preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO:30.

En otra modalidad preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia establecida en

SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO: 30.

Todavía en otra modalidad el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que es un anticuerpo variante obtenido por un protocolo de maduración de afinidad que tiene una especificidad aumentada para el CD22 humano.

En una modalidad preferida la caliqueamicina es una caliqueamicina gamma o N acetil gamma caliqueamicina.

En una modalidad, el derivado de caliqueamicina se funcionaliza con 3-mercapto-3-metil butanoil hidrazida.

En otra modalidad, la ligadura usada para conjugar el fármaco al portador es una ligadura hidrolizable que puede liberar el fármaco citotóxico a partir del conjugado después de enlace y entrada en las células objetivo. En una modalidad, preferida la ligadura hidrolizable es el ácido 4-(4-acetil fenoxi) butanoico (AcBut).

Otro aspecto de la invención se dirige a un conjugado de un derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo anti-CD22 que tiene la fórmula $\text{Pr}(-\text{X}-\text{S}-\text{S}-\text{W})_m$ en donde Pr es un anticuerpo anti-CD22, X es una ligadura hidrolizable que comprende un producto de cualquier grupo reactivo que puede reaccionar con un anticuerpo; W es un radical de caliqueamicina, m es la carga promedio para un producto de conjugación purificado de manera que la caliqueamicina constituye 4-10% del conjugado en peso y $(-\text{X}-\text{S}-\text{S}-\text{W})_m$ es un derivado de caliqueamicina generado por el proceso de la invención.

En una modalidad de este aspecto, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un grupo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un

41

anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab y un fragmento a F(ab)2.

En una modalidad preferida el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD22 que tiene especificidad para CD22 humano, y comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas como H1 en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) para CDR-H1, como H2 en la figura 1 (SEQ ID NO: 2) o H2' (SEQ ID NO: 13) o H2'' (SEQ ID NO: 15) o H2''' (SEQ ID NO: 16) para CDR-H2 o como H3 en la figura 1 (SEQ ID NO: 3) para CDR-H3 y comprende una cadena ligera en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas como L1 en la figura 1 (SEQ ID NO: 4) para CDR-L1 como L2 en la figura 1 (SEQ ID NO: 5) para CDR-L2, o como L3 en la figura 1 (SEQ ID NO: 6) para CDR-L3.

En otra modalidad preferida el anticuerpo anti-CD22 comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas en SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16 para CDR-H2 o SEQ ID NO: 3 para CDR-H3 y una cadena ligera en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas en SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 o SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

Todavía en otra modalidad preferida, el anticuerpo anti-CD22 comprende SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16 para CDR-H2, SEQ ID NO: 3 para CDR-H3, SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

En otra modalidad, el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo anti-CD22 injertado con CDR y comprende un

dominio variable que comprende regiones de estructura del aceptor humano y CDR de donadores no humanos.

En otra modalidad, el anticuerpo humanizado anti-CD22 tiene una estructura aceptor humano en donde las regiones del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se basan en una secuencia del consenso del subgrupo 1 humano y comprende residuos de donador no humano en las posiciones 1, 28, 48, 71 y 93. En otra modalidad, el anticuerpo humanizado comprende además residuos de un donador no humano en las posiciones 67 y 69.

En una modalidad preferida el anticuerpo humanizado injertado con CDR comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una región de estructura del aceptor humano con base en una secuencia de consenso humana del subgrupo 1 y comprende además residuos del donador no humano en las posiciones 2, 4, 37, 38, 45 y 60. En otra modalidad, el anticuerpo injertado con CDR comprende además residuo del donador no humano en la posición 3.

Todavía en otra modalidad el anticuerpo injertado CDR comprende una región variable de cadena ligera 5/44-gL1 / (SEQ ID NO: 19) y una región variable de cadena pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO: 27).

En otra modalidad, el anticuerpo injertado con CDR comprende una cadena ligera que tiene la secuencia como se establece en SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene la secuencia como se establece en SEQ ID NO: 30.

Todavía en otra modalidad el anticuerpo injertado con CDR comprende una cadena ligera tiene la secuencia como se establece SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que tiene la secuencia como se establece en SEQ ID NO: 30.

En una modalidad el anticuerpo injertado con CDR anti-CD22 es un anticuerpo variante obtenido por un protocolo de maduración de afinidad y tiene una especificidad aumentada para el CD22 humano.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD22 es un anticuerpo quimérico que comprende las secuencias de los dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal establecido en SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8, respectivamente.

Todavía en otra modalidad el anticuerpo anti-CD22 comprende un CDR híbrido con una secuencia de CDR de donador truncada en donde la porción faltante del CDR del donador se reemplaza por una secuencia diferente y forma un CDR funcional.

En una modalidad particularmente preferida, el derivado del fármaco citotóxico es una caliqueamicina gamma o un derivado de caliqueamicina N acetil gamma.

En otro aspecto, la invención se dirige a una método para la preparación de la composición liofilizada estable de un conjugado de un portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico. En una modalidad, preferida la composición estable liofilizada del conjugado del portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico se prepara al (a) disolver el conjugado del portador derivado de fármacos citotóxico monomérico hasta una concentración final de 0.5 hasta 2 mg/ml en una solución que comprende un crioprotector a una concentración de 1.5%-5% en peso, un agente polimérico de volumen a una concentración de 0.5-1.5% en peso, electrolitos a una concentración de 0.01M a 0.1M, un agente facilitador de la solubilidad a una concentración de 0.005-0.05% en peso, agente amortiguador a

una concentración de 5-50 mM de manera tal que el pH final de la solución es 7.8-8.2, y agua; (b) dosificar la solución anterior en viales a temperatura de +5°C hasta +10°C; (c) congelar la solución a una temperatura de congelación de -35°C hasta -50°C; (d) someter la solución congelada a una etapa inicial de secado por congelación a una presión de secado primaria de 20 hasta 80 micras a una temperatura de anaquel a -10°C hasta -40°C por 24 hasta 78 horas; y (e) someter el producto secado por congelación de la etapa (d) a una etapa de secado secundaria a una presión de secado de 20 a 80 micras a una temperatura de anaquel de +10°C a + 35°C durante 15 a 30 horas.

En una modalidad, el crioprotector utilizado en la liofilización de conjugado de fármaco/portador citotóxico se selecciona del alditol, manitol, sorbitol, inositol, polietilen glicol, ácido aldónico, ácido urónico, ácido aldárico, aldosas, cetosas, amino azúcares, alditoles, inositoles, gliceraldehídos, arabinosa, líxosa, pentosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, hexosa, idosa, manosa, talosa, heptosa, glucosa, fructosa, ácido glucónico, sorbitol, lactosa, manitol, metil α -glucopiranosida, maltosa, ácido isoascórbico, ácido ascórbico, lactona, sorbosa, ácido glucárico, eritrosa, treosa, arabinosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, eritrulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, tagatosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina, sacarosa, trehalosa, ácido neuramínico, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos, levano, fucoidano, carragenina, galactocarolosa, pectinas, ácidos pécticos, amilosa, pululano, glicógeno,

amilopectina, celulosa, dextrano, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma xantana, almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, trehalosa, etilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol, y pentaeritritol.

En una modalidad preferida, el crioprotector es sacarosa que está presente a una concentración de 1.5% en peso.

En una modalidad el agente de volumen polimérico utilizado durante el proceso de liofilización se selecciona de Dextrano 40 o almidón de hidroxietil 40, y está a una concentración de 0.9% en peso.

En otra modalidad el electrolito usado en la solución de liofilización es cloruro de sodio que está presente a una concentración de 0.05 M.

En una modalidad preferida un agente facilitador de la solubilidad se usa durante el proceso de liofilización. Preferiblemente este agente facilitador de la solubilidad es un tensoactivo. En una modalidad, particularmente preferida el tensoactivo es polisorbato 80, que está presente a una concentración de 0.01% en peso.

En una modalidad el agente amortiguador usado es trometamina que está presente a una concentración de 0.02 M. Se prefiere para el pH de la solución que sea de 8.0 al comienzo del proceso de liofilización. La solución que contiene el conjugado de portador/fármaco citotóxico se dosifica a los viales a una temperatura de +5°C previo al comienzo del proceso.

En una modalidad preferida, la solución de los viales se congela a una temperatura de -45°C; la solución

congelada se somete a una etapa inicial de secado por congelación a una presión de secado primaria de 60 micras y a una temperatura de anaquel de -30°C por 60 horas; y el producto secado por congelación se somete a una etapa secundaria de secado, a una presión de secado de 60 micras, a temperatura de anaquel de +25°C por 24 horas.

Otro aspecto de la invención se dirige a una composición que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de un conjugado de un derivado/portador de fármacos citotóxico monomérico preparado por un método de la invención.

En una modalidad, el portador en el conjugado de portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico es un portador proteínico seleccionado de hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos e imitadores de anticuerpos.

En una modalidad preferida, el portador proteínico es un anticuerpo monoclonal humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.

En una modalidad preferida el anticuerpo humanizado se dirige contra el antígeno de superficie celular CD22.

En una modalidad particularmente preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-CD22 tiene especificidad para el CD22 humano y comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprenden un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas como H1 en la figura 1 (SEQ ID NO:1) para CDR-H1, como H2 en la figura 1 (SEQ ID NO:2) o H2' (SEQ ID NO:13) o H2'' (SEQ ID NO:15) o H2''' (SEQ ID NO:16) para CDR-H2, o como H3 en la figura 1 (SEQ ID NO:3) para CDR-H3, y comprende una cadena ligera en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas como L1 en la figura 1

para (SEQ ID NO:4) para CDR-L1, como L2 en la figura 1 (SEQ ID NO:5) para CDR-L2, o como L3 en la figura 1 (SEQ ID NO:6) para CDR-L3.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo anti-CD22 tiene una cadena pesada en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas en SEQ ID NO:1 para CDR-H1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16 para CDR-H2, o SEQ ID NO:3 para CDR-H3, y una cadena ligera en donde el dominio variable comprende un CDR que tiene al menos una de las secuencias dadas en SEQ ID NO:4 para CDR-L1, SEQ ID NO:5 para CDR-L2, o SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

Todavía en otra modalidad preferida, el anticuerpo anti-CD22 comprende SEQ ID NO:1 para CDR-H1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16 para CDR-H2, SEQ ID NO:3 para CDR-H3, SEQ ID NO:4 para CDR-L1, SEQ ID NO:5 para CDR-L2, y SEQ ID NO:6 para CDR-L3.

En una modalidad particularmente preferida el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo anti-CD22 humanizado injertado con CDR, y comprende una región variable de cadena ligera 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19), y una región de variable de cadena pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).

En otra modalidad particularmente preferida, el anticuerpo humanizado anti-CD22 es un anticuerpo injertado con CDR que tiene especificidad para el CD22 humano y comprende una cadena ligera que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO:28 y una cadena pesada que tiene una secuencia establecida en SEQ ID NO:30.

En una modalidad, el anticuerpo injertado con CDR es un anticuerpo variante que tiene una especificidad

47

aumentada para el CD22 humano y el anticuerpo se obtiene por un protocolo de maduración de afinidad.

En una modalidad, el fármaco citotóxico monomérico es caliqueamicina y se selecciona preferiblemente de la gamma caliqueamicina o la N acetil caliqueamicina.

En una modalidad, la composición puede contener opcionalmente un agente bioactivo adicional. Tal agente bioactivo puede ser un fármaco citotóxico un factor de crecimiento o una hormona.

Todavía otro aspecto de la invención se dirige a un método de tratamiento de un sujeto con un trastorno proliferativo, al administrar al sujeto una dosis terapéuticamente efectiva de la composición de la invención. La composición se pueden administrar subcutáneamente intraperitonealmente, intravenosamente, intraarterialmente, intramedularmente, intratecalmente, transdermalmente, transcutánea, intranasal, tópica, enteral, intravaginalmente, sublingualmente, o rectalmente. En una modalidad preferida la composición de la invención se administra intravenosamente.

En una modalidad la composición se administra a un sujeto humano que padece de una trastorno proliferativo tal como el cáncer. En una modalidad, preferida el cáncer es una malignidad de células B. La malignidad de células B puede ser una leucemia o linfoma que expresa un antígeno de superficie celular CD22.

Todavía en otra modalidad el cáncer es un carcinoma o un sarcoma.

Otro aspecto de la presente invención se dirige a un método de tratamiento de una malignidad de células B al administrar a un paciente con tal malignidad una

composición terapéuticamente efectiva que comprende un anticuerpo anti-CD22 citotóxico conjugado de la invención. En una modalidad, preferida la malignidad de células B es un linfoma, particularmente linfoma No Hodgkin.

En una modalidad el fármaco citotóxico usado para preparar los conjugados de la presente invención se selecciona del grupo que consiste de caliqueamicinas, tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifeno, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemiasterlinas, maitansinoides, y esperamicinas.

En una modalidad, preferida el fármaco citotóxico es gamma caliqueamicina o N- acetil caliqueamicina.

En otra modalidad, el tratamiento comprende la administración de un conjugado de fármaco citotóxico de la invención con uno o más agentes bioactivos seleccionados de anticuerpos factores de crecimiento, hormonas, citocinas, antihormonas, xantinas, interleucinas, interferones, y fármacos citotóxicos.

En una modalidad preferida el agente bioactivo es un anticuerpo y se dirige contra un antígeno de superficie celular expresado en malignidades de células B. En una modalidad adicional preferida, el anticuerpo dirigido contra antígenos de superficie celular expresado en las malignidades de células B se selecciona de un grupo que consiste de anticuerpos anti-CD19, anti-CD20 y anti-CD33. Tales anticuerpo incluyen el anticuerpo anti-CD20, rituximab (RituxanTM).

En otra modalidad los agentes bioactivos son citoxinas o factores de crecimiento e incluyen pero no se limitan a interleucina 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF.

En otra modalidad los agentes bioactivos son hormonas e incluyen estrógenos, andrógenos, progestinas, y corticosteroides.

Todavía en otra modalidad el agente bioactivo es un fármaco citotóxico seleccionado de doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carubicina, nogalamicina, menogarilo, pitarubicina, valrubicina, citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, azacitidina, doxifluridina, pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina, gougierotina, puromicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, procarbazina, metotrexato, fluoruracilos, etopósido, taxol, análogos de taxol, y mitomicina.

En una modalidad preferida, la composición terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-CD22 de fármacos citotóxicos conjugado se administra junto con una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento, en donde la combinación de agentes citotóxicos se selecciona de: CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y procarbazina); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona); COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona); CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazina, bleomicina, vincristina, y prednisona); M-

BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorin); ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, citarabina, bleomicina, y vincristina); MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina, y leucovorin); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, y vinblastina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina), ChIVPP (clorambucil, vinblastina, procarbazona, y prednisona); IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, y etopósido); MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, y etopósido); DHAP (dexametasona, citarabina de alta dosis, y cisplatina); ESHAP (etopósido, metilpredisolona, citarabina de alta dosis, y cisplatina); CEPP (B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona, y bleomicina); CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina, - y prednisona); y CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona).

En una modalidad preferida, la composición terapéuticamente efectiva del anticuerpo citotóxico anti-CD22 de fármaco conjugado se administra previo a la administración de una o más de las composiciones anteriores de fármacos citotóxicos. En otra modalidad preferida la

composición terapéuticamente efectiva del conjugado citotóxico de anticuerpo anti-CD22 y fármaco se administra posterior a una o más de las combinaciones anteriores de fármacos citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.

Otro aspecto de la invención se dirige a un método de tratamiento de linfomas agresivos que comprende administrar a un paciente que necesita del tratamiento, una composición terapéuticamente efectiva de un conjugado de anticuerpo anti- CD22 derivado de caliqueamicina monomérica junto con uno o más agentes bioactivos.

Todavía otro aspecto de la presente invención se dirige al uso de la composición de la invención, en el tratamiento de un sujeto con un trastorno proliferativo tal como el cáncer. En particular, el cáncer es una malignidad de las células B que expresa el antígeno CD22 en la superficie celular. En particular la malignidad de células B es una leucemia o un linfoma. En una modalidad, el cáncer es carcinoma o una leucemia.

En una modalidad, la dosis terapéuticamente efectiva de la composición se administra subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intraarterialmente, intramedularmente, intratecalmente, transdermalmente, transcutáneamente, intranasalmente, tópicamente, enteralmente, intravaginalmente, sublingualmente o rectalmente.

En una modalidad preferida la dosis terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención se administra intravenosamente.

Otro aspecto de la invención se dirige al uso de un conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado de

caliqueamicina monomérico de la presente invención, para uso en el tratamiento de un sujeto con una malignidad de células B tal como el linfoma No Hodgkin. En una modalidad el conjugado de anticuerpo/anti-CD22 derivado de caliqueamicina monomérica de la presente invención se administra con uno o más agentes bioactivos.

En una modalidad, los agentes bioactivos se seleccionan de un grupo que consiste de anticuerpo, factores de crecimiento, hormonas, citocinas, antihormonas, xantinas, interleucinas, interferones, y fármacos citotóxicos.

En una modalidad, preferida el agente bioactivo es un anticuerpo dirigido contra un antígeno de superficie celular expresado en las malignidades de células B tales como anticuerpos anti-CD19, anti-CD20 y anti-CD33. En una modalidad preferida el anticuerpo anti-CD20 es rituximab (RituxanTM).

En otra modalidad los agentes bioactivos incluyen citocinas o factores de crecimiento tales como interleucina 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF u hormonas que incluyen estrógenos, andrógenos, progestinas y corticosteroides.

En otra modalidad el agente bioactivo es un fármaco citotóxico seleccionado de doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carubicina, nogalamicina, menogaril, pitarubicina, valrubicina, citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, azacitidina, doxifluridina, pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina, gougierotina, puromicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, dacarbazina,

vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, procarbazona, metotrexato, flurouracilos, etopósido, taxol, análogos de taxol, y mitomicina.

En una modalidad preferida, la dosis terapéuticamente efectiva del conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado monomérico de caliqueamicina se administra junto con una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte del régimen del tratamiento, en donde la combinación de agentes citotóxicos se selecciona de CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y procarbazona); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona); COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona); CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazona, bleomicina, vincristina, y prednisona); M-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorin); ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, citarabina, bleomicina, y vincristina); MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina; prednisona, bleomicina, y leucovorin); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina); MOPP (mecloetamina; vincristina, prednisona y procarbazona) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, y vinblastina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina,

vinblastina, y dacarbazina); CHIVPP (clorambucil, vinblastina, procarbazina, y prednisona); IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, y etopósido); MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, y etopósido); DHAP (dexametasona, citaribina de alta dosis, y cisplatina); ESHAP (etopósido, metilpredisolona, citarabina de alta dosis, y cisplatina); CEPP (B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazina, prednisona, y bleomicina); CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina, y prednisona); CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona), ESHOP (etopósido, metilpredisolona, citarabina de alta dosis, vincristina y cisplatina); EPOCH (etopósido, vincristina, y doxorubicina por 96 horas con dosis de bolo de ciclofosfamida y prednisona oral), ICE (ifosfamida, ciclofosfamida, y etopósido), CEPP (B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazina, prednisona, y bleomicina), CHOP-B. (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y bleomicina, CEPP-B (ciclofosfamida, etopósido, procarbazina, y bleomicina, y P/DOCE (epirubicina o doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida, y prednisona).

En una modalidad preferida, el conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado monomérico de caliqueamicina se administra previo a la administración de una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.

En otra modalidad preferida la dosis terapéuticamente efectiva de un conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado monomérico de caliqueamicina se administra posterior a la administración de una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.

Todavía en otra modalidad preferida, la dosis

terapéuticamente efectiva del conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado monomérico de caliqueamicina se administra junto con un anticuerpo dirigido contra un antígeno de superficie celular en malignidades de células B, y comprende opcionalmente una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento.

En otro aspecto, la invención se dirige al uso de un conjugado de anticuerpo anti-CD22/derivado monomérico de caliqueamicina de la presente invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo. Tal medicamento se puede usar para tratar trastornos proliferativos de células B ya sea solos o en combinación con otros agentes bioactivos.

Breve Descripción de Las Figuras

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de los CDR de anticuerpo monoclonal de ratón 5/44 (SEQ ID NOS:1 a 6).

La figura 2 muestra la secuencia de ADN y de proteínas de la variable de cadena ligera (V_L) que es el dominio del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44.

La figura 3 muestra la secuencia completa del dominio variable de cadena pesada (V_H) del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44.

La figura 4 muestra la estrategia de separación del sitio de glicosilación y lisina reactiva en CDR-H2.

La figura 5 muestra el diseño de injertos para la secuencia de cadena ligera 5/44. DPK-9 es la secuencia de estructura del aceptor de la línea germinal humana. Las líneas verticales indican las diferencias entre los residuos humanos y de ratón. Las secuencias subrayadas

indican residuos del donador que se han retenido en el injerto. Los CDR se indican en letras *itálicas* en **negritas** (no se muestra para DPK-9). El injerto gL1 tiene 6 residuos de estructura del donador, gL2 tiene 7.

La figura 6 muestra el diseño de injertos para la secuencia de cadena pesada 5/44; DP7 es la secuencia de estructura del aceptor de línea germinal humana. Las líneas verticales indican diferencias dentro de los residuos humanos y de ratón. Las secuencias subrayadas indican los residuos del donador que ha sido retenidos en el injerto. Los CDR se indican en *itálicas*, las letras en **negritas** (no se muestran para DP7). Los injertos gH4 y gH6 tienen 6 residuos de estructura del donador. Los injertos gH5 y gH7 tienen 4 residuos de estructura del donador.

La figura 7 muestra el mapa del vector pMRR14.

La figura 8 muestra el mapa del vector pMRR10.1.

La figura 9 muestra los resultados del ensayo Biacore de los mutantes quiméricos 5/44.

La figura 10 muestra los oligonucleótidos para los ensamblajes de genes 5/44 gH1 y GL1.

La Figura 11 muestra el mapa de plásmidos del vector intermediario pCR2.1 (544gH1).

La figura 12 muestra el mapa de plásmidos del vector intermediario pCR2.1 (544gL1).

La figura 13 muestra los casetes de oligonucleótidos utilizados para hacer injertos adicionales.

La figura 14 es una gráfica que muestra un ensayo de competición entre un anticuerpo 5/44 de ratón etiquetado fluorescentemente y variantes injertadas.

La figura 15 es una gráfica que muestra un ensayo de competición entre un anticuerpo 5/44 de ratón etiquetado

fluorescentemente y variantes injertadas.

La figura 16 muestra el ADN completo y la secuencia de proteínas de las cadenas ligeras y pesadas injertadas.

La figura 17 es una representación esquemática de un conjugado de DMH de caliqueamicina con anticuerpo NAc-gamma.

La figura 18 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544 en el crecimiento de linfoma de células B RAMOS.

La figura 19 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544 en linfomas grandes de células B en un modelo de xenoinjerto in vivo en ratones descubiertos.

La figura 20 es una gráfica que compara los efectos de CMC-544 hecho con el proceso de conjugación CMA-676 y el proceso de conjugación CMC-544 en el crecimiento del linfoma RL.

La figura 21 es una gráfica que muestra el linfoma RL tratado con rituximab (RituxanTM) que es susceptible a tratamiento con CMC-544.

La figura 22 es una gráfica que muestra el efecto de rituximab (RituxanTM) en el efecto citotóxico de CMC-544.

La figura 23 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544, rituximab (RituxanTM), y CMA-676 en la supervivencia de ratones SCID con un linfoma temprano diseminado RAMOS B.

La figura 24 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544, rituximab (RituxanTM), y CMA-676 en la supervivencia de ratones SCID con un linfoma tardío diseminado RAMOS B.

La figura 25 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544, rituximab (RituxanTM), y CMA-676 en la supervivencia de ratones SCID con linfoma tardío diseminado RAMOS B.

La figura 26 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544, rituximab (RituxanTM), y CMA-676 en la

supervivencia de ratones SCID con linfoma tardío diseminado RAMOS B.

La figura 27 es una gráfica que muestra el efecto de CMC-544, rituximab (RituxantTM), y CMA-676 en la supervivencia de ratones SCID con linfoma tardío diseminado RAMOS B.

La figura 28 es una gráfica que muestra la actividad anti-tumor CMC-544 con y sin rituximab (RituxanTM) sobre un linfoma que no es Hodgkin RL.

La figura 29 es una gráfica que muestra la actividad anti-tumor de CMC-544 y CHOP en un linfoma RL que no es Hodgkin.

Descripción Detallada de la Invención

Los conjugados de la presente invención comprenden un fármaco citotóxico derivado con una ligadura que incluye cualquier grupo reactivo que reacciona con un portador proteínico para formar un conjugado portador proteínico derivado de un fármaco citotóxico. Específicamente, los conjugados de la presente invención comprenden un fármaco citotóxico derivado con una ligadura que incluye cualquier grupo reactivo que reacciona con un anticuerpo usado como un portador proteínico, para formar un conjugado de anticuerpos de fármacos citotóxico. Específicamente el anticuerpo reacciona contra un antígeno de superficie celular en malignidades de células B. Se describe a continuación un proceso mejorado para la elaboración y purificación de tales conjugados. El uso de cosolventes en particular, aditivos y condiciones de reacción específicas junto con el proceso de separación, resulta en la formación de un conjugado de anticuerpo/derivado de fármaco

citotóxico monomérico con una reducción importante en el LCF. La forma monomérica, opuesto a la forma agregada tiene un valor terapéutico importante y minimiza el LCF y reduce substancialmente los resultados de agregación en la utilización en el material de partida de anticuerpos en una forma terapéuticamente significativa al evitar que el LCF compita con una fracción más altamente conjugada (HCF).

I. PORTADORES

Los agentes portadores/objetivo de la presente invención son preferiblemente agentes portadores/objetivo proteínicos. Se incluyen como agentes portadores/proteínicos las hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, imitaciones de anticuerpos y sus contrapartes preparadas por ingeniería genéticamente o enzimáticamente, referidas de aquí en adelante o singularmente como un grupo de portadores. La propiedad esencial de un portador es su capacidad de reconocer o enlazarse a un antígeno o receptor asociado con células indeseables e interiorizarse posteriormente. Los ejemplos de portadores que aplican en la presente invención se describen en la patente de E.U.A No. 5,053, 394, que se incorpora en la presente en su totalidad. Los portadores preferidos para su uso en la presente invención son anticuerpos e imitadores de anticuerpos.

Se han utilizado diversos andamiajes de proteínas que no son de inmunoglobulina, para generar imitaciones de anticuerpo que se enlazan a epítomos antígenicos con la especificidad de un anticuerpo (publicación PCT No. WO 00/34784). Por ejemplo, un andamiaje de "minicuerpo" que se

relaciona con el pliegue de inmunoglobulina se ha diseñado al suprimir tres hebras beta de un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal (Tramontano et al., J. Mol. Recognit. 7:9, 1994). Esta proteína incluye 61 residuos y se puede usar para presentar dos circuitos hipervariables. Estos dos circuitos han sido aleatorizados y seleccionados los productos para enlace de antígenos, pero hasta ahora la estructura parece estar de alguna forma limitada en utilidad debido a los problemas de solubilidad. Otra estructura utilizada para desplegar circuitos es un tendamistat, una proteína que inhibe específicamente las alfa amilasas de mamíferos y es un intercalado de lámina beta de 6 hebras y 74 residuos que se mantienen junto con dos enlaces bisulfuro (McConnell and Hoess, J. Mol. Biol. 250: 460, 1995). Este andamiaje incluye tres circuitos pero hasta la fecha, solamente se han examinado dos de estos circuitos para un potencial de aleatorización.

Se han probado otras proteínas como estructuras y se han utilizado para desplegar residuos aleatorios en superficies de hélice alfa (Nord et al., Nat. Biotechnol. 15: 772, 1997; Nord et al., Protein Eng. 8: 601, 1995), circuitos entre las hélices alfa en los conjuntos de hélices alfa (Ku and Schutz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6552, 1995), y circuitos limitados por puentes de bisulfuro tales como aquellos de los inhibidores de proteasa pequeños (Markland et al., Biochemistry 35: 8045, 1996; Markland et al., Biochemistry 35: 8058, 1996; Rottgen and Collins, Gene 164: 243, 1995; Wang et al., J. Biol. Chem. 270: 12250, 1995).

Ejemplos de los portadores de anticuerpos que se pueden usar en la presente invención incluyen anticuerpos

monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, y fragmentos biológicamente activos de los mismos. Preferiblemente tales anticuerpos se dirigen contra los antígenos de superficie celular expresados en células y/o tejidos objetivo en trastornos proliferativos tales como cáncer. Ejemplos de los anticuerpos específicos dirigidos contra antígenos de superficie celular en células objetivo incluyen sin limitación, anticuerpos contra el antígeno CD22 que se sobreexpresa en la mayoría de los linfomas de células B, G5/44, una forma humanizada de un anticuerpo monoclonal anti-CD22 murino, anticuerpos contra el antígeno de superficie de células CD33, que prevalece en ciertos tumores mieloides humanos especialmente leucemia mieloide aguda hP67.6, una forma humanizada de anticuerpo murino anti-CD33 (ver patente de E.U. No. 5,773,001); un anticuerpo contra el antígeno PEM que se encuentra en muchos tumores de origen epitelial designado mP67.6 (ver I. D. Bernstein et al., J. Clin. Invest. 79: 1153 (1987) y I. D. Bernstein et al., J. Immunol. 128: 867-881 (1992)); y un anticuerpo humanizado contra el antígeno de carbohidrato de Lewis y sobreexpresado en muchos tumores sólidos designados como hu3S193, (ver patente de E.U. No 6,310, 185 B1). Además existen varios anticuerpos comercialmente disponibles tales como rituximab (RituxanTM) y trastuzumab (HerceptinTM), que también se pueden usar como agentes de direccionamiento/portadores. Rituximab (RituxanTM) es un anticuerpo quimérico anti-CD20 usado para el tratamiento de diversos linfomas de células B y trastuzumab (HerceptinTM) es un anticuerpo humanizado anti-Her2 usado para tratar el cáncer de mama.

Se ejemplifica para su uso en la presente como un portador en la presente invención, una molécula de anticuerpo humanizado injertado con CDR dirigido contra el antígeno de superficie celular CD22, designado como G5/44. Este anticuerpo es una forma humanizada de un anticuerpo monoclonal murino que se dirige contra el antígeno de superficie celular anti-CD22 que es frecuente en ciertos linfomas humanos. El término "una molécula de anticuerpos injertada con CDR" como se usa en la presente se refiere a una molécula de anticuerpo en donde la cadena ligera y/o pesada contiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRS) que incluyen si se desea un CDR modificado (de aquí en adelante CDR) a partir de un anticuerpo donador (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertado en una estructura de región variable de cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Preferiblemente tal anticuerpo injertado con CDR tiene dominio variable que comprende regiones de estructura del aceptor humanas así como uno o más CDR del donador antes referidos.

Cuando se injertan los CDR, se puede usar cualquier región variable del aceptor adecuada en una secuencia de estructura que tenga referencia al tipo/clase del anticuerpo del donador a partir del cual se derivan los CDR incluyendo regiones de estructura humanas de primates y de ratón. Ejemplos de las estructuras humanas que se pueden usar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat et al. Seq. of Proteins of Immunol. Interest, 1: 310-334 (1994)). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden usar para la cadena pesada REI se puede usar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se puede usar para la cadena

ligera y pesada.

En un anticuerpo injertado con CDR con la presente invención se puede usar como un anticuerpo aceptor uno que tengan cadenas que sean homólogas a las cadenas del anticuerpo donador. Las cadenas ligera y pesada del aceptor no necesariamente necesitan derivarse del mismo anticuerpo y pueden si se desea, comprender cadenas compuestas que tengan regiones de estructura derivadas de cadenas diferentes.

También en un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, las regiones de estructura no necesitan tener exactamente la misma secuencia que aquellas del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, se pueden cambiar los residuos no usuales a residuos que se presentan más frecuentemente para esa clase o tipo de cadena del aceptor. Alternativamente, los residuos seleccionados en las regiones de estructura del aceptor se pueden cambiar de manera que correspondan al residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo del donador, o a un residuo que tiene una substitución conservadora para el residuo que se encuentra en la misma posición en el anticuerpo del donador. Tales cambios se deben mantener en un mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donador. Un protocolo para la selección de residuos en las regiones de estructura del aceptor que se puede necesitar cambiar se establece publicación PCT No. WO 91/09967, que se incorpora aquí en su totalidad.

Los residuos del donador son residuos del anticuerpo donador esto es, el anticuerpo a partir del cual se derivaron originalmente los CDR.

El anticuerpo de la presente invención puede

comprender una cadena pesada en donde el dominio variable comprende como CDR-H2 (como se define por Kabat et al., (supra)) un H2' en el cual se ha retirado una secuencia del sitio de glicosilación potencial con objeto de incrementar la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

Alternativa o adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención puede comprender una cadena pesada en donde el dominio variable comprende como CDR-H2 (como se define por Kabat et al., (supra)) un H2' en el cual un residuo de lisina está en la posición 60. Este residuo de lisina que se localiza en una posición expuesta dentro de CDR-H2, y se considera que tiene el potencial para reaccionar con los agentes de conjugación que resulta en una reducción de afinidad de enlace del antígeno, se substituye con un aminoácido alternativo.

Adicionalmente el anticuerpo de la presente invención puede comprender una cadena pesada en donde el dominio variable comprende como CDR-H2 (como se define por Kabat et al., (supra)) un H2'' en el cual tanto en la secuencia del sitio de glicosilación potencial como el residuo de lisina en la posición 60, se substituyen con aminoácidos alternativos.

El anticuerpo de la presente invención puede comprender: un anticuerpo completo que tengan cadenas ligeras y pesadas desde longitud completa; un fragmento biológicamente activo del mismo tal como Fab, modificado Fab, fragmento Fab', $F(ab')_2$ o Fv; un monómero o dímero de cadena pesada o ligera o un anticuerpo de cadena sencilla por ejemplo, un Fv de cadena sencilla en el cual los dominios variables de cadena ligera y pesada se unen por una ligadura de péptidos. Similarmente, las regiones

variables de cadena ligera y pesada se pueden combinar con otros dominios de anticuerpo como sea adecuado.

El anticuerpo de la presente invención también puede incluir un fragmento Fab modificado en donde la modificación es la adición de uno o más aminoácidos para permitir la colocación de una molécula reportera o efectora al extremo de la terminal C de su cadena pesada. Preferiblemente los aminoácidos adicionales forman una región de articulación modificada que contiene uno o dos residuos de cisteína a los cuales la molécula reportera o del efector se pueden colocar.

Los dominios de región constante del anticuerpo de la presente invención si están presentes, se pueden seleccionar haciendo referencia a a la función propuesta del anticuerpo, y en particular a las funciones del efector que puedan o no requerirse. Por ejemplo los dominios de región constante pueden ser dominios humanos IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En particular los dominios de región constante IgG humanos se pueden usar especialmente los isotipos IgG1 y IgG3, cuando el anticuerpo se pretende para usos terapéuticos y se requieren las funciones del efector de anticuerpos. Alternativamente, los isotipos IgG2 y IgG4 se pueden usar o se pueden mutar la región con IgG1 Fc para suspender la función del efector cuando se pretenda el anticuerpo para propósitos terapéuticos y las funciones del efector de anticuerpos no se requieran o se deseen.

El anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de enlace de al menos 5×10^{-8} M, preferiblemente al menos 1×10^{-9} M, más preferiblemente al menos 0.75×10^{-10} M, y más preferiblemente al menos 0.5×10^{-10} M.

En una modalidad, la presente invención se refiere a



conjugados de inmunotoxinas y métodos para la elaboración de estos conjugados, usando variantes de anticuerpos o imitaciones de anticuerpos. En una modalidad preferida las variantes del anticuerpo de la presente invención se dirigen contra CD22 y despliegan una afinidad mejorada con CD22. Tales variantes se pueden obtener por diversos protocolos de maduración de afinidad que incluyen la mutación de los CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), mezclado de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutadoras de E.coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), mezclado de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), despliegue de fago (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Crameri et al., Nature, 391, 288-291, 1998).

Se puede usar cualquier sistema de vector/célula hospedadora adecuada para la expresión de secuencias de ADN que codifiquen el portador que incluyen los anticuerpos de la presente invención. Se pueden usar sistemas bacterianos por ejemplo E.coli y otros sistemas microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos Fab y F (ab')₂, y especialmente fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla, por ejemplo Fvs de cadena sencilla. Se pueden usar sistemas de expresión eucarióticos de células hospedadoras, por ejemplo, de mamíferos para la producción de anticuerpos mayores que incluyen moléculas de anticuerpos completas. Las células hospedadoras de mamíferos adecuadas incluyen CHO, células de mieloma, células de levadura, células de insectos, células de hibridoma, células NSO, VERO o PER C6. Los sistemas de expresión adecuados también incluyen

animales y plantas transgénicas.

II. AGENTES TERAPÉUTICOS

Los agentes terapéuticos adecuados para su uso en la presente invención, son fármacos citotóxicos que inhiben o fragmentan la polimerización de tubulina, agentes de alquilación que se enlazan y fragmentan el ADN y agentes que inhiben la síntesis de proteínas o proteínas celulares esenciales tales como proteína cinasas, enzimas, y ciclinas. Ejemplos de tales ejemplos citotóxicos incluyen pero no se limitan a tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifen, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemiasterlinas, caliqueamicinas, esperamicinas y maitansinoides. Los fármacos citotóxicos preferidos son las caliqueamicinas que son un ejemplo de los antibióticos antitumor de trisulfuro de metilo. Los ejemplos de las caliqueamicina adecuadas para su uso en la presente invención, se describen por ejemplo, en la patente de E.U. No. 4,671,958; patente de E.U. No. 4,970,198, patente de E.U. No. 5,053,394, patente de E.U. No. 5,037,651; y patente de E.U. No. 5,079,233, que se incorporan aquí en su totalidad. La caliqueamicinas preferidas son los derivados de caliqueamicina gamma o los derivados de N acetil gamma caliqueamicina.

III. CONJUGADOS DE DERIVADO/PORTADOR DE FÁRMACO CITOTÓXICO.

Los conjugados de la presente invención tienen la fórmula $Pr (-X-W)_m$ en donde:

Pr es un portador proteínico,

X es un enlace que comprende un producto de cualquier

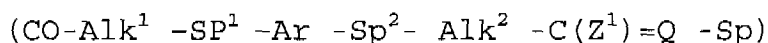
grupo reactivo que pueda reaccionar con un portador proteínico

W es el fármaco citotóxico;

m es la carga promedio para un producto de conjugación tal como la caliqueamicina que constituye 4-10% del conjugado en peso y

$(-X-W)_m$ es un fármaco citotóxico

Preferiblemente, X tiene la fórmula



en donde

Alk^1 y Alk^2 es independientemente un enlace o una cadena ramificada o no ramificada de (C_1-C_{10}) alquileo;

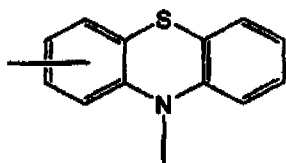
Sp^1 es un enlace, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, -NR'-, -N $(CH_2CH_2)_2$ N-, o -X-Ar'-Y-(CH₂)_n-Z en donde X, Y, y Z es independientemente un enlace, -NR'-, -S-, o -O-, con la condición de que cuando n=0, entonces al menos uno de Y y Z debe ser un enlace y Ar' es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos, tres grupos de (C_1-C_5) alquilo, (C_1-C_4) alcoxi, (C_1-C_4) tialcoxi, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR', o -S(CH₂)_nCONHR', con la condición de que cuando Alk^1 es un enlace, Sp^1 es un enlace;

n es un entero desde 0 hasta 5;

R' es una cadena ramificada o no ramificada (C_1-C_5) opcionalmente sustituida por uno o dos grupos de -OH, (C_1-C_4) alcoxi, (C_1-C_4) tioalcoxi, halógeno, nitro, (C_1-C_3) dialquilamino, o (C_1-C_3) trialquilamonio -A donde A- es un anión farmacéuticamente aceptable que completa una sal;

Ar es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos, o tres grupos de (C_1-C_6) alquilo, (C_1-C_5) alcoxi, (C_1-C_4) tioalcoxi, halógeno, nitro, -COOR', -

CONHR', $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$ en donde n y R' son como se definieron hasta aquí o un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, o 2, 7-naftilideno o



con cada naftilideno o fenotiazina opcionalmente substituido con uno, dos, tres o cuatro grupos de (C_1-C_6) alquilo, (C_1-C_5) alcoxi, (C_1-C_4) tioalcoxi, halógeno, nitro, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$ en donde n y R' son como se definen arriba, con la condición de que cuando Ar es fenotiazina, Sp^1 es un enlace solo unido a nitrógeno ;

Sp^2 es un enlace, $-S-$, o $-O-$, con la condición de que cuando Alk^2 es un enlace, Sp^2 es un enlace;

Z^1 es H, (C_1-C_5) alquilo, o fenilo opcionalmente substituido con uno, dos, o tres grupos de (C_1-C_5) alquilo, (C_1-C_5) alcoxi, (C_1-C_4) tioalcoxi, halógeno, nitro, $-COOR'$, $-ONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$ en donde n y R' son como se define arriba;

Sp es un radical divalente o trivalente (C_1-C_{18}) de cadena ramificada, radical aril o heteroarilo divalente o trivalente radical, radical divalente o trivalente (C_3-C_{18}) cicloalquilo o heterocicloalquilo radical divalente o trivalente aril- o heteroaril-arilo (C_1-C_{18}) , radical divalente o trivalente cicloalquil- o heterocicloalquil-alquilo (C_1-C_{18}) o radical divalente o trivalente (C_2-C_{18}) no saturado alquilo, en donde heteroarilo es preferiblemente furilo, tienilo, N-metilpirrolilo, piridinilo, n-metilimidazolilo, oxazolilo, pirimidinilo, quinolilo,

91

isoquinolilo, N-metilcarbazoilo, aminocumarinilo, o fenazinilo y en donde si Sp es un radical trivalente, Sp puede estar adicionalmente substituido por (C₁-C₅) dialquilamino inferior, (C₁-C₅) alcoxi inferior, hidroxilo, o grupos (C₁-C₅) alquiltio inferior; y

Q es =NHNCO-, =NHNCS-, =NHNCONH-, =NHNCSNH-, o =NHO-.

Preferiblemente, Alk¹ es una cadena ramificada o no ramificada (C₁-C₁₀) alquilenos; Sp' es un enlace, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, o -NR' en donde R' es como se definió hasta aquí, con la condición de que cuando Alk' es un enlace, Sp¹ es un enlace;

Ar es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente substituido con uno, dos o tres grupos de (C₁-C₆) alquilo, (C₁-C₅) alcoxi, (C₁-C₄) tioalcoxi, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR' -S(CH₂)NCOOR' -O(CH₂)_nCONHR', o -S(CH₂)_nCONHR' en donde n y R' son como se definió hasta aquí, o Ar es un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, o 2,7-naftilideno cada uno opcionalmente substituido con uno, dos, tres, o cuatro grupos de (C₁-C₆) alquilo, (C₁-C₅) alcoxi, (C₁-C₄) tioalcoxi, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)NCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' o -S(CH₂)_nCONHR'.

Z¹ es (C₁-C₅) alquilo, o fenilo opcionalmente substituido con uno, dos o tres grupos de (C₁-C₅) alquilo, (C₁-C₄) alcoxi, (C₁-C₄) tioalcoxi, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR', o -S(CH₂)_nCONHR'; Alk² y Sp² son juntos un enlace; y Sp y Q son como se definió inmediatamente arriba.

La patente de E.U. No. 5,773, 001, que se incorpora aquí en su totalidad, describe enlaces que se pueden usar con derivados nucleofílicos, particularmente hidrazidas y

nucleófilos relacionados preparados a partir de las caliqueamicinas. Estas ligaduras son especialmente útiles en donde una mejor actividad se obtiene cuando la ligadura formada entre el fármaco y el enlace es hidrolizable. Estos ligadores contienen dos grupos funcionales. Un grupo típicamente es un ácido carboxílico que se utiliza para reaccionar con el portador. El grupo funcional ácido cuando se activa adecuadamente, puede formar una ligadura de amida con un grupo amina libre del portador tal como por ejemplo, la amida en la cadena lateral de una lisina de un anticuerpo u otro portador proteínico. El otro grupo funcional comúnmente es un grupo carbonilo, esto es, un aldehído o una acetona que reaccionará con el agente terapéutico modificado adecuadamente. Los grupos carbonilo pueden reaccionar en un grupo hidrazida en el fármaco para formar una ligadura de hidrazona. Esta ligadura se hidroliza lo que permite la liberación del agente terapéutico del conjugado después de enlazarse a las células objetivo.

Una ligadura bifuncional más preferida para su uso en la presente invención es el ácido 4-(4-acetifenoxi)butanoico (AcBut) que resulta en un producto preferido en donde el conjugado consiste de -caliqueamicina, γ -caliqueamicina o N-acetil γ caliqueamicina funcionalizada para reaccionar con la 3-mercapto-3metil butanil hidrazida, la ligadura AcBut y un portador del direccionamiento del anticuerpo IgG humano o humanizado.

IV. CONJUGACION MONOMÉRICA

La naturaleza natural hidrofóbica de muchos fármacos citotóxicos que incluyen las caliqueamicinas, crea

dificultades en la preparación de conjugados monoméricos con buenas cargas de fármaco y rendimientos razonables que son necesarios para aplicaciones terapéuticas. La aplicación hidrofóbica aumentada de la ligadura suministrada por los enlazadores tales como la ligadura AcBut descrita en la patente EUA 5,773,001, así como la distancia covalente aumentada que separa al agente terapéutico del portador (anticuerpo), incrementa este problema.

La agregación de los conjugados del portador/derivados de fármaco citotóxico con mayores cargas de fármaco sucede debido a la naturaleza hidrofóbica de los fármacos. La carga de fármacos tiene a menudo limitaciones para obtener cantidades razonables del producto monomérico. En algunos casos tales como en los conjugados en la patente de EUA 5,877,296 es a menudo difícil hacer conjugados en rendimientos útiles con cargas útiles para aplicaciones terapéuticas usando las condiciones de reacción descritas en la patente de EUA No. 5,053,394 debido a la agregación excesiva. Estas condiciones de reacción utilizan al DMF como el co-solvente en la reacción de conjugación. Se necesitan por lo tanto métodos que permitan un rendimiento/cargas superiores de fármacos sin agregación sin la pérdida inherente de material.

Las mejoras para reducir la agregación se describen en las patentes de EUA 5,712,374 y 5,714,586 que se incorporan aquí en su totalidad. Se describen en esas patentes los portadores proteínicos que incluyen pero no se limitan a proteínas tales como los anticuerpos humanos o humanizados que se hacen para atacar a los agentes terapéuticos citotóxicos, tales como por ejemplo hP67.6 y los

anticuerpos humanizados aquí descritos. En esas patentes, el uso de una solución amortiguada compatible con proteínas no nucleofílicas que contiene (i) propilenglicol como un solvente y (ii) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C₆-C₁₈, se encuentra que produce generalmente un fármaco citotóxico monomérico con conjugados de portador/derivados con un rendimiento/carga de fármaco superior y una agregación disminuida que tiene una actividad excelente. Los ácidos preferidos aquí descritos fueron los ácidos C₇ a C₁₂ y el ácido más preferido fue el ácido octanoico y (tal como el ácido caprílico) o sus sales. Las soluciones amortiguadoras preferidas para conjugados hechas a partir de ésteres de N-hidroxisuccinimida (OSu) u otros ésteres comparablemente activados fueron solución salina amortiguada de fosfato (PBS) o el ácido N-2-hidroxietil piperacina-N'-2etanosulfónico (solución amortiguadora HEPES). La solución amortiguada usada en esas soluciones de conjugación no puede contener aminas libres o nucleófilos. Para otros tipos de conjugados, se pueden determinar fácilmente soluciones amortiguadoras aceptables. Alternativamente el uso de una solución amortiguadora compatible con proteínas no nucleofílicas que contienen t-butanol sin el aditivo adicional, también se encuentra que produce conjugados de portador/derivado monomérico de caliqueamicina con un rendimiento superior de fármacos y una agregación disminuida.

La cantidad de co-solvente necesaria para formar un conjugado monomérico varía de alguna manera de proteína a proteína, y se puede determinar por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica sin experimentación

indebida. La cantidad necesaria de aditivo para formar efectivamente un conjugado monomérico también varía de anticuerpo a anticuerpo. Esta cantidad también se puede determinar por alguien con experiencia ordinaria en la técnica sin experimentación indebida. En las patentes de EUA No.5,712,374 y 5,714,586, las adiciones de propilenglicol en cantidades que van desde 10% a 60% preferiblemente 10% a 40% y más preferiblemente alrededor de 30% en volumen de la solución total y un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C_6-C_{18} o su sal, preferiblemente ácido caprílico o su sal, en cantidades que van desde 20mM a 100mM, preferiblemente de 40mM a 90mM y más preferiblemente alrededor de 60mM a 90mM, se agregaron a reacciones de conjugación para producir conjugados monoméricos de portador/derivados de fármaco citotóxicos con un rendimiento/carga superior de carga y una agregación disminuida. Otros co-solventes orgánicos compatibles con proteínas diferentes al propilen glicol tales como el etilen glicol, etanol, DMF, DMSO, también se pueden usar. Se puede usar algo o todo el co-solvente orgánico para transferir el fármaco en la mezcla de conjugación.

Alternativamente en esas patentes, la concentración del ácido carboxílico C_6-C_{18} o su sal se puede incrementar hasta 150-300 mM y el co-solvente hasta 1-10%. En una modalidad el ácido carboxílico fue ácido octanoico o su sal. En una modalidad preferida, el ácido carboxílico fue ácido decanoico o su sal. En otra modalidad preferida el ácido carboxílico fue ácido caprílico o su sal que estuvo presente a una concentración de 200mM de ácido caprílico junto con 5% de propilenglicol o etanol.

En otra modalidad alternativa en esas patentes, se

puede agregar t-butanol a concentraciones en el intervalo desde 10% a 25%, preferiblemente 15% en volumen de la solución total, a la reacción total de conjugación para producir conjugados monoméricos de portador/derivados de fármaco citotóxico con una carga/rendimiento superior de fármaco y una agregación disminuida.

Estas condiciones de conjugación establecidas se aplicaron a la formación de CMA-676 (Gemtuzumab Ozogamicin), que se vende ahora comercialmente como MylotargTM. Desde la introducción de este tratamiento para la leucemia mieloide aguda (AML), se ha aprendido a través del uso de la cromatografía de intercambio de iones que la caliqueamicina no se distribuye en el anticuerpo en una forma uniforme. La mayoría de la caliqueamicina es aproximadamente la mitad del anticuerpo mientras que la otra mitad existe en un LCF que solamente contiene cantidades pequeñas de caliqueamicina. Consecuentemente, existe una necesidad crítica de mejorar los métodos para configurar fármacos citotóxicos tales como las caliqueamicinas a portadores que minimicen la cantidad de agregación y permitan una carga superior de fármaco uniforme con un rendimiento significativamente mejorado del producto conjugado.

Un ejemplo específico es aquel del conjugado G5/44-NAC- DMH gamma caliqueamicina que se refiere como AcBut y se muestra genéricamente en la figura 17. La reducción de la cantidad de LCF hasta <10% del anticuerpo total se desea para el desarrollo de CMC-544 y se consideraron diversas opciones para la reducción de los niveles de LCF. Otros atributos del inmunconjugado tales como el enlace de antígenos y la citotoxicidad no se deben afectar por la

solución final. Las opciones consideradas incluyen modificación física o genética del anticuerpo, las técnicas de separación cromatográficas o la modificación de las condiciones de reacción.

La reacción del anticuerpo G5/44 con la NAc-gamma-caliqueamicina DMH AcBut OSu usando las condiciones de reacción antiguas (condiciones del proceso CMA-676) resultan en un producto con propiedades físicas similares (carga de fármaco, LCF y agregación) como CMA-676. Sin embargo, el alto nivel (50-60%) de LCF presente después de la conjugación parece indeseable. Se determinaron condiciones óptimas de reacción a través de una metodología de diseño experimental estadístico en la cual las variables de reacción claves tales como temperatura, pH, entrada de un derivado de caliqueamicina y concentración de aditivos se evaluaron. El análisis de estos experimentos demostró que la entrada de caliqueamicina y la concentración de aditivos tuvo los efectos más importantes al nivel de una fracción conjugada baja de un LCF y la formación de agregados, mientras que la temperatura y el pH tuvieron influencias menores. En experimentos adicionales también se demostró que las concentraciones de portador de proteína (anticuerpo) y co-solvente (etanol) fueron similarmente de importancia menor (en comparación con la entrada de caliqueamicina y la concentración de aditivos) al controlar el LCF y los niveles de agregado. Con objeto de reducir el LCF hasta <10%, se incrementa la entrada de caliqueamicina desde 3% a 8.5% (w/w) con relación a la cantidad de anticuerpo en la reacción. Se cambio en aditivo del ácido octanoico o su sal a una concentración de 200 mM (proceso CMA-676) al ácido decanoico o su sal a una concentración de

37.5 mM. La reacción de conjugación avanzó mejor a una temperatura ligeramente elevada (30-35°C) y a un pH de (8.2-8.7). Las condiciones de reacción que incorporan estos cambios redujeron el LCF hasta debajo del 10% mientras se incrementa la carga de caliqueamicina y se refiere de aquí en adelante como una condición del proceso CMC-544 o condiciones nuevas del proceso. Una comparación de los resultados obtenidos con las condiciones del proceso CMA-676 se muestra en la tabla 1.

TABLA 1 COMPARACION DE LAS CONDICIONES DEL PROCESO CMA-676

Y CMC-544

*no se sabe de donde
sabe este conjugado.*

CONDICIONES/RESULTADOS	CONDICIONES DEL PROCESO CMA-676	CONDICIONES DEL PROCESO CMC-544
Entrada de caliqueamicina	3.0% (base en peso de polvo p/p)	8.5% (p/p)
Identidad del aditivo y temperatura de concentración	Ácido octanoico/sodio octanoico; 200 mM 26°C	Ácido decanoico/decanoato de sodio; 37.5 mM 31-35°C
PH	7.8	8.2-8.7
Carga de caliqueamicina (por ciento en peso por el ensayo UV)	2.4-3.5	7.0-9.0
Fracción conjugada baja (LCF) (antes de la purificación)	45.65 % área CLAR	<10%
Agregación (antes de la purificación)	-5%	<5%
Agregación (después de la purificación)	≤2%	<2%

El incremento de entrada de caliqueamicina aumenta la carga de fármaco por 2.5-3.0 por ciento en peso hasta 7.0-9.0 (más típicamente 7.5-8.5) por ciento en peso, y resulta en ningún incremento en la agregación de proteínas en la reacción. Debido a la reducción de agregado y de LCF, las condiciones del proceso CMC-544 resultan en un producto más homogéneo. El CMC-544 se ha preparado de manera que se

reproduce por este nuevo procedimiento de conjugación a una escala de anticuerpos de multigramos.

En las reacciones anteriores, la concentración del anticuerpo puede ir desde 1 a 15 mg/ml y la concentración del derivado del caliqueamicina por ejemplo el ester de N-Acetil gamma-caliqueamicina DMH AcBut OSu (usado para fabricar los conjugados que se muestran en la figura 17) va desde alrededor de 4.5-11% en peso del anticuerpo. El co-solvente fue el etanol para el cual se han demostrado los resultados a concentraciones que van desde 6 hasta 11.4% (base en volumen). Se efectuaron las reacciones en el ácido PBS, HEPES, N-(2-hidroxietil) piperacino-N'-(4-butansulfónico) (HEPBS) u otra solución amortiguadora compatible con un pH de 8 a 9 o una temperatura que va desde 30°C hasta alrededor de 35°C y para tiempos que van desde 15 minutos a 24 horas. Aquellos que son expertos en la técnica pueden fácilmente determinar intervalos aceptables de pH para otros tipos de conjugados. Para diversos anticuerpos el uso de variaciones ligeras en las combinaciones de los aditivos antes mencionados se ha encontrado que mejora la carga de fármacos y el rendimiento monomérico de conjugados, y se entiende que cualquier portador particular de proteínas puede requerir algunas alteraciones menores en las condiciones exactas o en la elección de aditivos para lograr los resultados óptimos.

V. PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE CONJUGADOS.

Después de la conjugación se pueden separar los conjugados monoméricos de los reactivos no conjugados (tal como un portador proteínico y un fármaco citotóxico libre/caliqueamicina) y/o la forma agregada de los conjugados

por métodos convencionales por ejemplo cromatografía de exclusión de tamaño (SEC, por sus siglas en inglés), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) cromatografía de intercambio de iones (IEC, por sus siglas en inglés) o cromatofocalización (CF, por sus siglas en inglés). Los conjugados purificados son monoméricos y contienen usualmente de 4 a 10% en peso de un fármaco citotóxico/caliqueamicina. En una modalidad preferida los conjugados se purifican usando cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). En los procesos previamente usados para la fabricación a escala de la producción de los conjugados anticuerpos de caliqueamicina/fármaco citotóxico (proceso CMA-676) la etapa única de separación posterior a la conjugación empleada fue cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Aunque esta etapa es bastante efectiva tanto para retirar el conjugado agregado como para lograr el intercambio de solución amortiguadora para la formulación es ineficaz al reducir el contenido de LCF. Consecuentemente, el proceso basado en SEC se soporta completamente en la química de la reacción de conjugación para controlar el contenido LCF del producto final. Otra desventaja de SEC es la limitación del volumen de la mezcla de reacción de conjugados aplicada a la columna (que no excede típicamente el 5% del volumen de lecho de la columna de proceso). Esto limita severamente el tamaño del lote (y por lo tanto la capacidad de producción) que se puede soportar en un espacio de producción dado. Finalmente, el proceso de purificación SEC también resulta en una dilución importante de la solución de conjugado lo cual coloca restricciones a la concentración de proteína que se puede lograr confiablemente en la formulación.

Cuando un fármaco citotóxico tiene una naturaleza

altamente hidrofóbica tal como un derivado de caliqueamicina y se usa en un conjugado, la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) es un candidato preferido para suministrar una separación efectiva del anticuerpo conjugado y no conjugado. La HIC presenta 3 ventajas claves sobre SEC: (1) tiene la capacidad de reducir eficientemente el contenido LCF así como el agregado; (2) la capacidad de carga de columna para el HIC es mucho mayor y (3) HIC evita la dilución excesiva del producto.

Diversos medios HIC de alta capacidad adecuados para un uso a escala de producción tales como la butil, fenil y octil sefarosa de flujo rápido 4 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), pueden separar efectivamente componentes y agregados no conjugados del conjugado del componente monomérico conjugados que siguen al proceso de conjugación.

VI. CONJUGACIONES Y FORMULACIONES

La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de una composición/formulación terapéutica o de diagnóstico que comprende mezclar el conjugado de portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico de la presente invención junto con un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

El conjugado de portador/derivado de fármaco citotóxico monomérico puede ser el único ingrediente activo en la formulación/composición terapéutica o de diagnóstico se puede acompañar por otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos por ejemplo las células anti-CD19, anti-CD20, anti-CD33, anti-T, anticuerpos anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes que no son

de anticuerpos tales como citocinas, factores de crecimiento, hormonas, anti-hormonas, fármacos citotóxicos y xantinas.

Las citocinas y factores de crecimiento que se pueden usar para tratar los trastornos proliferativos como el cáncer y que se pueden usar juntos con los conjugados de portador/derivados de fármacos citotóxicos de la presente invención incluyen interferones, ínter leucinas tales como la ínter leucina 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF.

Las hormonas usadas comúnmente para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer y que se pueden usar junto con los conjugados de portador/derivados de fármaco citotóxico de la presente invención incluyen estrógenos tales como el dietilestilbestrol y estradiol, andrógenos tales como la testosterona y halotestina, progestinas tales como Megace and Provera, y corticosteroides tales como la prednisona, dexametasona e hidrocortisona.

Las anti-hormonas tales como los anti-estrogenicas esto es tamoxifen, anti-andrógenos, esto es flutamida y agentes anti-adrenales se usan comúnmente para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer y se pueden usar junto con el conjugado portador/derivado de fármaco citotóxico de la presente invención.

Los agentes quimioterapéuticos/anti-neoplásticos usados comúnmente para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer y que se pueden usar junto con el conjugado de portador/derivado de fármaco citotóxico de la presente invención incluyen pero no se limitan a adriamicina, cisplatina, carboplatina, vinblastina, vincristina, bleomicina, metotrexato, doxorubicina, fluorouracilos, etopósido, taxol y sus diversos análogos y la mitomicina.

Las composiciones deben comprender preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de la invención. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa en la presente se usa como una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o evitar una enfermedad o condición dirigida, o mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier conjugado, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar principalmente en ensayos de cultivos celulares o en modelos animales usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. También se puede usar el modelo animal para determinar el rango de concentración adecuado y la vía de administración. Tal información se puede luego usar para determinar dosis útiles y vías de administración en humanos.

La cantidad precisa para un sujeto humano dependerá de la severidad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, peso y género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración combinación de fármacos, sensibilidades a la reacción y respuesta a la tolerancia a la terapia. Esta cantidad se puede determinar por experimentación de rutina y está dentro del juicio del médico. Generalmente una dosis efectiva estará desde 0.1 mg/m² a 50 mg/m², preferiblemente 0.4 mg/m² a 30 mg/m² más preferiblemente 2 mg/m² a 9 mg/m² cuya dosis se calcula sobre la base del portador proteínico.

Se pueden administrar individualmente composiciones a un paciente o se pueden administrar en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas. La dosis a la cual el derivado de fármaco citotóxico monomérico/conjugado de anticuerpo de la presente invención se administra depende

de la naturaleza de la condición a tratarse, el grado del linfoma maligno o leucemia y de si se usa profilácticamente el conjugado para tratar una condición existente.

La frecuencia de dosis dependerá de la vida media del conjugado y la duración de su efecto. Si el conjugado tiene una vida media corta (por ejemplo de 2 a 10 horas) puede ser necesario darle una o más dosis por día. Alternativamente si la molécula de conjugado tiene una vida media prolongada (por ejemplo de 2 a 15 días) solamente puede ser necesario darle una dosis una vez al día, una vez por semana o una vez cada uno o dos meses.

Una composición también puede contener un portador farmacéuticamente aceptable para la administración del conjugado del anticuerpo. El portador no debe en sí mismo inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no deben de ser tóxicos. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables por ejemplo sales ácidas de minerales como clorohidratos, bromohidratos, fosfatos y sulfatos o sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos y bensoatos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables en estas composiciones pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares tales como agentes



humectantes o emulsificantes o sustancias amortiguadoras del pH pueden estar presentes en tales composiciones. Tales portadores permiten que las composiciones se formen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes espesos o suspensiones para ingestión por el paciente.

Las formas preferidas para la administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral por ejemplo por inyección o infusión por ejemplo de inyección de bolo o infusión continua. En donde el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso y puede contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, conservadores, estabilizadores y/o dispersantes.

Aunque la estabilidad de la solución de conjugado amortiguada es adecuada para la estabilidad a corto plazo, la estabilidad a largo plazo es pobre. Para mejorar la estabilidad del conjugado y para incrementar su vida de anaquel, el conjugado de fármaco con anticuerpos se puede liofilizar a una forma seca para su reconstitución antes del uso con un líquido estéril adecuado. Los problemas asociados con la liofilización de una solución de proteínas están bien documentados. Puede suceder una pérdida de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria durante los procesos de congelado y de secado. Consecuentemente se pueden incluir crioprotectores para actuar como un estabilizador amorfo del conjugado y mantener la integridad estructural de la proteína durante el proceso de liofilización. En una modalidad el crioprotector útil en la presente invención es un alcohol de azúcar tal como

alditol, manitol, sorbitol, inositol, polietileno glicol y combinaciones de los mismos. En otra modalidad, el crioprotector es un ácido de azúcar incluyendo un ácido aldónico, un ácido urónico, un ácido aldarico y combinaciones de los mismos.

El crioprotector de esta invención también puede ser un carbohidrato. Los carbohidratos adecuados son compuestos de aldehído o de cetona que contienen 2 o más grupos de hidroxilos. Los carbohidratos pueden ser cíclicos o lineales e incluyen por ejemplo aldosa, setosa, amino azúcares alditoles, inositoles, ácidos aldónicos, ácidos urónicos, o ácidos aldáricos o combinaciones de los mismos. El carbohidrato puede ser un mono o di o policarbohidrato tal como por ejemplo un disacárido o un polisacárido. Los carbohidratos adecuados incluyen por ejemplo gliceraldehídos, arabinosa, lixosa, pentosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, hexosa, idosa, manosa, talosa, heptosa, glucosa, fructosa, ácido glucónico, sorbitol, lactosa, manitol, metil -glucopiranosida, maltosa, ácido isoascórbico, ácido ascórbico, lactona, sorbosa, ácido glucárico, eritrosa, treosa, arabinosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, eritrulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, tagatosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina, sacarosa, trealosa o ácido neuramínico o derivados del mismo. Los policarbohidratos adecuados incluyen por ejemplo arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos (tal como por ejemplo inulina), levano, fucoidano, carragenina, galactocarolosa, pectinas, ácido péctico, amilosa, pululano, glicógeno, amilopectina, celulosa,

89

dextrano, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma xantana, o almidón. Entre los carbohidratos particularmente útiles están la sacarosa, la glucosa, lactosa, trealosa, y combinaciones de los mismos. La sacarosa es un crioprotector particularmente útil.

Preferiblemente el crioprotector de la presente invención es un carbohidrato o un alcohol de "azúcar" que puede ser un alcohol polihídrico. Los compuesto polihídricos son compuestos que contienen más de un grupo de hidroxilos. Preferiblemente los compuestos polihídricos son lineales. Los compuestos polihídricos adecuados incluyen por ejemplo glicoles tales como etilenglicol, polietilenglicol, y polipropilenglicol, glicerol, o pentaeritritol o combinaciones de los mismos.

En algunas modalidades preferidas el agente crioprotector es sacarosa, trealosa, manitol o sorbitol.

Una vez que se formulan, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, se prefieren que se adapten las composiciones para la administración a sujetos humanos.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por cualquier numero de vías incluyen pero no limitado oral, intravenosa, intramuscular, intra arterial, intramedular intratecal, intraventricular, transdermal, transcutánea (ver publicación PCT No. WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal, o por vías rectales. También se pueden usar hiporocíos para administrar las composiciones de la invención. Típicamente las composiciones se pueden

preparar como inyectables ya sea soluciones o suspensiones líquidas. Las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en vehículos líquidos previo a la inyección pueden también prepararse.

La administración directa de las composiciones se efectuará generalmente por inyección subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente o administrarse al espacio intersticial de un tejido. También se pueden administrar las composiciones a una lesión. El tratamiento de dosis puede ser un esquema de dosis sencilla o un esquema de dosis múltiple.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será un conjugado portador proteínico/fármaco citotóxico. Como tal será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Así, si se va a administrar la composición por una vía usando el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al conjugado de la degradación pero que liberen al conjugado una vez que se ha absorbido del tracto gastrointestinal.

Está disponible una discusión completa de portadores farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J., 1991).

La presente invención en particular proporciona un anticuerpo anti-CD22 humanizado/derivado de caliqueamicina monomérico (G5/44), CMC-544, para su uso en el tratamiento de trastornos proliferativos caracterizados por células que expresan el antígeno CD22 en su superficie.

La presente invención proporciona además el uso de CMC-544 en la manufactura de una composición o un medicamento para un trastorno proliferativo caracterizado por células que expresan CD22.

CMC-544 también se puede usar en cualquier terapia en la que se desee reducir el nivel de células que expresan CD22 que están presentes en el sujeto que se trata con la composición o medicamentos aquí descritos. Específicamente la composición o medicamento se usa para tratar humanos o animales con trastornos proliferativos nominalmente linfomas y leucemias que expresan el antígeno CD22 en la superficie celular. Estas células que expresan CD22 pueden estar circulando en el cuerpo o estar presentes en un número indeseablemente grande localizado en un sitio particular en el cuerpo.

También se puede usar preferiblemente para el tratamiento el CMC-544, en malignidades de linaje de los linfocitos-B que incluyen linfomas y leucemias, más preferiblemente linfomas que no es Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), mieloma múltiple, leucemia de linfocitos aguda (ALL) y leucemia linfocítica crónica (CLL). CMC-544 se puede usar solo o en combinación con otros agentes bioactivos para tratar sujetos que padecen de las malignidades de células B.

Los agentes bioactivos comúnmente usados incluyen factores de crecimiento, citocinas y fármaco citotóxicos. Los fármacos citotóxicos usados comúnmente para tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer y se pueden usar junto con CMC-544 incluye una antraciclina tal como doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carubicina, nogalamicina, menogarilo, pitarubicina, y valrubicina por hasta 3 días, y una pirimidina o un nucleósido de purina tal como citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, floxuridina, fludarabina, gougertina,

puromicina, tegafur, tiasofurina. Otros agentes quimioterapéuticos/anti-neoplásicos que se pueden administrar en combinación con CMC-554 incluyen adriamicina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, procarbicina, metotrexato, fluorouracilos, etopósidos, taxol y sus diversos análogos y mitomicina. Se puede administrar CMC-554 concurrentemente con algunos o más de estos agentes terapéuticos. Alternativamente se puede administrar secuencialmente CMC-554 con uno o más de estos agentes.

El CMC-554 puede ser utilizado solo en paralelo o secuencialmente con una combinación con otros agentes bioactivos tales como factores de crecimiento, citocinas, esteroides tales como el anticuerpo anti-CD20, rituximab (RituxanTM) y agentes quimioterapéuticos como parte de un régimen de tratamiento. Los regímenes de tratamiento establecidos para los trastornos linfoproliferativos malignos incluyen CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, y procarbicina); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona); COP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona); CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina procarbicina, bleomicina, vincristina, y prednisona); m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorin); ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbicina); ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorin, citarabina, bleomicina, y vincristina); MACOP-B

91

(metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina; prednisona de dosis fija, bleomicina, y leucovorin); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina); MOPP alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, y vinblastina); y MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona, y procarbazona) alternando con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina); y ChIVPP (clorambucil, vinblastina, procarbazona, y prednisona). La terapia puede comprender una fase de terapia de inducción, una fase de terapia de consolidación y una fase de terapia de mantenimiento. También se puede administrar el CMC-544 solo, en paralelo o secuencialmente con cualquiera de los regímenes de terapia antes identificados como parte de una fase de inducción, una fase de terapia de consolidación y una fase de terapia de mantenimiento.

Los conjugados de la presente invención también se pueden administrar junto con otros agente bioactivos y quimioterapéuticos como parte de un régimen de quimioterapia de combinación para el tratamiento de linfomas regresivos agresivos. Tal régimen de tratamiento incluye IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato y etopósido), MIME (gag de metilo, ifosfamida, metotrexato y etopósido), DHAP (dexametasona, citarabina de alta dosis, y cisplatina), ESHAP (etopósido, metilpredisolona, citarabina de alta dosis y cisplatina) EPOCH (etopósido, vincristina y doxorubicina por 96 horas con dosis de bolo, de ciclofosfamida y prednisona oral), CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona, y bleomicina), CAMP

92

(lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona), CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), CHOP-B (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona y bleomicina), CEPP-B (ciclofosfamida, etopósido, procarbacin y bleomicina) y P/DOCE (epirubicina o doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida y prednisona). Los regímenes de tratamiento adicionales para linfomas agresivos pueden incluir en la fase 1 una primera línea de tratamiento con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona)-rituximab (RituxanTM)-CMC-544 seguido de la fase 2 y en la fase 3 con CHOP-rituximab (RituxanTM), CHOP-CMC-544 o CHOP-rituximab (RituxanTM)-CMC-544. Alternativamente la fase 1 puede tener una primera línea de tratamiento con COP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona)-rituximab (RituxanTM)-CMC-544 seguido de la fase 2 y la fase 3 con COP-rituximab (RituxanTM), COP-CMC-544 o COP-rituximab (RituxanTM)-CMC-544. En una modalidad adicional el tratamiento de linfomas agresivos pueden incluir una primera o segunda línea de tratamiento con un conjugado de fármaco de anticuerpos CMC-544 en la fase 1 seguido en la fase 2 y en la fase 3 con CMC-544 y CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona), CMC-544 y COP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), CMC-544 con rituximab (RituxanTM) o rituximab (RituxanTM) solamente. Todavía en otra modalidad, el tratamiento de linfomas agresivos pueden incluir una primera o línea de tratamiento con un conjugado de anticuerpos CMC-544 seguido en la fase 2 y en la fase 3 CMC-544 solamente o en combinación en regímenes con otros tratamientos que incluyen pero no se limitan a ESHOP (etopósido, metilpredisolona, citarabina de alta dosis, vincristina y

cisplatina), EPOCH (etopósido, vincristina y doxorubicina por 96 horas con dosis de bolo, ciclofosfamida y prednisona oral), IMVP-16 (fosfamida, metotrexato y etopósido), ASHAP (adriamicina, solumedrol, Ara-C y cisplatina) MIME (gag-metil, ifosfamida, metotrexato y etopósido) y ICE (ifosfamida, ciclofosfamida y etopósido). Los detalles de los diversos fármacos citotóxicos usados en quimioterapia de malignidades incluyendo regímenes quimioterapéuticos de combinaciones, dosis, etc., se suministran en esta solicitud se pueden encontrar en Cancer Principles and Practice of Oncology, Eds. Vincent T. DeVita, Samuelo Hellman, Steven A. Rosenberg, 6th Edition, Publishers: Lippincott, Williams and Wilkins (2001) and Physician's Cancer Chemotherapy Drug Manual, Eds. Edward Chu and Vincent T. DeVita, Publishers: Jones and Bartlett (2002).

La presente invención también proporciona un método de tratamientos de sujetos humanos o animales que padecen o están en riesgo de un trastorno proliferativos caracterizado por células que expresan CD22, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de CMC-544 de la presente invención.

La presente invención se describe además a continuación en ejemplos específicos de trabajo que se pretende que describa además la invención sin limitar su alcance.

EJEMPLO 1

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS CANDIDATO

Se seleccionó un conjunto de anticuerpos contra CD22 a partir de hibridomas utilizando los siguientes criterios de selección: enlace a células Daudi, internalización en

91

células Daudi, enlace a células mono nucleares de sangre periférica (PBMC), internalización sobre PBMC, afinidad (mayor a 10^{-9} M), ratón $\gamma 1$ y velocidad de producción. Se seleccionó 5/44 como un anticuerpo preferido.

I. CLONACIÓN DE GENES Y EXPRESIÓN DE UNA MOLÉCULA DE ANTICUERPO QUIMÉRICO 5/44

a) Preparación de células de hibridomas 5/44 y preparación del ARN para ello

Se generó el hibridoma 5/44 por tecnología convencional del hibridoma después de la inmunización de ratones con proteína humana CD22. Se preparó el ARN a partir de células hibridomas 5/44 usando un kit RNEasy (Qiagen, Crawley, UK; Catalogue No. 74106). El ARN obtenido se transcribió de una manera inversa al ADNc, como se describe a continuación.

b) Distribución de CD22 en los tumores NHL

Se efectuó un estudio de inmunohistoquímica para examinar la incidencia y distribución de la tinción usando los anticuerpos monoclonales 5/44 anti-CD22. Los anticuerpos de control anti-CD20 y anti-CD79a se incluyeron en el estudio para confirmar las áreas B de tumores.

Se estudiaron un total de 50 tumores y estos se categorizaron como sigue al usar la formulación de trabajo y los sistemas de clasificación REAL:

- 7 leucemia/linfoma linfoblástico B (alto/I)
- 4 linfocitos de linfoma pequeño B-CLL (bajo/A)
- 3 linfoma plasmacitoide/inmuno citoma (bajo/A)
- 1 célula de manto (Int/F)
- 14 linfomas de centro de folículo (bajo hasta

95

Int/D)

- 13 linfomas de células grandes difusas (Int hasta alto/G,H)
- 6 sin clasificar (K)
- 2 linfomas de células T

Cuarenta linfomas de células B fueron positivos para el antígeno CD22 con el anticuerpo 5/44 a 0.1 µg/ml y 6 adicionales se volvieron positivas cuando se incrementó la concentración hasta 0.4 µg/ml. Para los 2 tumores de células T restantes que fueron negativos a 0.1 µg/ml fueron un tejido insuficiente que permaneció para probar a una concentración superior. Sin embargo, la prueba en paralelo con otro anticuerpo anti-CD22 designado 6/13 (Celltech, Slough, UK) que dio una tensión más fuerte que 5/44 resulto en todos los 48 linfomas de células B que tiñeron positivo para CD22.

Así, es posible concluir que el antígeno CD22 se expresan ampliamente en los linfomas de células B y suministra por lo tanto un objetivo adecuado para la inmunoterapia en NHL.

c) Clonación de PCR de 5/44 V_H y V_L

Se sintetizaron secuencias de ADNc que codifican para los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas 5/44 usando transcriptasa inversa para producir copias de ADNc de hebra sencilla del ARN presente en el ARN total. Luego se probó esto como la plantilla para implicación de secuencias de murina de la región B usando cebadores de oligonucleotidos específicos por una reacción de polimerasa (PCR).

i) Síntesis de ADNc

96

Se sintetizó el ADNc en un volumen de reacción de 20 µl que contiene los siguientes reactivos: 50mM, Tris-HCL pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM ditiotritol, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM de dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 20 unidades de ARNsina, 75 ng de cebador de hexanucleotido aleatorio, 2 µg 5/44 ARN, y 200 unidades de la transcriptasa reversa del virus de leucemia murino de Moloney. Después de la incubación a 42°C durante 60 minutos se finalizó la reacción al calentar a 95°C durante 5 minutos.

ii) PCR

Se sometieron las alícuotas del ADNc a PCR usando combinaciones de cebadores específicos para las cadenas ligeras y pesadas. Los acumulados de cebador degenerado diseñados para combinarse en los pares base con las consecuencias conservadas del péptido de señal se usaron como cebadores delanteros. Estas secuencias contienen todas en orden un sitio de restricción (V_L Sful; V_H HindIII) que parte de 7 nucleótidos desde sus extremos 5', la secuencia GCCGCCACC (SEQ ID) NO:50), para permitir una traducción óptima de los ARNm resultantes, un codón de inicio y 20 a 30 nucleótidos basados en las secuencias del péptido líder de anticuerpos conocidos de ratón (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª. Edition, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

Los cebadores 3' se diseñan para cubrir la unión de la estructura 4 J-C del anticuerpo y contienen un sitio de restricción para la encima BsiWI para facilitar la clonación del fragmento V_L PCR. Los cebadores 3' de cadena pesada son una mezcla diseñada para abarcar la unión J-C del anticuerpo. El cebador 3' incluye un sitio de

restricción Apal para facilitar la clonación. La región 3' de los cebadores contiene una secuencia mixta que se basa en aquellas encontradas en los anticuerpos conocidos de ratón (Kabat et al., 1991, *supra*).

Las combinaciones de los cebadores antes descritos permiten que los productos PCR para V_H y V_L se clonen directamente en un vector de expresión adecuado (ver a continuación) para producir cadenas ligera y pesada quiméricas (de ratón y humano) y para que se expresen esos genes en células mamíferas para producir anticuerpos antiquiméricos del isotipo deseado.

Se fijaron como sigue las incubaciones (100 µl) para el PCR. Cada reacción contenía 10mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% p/v gelatina, 0.25 mM de dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 10 pmoles de mezcla de cebador 5', 10 pmoles de cebador 3', 1µl de ADNc y 1 unidad de polimerasa Taq. Se incubaron las reacciones a 95°C por 5 minutos y luego se formaron ciclos a través de 94°C por un minuto, 55°C por un minuto y 72°C por un minuto. Después de 30 ciclos, se analizaron las alícuotas de cada reacción por electroforesis en un gel de agarosa.

Para la región V de cadena pesada, un producto amplificado de ADN solamente se obtuvo cuando un acumulado de cebadores que se combinan dentro de los pares bases del comienzo de la estructura 1 reemplazó el acumulado del cebador de péptido de señal. Se clonaron los fragmentos en vectores formadores de secuencia de ADN. Se determinó la secuencia de ADN y se tradujo para dar una secuencia deducida de aminoácidos. Esta secuencia deducida se verificó con referencia de la proteína en la terminal N determinada experimentalmente. La figura 1 muestra la

07

secuencia de los aminoácidos de los CDRs del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44. Las figuras 2 y 3 muestran la secuencia de proteína y ADN de las regiones V de cadena ligera y pesada maduras del ratón monoclonal 5/44 respectivamente.

iii) Clonación molecular de los fragmentos de PCR.

Las secciones de la región 5 murina luego se clonaron en los vectores de expresión pMRR10.1 y pMRR14 (figuras 7 y 8). Estos son vectores para la expresión de ADN que contienen cadenas ligeras y pesadas que codifican cadenas constantes de la cadena ligera capa humana y la cadena pesada gama-4 humana. La región V_L se subclono en el vector de expresión por digestión y ligación de restricción a partir del vector que forma secuencias usando ciclos de restricción SfuI y BsiW1 creando el plásmido pMRR10(544cL) (figura 8). El ADN de cadena pesada se amplificó por PCR al usar un cebador 5' para introducir un péptido de señal, ya que esto no se obtuvo en la estrategia de clonación-un anticuerpo de cadena pesada de ratón líder de un hibridoma diferente local (determinado 162) se empleo. El cebador 5' tuvo la siguiente secuencia: 5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTTCGGATTCTCTCTCGTGTTCTTGGCACTCATTCTCAAGGGAGTGCAGTGTGAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGG3' (SEQ ID NO:51).

El cebador inverso fue idéntico a aquel usado en la clonación del gen V_H. El producto resultante por PCR se digirió en las enzimas HindIII y Apal, se subclonó y se confirmó su secuencia de ADN creando el plásmido pMRR14(544cH) (figura 7). La co-transfección transitoria de los vectores de expresión en las células CHO generó un anticuerpo quimérico c5/44. Esto se logró usando el

97

reactivo de lipofectamina según los protocolos del fabricante (InVitrogen:Life Technology, Groningen, Países Bajos. Catálogo no. 11668-027).

II. ELIMINACIÓN DEL SITIO DE GLICOSILACIÓN Y LISINA REACTIVA

Se observó una secuencia del sitio de glicosilación ligado en N potencial en CDR-H2, que tiene la secuencia de aminoácidos en N-Y-T (Figura 3). El SDS-PAGE, la inmunotransferencia Western y la tinción de carbohidratos de geles de 5/44 y sus fragmentos (incluyendo Fab) indica que el sitio estaba de hecho glicosilado (no se muestra). Además, se observó un residuo de lisina en una posición opuesta dentro de CDR-H2, que tuvo el potencial para reducir la afinidad de enlace del anticuerpo al suministrar un sitio adicional para conjugación con un agente con el cual se puede conjugar el anticuerpo.

Se usó una estrategia PCR para introducir las substituciones de aminoácido en la secuencia CDR-H2 en un intento por retirar el sitio de glicosilación y/o la lisina reactiva como se muestra en la figura 4. Los cebadores delanteros que codifican la mutaciones N55Q, T57A o T57V se utilizaron para retirar el sitio de glicosilación (figura 4) y un cuarto cebador delantero que contiene la substitución K60R, se generó para retirar el residuo reactivo de lisina (figura 4). Se utilizó un cebador reverso de la estructura 4 en cada una de estas amplificaciones PCR. Los productos PCR se digirieron con las enzimas XbaI y ApaI y se insertaron en pMRR14 (544cH) (también desdoblado con XbaI y ApaI) para generar los plásmidos de expresión que codifican estos mutantes. Las

mutaciones N55Q, T57A y T57V hacen ablación del sitio de glicosilación al cambiar la secuencia de aminoácidos fuera del consenso N-X-T/S mientras que la mutación K60R reemplaza la lisina potencialmente reactiva con un residuo de arginina similarmente cargado de forma positiva. Los plásmidos variantes resultantes cH se cotransfectan con el plásmido cL para generar variantes de anticuerpo quiméricos expresados.

III. EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LOS GENES QUIMÉRICOS

Se evaluaron las actividades de los genes quiméricos siguiendo una transfección transitoria en células CHO y la determinación de las constantes de afinidad por el análisis BiaCore.

Las afinidades del 5/44 quimérico o sus variantes que han tenido su sitio de glicosilación o su lisina reactiva eliminada, se investigaron usando la tecnología BIA para el enlace de los constructos CD22-mFc. Los resultados se muestran en la figura 9. Todas las mediciones de enlace se efectuaron en el instrumento BIAcore™ 2000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). El ensayo se efectuó por captura de CD22mFc por medio del Fc anti-ratón inmovilizado. El anticuerpo estaba en fase soluble. Se inyectaron muestras estándares y controles (50µl) sobre Fc anti-ratón inmovilizado seguido por un anticuerpo en la fase soluble. Después de cada ciclo se regeneró la superficie con 50µl de 40mM de HCl a 30µl/min. Se efectuó el análisis cinético usando el software BIAevaluation 3.1 (Pharmacia).

El retiro del sitio de glicosilación en el constructo T57A resultó en una velocidad activa ligeramente más rápida

y una velocidad inactiva ligeramente más lenta en comparación con el quimérico 5/44, dando una mejora de afinidad de aproximadamente 5 veces. La mutación N55Q no tuvo efecto en la afinidad. Este resultado fue inesperado ya que sugiere que la eliminación del carbohidrato mismo no tuvo aparentemente un efecto en el enlace (como con el cambio N55Q). Se observó la afinidad mejorada solamente con el cambio T57A. Una explicación posible es que independientemente de la presencia del carbohidrato, la treonina en la posición 57 ejerce un efecto negativo en el enlace que se elimina en la conversión de la treonina a la alanina. La hipótesis de que el tamaño pequeño de la alanina es importante y que el efecto negativo de la treonina se relaciona con su tamaño se soporta a partir del resultado obtenido usando la mutación T57V: ese reemplazo con la valina en la posición 57 no es benéfico (no se muestran los resultados).

La eliminación del residuo de lisina por la mutación K60R tuvo un efecto neutro en la afinidad esto es, la introducción del residuo de arginina elimina un sitio reactivo potencial sin comprometer la afinidad.

Las mutaciones para la eliminación del sitio de glicosilación y para la eliminación de la lisina reactiva se incluyeron por lo tanto en el diseño de humanización.

EJEMPLO 2

INJERTO POR CDR DE 5/44

La clonación molecular de los genes para las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 5/44 y su uso para producir anticuerpos quiméricos 5/44 (ratón/humano) se ha descrito arriba. Las secuencias de

nucleótidos y de aminoácidos del ratón en los dominios 5/44 V_L y V_H se muestran en las figuras 2 y 3 (SEQ ID NOS: 7 y 8), respectivamente. Este ejemplo describe el injerto CDR del anticuerpo 5/44 sobre las estructuras humanas para reducir la inmunogenicidad potencial en humanos según el método de Adair et al., (solicitud PCT No. W091/09967).

I. INJERTO CDR DE LA CADENA LIGERA 5/44

La alineación de la secuencia de proteína con las secuencias de consenso a partir de la región V de cadena ligera kappa del subgrupo 1 humano indican una identidad de secuencia del 64%. Consecuentemente para construir la cadena ligera injertada con CDR, las regiones de estructura del aceptor escogidas corresponden a aquellas de la secuencia O12, DPK9 de la línea germinal del subgrupo 1 V_k humano. La secuencia del aceptor de la estructura 4 se deriva de la secuencia de la línea germinal de la región J humana JK1.

Una comparación de las secuencias de aminoácidos de las regiones de estructura de la murina 5/44 y la secuencia del aceptor se da en la figura 5 y muestra que hay 27 diferencias entre las cadenas del aceptor y del donador. En cada posición se hizo un análisis del potencial del residuo de murina para contribuir con el enlace de antígenos ya sea directa o indirectamente a través de los efectos en el empaque o interfaz V_H/V_L . Si se considera importante un residuo de murina y es suficientemente diferente del residuo humano en términos de tamaño, polaridad o carga, entonces se conserva el residuo de murina. Con base en este análisis dos versiones de la cadena ligera injertada por CDR que tienen las secuencias dadas en SEQ ID NO:19 y SEQ

ID NO:20 (Figura 5), se construyeron.

II. INJERTO CDR DE LA CADENA PESADA 5/44

El injerto CDR de la cadena pesada 5/44 se logró usando la misma estrategia como se describe para la cadena ligera. El dominio V de la cadena pesada 5/44 se encuentra que es homólogo a las cadenas pesadas humanas que pertenecen al subgrupo 1 (70% de identidad de secuencias) y por lo tanto la secuencia de la estructura de la línea germinal del subgrupo 1 humano VH1-3, DP7 se usa como una estructura del aceptor. Las secuencias del aceptor de la estructura 4 se derivan de la secuencias germinal de la región J humano JH4.

Una comparación de la cadena pesada 5/44 con las regiones de estructura se muestran en la figura 6 en donde se puede observar que la cadena pesada 5/44 difiere de la secuencia del aceptor en las posiciones 22. El análisis de la contribución de que cualquiera de estos puede ser al enlace de antígeno conduce a 5 versiones de las cadenas pesadas injertadas por CDR que se construyen, que tiene la secuencia dadas en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:27 (Figura 6).

III. CONSTRUCCIÓN DE GENES PARA SECUENCIAS INJERTADAS

Se diseñaron genes para codificar las secuencias injertadas gH1 y gL1, y una serie de oligonucleótidos de traslapes se diseñaron y construyeron (figura 10). Se empleó una técnica de ensamble por PCR para construir los genes de la región 5 injertados con CDR. Se prepararon volúmenes de reacción de 100µl que contienen 10 mM Tris-HCl pH8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.001 % gelatina, 0.25 mM

de dATP, dTTP, dCTP, y dGTP, 1 pmol cada uno de los cebadores internos (T1, T2, T3, B1, B2, B3), 10 pmoles de cada uno de los cebadores externos (F1, R1), y una unidad de polimerasa Taq (Amplitaq, Applied BioSystems, catálogo no. N808-0171). Los parámetros del ciclo por PCR fueron 94°C para 1 minuto, 55°C para 1 minuto y 72 °C para 1 minuto, por 30 ciclos. Luego se corrieron los productos de reacción en un gel de agarosa al 1.5%, se extirparon y recuperaron usando las columnas de giro QIAGEN (kit de extracción con gel QIAquick no. de catálogo 28706). Se eluyó el ADN en un volumen de 30 µl. Las alícuotas (1 µl) del ADN gH1 y gL1 luego se clonaron dentro del vector de clonación InVitrogen pCR2.1 TOPO (catálogo no. K4500-01) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este vector que no es de expresión sirve como un intermediario de clonación para facilitar la formación de secuencia de un gran número de clones. Se usó la formación de secuencias de ADN usando cebadores específicos del vector para identificar los clones correctos que contiene gH1 y gL1, creando plásmidos pCR2.1 (544gH1) y pCR2.1 (544gL1) (Figuras 11 y 12).

Se utilizó un método de reemplazo de un casete de oligonucleótido para crear los injertos humanizados gH4, 5, 6 y 7, y gL2. La figura 13 muestra el diseño de los casetes de los oligonucleótidos. Para construir cada variante el vector pCR2.1 (544gH1) o pCR2.1(544gL1)) se corta con las enzimas de restricción mostradas (XmaI/SacII para la cadena pesada, XmaI/BstEII para la cadena ligera). El fragmento del vector grande se purificó con gel a partir de agarosa y se usó en el ligamiento con el casete de oligonucleótido. Estos casetes están compuestos de dos oligonucleótidos

complementarios que se muestran en la figura 13, se mezclan a una concentración de 0.5 pmoles/ μ l en un volumen de 200 μ l 12.5 M Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mM $MgCl_2$, 25 mM NaCl, 0.25 mM ditioeritritol. La combinación de los pares base se logra al calentar al 95°C por 3 minutos un baño de agua (volumen 500 ml) luego se deja que la reacción se enfríe lentamente hasta temperatura ambiente. El casete de oligonucleótido combinado en sus pares base luego se diluye 10 veces en agua antes de la ligación en el vector de corte adecuadamente. Se usó la formación de secuencias de ADN para confirmar la secuencia correcta al crear los plásmidos pCR2.1 (5/44-gH4-7) y pCR2.1 (5/44-gL2). Las secuencias injertadas verificadas luego se subclonaron en los vectores de expresión pMRR14 (cadena pesada) y PMR10.1 (cadena ligera).

IV. ACTIVIDAD DE ENLACE DE CD22 DE LAS SECUENCIAS INJERTADAS EN CDR

Los vectores que codifican las variantes injertadas se cotransfectaron en células CHO en una diversidad de combinaciones junto con las cadenas de anticuerpo quimérico original. Se comparó la actividad de enlace en un ensayo de competición, al competir el enlace del anticuerpo 5/44 original de ratón para el enlace a la célula Ramos (obtenida de ATCC, una línea celular de linfoblasto de linfoma de Burkitt que expresa la superficie CD22). Este ensayo se consideró la mejor forma de comparar los injertos en su capacidad para enlazarse a la superficie celular CD22. Los resultados se muestran en las figuras 14 y 15. Como se puede observar hay muy poca diferencia entre algunos de los injertos todos efectuados más efectivamente

que el quimérico al compartir contra el precursor murino. La introducción de los tres residuos humanos adicionales al final de CDR-H3 (gH5 y gH7) no parece haber afectado el enlace.

La combinación de injerto con el número menor de residuos de murina gL1gH7 se seleccionó. El injerto de cadena ligera gL1 tuvo 6 residuos de donador. Los residuos V2, V4, L37 y Q45 son residuos de empaque potencialmente importantes. El residuo H38 está en la interfaz V_H/V_L . El residuo D60 es un residuo de superficie cercano a CDR-L2 y puede contribuir directamente al enlace de antígeno. De estos residuos V2, L37, Q45 y D60 se encuentran en la secuencias de la líneas germinal de los genes kappa humanos de otros subgrupos. El injerto de cadena pesada gH7 tiene 4 residuos de estructura del donador (el residuo R28 se considera que es parte de CDR-H1 bajo la definición estructural usada en el injerto de CDR (ver Adair et al. (1991), solicitud PCT No. W091/09967)). Los residuos E1 y A71 son residuos de superficie cercanos a CDR. El residuo 148 es un residuo de empaque potencial. El residuo T93 está presente en la interfaz V_H/V_L . De estos residuos, E1 y A71 se encuentran en otros genes de línea germinal del subgrupo humano 1. El residuo 148 se encuentra en el subgrupo 4 de la línea germinal humana 4 y T73 se encuentra en el subgrupo 3 de la línea germinal humana.

El ADN completo y la secuencia de proteína de la cadena ligera y de la cadena pesada, incluyen una posición aproximada de intrones dentro de los genes de resgión constante suministrados por los vectores, se muestran en la figura 16 y se dan en SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:28, respectivamente, para la cadena ligera y SEQ ID NO:31 y SEQ

ID NO:30, respectivamente, para la cadena pesada.

El ADN que codifica estos genes de cadena ligera y pesada se extirpó de estos vectores. El ADN de cadena pesada se digirió en el sitio 5' HindIII, luego se trató con el fragmento Klenow de la polimerasa de ADN de E. coli I para crear el extremo con puntas romas 5'. El desdoblamiento del sitio 3' EcoRI resulta en fragmentos de cadena pesada que se purificaron a partir de geles de agarosa. De la misma manera se produjo un fragmento de cadena ligera, cerrado en puntas romas en el sitio 5'SfuI y con el sitio 3'EcoRI. Se clonaron ambos fragmentos en DHFR con base en los vectores de expresión y se usaron para generar líneas celulares estables en células CHO.

EJEMPLO 3

CONJUGACIÓN DE LA Nac-GAMMA CALIQUEAMICINA DMH ACBUT AL ANTICUERPO HUMANIZADO ANTI-CD22 (G5/44)

En una reacción típica de conjugación, el anticuerpo humanizado anti-CD (G5/44) se conjugó a Nac-gamma caliqueamicina DMH AcBut OSu (derivado de caliqueamicina) (ver figura 17), en donde la concentración de la proteína objetivo fue de 7.5 mg/ml y la carga del derivado de caliqueamicina fue de 8.5 por ciento en peso de la proteína. La reacción objetivo en su pH fue 8.5 ± 0.2 , y las concentraciones objetivo de los otros componentes de reacción fueron como siguen: 50 mM del ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(4-butansulfónico) (HEPBS), 37.5 mM de decanoato de sodio, y 9% v/v de etanol total. Se efectuó la reacción a $33^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ durante 1

hora. Los resultados del análisis de esta reacción típica previo a la purificación fueron como sigue: Proteína: 7.34 mg/ml; carga de caliqueamicina: 82.7 µg/ml; agregado: 93.25%; y proteína no conjugada (LCF); 1.07% (UV área % por CLAR).

El efecto de diversos tensoactivos aditivos y sus concentraciones en el rendimiento y pureza del producto, se probaron para determinar su efecto en la producción del monómero conjugado (ver tabla 2). Se corrieron reacciones en donde todo se mantuvo constante excepto para el aditivo y su concentración. Los conjugados producidos a partir de estas reacciones se analizaron para concentración de proteínas, carga de caliqueamicina, contenido de agregados y LCF. Aunque todos los ácidos n-carboxílicos en el rango del C₆ (hexanoato) al C₁₂ (dodecanoato) dieron resultados aceptables, los mejores resultados globales (bajo LCF, bajo agregado, y alta recuperación del conjugado monomérico se obtuvieron con decanoato en un rango de concentración de 30 mM a 50 mM.

TABLA 2: EFECTO DE LA IDENTIDAD DEL ADITIVO Y LA
CONCENTRACIÓN EN LOS RESULTADOS DE CONJUGACIÓN

Aditivo/concentración	Recuperación de proteína (% de recuperación)	Porcentaje de agregado	Porcentaje de LCF
Hexanoato-500 mM	51.3	3.36	38.3
Heptanoato-400 mM	49.9	4.7	20.6
Octanotato-200 mM	57.3	3.27	10.6
Nanonoato-100 mM	54.7	1.41	0.3
Decanoato-50 mM	56.7	1.35	0.2
Undecanoato-20 mM	46.9	2.95	0.6
Dodecanoato-5 mM	65.6	0.78	7.0

EJEMPLO 4

PROCESO DE PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA

I. PROCESO DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Aunque se identificó el flujo rápido 4 de butil sefarosa como los mejores medios HIC, se pueden obtener resultados aceptables con alteraciones ligeras en las condiciones cromatográficas usando otras resinas tales como el flujo de rápido de octil sefarosa, PPG-600C (Tosoh Biosep), Fractogel EMD Propyl (EM Processing) y Source 15ISO (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

El material de partida para la purificación fue una mezcla de reacción de conjugación que contiene 7.2 mg/ml de proteína a una carga de derivado de caliqueamicina de 83 µg/mg, con un contenido de agregado de 10.1% (por ciento de área por CLAR), y un contenido LCF de 5.6% (por ciento de área por CLAR).



Después de que se finalizó la reacción de conjugación, se diluyó 4 veces la mezcla de reacción por la adición de una solución de fosfato de potasio hasta una concentración de 0.7 M (pH 8.2). Después de mezclar, la solución se filtró a través de filtros de 0.45-micras. La solución diluida se cargó en una columna de flujo rápido de butil sefarosa 4. La cantidad total de proteína cargada a la columna fue 29 mg por ml de volumen de lecho. Después de un lavado con fosfato de potasio 0.7 M, se eluyó la columna usando un gradiente por etapas desde 0.7 M a 4 mM de fosfato de potasio, pH 8.2. se acumularon las fracciones diluidas en el gradiente de etapas para un procesamiento adicional, con un acumulado que consiste de un conjugado monomérico menor de 1% de área de cada agregado y LCF. Este acumulado se cargó en una columna desaladora Sephadex G-25 (Amersahm Biosciences) para intercambio con una solución amortiguadora adecuada para formulación que consiste de 20 mM tris-Cl y cloruro de sodio 100 mM a un pH de 8.0. La preparación, CMC-544 intercambiada con amortiguador purificada tuvo las siguientes propiedades: carga de caliqueamicina: 81 µg/mg; agregado: 0.4% (área por CLAR) LCF: 0.8% (área por CLAR).

EJEMPLO 5

ANÁLISIS DEL ENLACE DEL INMUNOCONJUGADO NAC-GAMMA

CALIQUEAMICINA DMH ACBUT-G5/44 (CMC-544).

El inmunconjugado del anticuerpo humanizado anti-CD22 (G5/44), con caliqueamicina (CMC-544) generado por el proceso anterior de conjugación se analizó en un estudio de enlace para determinar si el conjugado generado usando el proceso mejorado tuvo algún efecto adverso en el enlace de

antígeno. La tabla 3 muestra que el procedimiento de conjugación no tiene ningún impacto en la afinidad de enlace de antígeno del anticuerpo. El inmunoconjugado CMC-544 hecho por el nuevo o anterior procedimiento de conjugación enlazado al antígeno objetivo con afinidades similares, que no difieren de aquella del anticuerpo no conjugado G5/44.

TABLA 3: AFINIDADES DE ENLACE DE CMC-544 HECHAS AL USAR LOS PROCEDIMIENTOS DE CONJUGACIÓN CMA-676 Y CMC-544

Anticuerpo	K_D (M)	K_A (1/M)	K_g (1/s)	K_a (1/Ms)	Porcentaje
Anti-CD22					LCF
G5/44 humanizado	1.30×10^{-10}	7.90×10^9	2.80×10^{-5}	2.20×10^5	100
CMC-544 (21 μ g/ml) (procedimiento CMA-676)	1.20×10^{-10}	8.10×10^9	6.10×10^{-5}	4.90×10^5	25
CMC-544 (87 μ g/ml) (procedimiento CMC-544)	1.50×10^{-10}	6.60×10^9	6.90×10^{-5}	4.60×10^5	3.3

El análisis de biosensor se efectuó usando un BIAcore 2000 (BIAcore AB, Uppsala, Suecia). Se inmovilizó de forma covalente el CD22mFc en una microplaqueta biosensora recubierta con carboximetil dextrano activada con N-hidroxisuccinimida (CM5) usando una química de acoplamiento de aminas estándar a una densidad de proteínas de aproximadamente 2000 unidades de resonancia. Se diluyeron

112

las muestras de CMC-544 o G5/44 en la solución amortiguadora HBS (10 mM HEPES, pH 7.4, que contiene 150 mM NaCl, 3 mM EDTA y 0.005% polisorbato 20 (v/v)) y se inyectaron en un rango de concentración de 1 a 100 nM durante la superficie de microplaquetas de biosensor recubiertas con CD22mFc a una relación de flujo de 30 μ l/min durante 3 minutos para permitir el enlace. Después de la fase de enlace, se observó la disociación del anticuerpo enlazado a la lavar la microplaqueta con disolución amortiguadora HBS durante un periodo de 15 minutos. Se regeneró la superficie antigénica al lavar la microplaqueta sensora con 15 μ l de la solución amortiguadora de regeneración (10 mM NaOH y 200 mM NaCl) durante 30 segundos, seguido por un tiempo de estabilización de 2 minutos antes del siguiente ciclo. Se calcularon las constantes cinéticas con un análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineales usando un modelo de ajuste de curvas de enlace de 1:1 Langmuir y un programa de BIA evaluación (versión 3.0, BIAcore). El enlace del antígeno de CMC-544 se evaluó por un análisis de resonancia de plasmón de superficie utilizando CD22mFc inmovilizado covalentemente en una microplaqueta biosensora. Los resultados de los análisis cinéticos de los enlaces de CMC-544 y G5/44 a CD22mFc muestran que después de que se ajustaron globalmente los datos a un modelo de enlace de 1:1 Langmuir con compensación para la transferencia de masa, tanto CMC-544 como el G544 son conjugado enlazado a CD22 con una afinidad similar (CMC-544:CD22 K_D = 200 pM; G5/44: CD22 K_D = 235 pM). La conjugación a la caliqueamicina no impactó la capacidad de G5/44 para enlazarse efectivamente a CD22mFc.

El enlace de CMC-544 y G5/44 a CD22 expresado en la superficie de las células del linfoma B también se examinó por citometría de flujo. El Anti-CD33 mAb gentuzumab (hP67.6) y su conjugado de caliqueamicina CMA-676 (gentuzumab ozogamicin) se usaron como controles que coinciden con el isotipo en esta evaluación. El Rituximab (RituxanTM), un mAb CD20 anti-humano de IgG1 humano quimérico, se usó como un control positivo. Los IgG1 y IgG4 policlonales humanos purificados también se usaron como controles negativos. El enlace de CMC-544 y G5/44 a CD22 en Ramos o RL BCL fue similar y es diferente de aquel del IgG4 policlonal humano. RL BCL desplegó una menor expresión de superficie de CD22 que el Ramos BCL. En contraste, el enlace de CMA-676 o gLlgH7 a BCL fue similar con aquel del IgG4 policlonal humano consistente con su falta de expresión de CD33 (no se muestran los datos). Las mismas células demostraron un fuerte enlace de anti-CD20 rituximab (RituxanTM). A diferencia de hP67.6 y CMA-676, ni CMC-544 ni G5/44 demostraron ningún enlace a las células de leucemia CD22⁻ CD33⁺ HL-60 (no se muestran los datos). Estos resultados sugieren que la conjugación de G5/44 con caliqueamicina no afecta su especificidad de antígeno. CMC-544 específicamente reconoce al CD22 en células B humanas, pero no en células B de murina, rata, canino, porcino, o primate (cinomolgus y resus) (no se muestran los datos).

EJEMPLO 6

ANÁLISIS DE LOS EFECTOS IN VITRO E IN VIVO DE CMC-544

I. CITOTOXICIDAD IN VITRO

El efecto de CMC-544 hecho al usar los procesos CMA-676 y CMC-544 en el crecimiento in vitro de las líneas celulares del linfoma de células B CD22⁺, RL, Daudi, Raji y

Ramos, se compararon. Un conjugado de caliqueamicina que coincide con el isotipo dirigido al CD33 humano (CMA-676) se usó para reflejar los efectos no específicos del antígeno del conjugado. El uso del DMH de caliqueamicina N-Ac gamma sin conjugar (el fármaco liberado del conjugado con la hidrólisis ácida) en esta evaluación indica que cada una de estas líneas celulares usadas fue sensible a los efectos letales de la caliqueamicina. La tabla 4 muestra los resultados de estas evaluaciones con base en la equivalencia de la caliqueamicina y la tabla 5 muestra estos resultados expresados como las concentraciones de la proteína de anticuerpos conjugados. La administración mediada por CD22 de la caliqueamicina a las células CD22⁺ fue al menos 10 veces más eficiente al exterminar las células objetivo que el fármaco sin conjugar mismos. El conjugado de control que coincide con el isotipo (CMA-676) mostró citotoxicidad que fue menor o similar a la del derivado de caliqueamicina sin conjugar. Es evidente de la tabla 4 que el conjugado hecho por el proceso de conjugación CMC-544 puede generar un efecto citotóxico equivalente a concentraciones inferiores de anticuerpos que el conjugado hecho por el proceso de conjugación CMA-676.

TABLA: 4 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR CALIQUEAMICINA
CONJUGADA (IC₅₀ Pm de Caliqueamicina)

Líneas de linfoma de células B	Proceso CMC-544 carga CMC-544 65µG/MG	Proceso CMA-676 carga CMC-544 35µG/MG	Control negativo CMA-676 carga 35µG/MG	N-acetil gamma caliqueamicina DMH
RL #1	6	30	600	226
#2	12	40	400	270
Daudi #1	21	80	1886	260
Raji #1	500	ND*	2800	460
#2	560	520	4100	490
Ramos #1	200	130	ND	700
#2	260	ND	ND	1000

* ND, no determinado

TABLA 5: INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL ANTICUERPO
CONJUGADO

114

(IC₅₀ µg/mL DE ANTICUERPO)

Líneas de linfoma de células B	Proceso CMC-544 carga CMC-544: 65µG/MG	Proceso CMA-676 carga CMC-544: 35µG/MG	Control negativo CMA-676 carga 35µG/MG	Control de anticuerpo
RL #1	0.09	0.86	17.14	>100
#2	0.18	1.14	11.43	>100
Daudi #1	0.32	2.29	53.89	>100
Raji #1	7.69	ND*	80.00	>100
#2	8.62	14.86	117.14	>100
Ramos #1	3.08	3.71	ND	>100
#2	4.00	ND	ND	>100

* ND, no determinado

Citotoxicidad In vivo: CMC-544 hecho por el proceso CMC-544 se evaluó además en xenoinjertos de linfoma de células B. En estos estudios dos tumores de linfoma de células B, RAMOS y RL se utilizaron. El linfoma RL es una línea celular derivada de NHL que no es Burkitt mientras que RAMOS se derivó originalmente de linfoma Burkitt. En una experimento representativo que se muestra en la figura 18, CMC-544 y su contra parte del anticuerpo de murina se mostró que fueron eficaces al inhibir en una forma dependiente de la dosis el crecimiento de linfoma de células B RAMOS.

El conjugado del anticuerpo humanizado se mostró que era más potente que su contraparte murina. En este estudio la dosis menor de conjugado de caliqueamicina capas de provocar una inhibición importante en el

13

crecimiento de linfoma fue de 10µg/kg del Nac-gamma caliqueamicina DMH conjugado. En contraste en anticuerpo no conjugado G5/44, a 10 mg/Kg administrado de forma intraperitoneal en un programa similar como conjugado no tuvo efecto en el crecimiento del tumor.

Se efectuaron estudios similares utilizando el modelo de linfoma RL. La tabla 6 muestra en análisis combinado de tres experimentos diferentes en los cuales los efectos antitumor de CMC-544 se evaluaron en los tumores RL NHL con etapas de 300-400mg en tamaño en ratones desnudos. El CMC-544 en una forma dependiente de la dosis provocó que los tumores regresaran en un periodo de tiempo de tres semanas. La dosis mínimamente efectiva de CMC-544 en el modelo de linfoma RL se estableció de análisis estadístico de estos estudios para hacer 20µg/kg con base en el contenido de caliqueamicina. No hubo muertes en ninguno de estos tres estudios. La dosis superiores (60-320 µg/kg) de CMC-544 provocaron una regresión casi completa de linfoma RL. Al tomarse juntos los resultados obtenidos con los dos modelos de linfoma de células B de muestran claramente la capacidad de CMC-544 para provocar una regresión de tumor.

TABLA 6: EFECTO ANTITUMOR DE CMC-544 CONTRA LOS XENOINJERTOS RL NHL EN RATONES DESNUDOS

Dosis de caliqueamicina μG/KG	Crecimiento de tumor medio relativo	% T/C ²	Valor P contra vehículo
Vehículo	6.74	-	-
20	2.87	43	0.011
40	1.34	20	<0.001
60	0.58	9	<0.001
80	0.54	8	<0.001
160	0.21	3	<0.001
320	0.10	1	<0.001

¹ crecimiento de tumor relativo (RTG) calculado como (masa de tumor en la semana 3/masa de tumor al día 1) para cada animal

² 100* (RTG media para una dosis de CMC-544 / RTG media para el grupo de vehículo)

³ valor p a partir de una comparación de prueba T de un lado de CMC-544 contra vehículo usando un RTG transformado en jerarquía como la variable de respuestas. El término de error para todas las pruebas T se basa en la variante acumulada S² a través de todos los grupos de tratamiento (s²=154.54).

La capacidad de CMC-544 hecha por el nuevo procedimiento para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de linfoma de células B grandes establecidos usando los modelos de linfoma RAMOS y RL también se investigó. Se dejaron crecer los tumores y dejaron etapas hasta 1.5 o 2g de la masa de tumor después de lo cual se administró CMC-544 o un control negativo en conjugado que coincide con el isotipo (CMA-676) intraperitonealmente a una dosis de 160μg/kg de caliqueamicina conjugada manteniendo el

programa original de dosificación los días 1, 5 y 9. El mismo programa de dosificación se mostró previo para provocar una regresión de larga duración en los tumores en pequeñas etapas (ver tabla 6). Como se muestra en la figura 19, la administración de CMC-544 a los ratones que soportan linfomas RAMOS grandes provocaron una regresión gradual de la masa de linfoma persistente y para el día 20 tres de los cuatro ratones que tenían tumores estaban libres de tumores. Al observar estos ratones liberados de los tumores hasta el día 50, no indicó ningún nuevo crecimiento de linfoma RAMOS regresivo. En contraste, el control coincidente de isotipo CMA-676 no tuvo efecto en el crecimiento de tumor. Cuatro de cinco ratones que soportan tumores grandes tratados con CMA-676 se tuvieron que sacrificar antes del día 15 debido a que su carga de tumores estaba cercana al 15% de su peso corporal.

Se usó un experimento similar usando CMC-544 en el modelo de linfoma RL. La administración intraperitoneal de 160µg/kg a una dosis de >90% en un programa similar como se describe antes provocó una regresión de CMC-544 de la masa persistente de linfoma RL dentro de 30 días. Sin embargo para el día 45, dos ratones en este grupo con linfoma encogido mostraron un nuevo crecimiento de los tumores. Estos resultados indican que el CMC-544 puede provocar regresión de linfomas pequeños establecidos así como grandes. En un número pequeño de estudios que no se muestran aquí, los linfomas RL que volvieron a crecer esporádicamente después de la regresión inicial inducida por CMC-544 se volvieron a tratar nuevamente con CMC-544. Estos estudios mostraron que los tumores RL todavía eran responsables en un segundo curso de tratamiento con CMC-544

y regresaron nuevamente. Así el tratamiento con CMC-544 puede ser efectivo contra masa pequeñas y grandes de los linfomas de células B con el potencial de una terapia de repetición.

II. COMPARACIÓN IN VIVO DEL CONJUGADO HECHO CON LOS PROCESOS DE CONJUGACIÓN CMA-676 Y CMC-544

La figura 20 muestra los resultados de un experimento representativo en el cual ratones que soportan linfoma RL en etapas recibieron dos dosis diferentes (80 y 320µg/kg de caliqueamicina conjugada) de CMC-544 hecha usando el proceso de conjugación CMA-676 y el proceso de conjugación CMC-544 utilizando el programa de dosificación estándar. La eficacia antitumor observada fue dependiente de la dosis como se espera y no hubo diferencia en la eficacias de las otras dos preparaciones CMC-544. En contraste la N-acetil-gamma caliqueamicina de DMH sin conjugar administrada intraperitonealmente a 160µg/kg fue inactiva. Sin embargo, se debe enfatizar que para cada dosis de caliqueamicina conjugada, la cantidad de proteína de anticuerpo administrada en forma de un conjugado fue cuatro veces mayor para CMC-544 hecha por el proceso CMA-676 contra aquella que se hizo por el procesos CMC-544. Ya que el contenido de caliqueamicina de conjugado objetivo es responsable principalmente de provocar el efecto antitumor, es posible administrar la cantidad requerida de caliqueamicina por medio del conjugado hecho por el nuevo procedimiento usando cantidades mucho mas pequeña del anticuerpo de direccionamiento. La carga aumentada por el conjugado hecho por el proceso CMC-544 se debe en efecto a la falta de cantidades importantes de la fracción baja

121

conjugada (LCF).

III. TRATAMIENTO DE TUMORES RESISTENTES A RITUXIMAB (RITUXAN®)

La siguiente pregunta a explorarse fue si los linfomas de célula B que crecen después de la discontinuación del tratamiento con rituximab anti-CD20, comercialmente disponible (Rituxan®) todavía responden al tratamiento con CMC-544. En este punto, los linfomas RL (no en etapa) desarrollados se tratan con rituximab (Rituxan®) durante tres semanas. Conforme la terapia de rituximab (Rituxan®) continúa, se inhibe el crecimiento del linfoma RL. Una vez que cesa la terapia de rituximab (Rituxan®), los linfomas RL crecen rápidamente hasta el tamaño de ~1 g de masa, tiempo al cual se tratan con CMC-544 a la dosis intraperitoneal de 160µg/Kg. Como se muestra en las Figuras 21 y 22, estos linfomas RL todavía responden a CMC-544 con 80% de los ratones que están libres de tumor por el día 60. De esta manera, el CMC-544 es capaz de causar el regreso de linfomas de célula B con tres dosis que podrían solo inhibir por la dosificación continua de rituximab (Rituxan®).

EJEMPLO 8

EFEECTO IN VIVO E IN VITRO DE CMC-544

I. ESTUDIOS DE ENLACE Y TOXICIDAD

El CMC-544 se evaluó para su enlace a CD22 y también para su actividad en modelos in vivo e in vitro. El CMC-544 también se compara al CMA-676, un conjugado de control agrupado de isotipo de

122

hP67.6(IgG4) con caliqueamicina enlazada a AcBut, y a rituximab (Rituxan®), un IgG1 anti-CD 20 mAb quimérico, (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA.), que está comercialmente disponible y se adquiere de Medworld Pharmacy (Chestnut Ridge, NY). Se usan los siguientes anticuerpos en los estudios de domino enlazados a G5/44: BU12 (Celltech, Slough, RU); BLCAM, HD239 (Santa Cruz Biotech, San Cruz, CA); RFB-4 (Ansell Corp, Bayport, MN); SHCL-1, Leu 14 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ); 4KB128 y To 15 (Dako Corp, Carpinteria, CA); M6/13 y M5/44 (Celltech, Slough, RU). Los anticuerpos adicionales usados en los estudios de bloqueo fueron SJ10 (Immunotech, Fullerton, CA) y M17.1.1, M19.1.1, M38.1.1 (Celltech, Slough, RU). Las líneas celulares para los estudios incluyen línea de célula de linfoma Burkitt que incluyen Ramos (CRL-1923) y la línea de célula de linfoma no de Hodgkin (NHL) RL (CRL-2261) se obtienen todas de la American Type Culture Collection. Las líneas de célula se determinan para estar libres de micoplasma por el ensayo de detección de micoplasma de reacción de cadena de polimerasa (ATCC, Manassas, VA). Las líneas celulares se mantienen como cultivos de suspensión en un medio RPMI más FBS al 10%, HEPES 10mM, piruvato de sodio 1 mM, glucosa al 0.2%, penicilina G sodio 100 U/ml, y sulfato de estreptomicina 100 µg/ml.

Se evalúa si el G5/44 puede o no inhibir el enlace de mAbs de murino de especificidad conocida al CD22 por análisis BIAcore usando Fc-CD22 inmovilizado a la microplaqueta BIAcore CM5. Las unidades de resonancia de plasmón de superficie (RU) obtenidas con y sin

saturación previa del Fc-CD22 inmovilizado con G5/44 se comparan. Se realiza un análisis de interacción biomolecular usando BIACORE 2000. Los anticuerpos se pasan sobre una superficie de control en blanco (flujo celular 1, sirve como un control, no se acopló proteína) y la superficie de prueba de Fc-CD22 (flujo celular 2) inmovilizado en una microplaqueta sensora CM5, por medio de una química de acoplamiento de amina al nivel de 9,042 RU. El sensograma resultante fue la respuesta (RU) en el flujo celular 2 menos la respuesta (RU) en el flujo celular 1. se obtiene un segundo sensograma al saturar primero los flujos celulares con G5/44 (100 µg/ml) antes de la introducción de mAbs murino contra CD22 que se ha caracterizado previamente para su enlace. Inmediatamente durante la medición de la respuesta G5/44, los mAbs anti-CD22 de murino se tratan por perfusión individualmente sin remover el G544. La segunda respuesta combinada generada debido al enlace del mAb anti-CD22 murino al CD22 recubierto con G5/44, también se registra. Si el anticuerpo murino se enlaza al CD22 en sitios no relacionados a aquellos ocupados por G5/44, entonces las respuestas combinadas serán aditivas. Si el enlace de G5/44 a CD22 interfiere con o evita el enlace del segundo anticuerpo, entonces las respuestas combinadas no serán aditivas. Cada una de las segundas mediciones combinadas se corrigen para "fuera de relación" de la interacción G5/44:CD22.

El G5/44 bloquea el enlace de sólo aquellos anticuerpos que enlazan al epítipo A/dominio 1 tio Ig de CD22 (SHCL1 Leu 14 y HD239), lo que indica que G5/44 también se enlaza en este dominio de CD22. los

anticuerpos que se enlazan al epítipo B/dominio tipo Ig 3 de CD22 (RFB-4), epítipo C(dominio tipo Ig 4 de CD22 (To 15) y dominio 2 tipo Ig de CD22 (4KB128), no se bloquean por G5/44. Estos resultados indican que el sitio enlazado a G5/44 en CD22 se localiza en el primer dominio tipo Ig debido a que previene el enlace de aquellos mAbs anti CD22 que reconocen el primer dominio tipo Ig de CD22 (epítipo A). Otro anticuerpo anti CD22, M6/13 (Celltech, Slough, RU), de una subespecie desconocida también se bloquea por G5/44 (Celltech, Slough, RU), de esta manera se mapea el sitio de enlace de M6/13 para el epítipo A/dominio tipo Ig de CD22. el anticuerpo M5/44, que tiene la misma especificidad como G5/44, inhibe el enlace de G5/44, y sirve como un control positivo. El anticuerpo BU12 anti CD19 sirve como un control negativo en estas evaluaciones. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

125

TABLA 7: ENLACE DE M/AB ANTI-CD22 DE MURINO CON
ESPECIFICIDADES DEFINIDAS PARA FC-CD22 PREVIAMENTE TRATADO
CON G544. RESPUESTA DE ENLACE EXPRESADA COMO UNIDADES DE
RESONANCIA DE PLASMON DE SUPERFICIE (RU).

Anticuerpo	Dominio Ig de Epítopo de CD22	Respuesta 1 con G544	Respuesta 1 después del 2do mAb anti- CD22	Respuesta 3 (Respuesta 2-1)	Respuesta 3 ajustada para relación "APAGADA" de G544	Enlace del 2do mAb sin G544 ajustado para respaldo	Inhibición por G544 (%)
Anti CD22, SHCL-1 Leu 14	A 1,2	654.3	579.8	-74.5	9	29.3	69
Anti CD22 HD239	A 1	710.5	628.7	-81.8	1.7	19.3	91
Anti CD22 M 6/13	? ?	710.0	652.7	-57.3	26.2	152.4	83
Anti CD22 RFB-4	B 3	703.5	1108.5	405	488.5	534	9
Anti CD22 4KB128	? 2	691.0	1343.5	652.5	736.0	738.8	0
Anti CD22 To 15	C 4	676.9	1163.6	486.7	570.2	614.6	7
Anti CD22 M 5/44	Control positivo	725.1	679.3	-45.8	37.7	613.9	94
Anti CD19 BU12	Control negativo	686.2	602.7	-83.5	0	0	0

Al usar mAbs de murino de especificidad conocida para dominio individuales para CD22, la capacidad de G5/44 para bloquear el enlace de estos anticuerpos a células B se investiga. Adicionalmente, la capacidad de los mAbs para bloquear el enlace de G5/44 a células B se investiga

124

también. En estos estudios, se exponen primero 1×10^5 células Ramos al anticuerpo anti-CD22 murino (10 µg/ml de G5/44 humanizado o anti-CD22 monoclonal de ratón) durante 1 hora a 4°C antes de la exposición de las células al G5/44 (10µg/ml). Las células se incuban durante 1 hora adicional a 4°C. Después de los tratamiento del anticuerpo, las células B se peletizan y se lavan con PBS-BSA al 1% y se agrega el anticuerpo secundario apropiado (ya sea anti-humano de cabra-FIT (cadena pesada y ligera) o anti-ratón de cabra-FITC (cadena pesada y ligera)) a 100l de una dilución 1:100 en PBS-BSA al 1% durante 30 minutos a 4°C. Las células se peletizan nuevamente, se lavan, y se vuelven a suspender en PBS-BSA al 1% y se agregan a un tubo que contiene 250 µl de PBS-formaldehído al 1%. Se mide la intensidad de fluorescencia asociada con las células por citometría de flujo usando el citómetro de flujo BD FACSort.

Los resultados muestran que la exposición previa de G5/44 a células CD22+B resulta en la inhibición importante del posterior enlace de mAbs anti-CD22 M5/44 y M6/13. En contraste, el enlace de mAbs RFB4 anti-CD22, To15, HD239, y 4KB a células B no se inhibe por G5/44. La carencia de inhibición importante de HD239 enlazado a las células B por G5/44 como se detecta por citometría de flujo fue inesperada, especialmente desde que el análisis BIAcore indica que G5/44 puede bloquear el enlace de HD239 a CD22. La carencia de inhibición fuerte de HD239 enlazado por G5/44 puede explicarse con base en las diferencias en sus afinidades relativas para CD22. Cuando los mAbs anti-CD22 de murino anteriores se examinan para su capacidad para inhibir el enlace de G5/44 a células B CD22+, SHCL1 y