

Señor
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-109443- -00012-0000

Fecha: 2010-02-12 14:48:23 Dep. 2020 DIR NULVASCOR
Tra. 11 PA1LN1LIYII Lve: 379 FASLNACIONALII
Act 444 R1SPUESTARLEQUE Folios: 288

Re: P1.-WYETH HOLDINGS CORPORATION.-Solicitud de Patente de
Invención en Fase Nacional PCT para "CONJUGADOS PORTADORES DE
DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA".-Clase **A61K 39/395.-**
Expediente número **04-109.443.-**

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 2 de Octubre de 2009, y a mi memorial de plazo de 21 de Diciembre de 2009.
2. Con el fin de responder las objeciones presentadas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico No. **2968** bajo los acápites de Claridad del Capítulo Reivindicatorio, y Nivel Inventivo, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos, por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones.
3. **SOLICITUD DIVISIONAL**

En primera instancia, y antes de entrar a discutir los argumentos técnicos y las modificaciones que permiten superar las objeciones anteriormente mencionadas, me permito manifestar a ese Despacho que es deseo del solicitante presentar **una solicitud divisional** que tiene como objeto composiciones que comprenden conjugados de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo actualmente reclamados, de forma que la solicitud original esté dirigida a reivindicar en forma particular solo las realizaciones preferidas que se encuentran bajo el alcance de la presente invención.

Por lo tanto, debidamente autorizado por el solicitante, y de conformidad con el Artículo 36 de la Decisión Andina 486 de 2000, el Artículo 7 del Decreto 2591 de 13 de Diciembre de 2000 y el Artículo 11 de la Resolución No. 00210 de 15 de Enero de 2001, **se ha dividido la presente solicitud de patente en dos (2) solicitudes, a saber:**

- (1) **Una solicitud original** compuesta por **45** reivindicaciones que encuentran su sustento en la descripción y en el capítulo reivindicatorio originalmente presentado a ese Despacho con la presente solicitud

número **04-109.443**, y que corresponden específicamente a las reivindicaciones **1, 4, 5, 7, 9, 11 a 13, 15, 18 a 21, 23, 24, 26 a 32, 36, 38 a 50, 57, 58, y 60 a 66** que actualmente se encuentran bajo estudio, sobre las cuales se han hecho modificaciones con el fin de superar las objeciones de claridad de la solicitud hechas por el Señor Examinador, tal como se expondrá más adelante en este mismo memorial.

De esta manera, el capítulo reivindicatorio de la solicitud número **04-109.443** original, se encuentra ahora dirigido a proteger un método para preparar una composición que comprende conjugados de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo, así como la composición misma, donde el anticuerpo y el derivado de caliqueamicina están completamente definidos de acuerdo con las realizaciones preferidas reveladas dentro de la descripción de la presente solicitud.

- (2) **Una solicitud fraccionada** número **04-109.443A** que presenta un nuevo capítulo reivindicatorio constituido por **38** reivindicaciones que encuentran su sustento tanto en la descripción como en el capítulo reivindicatorio originalmente presentados, y que corresponden a la materia objeto de las reivindicaciones **1, 2, 8 a 22, 27 y 33 a 52** actualmente presentadas para la solicitud original número **04-109.443**, modificadas de manera que se haga referencia a un "*método para preparar una composición que comprenda conjugados de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo*" y excluyendo completamente las composiciones que son ahora objeto de la solicitud original.

*Divisional dirigida
conjugados
caliqueamicina/
anti-CD22*

Consecuentemente, la nueva solicitud fraccionada número **04-109.443A** se encuentra dirigida a proteger un método para preparar una composición que comprende conjugados de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo, donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD22 que contiene secuencias tanto de cadena pesada como de cadena liviana diferentes a las que están presentes en el anticuerpo que hace parte del conjugado que es ahora objeto de la correspondiente solicitud original **04-109.443**.

En relación con lo anterior me permito señalar que los capítulos reivindicatorios tanto de la solicitud original como de la nueva solicitud divisional cuentan con pleno sustento en la descripción de la solicitud en estudio, y no constituyen de ninguna manera una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada toda vez que estos reclaman materia que se encuentra cubierta por el alcance del capítulo reivindicatorio actualmente en estudio.

Acompaño los documentos que detallo a continuación, relacionados con cada una de las solicitudes resultantes del presente fraccionamiento:

(1) **SOLICITUD No. 04-109.443: "CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQEAMICINA"**

(a) Nuevo capítulo reivindicatorio modificado compuesto por **45** reivindicaciones que comprende las reivindicaciones 1, 4, 5, 7, 9, 11 a 13, 15, 18 a 21, 23, 24, 26 a 32, 36, 38 a 50, 57, 58, y 60 a 66 actualmente presentadas, reenumeradas como nuevas reivindicaciones 1 a 45, cuyo sustento se encuentra adicionalmente en la descripción de la solicitud número **04-109.443** inicialmente radicada el 29 de Octubre de 2004.

(2) **SOLICITUD DIVISIONAL A: "CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQEAMICINA".**

(a) Recibos números 09-97,030 y 10-589, expedidos por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acreditan el pago de los derechos que causa el presente fraccionamiento;

(b) Resumen, Objeto y finalidad de la invención y páginas 1 a 121 del texto de la descripción que corresponden al originalmente presentado en la solicitud número **04-109.443** inicialmente presentada;

(c) Páginas 122 a 131 del nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por **38** reivindicaciones que comprenden las reivindicaciones 1, 2, 8 a 22, 27 y 33 a 52 actualmente presentadas en la solicitud número **04-109.443**, modificadas, las cuales encuentran pleno sustento en la descripción y en el capítulo reivindicatorio presentado con la solicitud número **04-109.443** inicialmente radicada;

(d) Figuras 1 a 35;

(e) Listado de Secuencias 1-32;

(f) Extracto de la solicitud, en sus dos formas, que incluye el título que se encuentra de acuerdo con el objeto de la presente invención fraccionada y que incluye la reivindicación 1;

(g) Fotocopia del documento que acredita a la suscrita ALICIA LLOREDA y/o al doctor GUSTAVO TAMAYO, y/o a la doctor IGNACIO SANTAMARIA

y/o a al doctor ENRIQUE ALVAREZ, en los términos del Párrafo 1º del Artículo 543 del Decreto-Ley 410 de 1971, como Representantes Legales en Bogotá para todos los asuntos relacionados con la Propiedad Industrial de la sociedad **WYETH HOLDINGS CORPORATION**, organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Maine, Estados Unidos de América, y domiciliada en Madison, Estado de New Jersey, Estados Unidos de América;

(h) Fotocopia de los documentos que acreditan el traspaso que los autores del invento de la referencia, hacen a favor de mí representado de sus derechos sobre el mismo junto con las Traducciones Oficiales números 2004-12-23-675, 2004-12-23-676 y 2004-12-23-677;

(i) Tarjeta de propietario; y

(j) Formato Único de Conversión, División y Fusión de Solicitudes número 2000-14.

4. **CLARIDAD DEL CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

De otra parte, el Señor Examinador dentro de su Concepto Técnico No. **2968** objeta la claridad del capítulo reivindicatorio actualmente en estudio, por considerar que la reivindicación 1 no define de forma clara todos los componentes del conjugado de derivado de caliqueamicina/anticuerpo de la invención señalando específicamente el componente **X** y el anticuerpo **Pr**.

Así mismo, el Señor Examinador indica que la reivindicación 67 y sus dependientes se refieren a métodos para obtener un conjugado que posee además otro agente bioactivo, realización que no estaría ilustrada por ningún ejemplo dentro de la descripción de la solicitud en estudio.

Por último, el Señor Examinador señala que existe un error tipográfico dentro de las reivindicaciones 86 y 88.

Tomando en consideración todo lo anterior, es deseo del solicitante modificar el capítulo reivindicatorio actualmente en estudio con el fin de que este describa de manera totalmente clara y concisa el objeto de la presente invención de acuerdo con las realizaciones preferidas reveladas dentro de la descripción de la solicitud en estudio.

En conexión con lo anterior, me permito resaltar que las mencionadas modificaciones no constituyen de manera alguna una ampliación al alcance de la

invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que se está delimitando de forma más precisa el objeto de la invención según lo revelado en la descripción de la solicitud, tal como se muestra a continuación.

- **Reivindicación 1.** Con el propósito de clarificar aún más el objeto de la invención se ha modificado el preámbulo de esta reivindicación para que haga referencia a un *"método para preparar una composición que comprende conjugados de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo"*, lo cual mejora la claridad del capítulo reivindicatorio, por cuanto una de las características distintivas de la invención, la fracción de baja conjugación (LCF), se entiende dentro del contexto de una composición que comprende anticuerpos tanto conjugados como no conjugados. Por otro lado, se ha restringido el componente **Pr** del conjugado, definiéndolo como un anticuerpo quimérico o humanizado anti-CD22 el cual comprende específicamente ciertas secuencias de aminoácidos como se considera en las páginas 18 y 19 de la descripción de la solicitud. Así mismo, se ha definido la ligadura hidrolizable **X** como ácido 4-(4-acetilfenoxi)butanoico (AcBut) y **W** como NAc-gamma caliqueamicina, tal como se encuentra en las realizaciones preferidas de la invención, de acuerdo con lo revelado en la página 44 y en el ejemplo 3 de la página 79 de la descripción.

En relación con lo anterior me permito resaltar que la persona versada en la materia a partir del nombre químico *"NAc-gamma caliqueamicina"* reconocería sin lugar a dudas la estructura química del compuesto al cual se está haciendo referencia, la cual es también ilustrada en la figura 17 de la descripción de la solicitud en estudio.

- **Reivindicaciones 2 y 3.** Como consecuencia de las modificaciones realizadas sobre la reivindicación 1 estas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 4 y 5 (nuevas reivindicaciones 2 y 3).** Estas reivindicaciones no han sido modificadas y corresponden a las originalmente presentadas.
- **Reivindicación 6.** Me permito manifestar que es deseo del solicitante **eliminar** esta reivindicación del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicación 7 (nueva reivindicación 4).** Se ha hecho esta reivindicación dependiente de la reivindicación 1.

- **Reivindicación 8.** Esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicación 9 (nueva reivindicación 5).** Esta reivindicación corresponde a la anteriormente presentada, ajustando la dependencia acorde con la nueva numeración.
- **Reivindicación 10.** Se ha **eliminado** esta reivindicación del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 11 a 12 (nuevas reivindicaciones 6 y 7).** Estas reivindicaciones no han sido modificadas y corresponden a las originalmente presentadas.
- **Reivindicación 13 (nueva reivindicación 8).** Se ha modificado esta reivindicación para hacerla dependiente de la nueva reivindicación 6, y se ha eliminado la expresión "el paso (2) (b)". De esta forma la materia reclamada se ajusta a lo ilustrado en el ejemplo 3 de la página 79 de la descripción de la solicitud.
- **Reivindicación 14.** Esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicación 15 (nueva reivindicación 9).** Se ha ajustado la dependencia de acuerdo con la nueva numeración.
- **Reivindicaciones 16 y 17.** Estas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicación 18 (nueva reivindicación 10).** Esta reivindicación no ha sido modificada y corresponde a la anteriormente presentada.
- **Reivindicación 19 (nueva reivindicación 11).** Se han eliminado de esta reivindicación 4 de los medios cromatográficos anteriormente considerados y se ha modificado la dependencia acorde con la nueva numeración, ajustando la materia reclamada a lo revelado en los ejemplos 3 y 9 de las páginas 79 y 112 de la descripción de la solicitud.
- **Reivindicación 20 (nueva reivindicación 12).** Se ha ajustado la dependencia según la nueva numeración.

- **Reivindicación 21 (nueva reivindicación 13).** Se ha modificado el preámbulo de esta reivindicación para que haga referencia a "***una composición que comprende conjugado de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo anti-CD22***", y se han definido los componentes ***Pr, X*** y ***W*** del conjugado congruentemente con las modificaciones realizadas en la reivindicación 1.
- **Reivindicación 22.** Esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 23 y 24 (nuevas reivindicaciones 14 y 15).** Se ha modificado el preámbulo para que hagan referencia a "***la composición de la reivindicación 13***".
- **Reivindicación 25.** Esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 26 a 32 (nueva reivindicaciones 16 a 22).** Se han modificado estas reivindicaciones para que se refieran a "***la composición***", se ha eliminado la expresión "***y CDRs no humanos***" en congruencia con la modificación realizada en la reivindicación 1, que define el anticuerpo como no humano. Adicionalmente se han ajustado las dependencias acorde con la nueva numeración.
- **Reivindicaciones 33 a 35.** Estas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicación 36 (nueva reivindicación 23).** Se ha modificado el paso (a) del método reclamado para que haga referencia a "***la composición que comprende un conjugado de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo de conformidad con la reivindicación 21***", y se ha definido de forma más precisa el paso (d) de dicho proceso limitando el tiempo a máximo **72** horas, en concordancia con lo revelado en los ejemplos 3 y 9 de las páginas 79 y 112 de la descripción de la solicitud.
- **Reivindicación 37.** Esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 38 a 50 (nuevas reivindicaciones 24 a 36).** Se han ajustado las dependencias acorde con la nueva numeración

- **Reivindicaciones 51 a 56.** Estas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 57 y 58 (nuevas reivindicaciones 37 y 38).** Se ha modificado la dependencia en concordancia con la nueva numeración.
- **Reivindicación 59.** Esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 60 a 66 (nuevas reivindicaciones 39 a 45).** Se ha modificado la dependencia de estas reivindicaciones de acuerdo con la nueva numeración. Dentro de la reivindicación 61 se ha eliminado la expresión "*CDRs donadores no humanos*" con el fin de hacerla congruente con las modificaciones realizadas en la reivindicación 1.
- **Reivindicaciones 67 a 89.** Estas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.

Como consecuencia de las modificaciones anteriores, el capítulo reivindicatorio modificado queda constituido por **45** reivindicaciones que definen de forma clara el objeto de la invención y que hacen únicamente referencia a las realizaciones preferidas que cuentan con pleno sustento en la descripción de la solicitud en estudio, ilustradas en los ejemplos 3 y 9 de las páginas 79 y 112 de la descripción, superando de esta forma las objeciones presentadas por el Señor Examinador a este respecto.

De esta forma, el capítulo reivindicatorio modificado es totalmente claro y conciso al reclamar el método y la composición objeto de la presente solicitud, cumpliendo de esta forma a cabalidad con lo preceptuado en el Artículo 30 de la Decisión 486.

5. **NIVEL INVENTIVO.**

El Señor Examinador objeta la altura inventiva de la solicitud en estudio a la luz de las enseñanzas de los documentos **US5712374 (D1)** y **US6183744 (D2)**.

En referencia a estos documentos el Señor Examinador indica que "*para un experto en la materia era evidente a partir del anticuerpo CD-22 divulgado en D2, utilizar un conjugado como el propuesto en D1 y hacer las estandarizaciones de la técnica necesarias para conseguir su estabilidad y de esta manera resolver el problema técnico planteado*".

Sobre este particular me permito manifestar que los citados documentos no brindan las herramientas suficientes para que la persona versada en la materia obtenga de forma evidente el método y la composición objeto de la presente solicitud, ni por sí mismos ni en su combinación, hecho que es aún más claro a la luz de las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio que fueron discutidas en el numeral anterior de este mismo memorial, tal como me permito mostrar a continuación.

5.1. El documento D1 es el estado del arte más cercano pero no conduce a obtener la presente invención.

Como se discutió en mi memorial de Julio 7 de 2009, si bien el documento D1 revela un método para obtener conjugados monoméricos de derivado de caliqueamicina /portador proteico con una agregación disminuida, este proceso está dirigido específicamente a disminuir la agregación indeseada de los conjugados, sin hacer referencia alguna a la fracción conjugada baja (LCF). Es decir, el documento D1 se dirige a obtener un alto porcentaje de conjugados de forma monomérica, sin evaluar la existencia de una fracción de baja conjugación.

En relación con lo anterior me permito resaltar que dicho documento D1 no indica o sugiere de ninguna manera que la LCF pueda ser un parámetro de interés para tener en cuenta cuando se desea una composición que comprenda conjugados monoméricos de derivado de caliqueamicina y un portador proteico, y mucho menos que es preferible que este valor sea menor al 10%, tal como lo establece la presente solicitud.

Dentro de este contexto vale la pena resaltar que dicha fracción conjugada baja (LCF) corresponde al porcentaje de anticuerpo en una preparación dada que tiene anticuerpo sin conjuguar o no completamente conjugado, la cual disminuye la eficiencia de la acción de la composición, como claramente se revela en la descripción de la presente solicitud: *"La presencia de LCF en el producto se constituye en un uso ineficiente del anticuerpo, ya que no contiene al fármaco citotóxico. Esta fracción puede también competir con el conjugado portador-caliqueamicina por la molécula objetivo y reducir potencialmente el direccionamiento último, resultando en una eficacia reducida del fármaco citotóxico"* (Páginas 5 y 6, descripción de la solicitud en estudio, páginas 3 y 4 solicitud original WO03/092623).

En este sentido me permito señalar que la importancia de poseer una composición que contenga una LCF menor al 10% fue comprobada por el solicitante, como lo muestran los resultados del Ejemplo 6, II, de la página 92 de la descripción de la solicitud en estudio, donde se compara la acción in vivo de los dos conjugados (CMA-676 correspondiente a D1 y CMC-544 obtenido por el método de la presente

solicitud). Como se expuso en mi mencionado memorial de Julio 7 de 2009, el solicitante ha demostrado que al seguir el procedimiento revelado en D1 se obtiene un conjugado con una alta fracción LCF (página 49 y en tabla 1 de la página 50 de la descripción de la solicitud en estudio), siendo esta superior al 40%.

De esta forma, los mencionados resultados del Ejemplo 6, II, de la presente solicitud, muestran como se requiere cuatro veces más conjugado CMA-676 con respecto a CMC-544 para obtener la misma cantidad de proteína de anticuerpo y por lo tanto elicitara la misma respuesta en el organismo. Esto significa que gracias al bajo valor de LCF presente en las composiciones objeto de la solicitud la dosis de caliqueamicina requerida puede ser suministrada empleando cantidades más pequeñas de anticuerpo de direccionamiento.

Por otro lado, el conjugado de la invención ha probado igualmente ser más eficiente que la administración de un anticuerpo solo, como se observa en el ejemplo 6, III (página 93, descripción de la solicitud en estudio) donde se comprobó que el conjugado CMC-544 es capaz de producir la regresión de linfomas de células B con tres dosis, resultado que sólo podría ser obtenido por la dosificación continua de rituximab (Rituxan®, anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20).

Ahora bien, con relación a las enseñanzas de D1 me permito resaltar que dentro de dicho documento se revela que los conjugados allí obtenidos poseen **una baja agregación**, sin embargo este parámetro es completamente distinto a la fracción conjugada baja (LCF) medida por la presente solicitud, toda vez que la agregación se refiere a la unión de los conjugados debido a la naturaleza hidrofóbica de las caliqueamicinas y no al porcentaje de anticuerpo sin conjugar.

Consecuentemente, las enseñanzas de D1 no permiten que la persona versada en la materia si quiera considere la LCF como un parámetro importante a tener en cuenta dentro de composiciones que comprendan conjugados de derivado de caliqueamicina/anticuerpo, buscando que estas posean una actividad mejorada, y mucho menos dichas enseñanzas permitirían ver a dicha persona versada la relevancia de la entrada de caliqueamicina en el control de este parámetro, hecho que fue encontrado por el solicitante tal como es revelado en la página 49 de la descripción de la solicitud: *"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 LCF y la formación de agregados, mientras que la temperatura y el pH tuvieron influencias menores"*.

En relación con lo anterior me permito señalar que en virtud de las modificaciones realizadas sobre el capítulo reivindicatorio, que fueron expuestas en el numeral 6 de este mismo memorial, la presente invención claramente se dirige a

proteger composiciones que comprenden un conjugado constituido por un anticuerpo anti-CD22 con una secuencia específica, tal como el conjugado CMC-544 revelado en la descripción de la solicitud, las cuales han demostrado tener una actividad mejorada con respecto a aquellas que han sido obtenidas por el método revelado por D1 (CMA-676).

En este sentido me permito resaltar que, como se mencionó anteriormente, las composiciones que son objeto del capítulo reivindicatorio modificado están constituidas por un anticuerpo quimérico o humanizado anti-CD22 que posee regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) particulares, anticuerpos que no están de ninguna manera considerados dentro de las revelaciones de D1 y por lo tanto no sería posible predecir a partir de las enseñanzas de dicho documento que una composición que comprenda un conjugado de NAc- gamma caliqueamicina/anticuerpo anti-CD22 como el reclamado por la presente solicitud tendría dicho comportamiento mejorado con respecto a aquellos conjugados que hacen parte del estado del arte.

En este punto me permito referirme al señalamiento que hace el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina con respecto a las definiciones de "obvio" y "evidente" en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente¹:

"Resulta pertinente, a los efectos del artículo 4 de la Decisión 344, definir qué se entiende por "obvio" y por "evidente" a fin de determinar qué se debe entender por nivel inventivo.

Lo obvio es aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo "que se encuentra o pone delante de los ojos, muy claro o que no tiene dificultad". Mientras que lo evidente consiste en la "certeza clara y manifiesta de la que no se puede dudar; cierto, claro, patente y sin la menor duda". De forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.

En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado."

De esta forma, al no "saltar a la vista de manera clara y directa" a partir de las enseñanzas de D1 que un parámetro a ser controlado dentro de una composición que comprenda un conjugado de derivado de caliqueramicina/anticuerpo es la fracción

¹ Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, PROCESO 192-IP-2005

baja conjugada LCF, y al no tener "certeza clara y manifiesta" de que al ser dicho parámetro menor del 10% se obtendría un comportamiento mejorado del conjugado en el tratamiento de tumores, la persona versada en la materia no obtendría de ninguna manera la presente invención a partir de lo revelado en el citado documento D1.

5.2. **El documento D2 no supera las deficiencias de D1 para obtener la presente invención.**

Por otro lado, a pesar del hecho que el documento D2 hace referencia a un método de tratamiento contra la malignidad de células-B que suministra bajas dosis de anticuerpos anti-CD22, los cuales pueden estar acompañados suplementariamente por una proteína terapéutica como un inmunconjugado o proteína de fusión, dicho documento no sugiere de ninguna manera un conjugado que incluya caliqueamicina, sino que revela otros agentes terapéuticos de manera general como cualquier fármaco, toxina, inmunomodulador, quelante, compuesto de boro, agente fotoactivo o tinte y radioisótopo (columna 4, líneas 13 a 28. D2).

De esta forma, el citado documento D2 no revela un anticuerpo quimérico o humanizado anti-CD22 que particularmente posea regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) como las incluidas en el anticuerpo que hace parte del conjugado de la invención, y mucho menos muestra la utilidad de obtener un conjugado de NAc- gamma caliqueamicina con dicho anticuerpo.

Sumado a lo anterior, **aún si la persona versada en la materia decidiera combinar las enseñanzas de D1 y D2, no produciría de manera evidente la presente invención, sino que obtendría un método y un conjugado como el que es ejemplificado en la descripción de la solicitud en estudio bajo el nombre CMA-676, el cual es un conjugado de derivado de caliqueamicina/anticuerpo anti-CD22 con características diferentes al reclamado por la solicitud.**

En relación con lo anterior me permito reiterar que dicho conjugado CMA-676 es construido a partir de la metodología revelada en D1, y posee una fracción conjugada baja (LCF) mayor al 40% lo que lo hace menos potente que el conjugado de la invención en el tratamiento tumoral.

Como consecuencia de lo anterior, para obtener la presente solicitud a partir del estado del arte, no bastaría con que la persona versada en la materia combinara las enseñanzas de D1 y D2, sino que adicionalmente tendría que modificar el proceso y conjugado obtenido de dicha combinación buscando obtener una fracción conjugada baja (LCF) menor al 10%.

En conexión con lo anterior, me permito reiterar que ninguno de los citados documentos D1 y D2 indica o sugiere que dicha fracción LCF pueda llegar a ser un parámetro importante en la actividad del conjugado, y por lo tanto la persona versada en la materia no tendría ninguna motivación para luego de combinar las enseñanzas de D1 y D2 reducir específicamente este parámetro buscando composiciones que comprendan conjugados de derivado de caliqueamicina/anticuerpo con actividad mejorada en el tratamiento de tumores.

Como consecuencia de lo anterior, no bastaría una simple "estandarización de la técnica" como lo señala el Señor Examinador, toda vez que ninguno de los documentos se refiere a que sea deseable ajustar un cierto parámetro del conjugado y mucho menos que dicho parámetro sea la fracción de baja conjugación (LCF). Así mismo, como se mencionó anteriormente en este mismo memorial, la persona versada en la materia no podría de ninguna manera predecir a partir de de las enseñanzas de D1 y D2 la comprobada actividad mejorada de las composiciones de la invención.

Si a la luz de este hecho se tiene en consideración el señalamiento que con respecto a la evaluación de Nivel Inventivo de una solicitud hace el Manual Andino para el examen de solicitudes de patente, importante publicación preparada por la Secretaria de la Comunidad Andina que si bien no es vinculante si brinda una herramienta valiosa para la unificación de la interpretación y la aplicación de la Decisión 486 dentro de los países miembros de la Comunidad Andina:

*"Se considera el nivel inventivo como un proceso creativo cuyos resultados **no se deducen del estado de la técnica en forma evidente** para un técnico con conocimientos medios en la materia, en la fecha de presentación de la solicitud o de la prioridad reconocida".² (Resaltado fuera de texto).*

Es evidente que la presente solicitud conlleva Nivel Inventivo frente al estado del arte más próximo.

6. **CONCLUSIÓN.**

Por último me permito resaltar que las modificaciones realizadas sobre el capítulo reivindicatorio en virtud de la solicitud divisional presentada hacen que dicho capítulo sea totalmente claro y conciso al reclamar el método y la composición objeto de la presente solicitud.

² Secretaria General de la Comunidad Andina "Manual para el examen de solicitudes de patentes de invención en las oficinas de propiedad industrial de los países de la Comunidad Andina". Lima, 2004. Página 76.

Por otro lado, como consecuencia de las mencionadas modificaciones realizadas sobre el capítulo reivindicatorio, es claro que la persona versada en la materia no podría obtener de forma evidente la materia reclamada por la presente solicitud a partir de las enseñanzas de D1 y D2, máxime cuando la combinación de dichas enseñanzas conduciría a un conjugado que ya ha sido ejemplificado dentro de la descripción de la solicitud en estudio, el cual no posee las mismas ventajas técnicas que el que es objeto de la presente invención.

Así mismo, es claro que la actividad mejorada de las composiciones reclamadas por la presente solicitud no podría de ninguna manera ser prevista a partir de las enseñanzas de D1 y D2, por lo que es irrefutable el Nivel Inventivo que conlleva la solicitud en estudio frente al estado del arte más próximo.

7. Teniendo en cuenta que la fecha de presentación de la solicitud resultante del presente fraccionamiento es la misma --**29 de Octubre de 2004**-- atentamente solicito a usted se sirva dar a la solicitud fraccionada el mismo número de Expediente de la solicitud original, acompañada de la letra **A** para su identificación. Adicionalmente, la Clasificación Internacional para esta solicitud fraccionada, acorde con el objeto de la misma, es la siguiente: **A61K 39/395**.

8. En cuanto a la reivindicación de la prioridad respecto de la solicitud divisional, es la misma invocada en la solicitud original, la cual fue reivindicada oportunamente en Fase Internacional de la solicitud número 60/377,440 de 2 de Mayo de 2002.

9. Ratifico a usted que la sociedad titular de la solicitud fraccionada en cuestión es **WYETH HOLDINGS CORPORATION**; organizada y existente de conformidad con las leyes del estado de Maine, Estados Unidos de América y domiciliada en Madison, Estado de New Jersey, Estados Unidos de América.

10. Así mismo, reitero a usted que el documento que acredita mi calidad de Representante Legal de **WYETH HOLDINGS CORPORATION** para todos los asuntos de la Propiedad Industrial, fue presentado junto con mi memorial de 31 de Enero de 2005.

11. De conformidad con lo establecido por el Artículo 36 de la Decisión 486 de 2000, solicito a ese Despacho se sirva aceptar y estudiar la solicitud divisional presentada y conceder el privilegio de patente solicitado.

454-457

12. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las argumentaciones presentadas y de las modificaciones realizadas y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

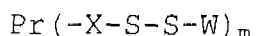
ALICIA LLOREDA RICAURTE
39690713
53215
ALICIA LLOREDA RICAURTE
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén

12 FEB. 2010



REIVINDICACIONES

① Un método para preparar una composición que comprende conjugados de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo con una fracción conjugada baja reducida (LCF) que tiene la fórmula,



En donde:

Pr es un anticuerpo quimérico o humanizado anti-CD22, donde dicho anticuerpo comprende SEQ ID NO:1 por CDR-H1, SEQ ID NO:2 ó SEQ ID NO:13 ó SEQ ID NO:15 ó SEQ ID NO:16 o los residuos 50 a 66 de SEQ ID NO: 27 o la secuencia GINPGNQYTTYKRNLKG o la secuencia GINPGNNYATYRRNLKG, ó la secuencia GINPGNNYATYRRKFQG por CDR-H2, SEQ ID NO:3 por CDR-H3, SEQ ID NO:4 por CDR-L1, SEQ ID NO:5 por CDR-L2 y SEQ ID NO:6 por CDR-L3;

X es el ácido 4-(4-acetilfenoxi)butanoico (AcBut);

W es NAc-gamma caliqueamicina;

m es la carga promedio para un producto de conjugación purificado de manera tal 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, dicho método caracterizado porque comprende las etapas de:

(1) agregar el derivado de caliqueamicina al anticuerpo en donde el derivado de caliqueamicina es 4.5-11% en peso del anticuerpo;

(2) incubar el derivado de caliqueamicina y el anticuerpo en una solución amortiguadora, compatible con

la proteína, no nucleofílica que tiene un pH en el rango desde alrededor de 7 hasta 9 para producir una ambigua composición que comprende un conjugado de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo, en donde la solución comprende además (a) un cosolvente orgánico, y (b) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C₆-C₁₈ o su sal, y en donde la incubación se conduce a una temperatura en el rango desde alrededor de 30°C hasta alrededor de 35°C durante un periodo de tiempo en el rango desde alrededor de 15 minutos hasta 24 horas; y

(3) someter la composición producida en la etapa (2) a un proceso de separación cromatográfica para separar los conjugados de derivados de caliqueamicina monomérico/anticuerpo con una carga en el rango de 4-10 % en peso de caliqueamicina y con una fracción conjugada baja (LCF) debajo de 10 por ciento del anticuerpo no conjugado, derivado de caliqueamicina, y conjugados agregados.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:19, y 14 una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:27.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:28 y una cadena pesada que 14 comprende SEQ ID NO:30.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende los residuos 50 a 66 de SEQ ID NO:27 por CDR-H2.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la caliqueamicina se funcionaliza con 3-mercapto-3-metil butanoil hidrazida.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el aditivo de la etapa (2) (b) es ácido octanoico o su sal.

7. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el aditivo de la etapa (2) (b) es ácido decanoico o su sal.

8. El método de conformidad con la reivindicación 6, donde el aditivo se provee en una concentración de menos de 200 mM.

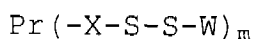
9. El método de conformidad con la reivindicación 7, donde el aditivo se provee en una concentración de menos de 50 mM.

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el proceso de separación cromatográfica de la etapa (3) es cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) se lleva a cabo usando un medio cromatográfico de Butil Sefarosa 4 de flujo rápido o medio cromatográfico de Octil Sefarosa 4 de flujo rápido.

12. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) se lleva a cabo usando un medio cromatográfico de Butil Sefarosa 4 de flujo rápido.

13. Una composición que comprende un conjugado de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo anti-CD22 con una fracción conjugada baja reducida (LCF) por debajo del 10 por ciento que tiene la fórmula:



caracterizado porque:

Pr es un anticuerpo quimérico o humanizado anti-CD22, donde dicho anticuerpo comprende SEQ ID NO:1 por CDR-H1, SEQ ID NO:2 ó SEQ ID NO:13 ó SEQ ID NO:15 ó SEQ ID NO:16 o los residuos 50 a 66 de SEQ ID NO: 27 o la secuencia GINPGNQYTTYKRNLKG o la secuencia GINPGNNYATYRRNLKG, ó la secuencia GINPGNNYATYRRKFQG por CDR-H2, SEQ ID NO:3 por CDR-H3, SEQ ID NO:4 por CDR-L1, SEQ ID NO:5 por CDR-L2 y SEQ ID NO:6 por CDR-L3;

y bs?

X es el ácido 4-(4-acetilfenoxi)butanoico (AcBut);

W es NAc-gamma caliqueamicina;

m es la carga promedio para un producto de conjugación purificado de manera tal que la

caliqueamicina constituye 4-10% del conjugado en peso; y

$(-X-S-S-W)_m$ es un derivado de caliqueamicina,

14. La composición de conformidad con la reivindicación 13, caracterizada porque el anticuerpo anti-CD22 comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:19 y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:27.

15. La composición de conformidad con la reivindicación 13, caracterizada porque el anticuerpo anti-CD22 comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:28 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 30.

16. La composición de conformidad con la reivindicación 25, caracterizada porque el anticuerpo anti-CD22 comprende los residuos 50 a 66 de SEQ ID NO:27 por CDR-H2.

17. La composición de conformidad con la reivindicación 13, caracterizada porque el anticuerpo anti-CD22 comprende un dominio variable que comprende regiones de estructura aceptora humanas.

18. La composición de conformidad con la reivindicación 17, caracterizada porque las regiones de estructura del aceptor humano del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se basan en SEQ ID NOS 21 y 22 y comprende un residuo donador en la posición 1, 28, 48, 72 y 97 en SEQ ID NO:8.

19. La composición de conformidad con la reivindicación 18, caracterizada porque el anticuerpo anti-CD22 comprende además residuos de donador en las posiciones 68 y 70 en SEQ ID NO:8.

20. La composición de conformidad con la reivindicación 17, caracterizada porque el anticuerpo anti-CD22 comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una región de estructura del aceptor humano basada en SEQ ID NOS:17 y 18 y además comprende residuos de donador en las posiciones 2, 4, 42, 43, 50, y 65 en SEQ ID NO:7.

21. La composición de conformidad con la reivindicación 20, caracterizada porque el anticuerpo anti-CD22 comprende además un residuo de donador en la posición 3 en SEQ ID NO:7.

22. La composición de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque el anticuerpo anti-CD22 comprende una región variable de la cadena ligera comprendiendo SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:8.

(23) Un método para la preparación de una composición liofilizada estable de un conjugado de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo, el método caracterizado porque comprende:

Cualquier anticuerpo

(a) disolver la composición que comprende un

conjugado de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo de conformidad con la reivindicación 13 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% por peso, un agente de volumen polimérico a una concentración de 0.5-1.5% por peso, electrolitos a una concentración de 0.01M hasta 0.1 M, un agente que facilita la solubilidad a una concentración de 0.005-0.05% por peso, agente amortiguante a una concentración de 5-50 mM de tal manera que el pH final de la solución es 7.8-8.2, y agua;

(b) dispersar la solución de arriba en los viales a una 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 de secado por congelación inicial a una presión de secado primaria de 20 hasta 80 micrones a una temperatura de anaquel a -10°C hasta -40°C durante 24 hasta 72 horas; y

(e) someter el producto secado por congelado de la etapa (d) a una etapa de secado secundario a una presión de secado de 20 hasta 80 micrones a una temperatura de anaquel de +10°C hasta + 35°C durante 15 hasta 30 horas.

24. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el crioprotector es sacarosa.

25. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque la sacarosa se presenta a una

concentración de 1.5% por peso.

26. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el agente de volumen polimérico es Dextrano 40, y está en una concentración de 0.9% por peso.

27. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el agente de volumen polimérico es almidón de hidroxietilo 40, y está en una concentración de 0.9% por peso.

28. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el electrolito es cloruro de sodio, y se presenta en una concentración de 0.05 M.

29. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el agente facilitador de la solubilidad es un tensoactivo.

30. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el tensoactivo es polisorbato 80, y se presenta en una concentración de 0.01% por peso.

31. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el agente de solución amortiguadora es trometamina, y se presenta en una concentración de 0.02 M.

32. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el pH de la solución de la etapa (a) es 8.0.

33. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la solución en la etapa (b) se repartió en viales a temperatura de +5°C.

34. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque en la etapa (c) el congelamiento de la solución en viales se llevó a cabo a temperaturas congelantes de -45°C.

35. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque en la etapa (d) la solución congelada se sujetó a una etapa de secado por congelado inicial a una presión de secado primaria de 60 micrones y a una temperatura de una anaquel de -30°C durante 60 horas.

36. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque en la etapa (e), el producto secado por congelado de la etapa (d) se sometió a una etapa de secado secundaria a una presión de secado de 60 micrones a una temperatura de anaquel de +25°C durante 24 horas.

37. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera SEQ ID NO:19, y una

región variable de cadena pesada SEQ ID NO:27.

38. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:28 y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:30.

39. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el anticuerpo comprende los residuos 50 a 66 de SEQ ID NO:27 por CDR-H2.

40. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el anticuerpo comprende un dominio variable que comprende regiones de estructura aceptora humanas.

41. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque las regiones de estructura del aceptor humano del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD22 se basan en SEQ ID NOS: 21 y 22 y comprende residuos de donador en las posiciones 1, 28, 48, 72 y 97 en la SEQ ID NO:8.

42. El método de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque el anticuerpo comprende además residuos de donador en las posiciones 68 y 70 en SEQ ID NO:8.

43. El método de conformidad con la reivindicación

41, caracterizado porque el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una región de estructura del aceptor humano basada en SEQ ID NOS:17 y 18 y además comprende residuos de donador en las posiciones 2, 4, 42, 43, 50 y 65 en SEQ ID NO:7.

44. El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el anticuerpo comprende además un residuo de donador en la posición 3 en SEQ ID NO:7.

45. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:8.

SECCION 2/3

DIVISIONAL
WYETH HOLDINGS CORPORATION
EXPEDIENTE No. 04-109.443A

Divisional no tenido en cuenta por petición
del mismo solicitante, ver folio 771.

467/82



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 04-109.443A

54. TITULO "CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS
DE CALIQUEAMICINA"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K 39/395

71. SOLICITANTE WYETH HOLDINS CORPORATION

DOMICILIO Madison, Estado de New Jersey, Estados
Unidos de América

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

72. BOGOTA, D.C.

(FORMA P 10)

FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSION, DIVISION Y FUSION DE SOLICITUDES
 2000-14

1 SOLICITUD DE RENUNCIA: ☐ Conversion ☒ Division ☐ Fusion		
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Registro de diseño industrial ☐ Esquemas de trazado para Circuitos Integrados		
2 SOLICITANTE	Nombre: WYETH HOLDINGS CORPORATION, sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Maine, Estados Unidos de América. Dirección: Five Gravel Farm, Madison, NJ 07940, Estados Unidos de América. Teléfono: 326-42-70 Fax: 606-97-01 Email: jlcc@lloredacamacho.com Domicilio: Madison, Estado de New Jersey, Estados Unidos de América.	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALICIA LLORED A RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º., Bogotá-Colombia Teléfono: 326-4270 Fax: 606-97-01 E-mail: jlcc@lloredacamacho.com	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número <u>39.690.713</u> TP <u>53.215</u>
4 CONVERSION Expediente No. _____ De _____	5 DIVISION Expediente No. <u>04-109.413A</u> No. de divisionales <u>Una (1)</u>	6 FUSION Expediente No. _____ Expediente No. _____
7 Comprobante de pago No. <u>19-97-0304 y 10-539</u> Fecha: <u>Diciembre 23, 2009 y Enero 5, 2010</u>		
8 Anexos: ☒ Comprobante de pago de la tasa. ☒ Poderes, si fuere el caso ☒ Certificado de existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas. ☒ Copia de la solicitud divisional.		
9 NOMBRE: <u>ALICIA LLORED A RICAURTE</u> FIRMA: 		

469 484

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

11 FEB 2011

RECIBO INICIAL DE CASA : 07 37,030
FECHA : 2010-02-12 14:48:23

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-109443-00012-0000

Fecha: 2010-02-12 14:48:23 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 288

RECIBO DE DEPÓSITO EN CASH

DEPOSITANTE

TITO PAGO

CANJE

CUENTA

NO. PAGO

OTRO PAGO

DE PAGO

LLORERA Y CIA S. A

CONDICIONACION

RECIBO DE DEPÓSITO EN CASH

11 FEB 2011

11 FEB 2011

RECIBO DE DEPÓSITO EN CASH

CANT. RECIBIDO

CONCEPTO

TOTAL

1 30000 01-01 00-00000000

1 30000 01-01 00-00000000

TOTAL

300,000.00

300,000.00

SEN: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RECIBO DE DEPÓSITO EN CASH

RECIBO DE DEPÓSITO EN CASH

DESGLOSADO	
D E A	
del Excmo	
4-109443	
2339	11 Feb-11

470 485

SECRETARÍA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

ACT. 444 RESPUESTA

VICIO ORIGINAL DE PAGO
FECHA: 08/01/2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-109443-00012-0000

Fecha: 2010-02-12 14:48:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTA REQUE Folios: 288

***** C O D I G O A A D A N T R *****

SECRETARÍA	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	NÚM. PAGO	FECHA PAGO	VAL. PAGO
LOPEZ Y CIA S. A	CONDICIONADA	BANCO DE BOGOTA	042764387	36907964	08/01/2010	5.230.400.00

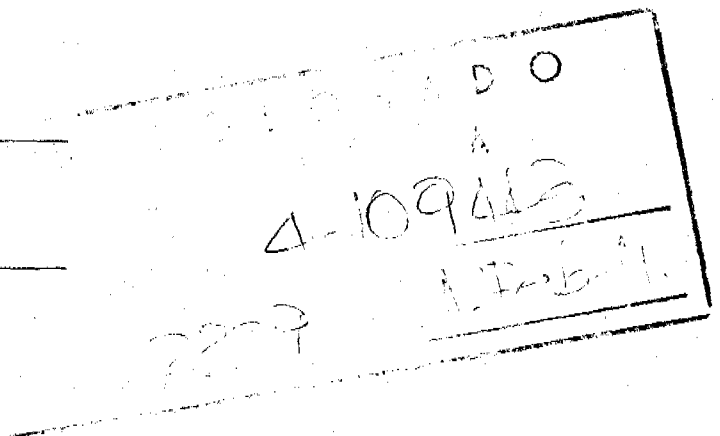
***** C O D I G O A A D A N T R *****

CAUS. IDENTIFIC	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	999 VALOR COMPLEMENTO TARIFA AAD ANTR	14,000.00
	TOTAL 1	14,000.00

CON: CANTIDAD DEL PAGO

RESPONSABLE:

RECIBO DE CADA APLICADO AL EXPEDIENTE NO.



1121 486

3

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-11-09-581
DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (sociedad), documento también escrito en inglés y en español.

Marilyn L. Mitchell
Notario Público, Estado de New Jersey
Mi Comisión Expira el 6 de febrero de 2005

APOSTILLA

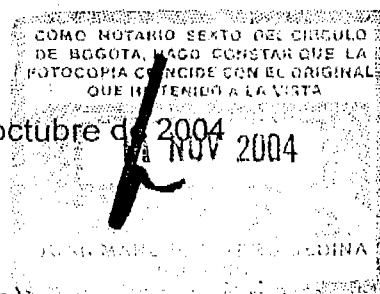
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por Marilyn L. Mitchell
3. actuando como Notario Público de New Jersey
4. lleva el sello/estampilla de Marilyn L. Mitchell, Notario

CERTIFICADO

5. en Trenton, New Jersey
6. el día 7 de octubre de 2004
7. por John E McCormac, CPA, Tesorero de New Jersey
8. No. A210246
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (ilegible)

Hay un sello dorado.



Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de noviembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

283160
Anita Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS
NOV 2004
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCUITO
DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA
COPIA CONCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 NOV 10 P 10:39

mes
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

JOSE LLORENDA CAMACHO A.C.

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

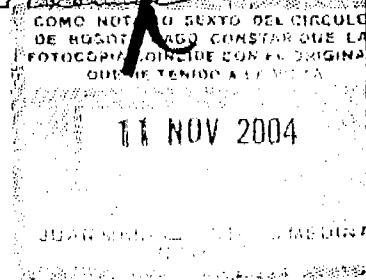
1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARILYN L. MITCHELL
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARILYN L MITCHELL, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 7TH DAY OF OCTOBER 2004
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A210246
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E. McCormac



Los abajo firmados, WYETH HOLDINGS CORPORATION, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Maine, Estados Unidos de América.

con domicilio en Five Giralda Farms, Madison,
Estado de New Jersey 07940,
Estados Unidos de América

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

473
The undersigned, WYETH HOLDINGS CORPORATION, a corporation organized and existing under the laws of State of Maine, United States of America.

domiciled at Five Giralda Farms, Madison,
State of New Jersey 07940,
United States of America

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments; to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

- We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 6th day of October 2004
Wyeth Holdings Corporation


William H. Calnan
Assistant Secretary

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América
Estado de New Jersey {ss
Condado de Morris

Hoy 6 de Octubre de 2004, compareció
William H. Calnan, a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
él es

de **WYETH HOLDINGS CORPORATION** la
compañía nombrada en el documento que antecede,
una sociedad debidamente organizada y existente
conforme a las leyes del Estado de Maine, Estados
Unidos de América, domiciliada en la ciudad de
Madison, Condado de Morris, Estado de New Jersey,
Estados Unidos de América, legalmente constituida
para un período de duración que aún no ha
terminado, que ejerce su objeto social conforme a
las leyes del Estado de Maine, Estados Unidos de
América; que el declarante está autorizado por dicha
Compañía para conferir este poder, que el sello
estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en
representación de la expresada Compañía, es el
sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
confiere este instrumento está comprendido dentro
del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
incorporación firmados en la ciudad de Augusta,
Estado de Maine, con fecha 23 de Julio, 1907
certifica que de conformidad con la legislación de
dicho Estado la anterior declaración juramentada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America
State of New Jersey {ss
County of Morris

On this 6th day of October, 2004, personally
came William H. Calnan,
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that he is the

Assistant Secretary of **WYETH HOLDINGS
CORPORATION** the company named within, a
Corporation organized and existing under the laws of
State of Maine, United States of America, domiciled
at the City of Madison, County of Morris, State of New
Jersey, United States of America, legally constituted
for a period of tenure not yet expired, which exercises
its corporate purposes according to the laws of State
of Maine, United States of America; that the
deponent is authorized by said Company to confer
this power of attorney; that the seal affixed hereunto
by the deponent in the name and on behalf of said
Corporation is the corporate seal thereof; and that the
purpose for which this instrument is granted is
included within the corporate purposes of the
Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at the
city of Augusta, State of Maine, under date of
July 23, 1907 and hereby certifies that under the laws
of said State the foregoing acknowledgment is
sufficient proof that the facts therein contained are
true, which he attests.

Marilyn L. Mitchell

MARILYN L. MITCHELL
NOTARY PUBLIC, STATE OF NEW JERSEY
My Commission Expires February 6, 2005

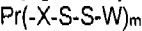
477

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No.º de solicitud: 04-109.443A		(51) Int Cl: A61K 39/395	
(22) Fecha de solicitud: 29-10-04		(71) Solicitante(s) WYETH HOLDINGS CORPORATION	
		(72) Inventor(es) 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.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/377,440	02-05-02	US
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 02-12-04		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 13/11/03
	Fecha de presentación de la solicitud: 02-05-03		Nº publicación: WO 2003/092623 A3
	No. de solicitud PCT/US2003/013910		
(54) Titulo: CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Un método para preparar una composición que comprende conjugados de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo con una fracción conjugada baja reducida (LCF) que tiene la fórmula,



En donde:

Pr es un anticuerpo anti-CD22 **diferente de** un anticuerpo que comprenda SEQ ID NO:1 por CDR-H1, SEQ ID NO:2 ó SEQ ID NO:13 ó SEQ ID NO:15 ó SEQ ID NO:16 o los residuos 50 a 66 de SEQ ID NO: 27 o la secuencia GINPGNQYTTYKRNLKG o la secuencia GINPGNNYATYRRNLKG, ó la secuencia GINPGNNYATYRRKFQG por CDR-H2, SEQ ID NO:3 por CDR-H3, SEQ ID NO:4 por CDR-L1, SEQ ID NO:5 por CDR-L2 y SEQ ID NO:6 por CDR-L3;

X es una ligadura hidrolizable que es capaz de liberar la caliqueamicina del conjugado después de enlazarse y entrar en las células objetivo.

W es una caliqueamicina;

m es la carga promedio para un producto de conjugación purificado de manera tal 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, dicho método caracterizado porque comprende las etapas de:

(1) agregar el derivado de caliqueamicina al anticuerpo en donde el derivado de caliqueamicina es 4.5-11% en peso del anticuerpo;

(2) incubar el derivado de caliqueamicina y el anticuerpo en una solución amortiguadora, compatible con la proteína, no nucleofílica que tiene un pH en el rango desde alrededor de 7 hasta 9 para producir un conjugado de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo, 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 conduce a una temperatura en el rango desde alrededor de 30°C hasta alrededor de 35°C durante un periodo de tiempo en el rango desde alrededor de 15 minutos hasta 24 horas; y

(3) someter el conjugado producido en la etapa (2) a un proceso de separación cromatográfica para separar los conjugados de derivados de caliqueamicina monomérico/anticuerpo con una carga en el rango de 4-10 % en peso de caliqueamicina y con una fracción conjugada baja (LCF) debajo de 10 por ciento del anticuerpo no conjugado, derivado de caliqueamicina, y conjugados agregados.

475

470

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
Industria y Comercio		DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	
SUPERINTENDENCIA		TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION		PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) N° de solicitud: 04-109.443A		(22) Fecha de solicitud: 29-10-04	
(51) Clasificación Internacional : A61K 39/395			
(71) Solicitante(s) WYETH HOLDINGS CORPORATION			
(72) Inventor(es) : 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.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/377,440	02-05-02	US
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 02-12-04		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 13-11-03	
Fecha de presentación de la solicitud: 02-05-03		N° publicación: WO2003/092623 A3	
No. de solicitud PCT/US2003/013910			
(54) Titulo: CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA			

476

476

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
Industria y Comercio		DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	
SUPERINTENDENCIA		TARJETA ARCHIVO TEMATICO	
PATENTE DE INVENCION ☐		PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) N° de solicitud: 04-109.443A		(22) Fecha de solicitud: 29-10-04	
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/395		FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm	
(71) Solicitante(s): WYETH HOLDINGS CORPORATION			
(72) Inventor(es): 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.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad			
(31) No. Prioridad		(32) Fecha	(33) País
60/377,440		02-05-02	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 02-12-04		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 13-11-03	
Fecha de presentación de la solicitud: 02-05-03		No. Publicación: WO2003/092623 A3	
No. de solicitud PCT/US2003/013910			
(54) Título: CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA			
(57) Resumen:			
(2) incubar el derivado de caliqueamicina y el anticuerpo en una solución amortiguadora, compatible con la proteína, no nucleofílica que tiene un pH en el rango desde alrededor de 7 hasta 9 para producir un conjugado de derivado de caliqueamicina monomérico/anticuerpo, en donde la solución comprende además (a) un cosolvente orgánico, y (b) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C₆-C₁₈ o su sal, y en donde la incubación se conduce a una temperatura en el rango desde alrededor de 30°C hasta alrededor de 35°C durante un periodo de tiempo en el rango desde alrededor de 15 minutos hasta 24 horas; y (3) someter el conjugado producido en la etapa (2) a un proceso de separación cromatográfica para separar los conjugados de derivados de caliqueamicina monomérico/anticuerpo con una carga en el rango de 4-10 % en peso de caliqueamicina y con una fracción conjugada baja (LCF) debajo de 10 por ciento del anticuerpo no conjugado, derivado de caliqueamicina, y conjugados agregados.			

477
482

CONJUGADOS PORTADORES DE DERIVADOS DE CALIQUEAMICINA

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

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. 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 +mylV), 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 (CDC) 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.

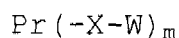
Breve Descripción de la Invención

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

484

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 $Pr(-X-S-S-W)_m$ 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 $(-X-S-S-W)_m$ 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

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, lixosa, 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 $+25^{\circ}\text{C}$ 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

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, procarbazona, 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 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, 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, metilprednisolona, 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, flurouracilo, 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, mecloretamina, 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 (mecloretamina, vincristina, prednisona, y procarbazona); ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina, y dacarbazina); MOPP (mecloretamina; vincristina, prednisona y procarbazona) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, y vinblastina); MOPP (mecloretamina, 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 ensambles 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 (Cramer 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

$(CO-Alk^1 -Sp^1 -Ar -Sp^2 - Alk^2 -C(Z^1)=Q -Sp)$

en donde

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

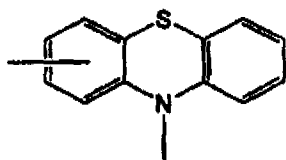
Sp^1 es un enlace, $-S-$, $-O-$, $-CONH-$, $-NHCO-$, $-NR'-$, $-N(CH_2CH_2)_2N-$, o $-X-Ar'-Y-(CH_2)_n-Z$ en donde X, Y, y Z es independientemente un enlace, $-NR'-$, $-S-$, o $-O-$, con la condición de que cuando $n=0$, entonces al menos uno de Y y Z debe ser un enlace y Ar' es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno 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, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$, 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 sustituido 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,

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 β -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 C_6-C_{18} , 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 C_7 a C_{12} 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 Mylotarg™. 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 inmunoconjugado 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 (30-35⁰C) 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

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 ⁰ C	Ácido decanoico/decanoato de sodio; 37.5 mM 31-35 ⁰ 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, inter leucinas tales como la inter 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 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, 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,

dextrano, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido alginico, 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 hiporocios 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, gougerotina,

puromicina, tegafur, tiasofurina. Otros agentes quimioterapéuticos/anti-neoplásticos 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-544 concurrentemente con algunos o más de estos agentes terapéuticos. Alternativamente se puede administrar secuencialmente CMC-544 con uno o más de estos agentes.

El CMC-544 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

540

(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

(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

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

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 oligonucleotícos específicos por una reacción de polimerasa (PCR).

i) Síntesis de ADNc

Se sintetizó el ADNc en un volumen de reacción de 20 μ l que contiene los siguientes reactivos: 50mM, Tris-HCL pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM ditioneitol, 3 mM $MgCl_2$, 0.5 mM de dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 20 unidades de ARNsina, 75 ng de cebador de hexanucleotido aleatorio, 2 μ g 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 BsiW1 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

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 subclonó en el vector de expresión por digestión y ligación de restricción a partir del vector que forma secuencias usando ciclos de restricción SfuI y BsiWI 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'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTTCGGATTCTCTCTCGTGTTCCTGGCACTCATTCTCAAGGGAGTGAGGTGTGAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGG3' (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 ApaI, 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

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

519

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