

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS

Cra. 7a # 74 – 64 Oficina 506
Tel: (571) 3132408 – 3132423 - 3132410 - 3131759
Fax: (571) 3131647 - 3132367
E-mail: mail@rubiolawyers.com
Apartado Aéreo 21848
Bogota, D.C. -Colombia

Doctor

Jesus Fernel GARCIA

Director de Nuevas Creaciones (e)

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-112351-A-00002-0000

Fecha: 2012-10-09 12:20:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 28

REF: Expediente No. **05-112351 A**
Patente de Invención: **“AGENTES CITOTOXICOS MEJORADOS QUE
COMPRENDEN NUEVOS MAITANSINOIDES”**
Fase Nacional: **PCT/US2004/013314**
Clasificación Int.: **A 61 K 47/48**
Titular: **IMMUNOGEN, INC.**

CONTESTACION AL REQUERIMIENTO NO.12422, NOTIFICADO POR FIJACION EN LISTA DE 18 DE JULIO DE 2012

HUMBERTO RUBIO CAMACHO, mayor de edad, domiciliado en Bogotá, D.C., identificado con la cédula de ciudadanía número 17'192.062 de Bogotá, abogado graduado portador de la Tarjeta Profesional No. 50.007 expedida por el Consejo Superior de la Judicatura, actuando en carácter de Apoderado de **IMMUNOGEN, INC**, domiciliado en 830 Winter Street, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos de America; encontrándome dentro de la debida oportunidad procesal para dar respuesta al auto proferido por su Despacho, mediante Oficio No.12422, notificado por fijación en lista de 18 de julio de 2012, me permito:

I. Manifestar:

1.- En el informe emitido sobre la presente invención, se han formulado las observaciones que a continuación resumimos:

a. De las Reivindicaciones (Art. 30 D486)

- El término “agente de enlace celular de la reivindicación 1 es muy general y puede comprender compuestos que no se encuentran revelados en la descripción.

- El radical Y₁' de la reivindicación 5 es muy general, ya que en su definición están implicados términos como R1 a R2, A, D, i, m, n, o, p, q, r, s, t, u, Z, los cuales pueden comprender muchos significados posibles, haciendo que la materia de la reivindicación no sea concisa.

- Los términos “cicloalquilo o cicloalquenilo que tienen 3-10 átomos de carbono”, “heterociclo aromático” o “radical heterociclo” de la reivindicación 5 son indefinidos, ya que son características funcionales y pueden comprender compuestos que no se encuentran revelados en la descripción.

b. Excepciones de la patentabilidad (Art 20 D486)

- El contenido de la reivindicación 50, que trata de un “Método para inducir la eliminación celular...”, no es patentable ya que se relaciona con métodos terapéuticos aplicados a seres humanos o animales.

c. Determinación del estado de la técnica:

- Los documentos del estado de la técnica citados como relevantes para la invención en este análisis son los siguientes:

D1: US 6,441,163

D2: US 5,208,020

D3: WO 0124763

d. Análisis de patentabilidad:

- Novedad:

Las reivindicaciones 1-4 se caracterizan por comprender al menos un maitansinoide enlazado a un agente de enlace celular. Estas características esenciales de dichas reivindicaciones ya fueron divulgadas en los documentos D1-D3, afectando la novedad de la presente solicitud.

De manera similar, las reivindicaciones 34 a 63 tratan de un método para hacer un conjugado que consiste en esterificación del maitansinoide, separar los diasterómeros (opcional), purificar y reaccionar con un agente de enlace celular.

Al comparar característica por característica se aprecia que las anterioridades D1 a D3 ya anticipaban la síntesis de conjugados maitansinoide-agente de enlace celular mediante la esterificación del maitansinoide con un grupo tiol para luego reaccionar con el agente de enlace celular de forma directa.

Nivel Inventivo:

Las reivindicaciones 5 a 10 y 20 a 32 tratan de un conjugado maitansinoide-agente de enlace celular, donde el maitansinoide está representado por la fórmula 4₁'. De la comparación de la fórmula de este compuesto con los de los documentos del estado de la técnica D1 a D3, se aprecia que la diferencia radica en el tipo de significado que se hacen en el sustituyente Y₁', especialmente no hay A, B, D, ni alquilino en el estado de la técnica.

El efecto técnico que confiere esta diferencia no se puede determinar ya que solamente se revela una actividad citotóxica, al igual que en las anterioridades citadas.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo es proveer conjugados de maitansinoides-agentes de enlace celular alternativos para el tratamiento del cáncer.

Teniendo en cuenta el problema técnico de la solicitud, la solución propuesta es una derivación del estado de la técnica, ya que una persona versada en la materia tomaría cualquiera de los compuestos de D1 a D3 y mediante usuales en la síntesis química, podría obtener los conjugados reivindicados con la expectativa de que también fuesen compuestos activos contra el cáncer, afectando el nivel inventivo de la solicitud.

Finalmente no se demuestra un efecto mejorado o sorprendente de los compuestos reivindicados en comparación con los conocidos en el estado de la técnica.

Por otra parte, las reivindicaciones 11 a 19 tratan de un conjugado maitansinoide-agente de enlace celular, donde el maitansinoide está representado por la fórmula 4₁'. , Se aprecia que la diferencia con D1 a D3 radica en el tipo de significado que se hacen en el sustituyente Y₁', especialmente no hay A, B, D, ni alquilino en el estado de la técnica.

El efecto técnico que confiere dicha diferencia no se puede determinar, ya que solamente se revela una actividad citotóxica, al igual que en las anterioridades citadas.

Por lo tanto el problema técnico objetivo, que es proveer conjugados de maitansinoides-agentes de enlace celular alternativos para el tratamiento del cáncer, y la solución propuesta por la invención, se concluye que esta última es una derivación del estado de la técnica, ya que una persona versada en la materia tomaría los compuestos D1 a D3 y mediante sus conocimientos usuales en síntesis química, obtener los conjugados reivindicados con la expectativa de que también fuesen compuestos activos contra el cáncer, afectando el nivel inventivo de la solicitud.

Finalmente no se demuestra un efecto mejorado o sorprendente de los compuestos reivindicados en comparación con los conocidos en el estado de la técnica.

e. Conclusión

Se concluye que las reivindicaciones 1-4 y 34-36, están afectadas en su novedad de acuerdo a los documentos del estado de la técnica D1 a D3, y que las reivindicaciones 5-32 no tienen nivel inventivo a la luz de los mencionados documentos D1 a D3.

2.- En contestación a las observaciones anteriores, manifestamos lo siguiente:

Acompañamos a esta respuesta un nuevo juego de reivindicaciones (1-38), todas ellas sustentadas en el contenido de la solicitud internacional PCT originalmente presentada.

En el nuevo capítulo reivindicatorio, las reivindicaciones se han enmendado para definir el maitansinoide como uno de los compuestos **4a** o DM3, el compuesto **4b** o DM4, el compuesto **4c** o DM3-SMe y el compuesto **4e** o DM4-SMe, todos los cuales se divulgan en la descripción original de la solicitud. Además, se añaden las nuevas reivindicaciones 35-38. La reivindicación 35 recita una condición negativa o "diclaimer", lo cual está expresamente considerado y permitido en el INSTRUCTIVO sobre el EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTES DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD (Código: PI02-I06), publicado por la SIC, en su página 67, dentro del acápite 2.12.3.4, referente a los **Parámetros**, y específicamente cuando analiza lo referente a las limitaciones negativas o disclaimers.

Las reivindicaciones 36 y 37 añadidas en el nuevo capítulo reivindicatorio, están sustentadas por el párrafo [213] de la solicitud PCT como se presentó originalmente, y la reivindicación 38 se apoya en el párrafo [175] de dicha solicitud.

En cuanto las objeciones particulares citadas en el reporte del examen de patentabilidad, a continuación contestamos cada una ellas en el mismo orden en que fueron citadas en dicho reporte.

a. De las Reivindicaciones:

El examinador ha objetado el término "agente de unión celular" como demasiado amplio ya que incluye compuestos no descritos en la descripción. El examinador también afirma que el radical Y_1' es tan amplio que carece concisión. El examinador afirma además que las frases "cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono", "heterocíclico aromático" y "radical heterocicloalquilo" no están definidas y, por lo tanto, puede comprender compuestos no descritos en la descripción.

Por otra parte (aspecto **b.**, citado previamente en esta respuesta), el examinador entiende que el contenido de la reivindicación 50, que se refiere a "inducir la muerte celular" no es materia patentable porque es un método terapéutico aplicable a seres humanos y animales.

En lo que respecta a la amplitud y concisión de las reivindicaciones, las reivindicaciones han sido modificadas para especificar que el agente de unión celular es un "anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo". La memoria descriptiva describe numerosos anticuerpos que se pueden utilizar en la presente invención. Además, el agente de unión celular en todos los conjugados utilizados en los ejemplos son anticuerpos.

El radical Y_1' se define ahora como $(CR_7R_8)(CR_5R_6)CR_1R_2S-$, en el cual: R_1 es metilo, R_2 es metilo o H, y R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H. Por lo tanto, el maitansinoide ahora se define como el compuesto **4a** o DM3, el compuesto **4b** o DM4, el compuesto **4c** o DM3-SMe y el compuesto **4e** o DM4-SMe, todos los cuales se divulgan en la descripción.

Las frases "cicloalquilo o cicloalquenilo que tienen 3-10 átomos de carbono", "heterocíclico aromático" y "radical heterocicloalquilo" se han eliminado de las

6

reivindicaciones, excepto para definir Z en las reivindicaciones 15, 19 y 22. La parte pertinente de la definición de Z se ha modificado para determinar ahora "arilo simple que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, arilo sustituido que tiene de 6 a 10 átomos de carbono que porta al menos un sustituyente seleccionado entre alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono, un alcoxi, un halógeno y un nitro, el radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, donde dicho radical heterocíclico aromático o dicho radical heterocicloalquilo es un anillo de 3-10 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados entre N, O ó S", tal como se encuentra sustentado en los párrafos [140]-[146] de la descripción original.

c. Determinación del estado de la técnica:

- El examinador ha citado los siguientes documentos del estado de la técnica, como relevantes para la patentabilidad de la presente invención:

D1: US 6,441,163

D2: US 5,208,020

D3: WO 01/24763

d. Análisis de Patentabilidad

Novedad:

El examinador indica que las reivindicaciones 1-4 se caracterizan porque comprenden al menos un maitansinoide unido a un agente de unión celular. El examinador afirma que cada uno de D1, D2 y D3 describe un conjugado que comprende un maitansinoide y un agente de unión celular. El examinador indica además que el método de fabricación de las reivindicaciones 34-63 carecen de novedad ya que cada uno de sus pasos se da a conocer en D1, D2 y D3.

Para superar esta objeción, en el nuevo capítulo reivindicatorio las reivindicaciones originales 1-4 se han eliminado, al igual que las reivindicaciones 34-38 y 43-47.

6

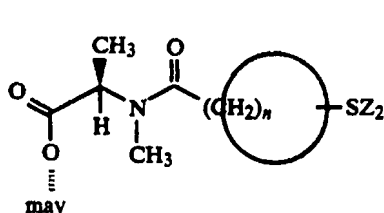
7

En cuanto a las reivindicaciones 39-42 (nuevas reivindicaciones 15-18) y 48-63 (nuevas reivindicaciones 19-34), la objeción emitida contra las mismas se refuta por las siguientes razones:

La presente invención se basa en el hallazgo inesperado que la unión de los maitansinoides, que llevan un grupo tiol estéricamente impedido (es decir, que poseen uno o dos sustituyentes sobre el α -carbono que porta la funcionalidad tiol), a los agentes de unión celular, da lugar a conjugados que han mejorado enormemente la actividad anti-tumoral *in vivo*, en comparación con los conjugados preparados con los maitansinoides descritos anteriormente en el estado de la técnica, los cuales no poseen un sustituyente en el átomo del α -carbono que lleva el enlace disulfuro. En esta característica es donde justamente radica el efecto técnico de la diferencia entre los compuestos descritos y los reivindicados en la presente solicitud.

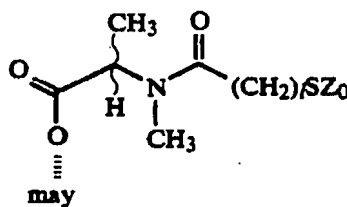
Otro hallazgo sorprendente fue que la actividad biológica mejorada se obtiene cuando el impedimento estérico está óptimamente sobre el lado maitansinoide del enlace disulfuro en los conjugados (véase el párrafo 16, y los Ejemplos 6-8, 10, 11, 13 y 14). Como se señaló anteriormente, los maitansinoides modificados de la presente invención tienen un grupo tiol estéricamente impedido (que poseen uno o dos sustituyentes en el α -carbono que lleva la funcionalidad tiol). Esto no es una característica de los maitansinoides de la técnica anterior.

El documento D2 citado por el examinador (US 5,208,020) enseña, entre otros, compuestos novedosos maitansinoides y agentes citotóxicos que comprenden uno o más compuestos de maitansinoide unidos a un agente de unión celular. Los maitansinoides que se divulgan en este documento están representados por las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI). Los maitansinoides representados por las fórmulas (I), (III), (IV), (V) y (VI) que se muestran a continuación



(I);

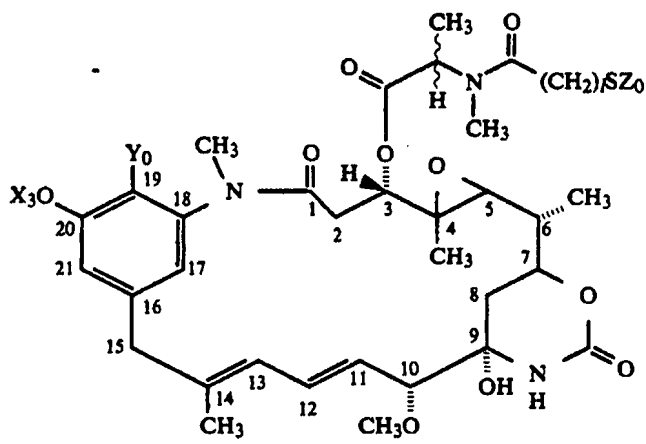
(I es un entero de 1 a 10)



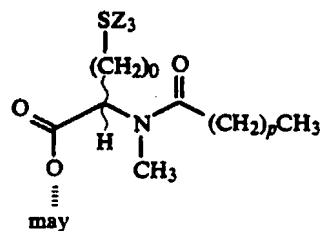
(III);

(n es un número entero de 3 a 8)

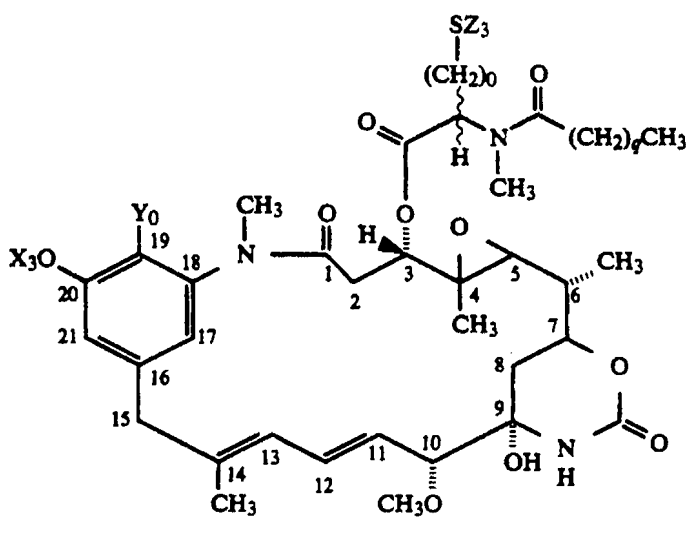
7



(l es 1, 2 ó 3)



(o es 1, 2 ó 3)



(VI)

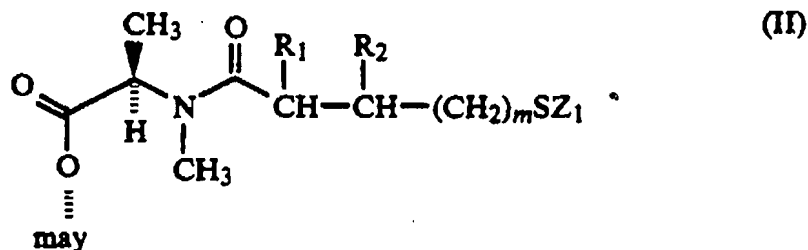
(o es 1, 2 ó 3)

tienen un grupo **metileno** (-CH₂-) adyacente al grupo tiol o el grupo disulfuro (es decir, -SZ₀ en la fórmula (I), -SZ₂ en la fórmula (III), SZ₀ en la fórmula (IV), SZ₃ en la fórmula (V) y -SZ en la fórmula (VI)). Tales grupos tiol o disulfuro se consideran como "no impedidos".

En contraste, como se ha indicado anteriormente, los maitansinoides de la presente invención, como se expone en la reivindicación 1 enmendada, son maitansinoides que contienen grupos tiol o disulfuro estéricamente impedidos, que tienen un grupo terminal -CR₁R₂SZ, en el que Z es H, o -SCH₃. El grupo CR₁R₂ introduce el impedimento estérico al grupo tiol -SZ, en el cual R₁ es metilo y R₂ es H o metilo. Las definiciones de R₁ y R₂ excluyen un grupo metileno (CH₂) del posible grupo -CR₁R₂ ya que R₁ no puede ser H. Por lo tanto, los maitansinoides reivindicados por el Solicitante tienen un voluminoso grupo alquileo -CR₁R₂ (R₁ y R₂ no son ambos H), no **un grupo metileno** próximo al grupo tiol o disulfuro; mientras que los maitansinoides

representados por las fórmulas (I), (III), (IV), (V) y (VI) de D1 (y D3) tienen un grupo metileno adyacente al grupo tiol o disulfuro.

Los maitansinoides representados por la fórmula (II) de D2, se muestran a continuación:



En esta fórmula, m es 0, 1, 2 ó 3. Cuando m no es 0, o cuando m es 0 y R₂ es H, los maitansinoides tienen un grupo metileno adyacente al grupo -SZ₁, los cuales no están comprendidos en los compuestos maitansinoides reivindicados por el Solicitante, como se explicó anteriormente. Cuando m es 0 y R₂ es CH₃ o CH₂CH₃, el maitansinoide lleva un sustituyente en el carbono que porta el grupo tiol o disulfuro. Sin embargo, debido a que el átomo de azufre está en posición β en relación a un grupo carbonilo, estos maitansinoides y conjugados de dichos maitansinoides con agentes de unión celular mediante un enlace disulfuro, resultaron ser inestables debido a su propensión a sufrir β-eliminación (véase el apartado [014] de la solicitud PCT según se presentó). Además, estos maitansinoides tienen una cadena de alquileo de **dos carbonos** (-CHR₁-CHR₂) que conecta el resto acilo N-metil-alanina con el grupo -SZ₁. En contraste, maitansinoide reivindicado por el Solicitante tiene en la cadena de alquileo de **tres carbonos** un grupo -CH₂CH₂CR₁R₂ que conecta el resto acilo N-metil-alanina con el grupo -SZ.

Más aún, los compuestos descritos en los ejemplos y figuras de D2 están representados por las fórmulas (I), (III), (IV), (V) y (VI). Por lo tanto, ninguno de los compuestos descritos en los ejemplos y las figuras tienen un grupo alquileo voluminosos (es decir, el grupo no-metileno) adyacente al grupo que contiene el tiol o el disulfuro como en los compuestos maitansinoides reivindicados por el Solicitante. Como tales, los compuestos de la técnica anterior de D2, carecen del efecto técnico de la enormemente mejorada actividad antitumoral *in vivo* que poseen los conjugados a los agentes de unión celular que comprenden los compuestos maitansinoides reivindicados en la presente solicitud.

D1 (US 6,441,163) por su parte, divulga un nuevo método para hacer inmunoconjugados. D3 (WO 01/24763) muestra la terapia de combinación de inmunoconjugados y agentes quimioterapéuticos. Los inmunoconjugados que se divulgan en D1 y D3, comprenden un agente de unión celular y un agente terapéutico, tal como un maitansinoide. Los maitansinoides que se divulgan en D1 y D3 son maitansinoides que contienen tiol o disulfuro representados por las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), es decir, los mismos compuestos descritos en D2. En consecuencia, los compuestos de estas referencias también carecen del efecto técnico de los compuestos de la presente invención.

Por lo tanto, los maitansinoides de la presente invención y los métodos de fabricación de los mismos, contrariamente a lo que se establece en el examen de patentabilidad, son nuevos con respecto a los maitansinoides divulgados en las referencias citadas D1 a D3.

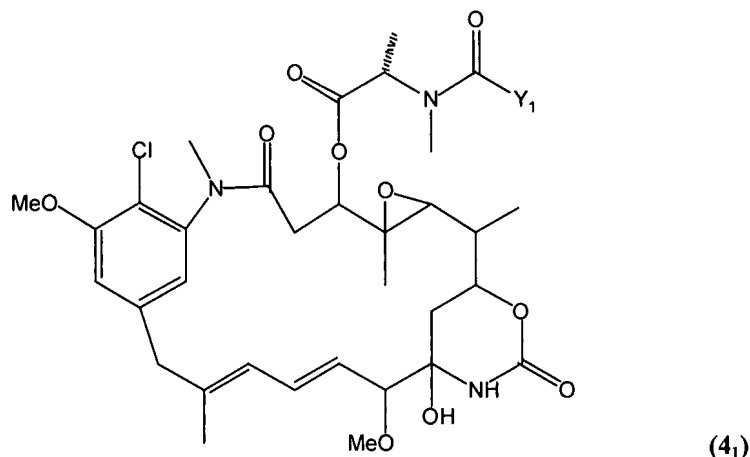
Actividad inventiva

Las reivindicaciones 5 a 32 (de los cuales las reivindicaciones 5-19 se han eliminado) se han objetado por carecer de actividad inventiva a la luz de cualquiera de los documentos de la técnica anterior D1, D2 o D3. El examinador reconoce que los compuestos reivindicados y los descritos en D1-D3 son diferentes en el sustituyente Y. Sin embargo, el examinador es de la opinión de que la invención reivindicada es una derivación obvia de los compuestos de la técnica anterior, y que el Solicitante no ha demostrado el efecto aumentado o sorprendente de los compuestos reivindicados.

Al respecto discrepamos respetuosamente. Aunque los compuestos reivindicados son citotóxicos, como también lo son los del estado de la técnica, el efecto aumentado o sorprendente de los compuestos reivindicados es que éstos han demostrado una citotoxicidad inesperadamente superior en comparación con la citotoxicidad de los compuestos de la técnica anterior. El examinador parece haber ignorado o pasado por alto este dato.

Por otra parte, en ningún documento de los citados por el examinador se ha sugerido que las estructuras reivindicadas pudieran ser la causa de este efecto superior. Para la conveniencia del examinador, las estructuras de los compuestos usados en los ejemplos y que se reivindica en la presente solicitud se describen a

continuación, junto con la estructura de DM1. Todos los compuestos pueden describirse mediante referencia a la fórmula 4₁, en la reivindicación 1.



en la cual:

Y representa $(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_5\text{R}_6)_m\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$

El compuesto **4a** o DM3: $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3$, R_5 , R_6 , R_7 , y $\text{R}_8 = \text{H}$, $l = 1$, $m = 1$ y $\text{Z} = \text{H}$.

El compuesto **4b** o DM4: R_1 y $\text{R}_2 = \text{CH}_3$, R_5 , R_6 , R_7 , y $\text{R}_8 = \text{H}$, $l = 1$, $m = 1$, y $\text{Z} = \text{H}$.

El compuesto **4c** o DM3-SMe: $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3$, R_5 , R_6 , R_7 , y $\text{R}_8 = \text{H}$, $l = 1$, $m = 1$ y $\text{Z} = \text{SCH}_3$,

El compuesto **4e** o DM4-SMe: R_1 y $\text{R}_2 = \text{CH}_3$, R_5 , R_6 , R_7 , y $\text{R}_8 = \text{H}$, $l = 1$, $m = 1$ y $\text{Z} = \text{SCH}_3$.

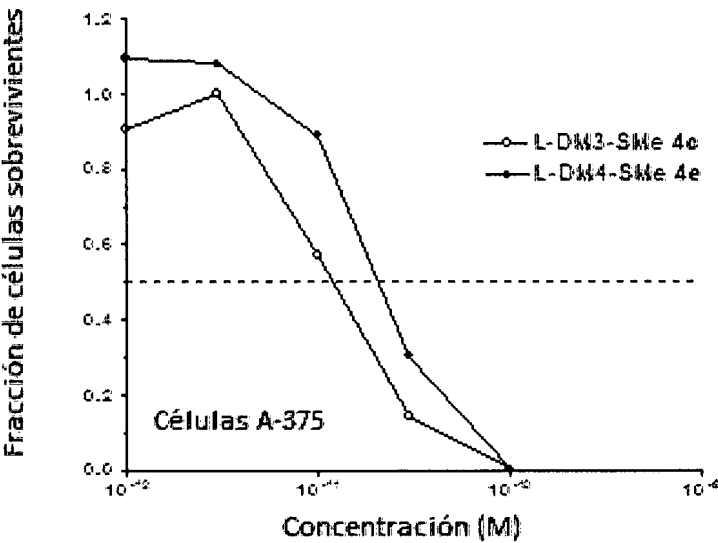
En el compuesto del estado de la técnica **1** o DM1: $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{H}$, R_5 , R_6 , R_7 , y $\text{R}_8 = \text{H}$, $l = 1$, $m = 1$ y $\text{Z} = \text{H}$. De hecho, en todos los compuestos de la técnica anterior, R_1 y R_2 , los cuales son los sustituyentes adyacentes al grupo tiol o disulfuro en Y son H.

El **Ejemplo 5a demuestra la citotoxicidad inesperadamente superior de DM3, DM3-SMe y DM4-SMe en comparación con DM1**. En este ejemplo, diferentes líneas celulares se incubaron con diferentes concentraciones de DM3, DM3-SMe, DM4-SMe o DM1. Los resultados de las mediciones de la citotoxicidad *in vitro* de los nuevos maitansinoides de la presente invención, se muestran en las figuras 4a a 4d, los cuales se reproducen a continuación. Los nuevos maitansinoides **4c** y **4e** que llevan enlaces disulfuro impedido, son altamente citotóxicos hacia las dos líneas celulares ensayadas, SK-BR-3 y A-375, con valores de IC_{50} que van desde $7 \times 10^{-12} \text{ M}$ a $2,5 \times 10^{-11} \text{ M}$. Así, la incorporación de sustituyentes alquilo en el carbono que lleva el resto disulfuro, conservó la elevada potencia citotóxica. Los maitansinoides **4a** que contienen tiol estéricamente impedido de la presente invención, son entre 30 y 50 veces más potentes que los maitansinoides correspondiente descritos anteriormente sin impedimento. Por lo tanto, la incorporación de sustituyentes alquilo en el átomo de

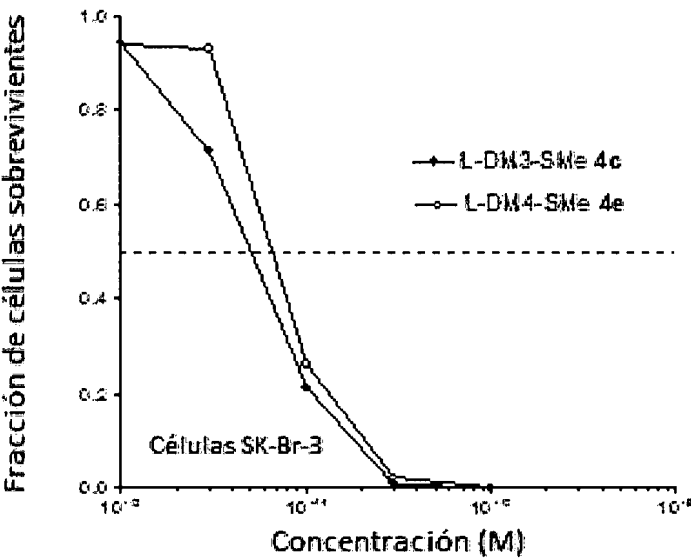
carbono que lleva el resto tiol, de forma totalmente inesperada, mejora en gran medida la potencia.

FIGURA 4

a) Citotoxicidad *in vitro* hacia las células A-375

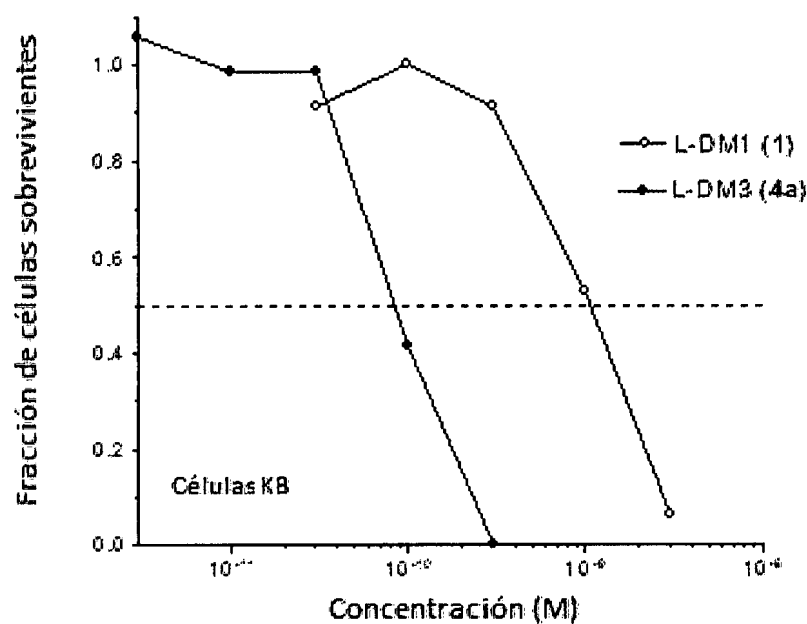


b) Citotoxicidad *in vitro* hacia las células SK-Br-3

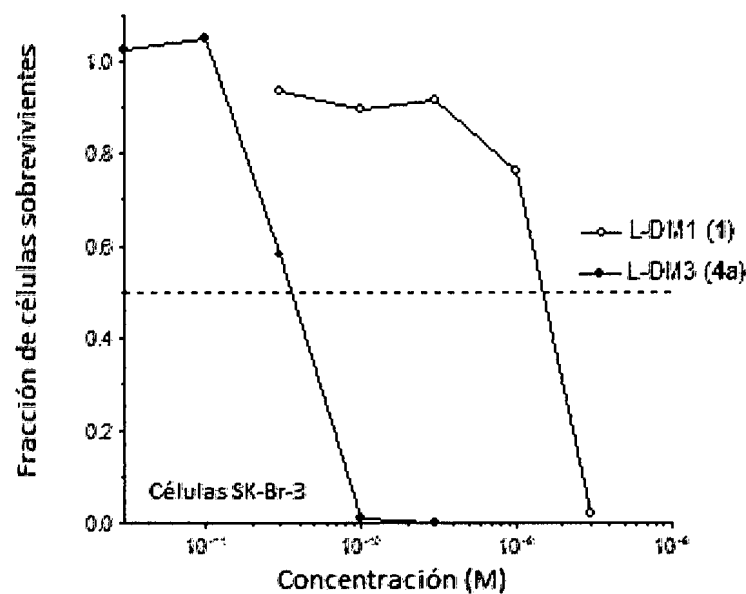


b) Citotoxicidad *in vitro* hacia las células KB

17



d) Citotoxicidad *in vitro* hacia células SK-Br-3



Por otra parte, el *Ejemplo 6 demuestra la eficacia inesperadamente superior in vivo de los conjugados de anticuerpos y maitansinoides de DM3 y DM4, en comparación con los conjugados de DM1 contra xenotransplantes de HT-29 en ratones SCID*. Se inocularon ratones con células de carcinoma de colon y los tumores se cultivaron durante 11 días hasta un tamaño promedio de 100 mm³. Los animales entonces se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos. El primer grupo recibió el conjugado huC242-DM1. El segundo grupo recibió el conjugado huC242-DM3. El

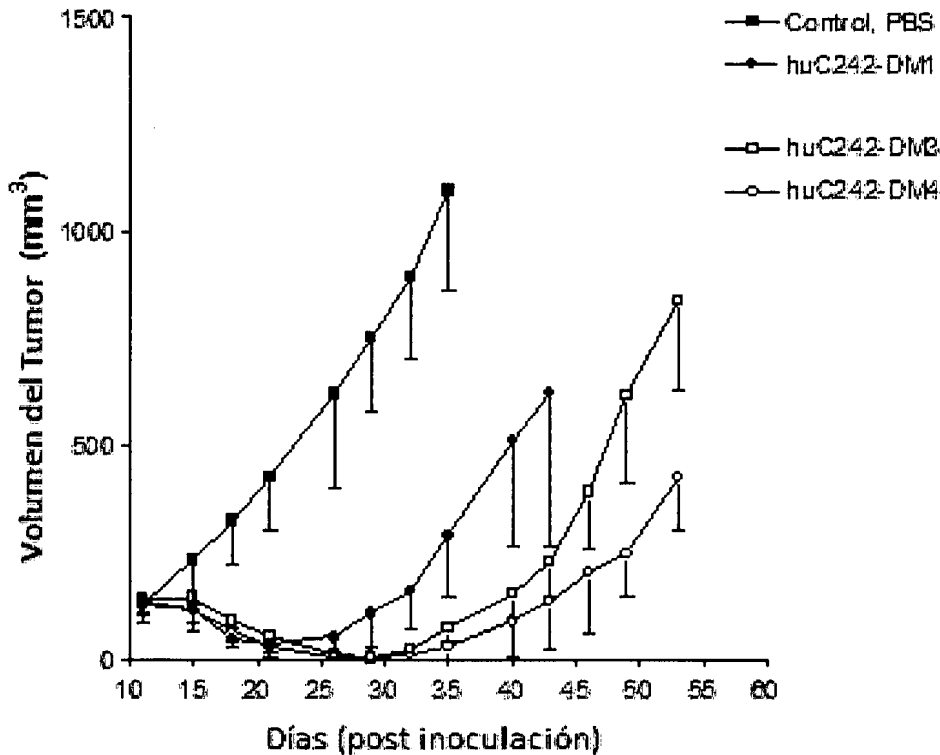
13

tercer grupo recibió el conjugado huC242 DM4. Un cuarto grupo de animales sirvió como control y recibió PBS usando el mismo programa de tratamiento que en los grupos 1-3.

El tamaño de los tumores se midió dos veces por semana y el volumen de los tumores se calculó mediante la fórmula: volumen del tumor = $\frac{1}{2}$ (longitud x ancho x alto). El peso de los animales también se midió dos veces por semana. Los resultados se muestran en la Figura 7, la cual se reproduce a continuación. Como se muestra en la Figura 7, los tumores en el grupo de control de ratones crecieron hasta un tamaño de casi 1000 mm³ en 35 días. El tratamiento con huC242-DM1 resultó en un retraso del crecimiento tumoral de 18 días, mientras que los conjugados hechos con los maitansinoides **4a** y **4b** de la presente invención fueron significativamente más eficientes y prolongaron inesperadamente el retraso del crecimiento tumoral de 28 días y 36 días, respectivamente.

FIGURA 7

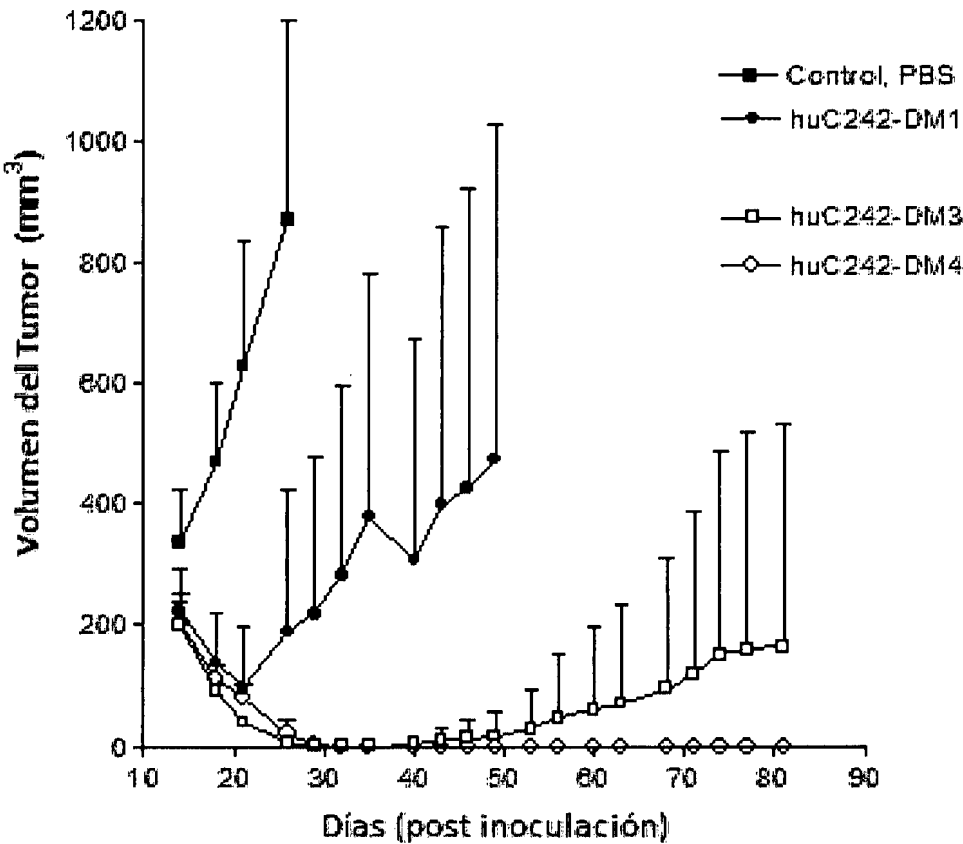
Eficacia *in vivo* de los conjugados del maitansinoide huC242- (xenotransplantes de HT-29)



Adicionalmente, el *Ejemplo 7 demuestra la inesperada súper eficacia in vivo de los conjugados de anticuerpos con los maitansinoides DM3 y DM4, en comparación con los conjugados de DM1 contra xenotransplantes de COLO 205 en ratones SCID*, de una manera análoga a la del Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la Figura 8, que se reproduce a continuación. La Figura 8 muestra que los tumores en el grupo de ratones de control crecieron hasta un tamaño de casi 900 mm³ en 24 días. El tratamiento con huC242-DM1 resultó en un retraso del crecimiento tumoral de 20 días, mientras que el conjugado preparado con el maitansinoide **4a** de la presente invención fue considerablemente más eficaz y causó la regresión tumoral completa duración de 45 días. Inesperadamente, el tratamiento con el conjugado preparado con los maitansinoides **4b** de la presente invención fue incluso más eficaz, lo que resultó en la cura de todos los animales tratados.

FIGURA 8

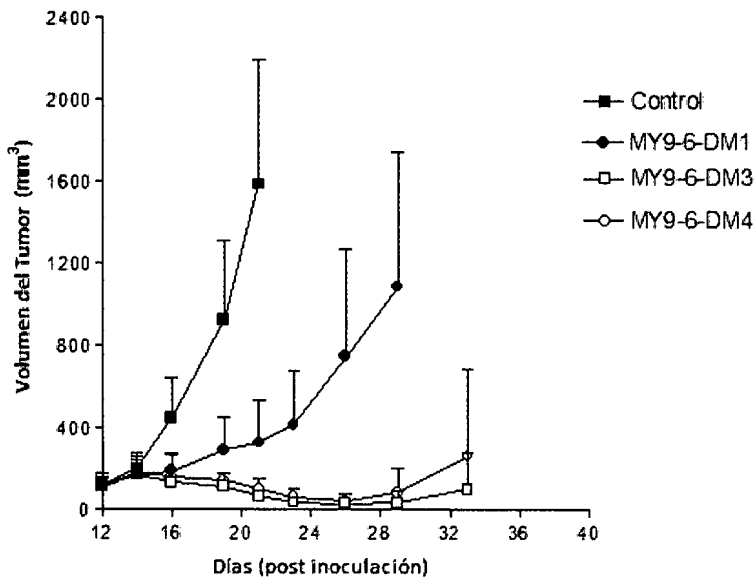
Eficacia *in vivo* de los conjugados del maitansinoide-huC242 (xenotransplantes de COLO-205)



De manera similar, el Ejemplo 8 demuestra la súper eficacia inesperada *in vivo* de conjugados de anticuerpos con los maitansinoides DM3 y DM4, en comparación con los conjugados de DM1 contra los xenotransplantes de HL-60 en ratones SCID. Los resultados se muestran en la Figura 9, la cual se reproduce a continuación. La Figura 9 muestra que los tumores en el grupo de control de ratones crecieron rápidamente hasta un tamaño de casi 1600 mm³ en 21 días. El tratamiento con MY9-6-DM1 resultó en un retraso del crecimiento tumoral de alrededor de 5 días, mientras que los conjugados hechos con los maitansinoides **4a** y **4b** de la presente invención fueron significativamente más eficaces, prolongando el retraso del crecimiento tumoral hasta más de 20 días.

FIGURA 9

Eficacia de los conjugados del maitansinoide MY-9-6 (xenotransplantes de HL60)

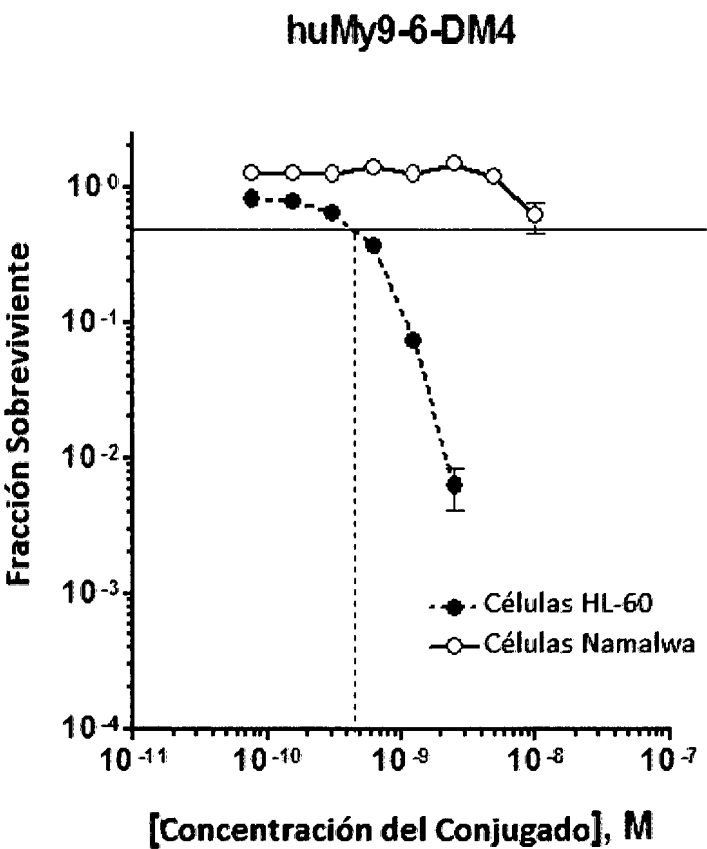


Por su parte el Ejemplo 11 demuestra la inesperada súper eficacia *in vivo* de los conjugados de anticuerpos con los maitansinoides DM3 y DM4, en comparación con los conjugados de DM1 contra los xenotransplantes de tumores humanos HL-60 en ratones SCID. La eficacia de huMy9-6-DM4 se comparó con la de huMy9-6-DM1. Como se muestra en la Figura 11, la cual se reproduce a continuación, se encontró de manera inesperada que huMy9-6-

DM4 fue más eficaz que huMy9-6-DM1. HuMy9-6-DM4 mantiene a los animales en remisión completa (CR) durante cerca de sesenta días, mientras que los animales tratados con huMy9-6-DM1 tuvieron una recaída después de aproximadamente 20 días en CR.

FIGURA 10

Análisis de citotoxicidad *in vitro*: Actividad de HuMy9-6-DM4 hacia las células HL-60 positivas para el antígeno y hacia las células Namalwa negativas para el antígeno.



De los resultados anteriormente mostrados, no debe haber lugar a la menor duda de que los compuestos de la presente invención, los conjugados que se obtienen a partir de los mismos, y los métodos para su obtención, son inventivos sobre sus análogos del estado de la técnica, no solamente por el efecto inesperadamente superior demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* sobre los diferentes tumores probados, sino adicionalmente porque la característica estructural reivindicada no ha sido ni anticipada ni sugerida en ninguno de los documentos de la técnica anterior D1, D2 y D3.

Por lo tanto, contrariamente a lo que se concluye en el examen de patentabilidad, la materia reivindicada en la presente solicitud según se ha enmendado, es nueva e inventiva sobre los documentos del estado de la técnica.

En consecuencia entendemos que todas las objeciones emitidas en el examen de patentabilidad se han superado con esta respuesta y los documentos de la solicitud que se adjuntan, por lo tanto solicito que sobre la base de su consideración, se proceda a la concesión de la correspondiente patente colombiana.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto consideramos que la presente solicitud es novedosa tiene nivel inventivo, las nuevas reivindicaciones definen la materia que se desea proteger siendo claras, concisas y debidamente sustentadas en la descripción y no está comprendida en el estado de la técnica, conforme lo establece el Art. 14, 16 y 30 de la Decisión 486.

De manera atenta solicito a su Despacho, tener en cuenta cada una de las consideraciones expuestas anteriormente, al momento de estudiar el presente caso.

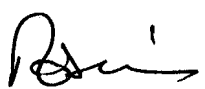
II.- ANEXO:

(i) Capitulo reivindicatorio.

III.- PETICIÓN:

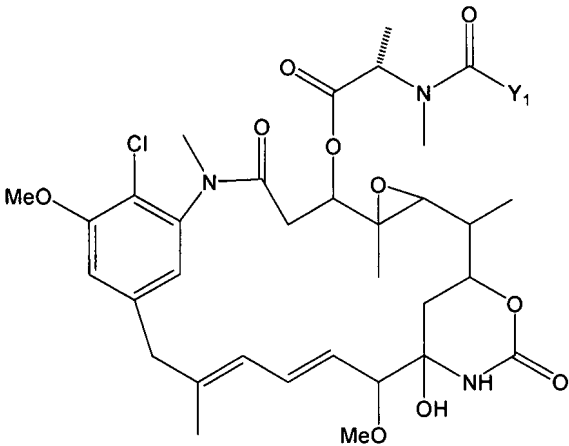
Conforme a lo anterior, una vez atendidos los requerimientos y exigencias del examinador y al tener en cuenta el nuevo capítulo de reivindicaciones que se presenta, así como los argumentos expuesto, solicito muy respetuosamente a su Despacho, continuar el trámite de rigor y de ser el caso se hagan las correspondientes observaciones con al ánimo de hacer lo pertinente dentro del presente trámite, teniendo en cuenta que la presente solicitud cumple con las exigencias establecidas en la D486

Atentamente,


HUMBERTO RUBIO CAMACHO
C.C. 17'192.062 de Bogotá
T.P. 50.007 Consejo Superior
de la Judicatura
COD.4134

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de maitansinoide-agente de unión celular, donde el maitansinoide está representado por la formula 4₁:



4₁

en la cual:

Y₁ representa (CR₇R₈)₁(CR₅R₆)_mCR₁R₂S-, donde:

R₁ es metilo;

R₂ es metilo o H;

R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H;

l y m son 1; y

el agente de unión celular es un anticuerpo o un frgamento de unión al antígeno del mismo.

2. El conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de la reivindicación 1, caracterizado porque R₁ es metilo y R₂ es H.

3. El conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de la reivindicación 1, caracterizado porque R₁ y R₂ son metilo.

4. El conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizado porque el anticuerpo comprende al menos un sitio de unión del anticuerpo.

5. El conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de la

reivindicación 4, caracterizado porque el anticuerpo es MY9, anti-B4 o C242.

6. El conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de la reivindicación 4, caracterizado porque el anticuerpo es MY9 humanizado o de superficie modificada, anti-B4 humanizado o de superficie modificada, o C242 humanizado o de superficie modificada.

7. Un conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de unión celular es seleccionado a partir del grupo que consiste de un anticuerpo humanizado o de superficie modificada del anticuerpo murino MY9 que se une específicamente al antígeno CD33, un anticuerpo humanizado o de superficie modificada del anticuerpo murino B4 que se une específicamente al antígeno CD19, y un anticuerpo humanizado o de superficie modificada del anticuerpo murino C242 que se une específicamente al antígeno CanAg.

8. El conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de la reivindicación 7, caracterizado porque R_1 y R_2 son metilo.

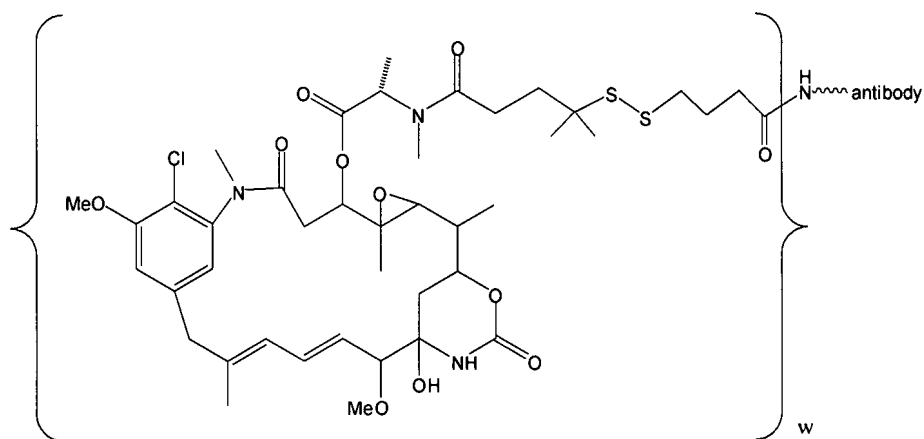
9. El conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de la reivindicación 8, caracterizado porque el agente de unión celular es un anticuerpo humanizado o de superficie modificada del anticuerpo murino B4 que se une específicamente al antígeno CD19.

10. El conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de las reivindicaciones 7-9, caracterizado porque el maitansinoide y el agente de unión celular están unidos covalentemente mediante un reticulador que tiene un puente disulfuro.

11. El conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado porque el maitansinoide y el agente de unión celular se reticulan mediante *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB).

12. El conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque un promedio de 1-10 moléculas de maitansinoide se unen por anticuerpo.

13. El conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de la reivindicación 12, caracterizado porque el conjugado está representado por la siguiente fórmula:

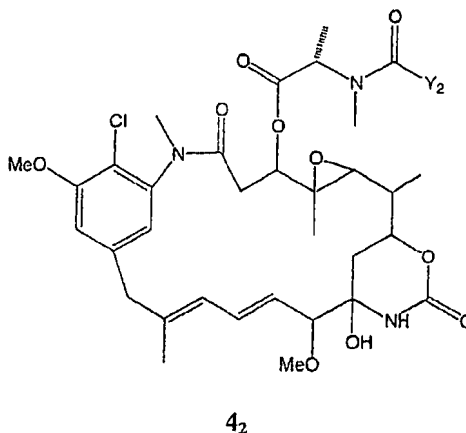


en la cual w es 1-10.

14. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de unión celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. Un método para hacer un conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de la reivindicación 1, que comprende:

esterificar un maitansinol para dar un maitansinoide de la fórmula 4₂:



en la cual:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_mCR_1R_2SZ_2$, donde:

R_1 es metilo;

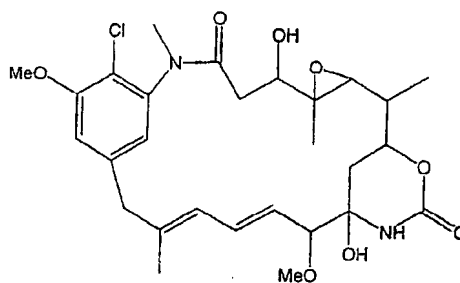
R_2 es metilo o H;

R_5 , R_6 , R_7 y R_8 , son cada uno H;

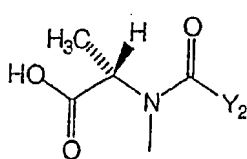
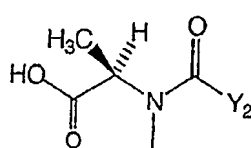
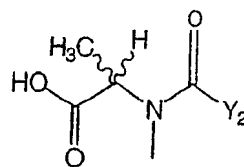
l y m son 1;

Z_2 es SR o -COR, donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a

10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, arilo sustituido que tiene de 6 a 10 átomos de carbono que lleva al menos un sustituyente seleccionado a partir de alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono, un alcoxi, un halógeno y un nitro, el radical heterocíclico aromático o hetericloalquilo, donde dicho radical heterocíclico aromático o hetericloalquilo es un anillo de 3 a 10 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados a partir de N, O o S; dicho método que comprende hacer reaccionar el maitansinol de la estructura **11** en el C-3:

**11**

con un compuesto de la fórmula (III-L), (III-D), o (III-D,L):

**L****D****D, L****(III)**

en las cuales:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_mCR_1R_2SZ_2$,

donde:

R_1 es metilo;

R_2 es metilo o H;

R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H,

l y m son 1; y

Z_2 es SR o -COR, donde R es alquilo o alquenilo lineal que tienen de 1

5

separar los diastereómeros, si están presentes,

10

15

16. El método de la reivindicación 15, caracterizado porque el grupo reactivo es un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido.

17. El método de la reivindicación 15, caracterizado porque R_1 es y R_2 es H.

20

19. Un método para hacer un conjugado de maitansinoide-agente de celular de la reivindicación 11 o 13, dicho método que comprende hacer reaccionar un maitansinoide de fórmula 4



23

en la cual:

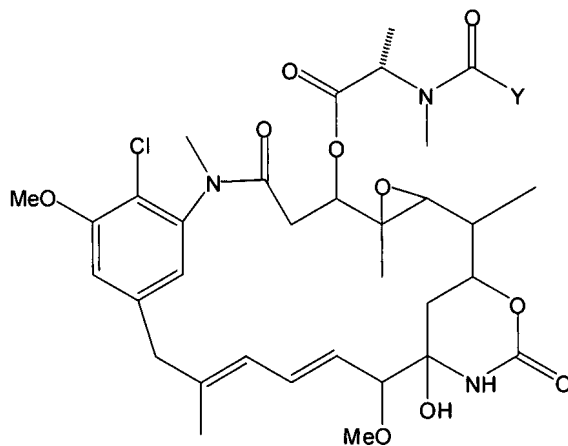
Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_mCR_1R_2SZ$, donde:

Z es H, SR o -COR donde R es alquilo lineal o alquenilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico o alquenilo que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, arilo sustituido que tiene de 6 a 10 átomos de carbono que lleva al menos un sustituyente seleccionado a partir de alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono, un alcoxi, un halógeno y un nitro, el radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

donde dicho radical heterocíclico aromático o dicho radical heterocíclico es un anillo de 3 a 10 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionado a partir N, O o S,

con dicho agente de unión celular, donde dicho agente de unión celular es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende el grupo reactivo ditio, el cual es un grupo ditiopiridil sustituido proveniente de *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB).

20. Un método de hacer el conjugado de maitansinoide-agente de unión celular de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, dicho método que comprende hacer reaccionar un maitansinoide de fórmula 4



4

en la cual:

Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_mCR_1R_2SZ$, donde:

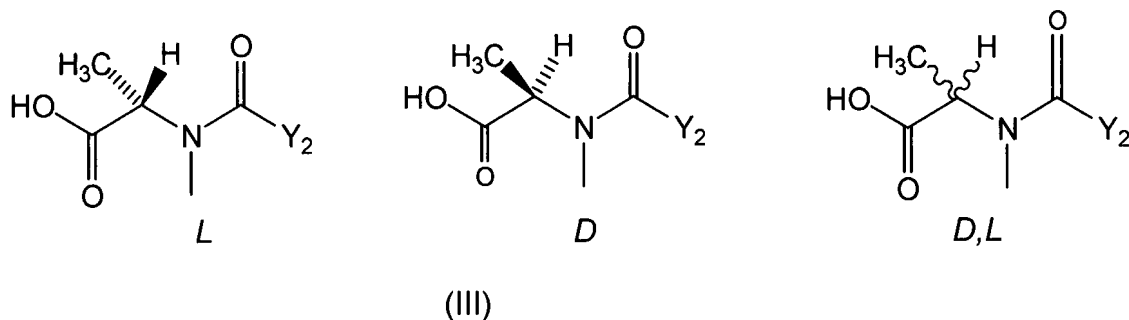
Z es H, SR o -COR, donde R es alquilo lineal o alquenilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico, o alquenilo que tiene

de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, arilo sustituido que tiene de 6 a 10 átomos de carbono que lleva al menos un sustituyente seleccionado entre alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono, un grupo alcoxi, un halógeno y un nitro, el radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, en el que dicho radical heterocíclico aromático o dicho radical heterocíclico es un anillo de 3 a 10 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados a partir de N, O o S,

con dicho agente de unión celular, en el que dicho agente de unión celular es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un grupo reactivo ditio.

21. Un método "ex vivo" para inducir la muerte celular en las poblaciones de células seleccionadas, que comprende poner en contacto las células diana o el tejido que contiene las células diana con una cantidad eficaz de un maitansinoide-agente de unión celular de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, una sal o solvato del mismo.

22. Un compuesto de fórmula III:



en las cuales:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_mCR_1R_2SZ_2$, donde:

R_1 es metilo;

R_2 es metilo o H;

R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H

l y m son 1; y

Z_2 es SR o -COR, en el que R es alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, arilo simple con 6 a 10 átomos de carbono, arilo sustituido que tiene de 6 a 10 átomos de carbono

que lleva al menos un sustituyente seleccionado a partir de alquilo que contiene de 1 a 4 carbonos átomos, un alcoxi, un halógeno y un nitro, el radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, donde dicho radical heterocíclico aromático o dicho radical heterocicloalquilo es un anillo de 3 a 10 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados a partir de N, O o S.

23. *N*-metil-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxa-pentil)-*L*-alanina (compuesto **10** (S)), *N*-metil-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxa-pentil)-*D*-alanina (compuesto **10** (R)) o *N*-metil-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxa-pentil)-*D,L*-alanina (compuesto racémico **10**).

24. Un método para hacer *N*-metil-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxa-pentil)-alanina (compuesto **10**) que contiene *N*-metil-*L*-alanina, *N*-metil-*D*-alanina, o *N*-metilalanina racémica, que comprende:

(1) hacer reaccionar el sulfuro de isobutileno (compuesto **5**) con el anión de acetonitrilo para dar 4-mercapto-4-metil-pentano nitrilo (compuesto **6**);

(2) hidrolizar el compuesto **6** para dar ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (compuesto **7**);

(3) convertir el compuesto **7** en 4-metil-4-(metilditio) pentanoico (compuesto **8**) mediante reacción con metilmetanotolsulfonato;

(4) convertir el compuesto **8** en *N*-hidroxisuccinimidil-4-metil-4-(metilditio) pentanoato de etilo (compuesto **9**); y

(5) hacer reaccionar el compuesto **9** con *N*-metil-*L*-alanina, *N*-metil-*D*-alanina, o *N*-metilalanina racémica para dar dicho compuesto **10** que contiene *N*-metil-*L*-alanina, *N*-metil-*D*-alanina, o *N*-metilalanina racémica.

25. Una mezcla de *N*-metil-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxa-pentil]-*S*-alanina y *N*-metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxa-pentil]-*S*-alanina (compuestos **15a**(*S,S*) y **15b**(*S,R*)).

26. Un método para hacer una mezcla de *N*-metil-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxa-pentil]-*S*-alanina y *N*-metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxa-pentil]-*S*-alanina (compuestos **15a**(*S,S*) y **15b**(*S,R*)), que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (compuesto **12**) con metilmetanotolsulfonato para dar ácido 4-metilditio-pentanoico (compuesto **13**);

(2) convertir el compuesto **13** en N-hidroxisuccinimidil-4-metilditio-pentanoato de etilo (compuesto **14**); y

(3) hacer reaccionar el compuesto **14** con N-metil-L-alanina para dar dicha mezcla de compuestos **15a(S,S)** y **15b(S,R)**.

5 27. Una mezcla de N-metil-N-[4-(S)-metilditio-1-oxa-pentil]-R-alanina y N-metil-N-[4-(R)-metilditio-1-oxa-pentil]-R-alanina (compuestos **15(R,S)** y **15(R,R)**).

10 28. Un método para hacer una mezcla de N-metil-N-[4-(S)-metilditio-1-oxa-pentil]-R-alanina y N-metil-N-[4-(R)-metilditio-1-oxa-pentil]-R-alanina (compuestos **15(R,S)** y **15(R,R)**), que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (compuesto **12**) con metanotiosulfonato de metilo para dar ácido 4-metilditio-pentanoico (compuesto **13**);

15 (2) convertir el compuesto **13** en N-hidroxisuccinimidil-4-metilditio-pentanoato de etilo (compuesto **14**);

(3) hacer reaccionar el compuesto **14** con N-metil-D-alanina para dar dicha mezcla de compuestos **15(R,S)** y **15(R,R)**.

20 29. N-metilalanina acilada racémica con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono lleva el átomo de azufre que es o bien racémico o de la quiralidad R o S para dar los compuestos de N-metil-N-[4-metilditio-1-oxa-pentil]-alanina (compuesto **15**).

25 30. Un método para hacer N-metilalanina acilada racémica con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de la quiralidad R o S para dar los compuestos de N-metil-N-[4-metilditio-1-oxa-pentil]-alanina (compuesto **15**), que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotiosulfonato de metilo para dar ácido 4-metilditio-pentanoico (compuesto **13**);

30 (2) convertir el compuesto **13** en N-hidroxisuccinimidil 4-metilditio-pentanoato de etilo (compuesto **14**);

(3) hacer reaccionar el compuesto **14** con N-metilalanina racémica para dar dicha N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una

funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono lleva el átomo de azufre que es o bien racémico o de la quiralidad R o S para dar los compuestos de *N*-metil-*N*-[4-metilditio-1-oxa-pentil]-alanina (compuesto **15**).

31. *N*-metil-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxa-pentil]-*S*-alanina (compuesto **15a**(*S,S*)).

5 32. Un método para hacer *N*-metil-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxa-pentil]-*S*-alanina (compuestos **15a**(*S,S*)) que comprende:

(1) convertir (*R*)-1,3-butanodiol en ácido (*S*)-4-(metilditio)pentanoico **19**;

(2) convertir el compuesto **19** en *N*-hidroxisuccinimidil yl(*S*)-4-(metilditio)pentanoato (compuesto (**20**)); y

10 (3) hacer reaccionar el compuesto **20** con *N*-metil-*L*-alanina para dar dicho compuesto **15a**(*S,S*).

33. *N*-metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxa-pentil]-*S*-alanina (compuesto **15b**(*S,R*)).

34. Un método para hacer *N*-metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxa-pentil]-*S*-alanina (compuesto **15b**(*S,R*)) que comprende:

15 (1) convertir (*S*)-1,3-butanodiol en ácido (*R*)-4-(metilditio)pentanoico **24**;

(2) convertir el compuesto **24** en *N*-hidroxisuccinimidil (*R*)-4-(metilditio)pentanoato (compuesto **25**); y

(3) hacer reaccionar el compuesto **25** con *N*-metil-*L*-alanina para dar dicho compuesto **15b**(*S,R*).

20 35. El conjugado maitansinoide-agente de unión celular de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde el agente de unión celular no es un anticuerpo MY9 humanizado o de superficie modificada.