



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

05-115708

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO Composición de Fármaco Conjugado

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K47/48 // A61P35/00

71. SOLICITANTE IMMUNOGEN, INC.

DOMICILIO Estados Unidos

74. APODERADO Dilia Rodriguez D'Alema

22. BOGOTÁ, D. C., Varanbox. 15/05

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

14-12-05

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: IMMUNOGEN, INC. Dirección: 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 Nacionalidad o domicilio: Estados Unidos Lugar de constitución: Estados Unidos		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1. AMPHLETT, Godfrey , 2.ZHANG, Wei. 3. FLEMING, Michael. 4.CHIH, Hung-Wei		
	Dirección 1. 8 ½ Ash Street Place, Cambridge MA 02138, Estados Unidos 2. 1580 Massachusetts Avenue, #7B, Cambridge MA 02138, Estados Unidos; 3. 5 Birchwood Drive, Londonderry, NH 03053, Estados Unidos. 4. 101 Western Avenue # 63, Cambridge, MA 02139, Estados Unidos Nacionalidad o Domicilio: 1. Estadounidense, 2. Chino, 3. Estadounidense. 4. Estadounidense		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US2004/015376 Fecha : Mayo 14, 2004 Publicación Internacional No. WO 2004/110498 A2 Fecha: Diciembre 23, 2004			
6) Título (54) COMPOSICIÓN DE FÁRMACO CONJUGADO			
7) Clasificación Internacional: A6K 47/48 // A61P35/00			
8) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	SI ☒ NO ☐ Estados Unidos	Mayo 14, 2003	60/470.550
9) C mprobarnte de pago N°. 05.87.306 Fecha: Noviembre 11, 2005			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina			

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radiacion : 05115700 00000000 Folios: 165
Fecha (MM): 2005-11-25 17:39:05
Tramite : 011 PCT-000000 370 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 87,306
FECHA : NOVIEMBRE 11 DE 2005

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CD. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	42212714	11/11/2005	6,746,000.00

C O N C E P T O

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

43

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros: - Reporte de Búsqueda Internacional
 - Opinión Escrita
 - Solicitud PCT

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:



C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 December 2004 (23.12.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/110498 A2

- (51) International Patent Classification²: A61K 47/48
- (21) International Application Number:
PCT/US2004/015376
- (22) International Filing Date: 14 May 2004 (14.05.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60470,550 14 May 2003 (14.05.2003) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNOGEN, INC. [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US)
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): AMPHLETT, Godfrey [US/US]; 8 1/2 Ash Street Place, Cambridge, MA 02138 (US). ZHANG, Wei [CN/US]; 1580 Massachusetts Avenue, #7B, Cambridge, MA 02138 (US). FLEMING, Michael [US/US]; 5 Birchwood Drive, Londonderry, NH 03053 (US). CHIH, Hung-Wei [—/US]; 101 Western Avenue, #63, Cambridge, MA 02139 (US)
- (74) Agent: KOLOM, Melissa, E. à; Leydig, Vott & Mayer, LTD, 2 Prudential Plaza, Suite 4900, 180 N. Stetson Avenue, Chicago, IL 60601-6780 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

WO 2004/110498 A2

(54) Title: DRUG CONJUGATE COMPOSITION

(57) Abstract: The invention provides a liquid composition and a lyophilized composition comprising a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid. The invention further provides a method for killing a cell in a human comprising administering to the human either of the compositions such that the antibody binds to the surface of the cell and the cytotoxicity of the maytansinoid is activated, whereby the cell is killed.

DRUG CONJUGATE COMPOSITION

FIELD OF THE INVENTION

[0001] This invention pertains to a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, and methods of using same.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] The treatment of cancer has progressed significantly with the development of pharmaceuticals that more efficiently target and kill cancer cells. To this end, researchers have taken advantage of cell-surface receptors and antigens selectively expressed by cancer cells to develop drugs based on antibodies that bind the tumor-specific or tumor-associated antigens. In this regard, cytotoxic molecules such as bacteria and plant toxins, radionuclides, and certain chemotherapeutic drugs have been chemically linked to monoclonal antibodies that bind tumor-specific or tumor-associated cell surface antigens (see, e.g., International (PCT) Patent Application Nos. WO 00/02587, WO 02/060955, and WO 02/092127, U.S. Patents 5,475,092, 6,340,701, 6,171,586, U.S. Patent Application Publication No. 2003/0004210 A1, and Ghetie et al., *J. Immunol. Methods*, 112, 267-277 (1988)). Such compounds are typically referred to as toxin, radionuclide, and drug "conjugates," respectively. Often they also are referred to as immunoconjugates, radioimmunoconjugates and immunotoxins. Tumor cell killing occurs upon binding of the drug conjugate to a tumor cell and activation of the cytotoxic activity of the maytansinoid. The selectivity afforded by drug conjugates minimizes toxicity to normal cells, thereby enhancing tolerability of the drug in the patient.

[0003] Despite the tumor selectivity afforded by drug conjugates, the use of drug conjugates in a clinical context is limited by a number of factors. In this respect, drug conjugate formulations typically are based on a known formulation of the antibody from which the drug conjugate is manufactured, without consideration as to what effect the conjugated cytotoxic molecule may have on the stability of the antibody. As such, current drug conjugate compositions are less stable than compositions containing the tumor-specific antibody alone.

[0004] Thus, in view of the above, there remains a need for drug conjugate compositions containing highly cytotoxic drugs that are more stable than currently available drug conjugate compositions. There also remains a need for methods of using such drug conjugate compositions to treat human diseases associated with cell proliferation, such as cancer.

[0005] The invention provides such a composition and method. These and other advantages of the invention, as well as additional inventive features, will be apparent from the description of the invention provided herein.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0006] The invention provides a composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent, (iii) a tonicifying amount of sodium chloride, (iv) water, and optionally (v) a surfactant, wherein the composition has a pH of about 5-6. The invention also provides a lyophilized composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent, (iii) a cryoprotectant, (iv) a bulking agent, and optionally (v) a surfactant, wherein the composition has a pH of about 5-6 when reconstituted with water. The invention further provides a method for killing a cell in a human comprising administering to the human either of the above-described compositions such that the antibody binds to the surface of the cell and the cytotoxicity of the maytansinoid is activated, whereby the cell is killed.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0007] The invention provides a composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent, (iii) optionally a surfactant, (iv) a tonicifying amount of sodium chloride, and (v) water, wherein the composition has a pH of about 5-6.

[0008] The inventive composition contains a conjugate which comprises an antibody chemically coupled to a maytansinoid. The term "antibody," as used herein, refers to any immunoglobulin, any immunoglobulin fragment, such as Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, diabodies, and triabodies, or immunoglobulin chimera, which can bind to an antigen on the surface of a cell (e.g., which contains a complementarity determining region (CDR)). Any suitable antibody can be used in the inventive composition. One of ordinary skill in the art will appreciate that the selection of an appropriate antibody will depend upon the cell population to be targeted. In this regard, the type and number of cell surface molecules (i.e., antigens) that are selectively expressed in a particular cell population (typically and preferably a diseased cell population) will govern the selection of an appropriate antibody for use in the inventive composition. Cell surface expression profiles are known for a wide variety of cell types, including tumor cell types, or, if unknown, can be determined using routine molecular biology and histochemistry techniques.

[0009] The antibody can be polyclonal or monoclonal, but is most preferably a monoclonal antibody. As used herein, "polyclonal" antibodies refer to heterogeneous

populations of antibody, typically contained in the sera of immunized animals. "Monoclonal" antibodies refer to homogenous populations of antibody molecules that are specific to a particular antigen. Monoclonal antibodies are typically produced by a single clone of B lymphocytes ("B cells"). Monoclonal antibodies may be obtained using a variety of techniques known to those skilled in the art, including standard hybridoma technology (see, e.g., Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), and C.A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). In brief, the hybridoma method of producing monoclonal antibodies typically involves injecting any suitable animal, typically and preferably a mouse, with an antigen (i.e., an "immunogen"). The animal is subsequently sacrificed, and B cells isolated from its spleen are fused with human myeloma cells. A hybrid cell is produced (i.e., a "hybridoma"), which proliferates indefinitely and continuously secretes high titers of an antibody with the desired specificity *in vitro*. Any appropriate method known in the art can be used to identify hybridoma cells that produce an antibody with the desired specificity. Such methods include, for example, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot analysis, and radioimmunoassay. The population of hybridomas is screened to isolate individual clones, each of which secrete a single antibody species to the antigen. Because each hybridoma is a clone derived from fusion with a single B cell, all the antibody molecules it produces are identical in structure, including their antigen binding site and isotype. Monoclonal antibodies also may be generated using other suitable techniques including EBV-hybridoma technology (see, e.g., Haskard and Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2), 361-67 (1984), and Roder et al., *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), or bacteriophage vector expression systems (see, e.g., Huse et al., *Science*, 246, 1275-81 (1989)). To prepare monoclonal antibody fragments, recombinant methods typically are employed.

[0010] The monoclonal antibody can be isolated from or produced in any suitable animal, but is preferably produced in a mammal, more preferably a mouse, and most preferably a human. Methods for producing an antibody in mice are well known to those skilled in the art and are described herein. With respect to human antibodies, one of ordinary skill in the art will appreciate that polyclonal antibodies can be isolated from the sera of human subjects vaccinated or immunized with an appropriate antigen. Alternatively, human antibodies can be generated by adapting known techniques for producing human antibodies in non-human animals such as mice (see, e.g., U.S. Patents 5,545,806, 5,569,825, and 5,714,352, and U.S. Patent Application Publication No. 2002/0197266 A1).

[0011] While being the ideal choice for therapeutic applications in humans, human antibodies, particularly human monoclonal antibodies, typically are more difficult to generate than mouse monoclonal antibodies. Mouse monoclonal antibodies, however,

induce a rapid host antibody response when administered to humans, which can reduce the therapeutic or diagnostic potential of the antibody-drug conjugate. To circumvent these complications, a monoclonal antibody preferably is not recognized as "foreign" by the human immune system. To this end, phage display can be used to generate the antibody. In this regard, phage libraries encoding antigen-binding variable (V) domains of antibodies can be generated using standard molecular biology and recombinant DNA techniques (see, e.g., Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Phage encoding a variable region with the desired specificity are selected for specific binding to the desired antigen, and a complete human antibody is reconstituted comprising the selected variable domain. Nucleic acid sequences encoding the reconstituted antibody are introduced into a suitable cell line, such as a myeloma cell used for hybridoma production, such that human antibodies having the characteristics of monoclonal antibodies are secreted by the cell (see, e.g., Janeway et al., *supra*, Huse et al., *supra*, and U.S. Patent 6,265,150). Alternatively, monoclonal antibodies can be generated from mice that are transgenic for specific human heavy and light chain immunoglobulin genes. Such methods are known in the art and described in, for example U.S. Patents 5,545,806 and 5,569,825, and Janeway et al., *supra*. Most preferably the antibody is a humanized antibody. As used herein, a "humanized" antibody is one in which the complementarity-determining regions (CDR) of a mouse monoclonal antibody, which form the antigen binding loops of the antibody, are grafted onto the framework of a human antibody molecule. Owing to the similarity of the frameworks of mouse and human antibodies, it is generally accepted in the art that this approach produces a monoclonal antibody that is antigenically identical to a human antibody but binds the same antigen as the mouse monoclonal antibody from which the CDR sequences were derived. Methods for generating humanized antibodies are well known in the art and are described in detail in, for example, Janeway et al., *supra*, U.S. Patents 5,225,539, 5,585,089 and 5,693,761, European Patent No. 0239400 B1, and United Kingdom Patent No. 2188638. Humanized antibodies can also be generated using the antibody resurfacing technology described in U.S. Patent 5,639,641 and Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235, 959-973 (1994). While the antibody employed in the conjugate of the inventive composition most preferably is a humanized monoclonal antibody, a human monoclonal antibody or a mouse monoclonal antibody, as described above, are also within the scope of the invention.

[0012] Antibody fragments that have at least one antigen binding site, and thus recognize and bind to at least one antigen or receptor present on the surface of a target cell, also are within the scope of the invention. In this respect, proteolytic cleavage of an intact antibody molecule can produce a variety of antibody fragments that retain the ability to recognize and bind antigens. For example, limited digestion of an antibody molecule with

the protease papain typically produces three fragments, two of which are identical and are referred to as the Fab fragments, as they retain the antigen binding activity of the parent antibody molecule. Cleavage of an antibody molecule with the enzyme pepsin normally produces two antibody fragments, one of which retains both antigen-binding arms of the antibody molecule, and is thus referred to as the F(ab')₂ fragment. A single-chain variable region fragment (sFv) antibody fragment, which consists of a truncated Fab fragment comprising the variable (V) domain of an antibody heavy chain linked to a V domain of a light antibody chain via a synthetic peptide, can be generated using routine recombinant DNA technology techniques (see, e.g., Janeway et al., *supra*). Similarly, disulfide-stabilized variable region fragments (dsFv) can be prepared by recombinant DNA technology (see, e.g., Reiter et al., *Protein Engineering*, 7, 697-704 (1994)). Antibody fragments of the present invention, however, are not limited to these exemplary types of antibody fragments. Any suitable antibody fragment that recognizes and binds to a desired cell surface receptor or antigen can be employed. Antibody-antigen binding can be assayed using any suitable method known in the art, such as, for example, radioimmunoassay (RIA), ELISA, Western blot, immunoprecipitation, and competitive inhibition assays (see, e.g., Janeway et al., *supra*, and U.S. Patent Application Publication No. 2002/0197266 A1).

[0013] In addition, the antibody can be a chimeric antibody. By "chimeric" is meant that the antibody comprises at least two immunoglobulins, or fragments thereof, obtained or derived from at least two different species (e.g., two different immunoglobulins, a human immunoglobulin constant region combined with a murine immunoglobulin variable region).

[0014] Any suitable antibody can be used in the inventive composition. Particularly preferred antibodies are humanized monoclonal antibodies, examples of which include huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, and rituximab (see, e.g., U.S. Patent 5,639,641, U.S. Provisional Patent Application No. 60/424,332, International (PCT) Patent Application No. WO 02/16401, Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235, 959-973 (1994), Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 969-73 (1994), Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8618-8623 (1996), Nadler et al., *J. Immunol.*, 131, 244-250 (1983), Colomer et al., *Cancer Invest.*, 19, 49-56 (2001), Heider et al., *Eur. J. Cancer*, 31A, 2385-2391 (1995), Welt et al., *J. Clin. Oncol.*, 12, 1193-1203 (1994), Maloney et al., *Blood*, 90, 2188-2195 (1997), and U.S. Patent 5,665,357). Most preferably, the antibody is the huN901 humanized monoclonal antibody or the huMy9-6 humanized monoclonal antibody. Other humanized monoclonal antibodies are known in the art and can be used in connection with the inventive composition.

[0015] In accordance with the invention, the above-described antibody is chemically coupled to any suitable cytotoxic agent, particularly a cytotoxic agent that induces cytotoxicity of tumor cells, to form a conjugate as described above. As a result of normal

pharmacologic clearance mechanisms, an antibody employed in a drug conjugate contacts and binds to target cells only in limited amounts. Therefore, the cytotoxic agent employed in the conjugate must be highly cytotoxic such that sufficient cell killing occurs to elicit a therapeutic effect. Examples of such cytotoxic agents include novel taxanes (see, e.g., International (PCT) Patent Application Nos. WO 01/38318 and PCT/US03/02675), DNA-alkylating agents (e.g., CC-1065 analogs), anthracyclines, tubulysin analogs, duocarmycin analogs, auristatin E, and cytotoxic agents comprising a reactive polyethylene glycol moiety (see, e.g., Sasse et al., *J. Antibiot. (Tokyo)*, 53, 879-85 (2000), Suzawa et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 2175-84 (2000), Ichimura et al., *J. Antibiot. (Tokyo)*, 44, 1045-53 (1991), Francisco et al., *Blood* (2003) (electronic publication prior to print publication), U.S. Patents 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, and 6,436,931, U.S. Patent Application Publication No. 2001/0036923 A1, Pending U.S. Patent Application Nos. 10/024,290 and 10/116,053, and International (PCT) Patent Application No. WO 01/49698). Alternatively and most preferably, the antibody is chemically coupled to a maytansinoid to form the conjugate of the inventive composition.

[0016] Maytansinoids were originally isolated from the east African shrub belonging to the genus *Maytenus*, but were subsequently also discovered to be metabolites of soil bacteria, such as *Actinosynnema pretiosum* (see, e.g., U.S. Patent 3,896,111). Maytansinoids induce cytotoxicity through mitotic inhibition. Experimental evidence suggests that maytansinoids inhibit mitosis by inhibiting polymerization of the microtubule protein tubulin, thereby preventing formation of microtubules (see, e.g., U.S. Patent 6,441,163 and Remillard et al., *Science*, 189, 1002-1005 (1975)). Maytansinoids have been shown to inhibit tumor cell growth *in vitro* using cell culture models, and *in vivo* using laboratory animal systems. Moreover, the cytotoxicity of maytansinoids is 1,000-fold greater than conventional chemotherapeutic agents, such as, for example, methotrexate, daunorubicin, and vincristine (see, e.g., U.S. Patent 5,208,020). Maytansinoids are known in the art to include maytansine, maytansinol, C-3 esters of maytansinol, and other maytansinol analogues and derivatives (see, e.g., U.S. Patents 5,208,020 and 6,441,163). C-3 esters of maytansinol can be naturally occurring or synthetically derived. Moreover, both naturally occurring and synthetic C-3 maytansinol esters can be classified as a C-3 ester with simple carboxylic acids, or a C-3 ester with derivatives of N-methyl-L-alanine, the latter being more cytotoxic than the former. Synthetic maytansinoid analogues also are known in the art and described in, for example, Kupchan et al., *J. Med. Chem.*, 21, 31-37 (1978). Methods for generating maytansinol and analogues and derivatives thereof are described in, for example, U.S. Patent 4,151,042.

[0017] Suitable maytansinoids for use in the inventive composition can be isolated from natural sources, synthetically produced, or semi-synthetically produced using methods

known in the art. Moreover, the maytansinoid can be modified in any suitable manner, so long as sufficient cytotoxicity is preserved in the ultimate conjugate molecule. In this regard, maytansinoids lack suitable functional groups to which antibodies can be linked. A linking moiety desirably is utilized to link the maytansinoid to the antibody to form the conjugate. The linking moiety contains a chemical bond that allows for the activation of maytansinoid cytotoxicity at a particular site. Suitable chemical bonds are well known in the art and include disulfide bonds, acid labile bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds, thioether bonds formed between sulfhydryl and maleimide groups, and esterase labile bonds. Most preferably, the linking moiety comprises a disulfide bond or a thioether bond. In accordance with the invention, the linking moiety preferably comprises a reactive chemical group. Particularly preferred reactive chemical groups are N-succinimidyl esters and N-sulfosuccinimidyl esters. In a preferred embodiment, the reactive chemical group can be covalently bound to the maytansinoid via disulfide bonding between thiol groups. Thus, a maytansinoid modified as described herein preferably comprises a thiol group. One of ordinary skill in the art will appreciate that a thiol group contains a sulfur atom bonded to a hydrogen atom and is typically also referred to in the art as a sulfhydryl group, which can be denoted as "-SH" or "RSH."

[0018] Particularly preferred maytansinoids comprising a linking moiety that contains a reactive chemical group are C-3 esters of maytansinol and its analogs where the linking moiety contains a disulfide bond and the chemical reactive group comprises a N-succinimidyl or N-sulfosuccinimidyl ester. Many positions on maytansinoids can serve as the position to chemically link the linking moiety. For example, the C-3 position having a hydroxyl group, the C-14 position modified with hydroxymethyl, the C-15 position modified with hydroxy and the C-20 position having a hydroxy group are all useful. The linking moiety most preferably is linked to the C-3 position of maytansinol. Most preferably, the maytansinoid used in connection with the inventive composition is N^{2'}-deacetyl-N^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine (DM1) or N^{2'}-deacetyl-N^{2'}-(4-mercapto-4-methyl-1-oxopentyl)-maytansine (DM4).

[0019] Linking moieties with other chemical bonds also can be used in the context of the invention, as can other maytansinoids. Specific examples of other chemical bonds include acid labile bonds, thioether bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds and esterase labile bonds. Methods for producing maytansinoids with linking moieties are described in, for example, U.S. Patents 5,208,020, 5,416,064, and 6,333,410.

[0020] The linking moiety of a maytansinoid typically and preferably is part of a larger linker molecule that is used to join the antibody to the maytansinoid. Any suitable linker molecule can be used in connection with the invention, so long as the linker molecule provides for retention of the cytotoxicity and targeting characteristics of the maytansinoid

and the antibody, respectively. The linker molecule joins the maytansinoid to the antibody through chemical bonds (as described above), such that the maytansinoid and the antibody are chemically coupled (e.g., covalently bonded) to each other. Desirably, the linker molecule chemically couples the maytansinoid to the antibody through disulfide bonds or thioether bonds. Most preferably, the antibody is chemically coupled to the maytansinoid via disulfide bonds.

[0021] Particularly preferred linker molecules include, for example, N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) (see, e.g., Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173, 723-737 (1978)), N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate (SPDB) (see, e.g., U.S. Patent 4,563,304), N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP) (see, e.g., CAS Registry number 341498-08-6), N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) (see, e.g., Yoshitake et al., *Eur. J. Biochem.*, 101, 395-399 (1979)), and N-succinimidyl 4-methyl-4-[2-(5-nitro-pyridyl)-dithio]pentanoate (SMNP) (see, e.g., U.S. Patent 4,563,304). The most preferred linker molecules for use in the inventive composition are SPP, SMCC, and SPDB.

[0022] The inventive composition comprises a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid. A "therapeutically effective amount" means an amount sufficient to show a meaningful benefit in an individual, e.g., promoting at least one aspect of tumor cell cytotoxicity, or treatment, healing, prevention, or amelioration of other relevant medical condition(s) associated with a particular cancer. Therapeutically effective amounts may vary depending upon the biological effect desired in the individual, condition to be treated, and/or the specific characteristics of the conjugate, and the individual. Thus, in accordance with the methods described herein, the attending physician (or other medical professional responsible for administering the composition) will typically decide the amount of the composition with which to treat each individual patient. The concentration of the conjugate in the inventive composition desirably is about 0.1 mg/mL to about 5 mg/mL (e.g., about 0.5 mg/mL, about 2 mg/mL, or about 5 mg/mL). In a preferred embodiment, the concentration of the conjugate in the inventive composition is about 1 mg/mL or higher (e.g., about 2 mg/mL or higher, about 3 mg/mL or higher, or about 4 mg/mL or higher). Most preferably, the concentration of the conjugate in the inventive composition is about 5 mg/mL. While compositions comprising at least 1 mg/mL of the conjugate are particularly preferred, conjugate concentrations of less than 1 mg/mL (e.g., concentrations of about 0.1 mg/mL to about 0.9 mg/mL) also can be stably maintained in the inventive composition, and thus are within the scope of the invention. Compositions comprising greater than 1 mg/mL of the conjugate molecule are advantageous for clinical and commercial use, in that such

concentrations enable single doses of the composition to be prepared in a more convenient (i.e., smaller) volume for administration.

[0023] The inventive composition desirably is formulated to be acceptable for pharmaceutical use, such as, for example, administration to a human host in need thereof. To this end, the conjugate molecule preferably is formulated into a composition comprising a physiologically acceptable carrier (e.g., excipient or diluent). Physiologically acceptable carriers are well known and are readily available, and include buffering agents, anti-oxidants, bacteriostats, salts, and solutes that render the formulation isotonic with the blood or other bodily fluid of the human patient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers (e.g., surfactants), and preservatives. The choice of carrier will be determined, at least in part, by the location of the target tissue and/or cells, and the particular method used to administer the composition. Examples of suitable carriers and excipients for use in drug conjugate formulations are disclosed in, for example, International (PCT) Patent Application Nos. WO 00/02587, WO 02/060955, and WO 02/092127, and Ghetie et al., *J. Immunol. Methods*, 112, 267-277 (1988). Most preferably, the inventive composition comprises a buffering agent, a surfactant, a tonicifying amount of sodium chloride, and water.

[0024] Any suitable pharmaceutically acceptable buffering agent may be used in connection with the inventive composition. Examples of particularly preferred buffering agents include citrate, acetate, succinate, phosphate, and histidine. The inventive composition, however, is not limited to these exemplary buffering agents. The buffering agent may be present in the inventive composition in any suitable concentration, so long as sufficient stability of the composition is achieved under the desired conditions. In this regard, the concentration of the buffering agent in the composition preferably is about 2 mM to about 50 mM (e.g., about 2-10 mM, about 10-20 mM, about 20-30 mM, about 30-40 mM, or about 40-50 mM). Most preferably, the concentration of the buffering agent in the composition is about 5-15 mM (e.g., about 10 mM). The buffering agent desirably is sodium succinate or sodium acetate, but most preferably is sodium citrate. The buffering agent typically is present in the inventive composition such that the pH is maintained within a desired range. In this respect, the inventive composition preferably has a pH of about 5-6 (e.g., about 5, 5.5, or 6). It is believed that compositions with a higher pH (e.g., about pH 6 or higher) are less stable than compositions with a lower pH (i.e., about pH 6 or less). Thus, the inventive composition most preferably has a pH of about 5.5.

[0025] In addition to the buffering agent discussed above, the inventive composition also optionally contains a surfactant. Any suitable surfactant can be used in connection with the invention. Suitable surfactants are well known to those skilled in the art. In accordance with the inventive composition, the surfactant desirably is a polysorbate, and preferably is

14
14

polysorbate 20 or polysorbate 80. Most preferably, the surfactant is polysorbate 20. The surfactant may be present in the inventive composition in any suitable concentration, so long as sufficient stability of the composition is achieved under the desired conditions. In this regard, the concentration of the surfactant in the composition preferably is about 0.002% to about 0.1% wt./vol. (e.g., about 0.002-0.01%, about 0.005-0.02%, or about 0.01-0.1% wt./vol.) of the total volume of the composition. Most preferably, the concentration of the surfactant in the composition is about 0.005-0.02% wt./vol. (e.g., about 0.01% wt./vol.) of the total volume of the composition. Although compositions formulated with surfactants are preferred, compositions formulated without surfactants are also within the scope of the invention.

[0026] As an additional stabilizing agent, sodium chloride also is added to the inventive composition. In this regard, the inventive composition comprises a suitable amount, preferably a tonicifying amount, of sodium chloride (NaCl). By the phrase a "tonicifying amount of sodium chloride," it is meant that the concentration of NaCl in the composition is such that the tonicity of the composition is the same as the tonicity of human blood (i.e., isotonic). In this regard, the NaCl can be present in the inventive composition in any suitable concentration, so long as sufficient tonicity and stability is achieved in the inventive composition. Desirably, the concentration of sodium chloride in the composition is about 50 mM to about 500 mM (e.g., about 50-100 mM, about 100-150 mM, about 150-250 mM, about 250-350 mM, or about 350-450 mM). While higher concentrations of sodium chloride (e.g., about 150 mM or more) may render the inventive composition hypertonic rather than isotonic, dilution of such compositions with any suitable isotonic solvent such as, preferably, dextrose 5% in water ("D5W") or normal saline ("NS") prior to human administration would render such compositions only slightly hypertonic and suitable for use in the invention. Preferably, the concentration of sodium chloride in the composition is about 100 mM to about 200 mM (e.g., about 100-140 mM, about 130-170 mM, or about 160-200 mM). Most preferably, the concentration of sodium chloride in the composition is about 110-150 mM (e.g., about 110mM-130mM, or about 120 mM).

[0027] In a particularly preferred embodiment of the invention, the composition comprises (i) about 5 mg/mL of a conjugate comprising huN901 chemically coupled to DM1, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 120 mM sodium chloride, and (v) water (preferably water suitable for injection (WFI)), wherein the pH of the composition is about 5.5. In another preferred embodiment, the composition comprises (i) about 1 mg/mL or more (e.g., about 1 mg/mL, about 2 mg/mL, 3 mg/mL, about 5 mg/mL, or ranges therebetween) of a conjugate comprising huMy9-6 chemically coupled to DM1, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) optionally about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 135 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH

of the composition is about 5.5. In yet another preferred embodiment, the composition comprises (i) about 1 mg/mL or more (e.g., about 1 mg/mL, about 2 mg/mL, 3 mg/mL, about 5 mg/mL, or ranges therebetween) of a conjugate comprising huMy9-6 chemically coupled to DM4, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) optionally about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 135 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH of the composition is about 5.5. In an additional preferred embodiment, the composition comprises (i) about 1 mg/mL or more (e.g., about 1 mg/mL, about 2 mg/mL, 3 mg/mL, about 5 mg/mL, or ranges therebetween) of a conjugate comprising huN901 chemically coupled to DM1 via an SMCC linker, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) optionally about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 130 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH of the composition is about 5.5.

[0028] Compositions containing antibodies (or proteins in general) are rendered unstable by oxidation. Thus, in another embodiment of the invention, the composition further comprises an antioxidant. Any suitable antioxidant can be used in the inventive composition. Suitable antioxidants are known in the art and include, for example, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, tocotrienols, polyphenols, zinc, manganese, selenium, vitamin C, vitamin E, beta carotene, cysteine, and methionine. The antioxidant used in connection with the inventive composition most preferably is methionine. The antioxidant can be present in the composition in any suitable concentration. Desirably, the concentration of the antioxidant in the composition is about 100 μ M to about 100 mM (e.g., about 0.25-1 mM, about 0.5-2 mM, about 5-15 mM, about 20-70 mM, or about 60-90 mM). Most preferably, the concentration of the antioxidant in the composition is about 5-15 mM (e.g., about 10 mM).

[0029] In addition to antioxidants, the inventive composition can further be stabilized by the addition of sucrose. The use of sucrose to stabilize antibody formulations is known to those of skill in the art. Any suitable amount of sucrose can be used in the inventive composition, but the concentration of sucrose in the composition desirably is about 0.1% to about 10% wt/vol. (e.g., about 0.1-1%, about 2-5%, or about 7-10% wt/vol.) of the total volume of the composition. Most preferably, the concentration of sucrose in the composition is about 4-6% wt/vol. (e.g., about 5% wt/vol.) of the total volume of the composition.

[0030] The invention further provides a packaged composition comprising a sealed container having the inventive composition dispersed therein, and an inert gas overlay. The packaged composition can be overlaid with any suitable inert gas, so long as the inventive composition is stably maintained within the packaged composition. The inert gas preferably is nitrogen or argon. The packaged composition can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampules or vials.

16
15

[0031] In addition to the water-containing composition described herein (also referred to herein as a "liquid" or "aqueous" composition), the invention also provides a lyophilized composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent, (iii) a surfactant, (iv) a cryoprotectant, and (v) a bulking agent, wherein the composition has a pH of about 5-6 when reconstituted with water. By "lyophilized" is meant that the composition has been freeze-dried under a vacuum. Lyophilization typically is accomplished by freezing a particular formulation such that the solutes are separated from the solvent(s). The solvent is then removed by sublimation (i.e., primary drying) and next by desorption (i.e., secondary drying). Descriptions of the conjugate (i.e., the antibody chemically coupled to the maytansinoid), buffering agent, surfactant, and components thereof, set forth above in connection with other embodiments of the invention also are applicable to those same aspects of the aforesaid lyophilized composition. Prior to reconstitution of the lyophilized composition, the relative amounts of each component comprising the inventive lyophilized composition can be described in terms of mg of excipient (e.g., buffer, surfactant, bulking agent, cryoprotectant) per mg of conjugate.

[0032] While any suitable buffering agent described herein can be used in connection with the inventive lyophilized composition, the inventive lyophilized composition preferably comprises a sodium succinate buffer. The buffering agent can be present in the inventive lyophilized composition in any suitable amount. In particular, the lyophilized composition desirably comprises about 0.1 mg to about 2 mg of the buffering agent per mg of the conjugate (e.g., about 0.1 mg to about 0.5 mg buffering agent per mg of the conjugate, about 0.5 mg to about 1 mg buffering agent per mg of the conjugate, or about 1 mg about 2 mg buffering agent per mg of the conjugate). Most preferably, the lyophilized composition comprises about 0.3 mg sodium succinate buffer per mg of the conjugate.

[0033] While any suitable surfactant described herein can be used in connection with the inventive lyophilized composition, the surfactant desirably is a polysorbate, and preferably is polysorbate 20 or polysorbate 80. Most preferably, the surfactant is polysorbate 20. The surfactant may be present in the inventive lyophilized composition in any suitable amount, so long as sufficient stability of the lyophilized composition is achieved under the desired conditions. In this regard, the lyophilized composition desirably comprises about 0.005 mg to about 0.1 mg of the surfactant per mg of the conjugate (e.g., about 0.005 mg to about 0.01 mg surfactant per mg of the conjugate, about 0.01 mg to about 0.05 mg surfactant per mg of the conjugate, or about 0.05 mg to about 0.1 mg surfactant per mg of the conjugate). When the surfactant is polysorbate 20, the lyophilized composition preferably comprises about 0.02 mg polysorbate 20 per mg of the conjugate.

17
16

[0034] In order to prevent degradation of the active ingredients of the composition during freezing and drying, the inventive lyophilized composition further comprises a cryoprotectant, preferably an amorphous cryoprotectant. The term "cryoprotectant," as used herein, refers to an excipient that protects unstable molecules during freezing. Suitable cryoprotectants for use in the inventive composition are known to those skilled in the art, and include, for example, glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), polyethylene glycol (PEG), dextran, glucose, trehalose, and sucrose. Most preferably, the cryoprotectant is sucrose. The cryoprotectant may be present in the inventive lyophilized composition in any suitable amount. The lyophilized composition desirably comprises about 0.5 mg to about 5 mg (e.g., about 0.5 mg to about 2 mg) of the cryoprotectant per mg of the conjugate (e.g., about 0.8 mg cryoprotectant per mg of the conjugate, about 2 mg cryoprotectant per mg of the conjugate, or about 4 mg cryoprotectant per mg of the conjugate). When the cryoprotectant is sucrose, the lyophilized composition preferably comprises about 0.5 mg to about 2 mg (e.g., about 1 mg) sucrose per mg of the conjugate.

[0035] The inventive lyophilized composition can further contain a bulking agent, preferably a crystallizable bulking agent. Bulking agents typically are used in the art to provide structure and weight to the "cake" produced as a result of lyophilization. Any suitable bulking agent known in the art may be used in connection with the inventive lyophilized composition. Suitable bulking agents include, for example, mannitol, dextran, and glycine. The bulking agent used in the inventive composition most preferably is glycine. The lyophilized composition can contain any suitable amount of the bulking agent, but preferably the lyophilized composition comprises about 2 mg to about 20 mg of the bulking agent per mg of the conjugate (e.g., about 2 mg to about 10 mg bulking agent per mg of the conjugate, about 5 mg to about 10 mg bulking agent per mg of the conjugate, about 10 mg to about 15 mg bulking agent per mg of the conjugate, or about 15 mg to about 20 mg bulking agent per mg of the conjugate). When the bulking agent is glycine, the lyophilized composition preferably comprises about 3.8 mg glycine per mg of the conjugate.

[0036] Thus, in accordance with the invention, the contents of a lyophilized composition that is to be reconstituted to contain 5 mg/mL of conjugate (e.g., preferably a conjugate comprising huN901 chemically coupled to DM1) preferably comprises (i) about 0.3 mg sodium succinate buffer per mg of the conjugate, (ii) about 0.02 mg polysorbate 20 per mg of the conjugate, (iii) about 1 mg sucrose per mg of the conjugate, and (iv) about 3.8 mg glycine per mg of the conjugate. Once reconstituted with water, such a lyophilized composition preferably has a pH of about 5.5. Moreover, when the lyophilized composition is reconstituted with water, the descriptions of the relative concentrations of the conjugate,

the buffering agent, and the surfactant set forth above in connection with the inventive liquid composition also are applicable to the aforesaid lyophilized composition.

[0037] Lyophilization methods are well known in the art and are described in, for example, Wang, W., *Int. J. Pharm.*, 203, 1-60 (2000). For example, the inventive lyophilized composition can be produced using a lyophilization cycle comprising the following steps: (1) pre-cooling at a shelf temperature of 4 °C and ambient chamber pressure for 2.5 hours, (2) freezing at a shelf temperature of -50 °C and ambient chamber pressure for 14 hours, (3) glycine recrystallization at a shelf temperature of -20 °C and ambient chamber pressure for 6 hours, (4) re-freezing at a shelf temperature of -50 °C and ambient chamber pressure for 16 hours, (5) primary drying at a shelf temperature of -13 °C and 100 mTorr of pressure for 24 hours, (6) secondary drying at a shelf temperature of 24 °C and 100 mTorr of pressure for 10 hours, and (7) stopper phase at a shelf temperature of 24 °C and ambient chamber pressure. The inventive lyophilized composition, however, is not limited to compositions produced by the above-described method. Indeed, any suitable lyophilization method can be used to produce the inventive lyophilized composition, and it will be apparent to those skilled in the art that the chosen lyophilization parameters (e.g., drying times) will vary depending on a variety of factors, including the volume of the solution to be lyophilized.

[0038] In addition to the preferred embodiments described herein, the inventive composition (whether in liquid or lyophilized form) can comprise additional therapeutic or biologically active agents. For example, therapeutic factors useful in the treatment of a particular indication (e.g., cancer) can be present. Factors that control inflammation, such as ibuprofen or steroids, can be part of the composition to reduce swelling and inflammation associated with *in vivo* administration of the composition and physiological distress. Immune enhancers can be included in the composition to up regulate the body's natural defenses against disease. Vitamins and minerals, antioxidants, and micronutrients can be co-administered with the composition. Antibiotics, i.e., microbicides and fungicides, can be present to reduce the risk of infection pertaining to the procedures associated with administration of the composition and other disorders.

[0039] The invention further provides a method for killing a cell in a human comprising administering to the human a composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent, (iii) a surfactant, (iv) a tonicifying amount of sodium chloride, and (v) water, wherein the composition has a pH of about 5-6, such that the antibody binds to the surface of the cell and the cytotoxicity of the maytansinoid is activated, whereby the cell is killed. Descriptions of the conjugate (i.e., the antibody chemically coupled to the maytansinoid), excipients (e.g., buffering agent, surfactant, sodium chloride, etc.), and

19
+8

components thereof, set forth above in connection with other embodiments of the invention also are applicable to those same aspects of the aforesaid inventive method.

[0040] The inventive method involves administering the inventive composition to a human. Ideally, the inventive method is used to target and kill cells affected by a disease, particularly a disease associated with elevated levels of cellular proliferation, such as cancer. Thus, in this regard, the inventive method preferably is used to kill tumor cells in a human, thereby resulting in the prevention, amelioration, and/or cure of the cancer.

[0041] While any suitable means of administering the composition to a human can be used within the context of the invention, typically and preferably the inventive composition is administered to a human via injection, and most preferably via infusion. By the term "injection," it is meant that the composition is forcefully introduced into a target tissue of the human. By the term "infusion," it is meant that the composition is introduced into a tissue, typically and preferably a vein, of the human. The composition can be administered to the human by any suitable route, but preferably is administered to the human intravenously or intraperitoneally. When the inventive method is employed to kill tumor cells, however, intratumoral administration of the inventive composition is particularly preferred. When the inventive composition is administered by injecting, any suitable injection device can be used to administer the composition directly to a tumor. For example, the common medical syringe can be used to directly inject the composition into a subcutaneous tumor. Alternatively, the composition can be topically applied to the tumor by bathing the tumor in the inventive liquid composition. Likewise, the tumor can be perfused with the inventive composition over a period of time using any suitable delivery device, e.g., a catheter. While less preferred, other routes of administration can be used to deliver the composition to the human. Indeed, although more than one route can be used to administer the inventive composition, a particular route can provide a more immediate and more effective reaction than another route. For example, while not particularly preferred, the inventive composition can be applied or instilled into body cavities, absorbed through the skin, inhaled, or administered parenterally via, for instance, intramuscular or intraarterial administration. Preferably, the inventive composition parenterally administered to a human is specifically targeted to particular cells, e.g., cancer cells.

[0042] As described herein, the conjugate comprises an antibody, which is preferably a humanized monoclonal antibody, such as huN901, huMy9-6, huB4, or huC242. Other suitable antibodies include, for example, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, and rituximab. When compositions comprising such conjugates are employed in the inventive method, the antibody targets the conjugate to a desired cell (e.g., a tumor cell) through interactions with antigens (e.g., tumor-specific antigens) expressed at the surface of the cell (e.g., tumor cell). Tumor-specific antigens have been extensively described in the prior art

20
19

for a variety of tumors, including, for example, epithelial cancers (e.g., MUC1), and breast and ovarian cancer (e.g., HER2/neu), (see, e.g., Bartnes, *Tidsskr. Nor. Lægeforen.*, 121, 2941-5 (2001), and von Mensdorff-Pouilly et al., *Int. J. Biol. Markers*, 15, 343-356 (2000)).

[0043] In a preferred embodiment of the invention, the antibody (e.g., huMy9-6) binds to the CD33 antigen, which is expressed, for example, by acute myeloid leukemia cells. In another preferred embodiment, the antibody (e.g., huB4) binds to the CD19 antigen, which is expressed, for example, by human B-cell lymphoma cells. Alternatively, the antibody (e.g., huC242) binds to the CanAg antigen, which is expressed by a number of cancer cell types, including, for example, colorectal, pancreatic, gastric, and other gastrointestinal cancers, and the majority of non-small-cell lung cancers. Most preferably, the antibody (e.g., huN901) binds to the NCAM/CD56 antigen, which is expressed, for example, by small cell lung carcinoma (SCLC) cells, and by other cancers of neuroendocrine origin. Other preferred antigens to which the antibody can bind include the GD₃ antigen, PSMA, the alpha-folate receptor, Her2/neu, CD44v6, the fetal acinar pancreatic (FAP) antigen, the Cripto-1 antigen, the CA6 antigen, CD20, CA 55.1, MN/CA IX, and chondroitin sulfate proteoglycan (see, e.g., Chang et al., *Cancer Res.*, 59, 3192-98 (1999), Miotti et al., *Int. J. Cancer*, 39, 297-303, (1987), Colomer et al., *supra*, Heider et al., *supra*, Welt et al., *supra*, LePage et al., *American Assn. For Cancer Research (AACR), 2003 Annual Meeting*, Poster Abstract No. 749, Kearse et al., *Int. J. Cancer*, 88, 866-72 (2000), Maloney et al., *supra*, Opravsky et al., *Genomics*, 33, 480-87 (1996), Behm et al., *Blood*, 87, 1134-39 (1996), and U.S. Patent 5,665,357). Upon binding of the conjugate to a target (i.e., tumor) cell via any of the tumor specific antigens or receptors described herein, the cytotoxicity of the maytansinoid is activated. Examples of mechanisms by which maytansinoid cytotoxicity can be activated include release of the free maytansinoid inside the cell via cleavage of the disulfide linkage between the antibody and the maytansinoid, antibody degradation within the cell, and activation of maytansinoid cytotoxicity at the cell surface. The inventive method, however, is not limited to these exemplary modes of maytansinoid activation. Indeed, any mechanism that activates the cytotoxicity of the maytansinoid is within the scope of the inventive method.

[0044] For the purposes of human administration, the inventive liquid composition described herein may be administered (e.g., infused) directly to a human, or diluted with a suitable diluent immediately prior to administration. Suitable diluents are known in the art and include D5W and normal saline (NS). Dilutions of 1:1, 1:2, 1:3, or more (e.g., 1:5, 1:10, or even 1:50) with suitable diluents are possible. Dilution of the inventive composition desirably does not reduce the concentration of the conjugate molecule in the composition below about 0.1 mg/mL. Upon diluting the inventive liquid composition, the

2021

previously described concentrations of each of the components (e.g., buffering agent, surfactant, and sodium chloride) of the composition are correspondingly reduced.

[0045] When the inventive lyophilized composition described herein is administered to a human, the composition must be first reconstituted by adding a sterile liquid excipient, for example, water suitable for injection, D5W, or NS, immediately prior to use. Thus, the invention further provides a method for killing a cell in a human comprising (a) providing the lyophilized composition as described herein, (b) adding water to the lyophilized composition to provide a reconstituted composition, and (c) administering the reconstituted composition to the human such that the antibody binds to the surface of the cell and the maytansinoid is internalized by the cell, whereby the cell is killed. Descriptions of the lyophilized composition, administration routes, tumor specific antigens, and components thereof, set forth above in connection with other embodiments of the invention also are applicable to those same aspects of the aforesaid inventive method. Moreover, as discussed herein, after the inventive lyophilized composition is reconstituted with water, the descriptions of the relative concentrations of the conjugate and excipients (e.g., buffering agent, surfactant, cryoprotectant, and bulking agent) described above in connection with the inventive liquid composition also are applicable to those same aspects of the aforesaid inventive method.

[0046] As discussed herein, the inventive method, whether employing a liquid composition or a lyophilized composition, preferably is used in connection with treating cancer. The inventive method can be used to treat cancer of any type, including, for example, cancer of the lung, breast, colon, prostate, kidney, pancreas, ovary, blood, and lymphatic organs. While less preferred, the inventive composition may be used to treat other diseases associated with cellular proliferation including autoimmune diseases (e.g., systemic lupus, rheumatoid arthritis, and multiple sclerosis), graft rejections (e.g., renal transplant rejection, liver transplant rejection, lung transplant rejection, cardiac transplant rejection, and bone marrow transplant rejection), graft versus host disease, viral infections (e.g., CMV infection, HIV infection, AIDS, etc.), and parasitic infections (e.g., giardiasis, amoebiasis, schistosomiasis), and others.

[0047] The following examples further illustrate the invention but, of course, should not be construed as in any way limiting its scope.

EXAMPLE 1

[0048] This example demonstrates the production of a composition comprising a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, buffering agent, surfactant, tonicifying amount of sodium chloride, and water.

21 22

[0049] The generation of a conjugate comprising the huN901 monoclonal antibody chemically coupled to the maytansinoid DM1 via disulfide bonds ("huN901:DM1") has been previously described (see, e.g., U.S. Patent 6,441,163). Formulations containing either 1 mg/mL or 5 mg/mL of the huN901:DM1 conjugate in the presence of each of the above-described excipients individually were prepared. The stability of each of the formulations was assessed using the following assays: visual inspection to detect particulates, a chromatographic method to measure free drug-related species, and HPLC size exclusion chromatography (SEC-HPLC) to detect high and low molecular weight conjugate-related species. With respect to visual inspection, the presence of particulates are indicative of instability and, therefore, are considered undesirable, while a clear solution is indicative of a stable formulation. The chromatographic assay was used to measure the amount of free drug at 4 °C and 25 °C. The results of each of these assays suggested that a formulation containing about 5 mg/mL huN901:DM1 conjugate, about 10 mM sodium citrate, about 0.01% polysorbate and sodium chloride at pH 5.5 (i.e., the inventive liquid composition) would have superior stability.

[0050] To confirm the stability of the above-described formulation with respect to dimer formation, which also is an indicator of instability, the huN901:DM1 conjugate was concentrated and formulated in either phosphate buffered saline (PBS), pH 6.5 (Formulations 1A-1C), or 10 mM sodium citrate, 0.01% polysorbate 20, 60 mM NaCl, pH 5.5 (Formulation 1D). After 6 months at 4 °C or 25 °C the samples were assayed by SEC-HPLC. The results of this analysis are set forth in Table 1.

Table 1

Formulation	Conjugate Concentration (mg/mL)	Buffering Agent	Surfactant	NaCl	% Conjugate Dimer after 6 months at	
					4 °C	25 °C
1A (comparative)	5.0	PBS, pH 6.5	None	None	5.5	9.3
1B (comparative)	3.8	PBS, pH 6.5	None	None	5.5	8.4
1C (comparative)	1.2	PBS, pH 6.5	None	None	4.9	6.0
1D (invention)	5.0	Sodium citrate, pH 5.5	0.01% polysorbate 20	60 mM	5.1	6.0

[0051] These results demonstrate that compositions of the invention (as represented by Formulation 1D) protected against formation of conjugate dimer. Thus, the combined results of the visual inspection assay, the chromatographic assay, and the SEC-HPLC assay indicate that the inventive composition was the most stable of the tested formulations.

22 23

EXAMPLE 2

[0052] This example demonstrates the production of a composition comprising a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, buffering agent, surfactant or sucrose, tonifying amount of sodium chloride, and water

[0053] A conjugate comprising the huN901 monoclonal antibody chemically coupled to the maytansinoid DM1 via an N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP) linker ("huN901-SPP-DM1") was prepared using methods described herein and known in the art (see, e.g., U.S. Patent 6,441,163). The huN901-SPP-DM1 conjugate was formulated in either (a) PBS, pH 6.5 (Formulations 2A and 2B) or (b) 10 mM sodium citrate, 0.01% polysorbate 20, 135 mM NaCl, pH 5.5 (Formulation 2C) at varying concentrations. Samples of each of the formulations were incubated at 4 °C and 25 °C for 6 months, after which the formulations were tested for the presence of free drug and conjugate dimers by chromatographic assays. The results of these analyses are set forth in Table 2.

Table 2

Formulation	Conjugate Concentration (mg/mL)	Buffering Agent	Surfactant	% Dimer			% Free Drug		
				Time Zero	6 months		Time Zero	6 months	
					4 °C	25 °C		4 °C	25 °C
2A (Comparative)	10	PBS, pH 6.5	None	4.8	5.8	6.1	1.1	1.6	4.6
2B (Comparative)	50	PBS, pH 6.5	None	5.2	8.5	10.1	1.1	1.6	4.9
2C (Invention)	50	Sodium citrate, pH 5.5	0.01% polysorbate	4.4	5.5	6.4	0.4	1.2	2.9

W/O 2004/110498

20

PCT/US2004/015376

22

25
24

[0054] In addition to the results recited in Table 2, the formulations were visually inspected for particulates. The inventive formulation (Formulation 2C) was visually clear after 6 months' storage at 4 °C, while particulates and sediments were observed in the comparative formulations (as represented by formulations 2A and 2B).

[0055] These results demonstrate the enhanced stability of compositions of the invention.

EXAMPLE 3

[0056] This example demonstrates the production of a composition comprising a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, buffering agent, surfactant, tonicifying amount of sodium chloride, an antioxidant, and water.

[0057] A conjugate comprising the huN901 monoclonal antibody chemically coupled to the maytansinoid DM1 via an N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) linker ("huN901-SMCC-DM1") was prepared using methods described herein and known in the art (see, e.g., U.S. Patent 6,441,163). 1 mg/mL huN901-SMCC-DM1 conjugate was formulated in either (a) phosphate buffered saline (PBS), pH 6.5 (Formulation 3A), (b) 10 mM sodium citrate, 0.01% polysorbate 20, 130 mM NaCl, pH 5.5 (Formulation 3B), or (c) 10 mM sodium citrate, 0.01% polysorbate 20, 130 mM NaCl, 10 mM methionine, pH 5.5 (Formulation 3C). After a 3.5-month incubation at 25 °C and 37 °C, samples of each of the formulations were tested for the presence of conjugate dimers by a chromatographic assay. The results of this analysis are set forth in Table 3.

Table 3

Formulation	Buffering Agent	Surfactant	Antioxidant	% Dimer		
				Time Zero	3.5-months	
					25 °C	37 °C
3A (comparative)	PBS, pH 6.5	None	None	4.0	5.8	11.2
3B (invention)	Sodium citrate, pH 5.5	0.01% polysorbate 20	None	4.0	4.7	6.3
3C (invention)	Sodium citrate, pH 5.5	0.01% polysorbate 20	10 mM methionine	4.0	4.4	4.8

[0058] These results demonstrate that compositions of the invention (as represented by Formulations 3B and 3C) provide enhanced stability.

EXAMPLE 4

[0059] This example demonstrates the production of a composition comprising a conjugate comprising the monoclonal antibody huMy9-6 chemically coupled to the myxamethinoid DM1, buffering agent, tonicity agent, sodium chloride, and water, with or without a surfactant and sucrose.

[0060] A conjugate comprising the huMy9-6 monoclonal antibody chemically coupled to the myxamethinoid DM1 via an N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP) linker ("huMy9-6-SPP-DM1") was prepared using methods described herein and known in the art (see, e.g., U.S. Patent 6,441,163). 1 mg/mL of the huMy9-6-SPP-DM1 conjugate was formulated in either (a) phosphate buffered saline (PBS), pH 6.5 (Formulation 4A), (b) 10 mM sodium citrate, 135 mM NaCl, pH 5.5 (Formulation 4B), (c) 10 mM sodium citrate, 0.01% polysorbate 20, 135 mM NaCl, pH 5.5 (Formulation 4C), or (d) 10 mM sodium citrate, 5% sucrose, 60 mM NaCl, pH 5.5 (Formulation 4D). After a three-month incubation at 4 °C or 25 °C, samples of each of the formulations were assayed by SEC-HPLC to measure high molecular weight (HMW) species, and by a chromatographic assay to measure free drug species. The results of this analysis are set forth in Table 4.

Table 4

Formulation	Buffering Agent	NaCl (mM)	Surfactant	Stabilizer	% Free Drug			% HMW Species		
					Time Zero	3 months		Time Zero	3 months	
						4° C	25° C		4° C	25° C
4A (comparative)	PBS, pH 6.5	None	None	None	0.2	1.3	3.2	0.5	1.4	2.0
4B (invention)	Sodium citrate, pH 5.5	135	None	None	0.1	1.0	1.8	0.4	0.7	1.4
4C (invention)	Sodium citrate, pH 5.5	135	0.01% polysorbate 20	None	0.1	1.0	1.8	0.5	0.8	1.8
4D (invention)	Sodium citrate, pH 5.5	60	None	5% sucrose	0.1	1.1	1.9	0.4	0.5	0.8

23

28
27

[0061] In addition, samples of Formulations 4A and 4B were incubated at 4° C and 25° C for three months, and then tested for conjugate dimer formation as discussed above. The results of this analysis are set forth in Table 5.

Table 5

Formulation	Buffering Agent	% Dimer		
		Time Zero	3 months	
			4° C	25° C
4A (comparative)	PBS, pH 6.5	6.3	10.8	12.3
4B (invention)	Sodium citrate, pH 5.5	5.7	7.0	7.7

[0062] These results demonstrate that compositions of the invention (as represented by Formulations 4B, 4C, and 4D) provide enhanced stability, and that sucrose adds additional stabilizing benefits.

EXAMPLE 5

[0063] This example demonstrates the production of a composition comprising a conjugate comprising the monoclonal antibody huMy9-6 chemically coupled to the maytansinoid DM4, buffering agent, tonicifying amount of sodium chloride, and water, with or without a surfactant.

[0064] A conjugate comprising the huMy9-6 monoclonal antibody chemically coupled to the maytansinoid DM4 via an N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate (SPDB) linker ("huMy9-6-SPDB-DM4") was prepared using methods described herein and known in the art (see, e.g., U.S. Patent 6,441,163). 1 mg/mL of the huMy9-6-SPDB-DM4 conjugate was formulated in either (a) phosphate buffered saline (PBS), pH 6.5, (b) 10 mM sodium citrate, 135 mM NaCl, pH 5.5, or (c) 10 mM sodium citrate, 0.01% polysorbate 20, 135 mM NaCl, pH 5.5. To confirm the stability of the above-described formulations, samples of each of the formulations were tested for the presence of particles using a HIAC particle counter after a six-month incubation at -80 °C. Samples of each of the formulations also were tested for the presence of free drug species as described above after a six-month incubation at 4 °C or 25 °C. The results of these analyses are set forth in Table 6.

2829

Table 6

Formulation	Buffering Agent	Surfactant	NaCl mM	>5µm Particles after 6 months at -80 °C	% Free Drug after 6 months	
					4 °C	25 °C
5A (comparative)	PBS, pH 6.5	None	None	21218	1.6	5.0
5B (invention)	Sodium citrate, pH 5.5	None	135	8778	1.2	2.5
5C (invention)	Sodium citrate, pH 5.5	0.01% polysorbate 20	135	776	1.1	2.8

[0065] These results demonstrate that the compositions of the invention (as represented by Formulations 5B and 5C) protected against the formation of free drug species and particulates, and that the presence of polysorbate added additional stability protection against particle formation.

EXAMPLE 6

[0066] This example demonstrates the production of a lyophilized composition comprising a conjugate comprising the monoclonal antibody huN901 chemically coupled to the maytansinoid DM1.

[0067] The generation of a conjugate comprising the huN901 human monoclonal antibody chemically coupled to the maytansinoid DM1 via disulfide bonds ("huN901:DM1") has been previously described (see, e.g., U.S. Patent 6,441,163). Four formulations, designated Formulations 6A-6D, were prepared. Each formulation contained (a) 1 mg/mL huN901-DM1, (b) either 10 mM sodium citrate or 10 mM sodium succinate, (c) 0.5 % wt./vol. sucrose, (d) 250 mM glycine, and (e) water, with or without 0.01% wt./vol. polysorbate 20, at a pH of 5.5, as set forth in Table 7.

Table 7

Formulation	Buffering Agent	Surfactant	Cryoprotectant	Bulking Agent
6A (comparative)	sodium citrate	none	sucrose	glycine
6B (comparative)	sodium citrate	polysorbate 20	sucrose	glycine
6C (comparative)	sodium succinate	none	sucrose	glycine
6D (invention)	sodium succinate	polysorbate 20	sucrose	glycine

29 30

[0068] 1 mL samples of each of the Formulations 6A-6D were lyophilized in 1 mL vials according to the lyophilization scheme recited in Table 8.

Table 8

Lyophilization Step	Shelf Temp (°C)	Chamber Pressure (mTorr)	Step Duration (hours)
Pre-cool	4	Ambient	2.5
Freeze	-50	Ambient	14
Glycine recrystallization	-20	Ambient	6
Re-freeze	-50	Ambient	16
Primary dry	-13	100	24
Secondary dry	24	100	10
Stopper	24	Ambient	-

[0069] After lyophilization, samples of each of Formulations 6A-6D displayed solid, uniform white cakes, and samples of all formulations resuspended rapidly (i.e., less than 20 seconds for complete dissolution) when reconstituted in distilled water. The reconstituted samples were analyzed for visual appearance and high molecular weight species by HPLC size exclusion chromatography (SEC-HPLC). The presence of particulates and/or a high molecular weight species are indicative of instability and, therefore, are considered undesirable, while a clear solution is indicative of a stable formulation. The results of this analysis are set forth in Table 9.

Table 9

Formulation	Post-reconstitution	
	Appearance	High Molecular Weight (%)
6A (comparative)	Opalescent, particles	0.3
6B (comparative)	Particles	0
6C (comparative)	Clear, no particulates	0.39
6D (invention)	Clear, no particulates	0.05

[0070] Based on these results, the lyophilized composition of the invention (i.e., Formulation 6D) was the only composition that effectively prevented the formation of particulates and high molecular weight species upon lyophilization. The inventive lyophilized composition was the most stable of the tested formulations.

30 31

EXAMPLE 7

[0071] This example demonstrates the stability of a lyophilized composition comprising a conjugate comprising the monoclonal antibody huN901 chemically coupled to the maytansinoid DM1.

[0072] A conjugate comprising the huN901 monoclonal antibody chemically coupled to the maytansinoid DM1 via an N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP) linker ("huN901-SPP-DM1") was prepared as described herein. 5 mg/mL of the huN901-SPP-DM1 conjugate was formulated in either (a) PBS, pH 6.5 and stored as a liquid or (b) 10 mM sodium succinate, 0.5% sucrose, 0.01% polysorbate 20, 250 mM glycine, pH 5.5, and lyophilized as described in Example 6. Samples were incubated at 4 °C and 25 °C for 6 months, after which they were tested for the presence of particles, conjugate dimers, and free drug species as described herein. The results of these analyses are set forth in Table 10.

Table 10

Formulation	Appearance			Particles ($>5\text{ }\mu\text{m}$)	% Dimer			% Free Drug			
	Time 0	6 month			Time Zero	6 months		Time Zero	6 months		
		4°C	25°C			25°C	4°C		25°C	4°C	25°C
7A liquid (Comparative)	clear	particulates and sediments	clear	1122	5.2	8.5	10.1	1.1	1.6	4.9	
7B lyophilized (Invention)	White solid cake; 20-sec reconstitution time, clear solution, no particulate	White solid cake; 19-sec reconstitution time, clear solution, no particulate	White solid cake; 15-sec reconstitution time, clear solution, no particulate	24	3.8	4.1	4.6	0.6	0.6	0.9	

WFO 2004/110498

28

PCT/US2004/013376

32

[0073] These results demonstrate the stability of the inventive lyophilized composition, as evidenced by the reduction in particles, conjugate dimer, and free drug as compared to the liquid compositions formulated in PBS.

[0074] All references, including publications, patent applications, and patents, cited herein are hereby incorporated by reference to the same extent as if each reference were individually and specifically indicated to be incorporated by reference and were set forth in its entirety herein.

[0075] The use of the terms "a" and "an" and "the" and similar referents in the context of describing the invention (especially in the context of the following claims) are to be construed to cover both the singular and the plural, unless otherwise indicated herein or clearly contradicted by context. The terms "comprising," "having," "including," and "containing" are to be construed as open-ended terms (i.e., meaning "including, but not limited to,") unless otherwise noted. Recitation of ranges of values herein are merely intended to serve as a shorthand method of referring individually to each separate value falling within the range, unless otherwise indicated herein, and each separate value is incorporated into the specification as if it were individually recited herein. All methods described herein can be performed in any suitable order unless otherwise indicated herein or otherwise clearly contradicted by context. The use of any and all examples, or exemplary language (e.g., "such as") provided herein, is intended merely to better illuminate the invention and does not pose a limitation on the scope of the invention unless otherwise claimed. No language in the specification should be construed as indicating any non-claimed element as essential to the practice of the invention.

[0076] Preferred embodiments of this invention are described herein, including the best mode known to the inventors for carrying out the invention. Variations of those preferred embodiments may become apparent to those of ordinary skill in the art upon reading the foregoing description. The inventors expect skilled artisans to employ such variations as appropriate, and the inventors intend for the invention to be practiced otherwise than as specifically described herein. Accordingly, this invention includes all modifications and equivalents of the subject matter recited in the claims appended hereto as permitted by applicable law. Moreover, any combination of the above-described elements in all possible variations thereof is encompassed by the invention unless otherwise indicated herein or otherwise clearly contradicted by context.

33 34

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent, (iii) a surfactant, (iv) a tonicifying amount of sodium chloride, and (v) water, wherein the composition has a pH of about 5-6.
2. The composition of claim 1, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 0.1 mg/mL to about 5 mg/mL.
3. The composition of claim 2, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 1 mg/mL or more.
4. The composition of claim 2, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 5 mg/mL.
5. The composition of any of claims 1-4, wherein the buffering agent is selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, a phosphate buffer, and a histidine buffer.
6. The composition of claim 5, wherein the concentration of the buffering agent in the composition is about 2 mM to about 50 mM.
7. The composition of claim 6, wherein the composition comprises a sodium citrate buffer at a concentration of about 10 mM and the pH of the composition is about 5.5.
8. The composition of any of claims 1-7, wherein the surfactant is polysorbate 20 or polysorbate 80.
9. The composition of claim 8, wherein the concentration of the surfactant in the composition is about 0.002% to about 0.1% of the total volume of the composition.
10. The composition of claim 9, wherein the surfactant is polysorbate 20.
11. The composition of claim 10, wherein the concentration of polysorbate 20 in the composition is about 0.01% of the total volume of the composition.

35
34

12. The composition of any of claims 1-11, wherein the concentration of sodium chloride in the composition is about 50 mM to about 500 mM.

13. The composition of claim 12, wherein the concentration of sodium chloride in the composition is about 100 mM to about 200 mM.

14. The composition of claim 13, wherein the concentration of sodium chloride in the composition is about 120 mM.

15. The composition of claim 1, wherein the composition comprises (i) about 5 µg/mL of a conjugate comprising huN901 chemically coupled to DM1, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 120 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH of the composition is about 5.5.

16. The composition of claim 1, wherein the composition comprises (i) about 1 mg/mL or more of a conjugate comprising huMy9-6 chemically coupled to DM1, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 135 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH of the composition is about 5.5.

17. The composition of claim 1, wherein the composition comprises (i) about 1 mg/mL or more of a conjugate comprising huMy9-6 chemically coupled to DM4, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 135 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH of the composition is about 5.5.

18. The composition of any of claims 1-17, wherein the composition further comprises an antioxidant.

19. The composition of claim 18, wherein the concentration of the antioxidant in the composition is about 100 µM to about 100 mM.

20. The composition of claim 19, wherein the antioxidant is selected from the group consisting of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, tocotrienols, polyphenols, zinc, manganese, selenium, vitamin C, vitamin E, beta carotene, cysteine, and methionine.

21. The composition of claim 20, wherein the antioxidant is methionine.
22. The composition of claim 21, wherein the concentration of methionine in the composition is about 10 mM.
23. The composition of any of claims 1-22, wherein the composition comprises sucrose.
24. The composition of claim 23, wherein the concentration of sucrose in the composition is about 0.1% to about 10% of the total volume of the composition.
25. The composition of claim 24, wherein the concentration of sucrose in the composition is about 5% of the total volume of the composition.
26. A packaged composition comprising a sealed container and dispersed therein the composition of any of claims 1-26 and an inert gas overlay.
27. The packaged composition of claim 26, wherein the inert gas is nitrogen or argon.
28. A method for killing a cell in a human comprising administering to the human a composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent, (iii) a surfactant, (iv) a tonicifying amount of sodium chloride, and (v) water, wherein the composition has a pH of about 5-6, such that the antibody binds to the surface of the cell and the cytotoxicity of the maytansinoid is activated, whereby the cell is killed.
29. The method of claim 28, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 0.1 mg/mL to about 5 mg/mL.
30. The method of claim 29, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 1 mg/mL or more.
31. The method of claim 29, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 5 mg/mL.

36 37

32. The method of any of claims 28-31, wherein the surfactant is polysorbate 20 or polysorbate 80.

33. The method of claim 29, wherein the surfactant is polysorbate 20.

34. The method of any of claims 28-33, wherein the composition further comprises an antioxidant.

35. The method of claim 34, wherein the antioxidant is selected from the group consisting of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, tocotrienols, polyphenols, zinc, manganese, selenium, vitamin C, vitamin E, beta carotene, cysteine, and methionine.

36. The method of claim 35, wherein the antioxidant is methionine.

37. The method of any of claims 28-36, wherein the composition comprises sucrose.

38. A lyophilized composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent, (iii) a surfactant, (iv) a cryoprotectant, and (v) a bulking agent, wherein the composition has a pH of about 5-6 when reconstituted with water.

39. The composition of any of claims 1-14 or claim 38, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

40. The composition of claim 39, wherein the antibody is a humanized monoclonal antibody.

41. The composition of claim 39, wherein the antibody is selected from the group consisting of huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, and rituximab.

42. The composition of any of claims 1-14 or claims 38-41, wherein the maytansinoid comprises a thiol group.

43. The composition of claim 42, wherein the maytansinoid is DM1.

38
39

44. The composition of claim 42, wherein the maytansinoid is DM4.
45. The composition of any of claims 1-14 or 38-44, wherein the antibody is chemically coupled to the maytansinoid via chemical bonds selected from the group consisting of disulfide bonds, acid labile bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds, thioether bonds, and esterase labile bonds.
46. The composition of claim any of claims 38-45, wherein the buffering agent is selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, a phosphate buffer, and a histidine buffer.
47. The composition of claim 46, wherein the composition comprises about 0.1 mg to about 2 mg of the buffering agent per mg of the conjugate.
48. The composition of claim 47, wherein the composition comprises about 0.3 mg sodium succinate buffer per mg of the conjugate.
49. The composition of any of claims 38-48, wherein the surfactant is polysorbate 20 or polysorbate 80.
50. The composition of claim 49, wherein the composition comprises about 0.005 mg to about 0.1 mg of the surfactant per mg of the conjugate.
51. The composition of claim 50, wherein the surfactant is polysorbate 20.
52. The composition of claim 51, wherein the composition comprises about 0.02 mg polysorbate 20 per mg of the conjugate.
53. The composition of any of claims 38-52, wherein the composition comprises about 0.5 mg to about 5 mg of the cryoprotectant per mg of the conjugate.
54. The composition of claim 53, wherein the cryoprotectant is sucrose.
55. The composition of claim 54, wherein the composition comprises about 1 mg sucrose per mg of the conjugate.

39
38

56. The composition of any of claims 38-55, wherein the composition comprises about 2 mg to about 20 mg of the bulking agent per mg of the conjugate.

57. The composition of claim 56, wherein the bulking agent is glycine.

58. The composition of claim 57, wherein the composition comprises about 3.8 mg glycine per mg of the conjugate.

59. The composition of claim 38, wherein the composition comprises (i) a conjugate comprising huN901 chemically coupled to DM1, (ii) about 0.3 mg sodium succinate buffer per mg of the conjugate, (iii) about 0.02 mg polysorbate 20 per mg of the conjugate, (iv) about 1 mg sucrose per mg of the conjugate, and (v) about 3.8 mg glycine per mg of the conjugate.

60. A method for killing a cell in a human comprising (a) providing the lyophilized composition of any of claims 38-59, (b) adding water to the lyophilized composition to provide a reconstituted composition, and (c) administering the reconstituted composition to the human such that the antibody binds to the surface of the cell and the cytotoxicity of the maytansinoid is activated, whereby the cell is killed.

61. The method of any of claims 28-37 or claim 60, wherein the cell is a tumor cell.

62. The method of any of claims 28-37 or claims 60-61, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

63. The method of claim 62, wherein the antibody is a humanized monoclonal antibody.

64. The method of claim 62, wherein the antibody is selected from the group consisting of huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, and rituximab.

65. The method of any of claims 28-37 or any of claims 60-64, wherein the maytansinoid comprises a thiol group.

40
39

66. The method of claim 65, wherein the maytansinoid is DM1.
67. The method of claim 65, wherein the maytansinoid is DM4.
68. The method of any of claims 28-37 or claims 60-67, wherein the antibody is chemically coupled to the maytansinoid via chemical bonds selected from the group consisting of disulfide bonds, acid labile bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds, thioether bonds, and esterase labile bonds.
69. The method of any of claims 28-37 or any of claims 60-68, wherein the antibody binds to an antigen present on the surface of the cell
70. The method of claim 69, wherein the antigen is selected from the group consisting of NCAM/CD56, CD33, CD19, GD3, CanAg, PSMA, alpha-folate receptor, Her2/neu, CD44v6, fetoacinar pancreatic (FAP) antigen, Cripto-1, CA6, CD20, CA55.1, MN/CA IX, and chondroitin sulfate proteoglycan.
71. The method of any of claims 60-70, wherein the concentration of the conjugate in the reconstituted composition is about 0.1 mg/mL to about 5 mg/mL.
72. The method of claim 71, wherein the concentration of the conjugate in the reconstituted composition is about 1 mg/mL or more.
73. The method of claim 71, wherein the concentration of the conjugate in the reconstituted composition is about 5 mg/mL.
74. The method of any of claims 60-73, wherein the buffering agent is selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, a phosphate buffer, and a histidine buffer.
75. The method of claim 74, wherein the concentration of the buffering agent in the reconstituted composition is about 2 mM to about 50 mM.

41
40

76. The method of claim 75, wherein the reconstituted composition comprises a sodium succinate buffer at a concentration of about 10 mM and the pH of the reconstituted composition is about 5.5.

77. The method of any of claims 60-76, wherein the surfactant is polysorbate 20 or polysorbate 80.

78. The method of claim 77, wherein the concentration of the surfactant in the reconstituted composition is about 0.002% to about 0.1% of the total volume of the reconstituted composition.

79. The method of claim 78, wherein the surfactant is polysorbate 20.

80. The method of claim 79, wherein the concentration of polysorbate 20 in the reconstituted composition is about 0.01% of the total volume of the reconstituted composition.

81. The method of any of claims 60-80, wherein the concentration of the cryoprotectant in the reconstituted composition is about 0.1% to about 3% of the total volume of the reconstituted composition.

82. The method of claim 81, wherein the cryoprotectant is sucrose.

83. The method of claim 82, wherein the concentration of sucrose in the reconstituted composition is about 0.5% of the total volume of the reconstituted composition.

84. The method of any of claims 60-83, wherein the concentration of the bulking agent in the reconstituted composition is about 50 mM to about 500 mM.

85. The method of claim 84, wherein the bulking agent is glycine.

86. The method of claim 85, wherein the concentration of glycine in the reconstituted composition is about 250 mM.

42
41

87. The method of any of claims 28-37 or claims 60-86, wherein the composition is administered to the human intravenously, intraperitoneally, or intratumorally.

88. A composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent, (iii) a tonicifying amount of sodium chloride, and (iv) water, wherein the composition has a pH of about 5-6.

89. A method for killing a cell in a human comprising administering to the human a composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent, (iii) a tonicifying amount of sodium chloride, and (iv) water, wherein the composition has a pH of about 5-6, such that the antibody binds to the surface of the cell and the cytotoxicity of the maytansinoid is activated, whereby the cell is killed.

90. A lyophilized composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent, (iii) a cryoprotectant, and (iv) a bulking agent, wherein the composition has a pH of about 5-6 when reconstituted with water.

2
43

42

COMPOSICIÓN DE FARMACO CONJUGADO

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención pertenece a un conjugado que
5 comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un
maytansinoide, y a métodos para usarlo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El tratamiento de cáncer ha progresado
10 significativamente con el desarrollo de fármacos que
pueden eficientemente considerarlo como objetivo y matar
a células cancerosas. Para este fin, los investigadores
han tomado ventaja de receptores de superficie celular y
a la selectividad antigénica expresada por células
15 cancerosas para desarrollar fármacos basados en
anticuerpos que enlazan a antígenos específicos de tumor
o asociados a tumor. A este respecto, moléculas
citotóxicas tales como bacterias y toxinas vegetales,
radionuclidos, y ciertos fármacos quimioterapéuticos se
20 han unido químicamente a anticuerpos monoclonales que
enlazan a antígenos de superficie celular asociados a
tumor o específicos de tumor (ver, por ejemplo, las
Solicitudes de Patentes Internacionales (PCT) Nos. WO
00/02587, WO 02/060995, y WO 02/092127, las Patentes U.S.
25 5,475,092, 6,340,701, 6,171,586, La Publicación de

44

43

Solicitud de Patente U.S. No. 2003/000421 A1, y Ghetie y colaboradores, *J. Immunol. Methods*, 112, 267-277 (1988)). Dichos compuestos son mencionados típicamente como toxinas, radionuclidos, y fármacos "conjugados",
5 respectivamente. A menudo también son mencionados como inmunoconjugados, radioinmunoconjugados e inmunotoxinas. La destrucción de células tumorales tiene lugar a partir del enlace del fármaco conjugado a una célula tumoral y de la activación de la actividad citotóxica del
10 maytansinoide. La selectividad producida por fármacos conjugados minimiza la toxicidad hacia células normales, mejorando así la tolerancia del fármaco en el paciente.

A pesar de la selectividad del tumor producida por los fármacos conjugados, el uso de fármacos conjugados en
15 un contexto clínico está limitado por numerosos factores. A este respecto, formulaciones de fármacos conjugados están basadas típicamente en una formulación del anticuerpo conocida a partir de la cual es fabricado el fármaco conjugado, sin consideración para el efecto de la
20 molécula citotóxica conjugada pueda tener sobre la estabilidad del anticuerpo. Como tales las composiciones de fármacos conjugados actuales son menos estables que composiciones que contienen el anticuerpo específico de tumor solo.

45

44

Por consiguiente, en vista de lo anterior, persiste la necesidad por composiciones de fármacos conjugados que contengan fármacos muy citotóxicos que sean más estables que composiciones de fármacos conjugados disponibles
5 actualmente. Persiste también una necesidad por métodos de usar dichas composiciones de fármacos conjugados para tratar enfermedades humanas asociadas con la proliferación celular, tales como cáncer.

La invención proporciona una composición y un método
10 tales. Estas y otras ventajas de la invención, así como también aspectos de la invención adicionales, serán obvias de la descripción de la invención proporcionada en la presente.

15

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona una composición que comprende (i) una cantidad efectiva terapéuticamente de un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide, (ii) un agente
20 regulador, (iii) una cantidad tonificante de cloruro de sodio, (iv) agua, y opcionalmente (v) un surfactante, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5- 6. La invención también proporciona una composición liofilizada que comprende (i) una cantidad efectiva
25 terapéuticamente de un conjugado que comprende un

46
45

anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide, (ii) un agente regulador, (iii) un crioprotector, (iv) un agente para carga, y opcionalmente (v) un surfactante, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5- 6 cuando es reconstituido con agua. La invención proporciona adicionalmente un método para destruir una célula en un humano que comprende administrar al humano las composiciones descritas anteriormente de modo que el anticuerpo enlace a la superficie de la célula y la citotoxicidad del maytansinoide es activada, con lo cual la célula es destruida.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona una composición que comprende (i) una cantidad efectiva terapéuticamente de un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide, (ii) un agente regulador, (iii) opcionalmente un surfactante, (iv) una cantidad tonificante de cloruro de sodio, y (v) agua, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5 - 6.

La composición de la invención contiene un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide. El término "anticuerpo", como se usa en la presente, se refiere a cualquier inmunoglobulina,

42
46

cualquier fragmento de inmunoglobulina, tal como Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, di-cuerpos y tri-cuerpos, o inmunoglobulina quimera, los cuales pueden enlazar a un antígeno sobre la superficie de una célula (por ejemplo, 5 que contiene una región determinante de complementaridad (CDR)). Cualquier anticuerpo adecuado puede ser usado en la composición de la invención. Un experto en la materia apreciará que la selección de un anticuerpo adecuado dependerá de la población celular a ser considerada como 10 objetivo. A este respecto, el tipo y número de moléculas de superficie celular (es decir, antígenos) que sean expresadas selectivamente en una población celular particular (típica y preferiblemente una población celular enferma) dirigirá la selección de un anticuerpo 15 apropiado para uso en la composición de la invención. Los perfiles de expresión de superficie celular son conocidos por una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo tipos de células tumorales, o, si se desconoce puede ser determinada usando técnicas de biología molecular y de 20 histoquímica de rutina.

El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, pero es más preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Como se usa en la presente, anticuerpos "policlonales" se refieren a poblaciones de anticuerpos heterogéneas, 25 típicamente contenidas en el suero, típicamente

contenidas en el suero de animales inmunizados. Anticuerpos "monoclonales", se refiere a poblaciones homogéneas de moléculas de anticuerpos que son específicas para un antígeno particular. Los anticuerpos monoclonales son producidos típicamente por un clon único de linfocitos B ("células B"). Los anticuerpos monoclonales pueden ser obtenidos usando una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la materia, incluyendo la tecnología del hibridoma estándar (ver, por ejemplo, Köhler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), Harlow y Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), y C.A. Janeway y colaboradores (eds.), *Immunobiology*, 5a. Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). Resumiendo, el método del hibridoma de producir anticuerpos monoclonales involucra inyectar a cualquier animal adecuado, típica y preferiblemente un ratón, con un antígeno (es decir, un "inmunógeno"). El animal es subsecuentemente sacrificado, y células B aisladas de su bazo son fusionados con células de mieloma humano. Una célula híbrida es producida (es decir, un "hibridoma", la cual prolifera indefinidamente y secreta continuamente títulos altos con la especificidad deseada *in vitro*. Puede usarse cualquier método conocido apropiado en el arte para identificar células de hibridoma que producen un anticuerpo con la

especificidad deseada. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, el ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA), análisis por tinción Western, y radioinmunoensayo. La población de hibridomas es cribada para aislar clones
5 individuales, cada uno de los cuales secretan una especie de anticuerpo único para el antígeno. Porque cada hibridoma es un clon derivado de fusión con una célula B individual, todas las moléculas de anticuerpos producidas son idénticas en estructura, incluyendo su sitio de
10 enlace antigénico e isotipo. Los anticuerpos monoclonales pueden ser generados usando otras técnicas adecuadas que incluyan la tecnología de hibridoma-EBV (ver, por ejemplo, Haskard y Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2), 361-67 (1984), y Roder y colaboradores, *Methods Enzymol.*,
15 121, 140-67 (1986)), o sistemas de expresión en vector bacteriófago (ver, por ejemplo, Huse y colaboradores, *Science*, 246, 1275-81 (1989)). Para preparar fragmentos de anticuerpos monoclonales se emplean típicamente métodos recombinantes.

20 El anticuerpo monoclonal puede ser aislado de o producido de cualquier animal adecuado, pero es producido preferiblemente en un mamífero, más preferiblemente un ratón, y más preferiblemente un humano. Los métodos para producir un anticuerpo en ratones son bien conocidos por
25 los expertos en la materia y se describen en la presente.

Con respecto a anticuerpos humanos, un experto en la materia apreciará que anticuerpos monoclonales pueden ser aislados del suero de sujetos humanos vacunados o inmunizados con un antígeno apropiado. De manera
5 alternativa, los anticuerpos humanos pueden ser generados adaptando técnicas conocidas para producir anticuerpos humanos en animales o en humanos tales como ratones (ver, por ejemplo, Patentes U.S. 5,545,806, 5,569,825, y 5,714,352, y la Publicación de Solicitud de Patente No.
10 2002/0197266 A1).

Aunque la selección ideal es para aplicaciones terapéuticas en humanos, anticuerpos humanos, particularmente anticuerpos monoclonales humanos, típicamente son más difíciles de generar que anticuerpos
15 monoclonales de ratón. No obstante, anticuerpos monoclonales de ratón inducen una respuesta del anticuerpo huésped rápida cuando se administra a humanos, lo cual puede reducir el potencial de diagnóstico y terapéutico del anticuerpo-fármaco conjugado. Para
20 eliminar estas complicaciones, un anticuerpo monoclonal preferiblemente no es reconocido como "extraño" por el sistema inmune humano. Para este fin, puede usarse la exposición del fago para generar el anticuerpo. A este respecto, bibliotecas de fago que codifican a regiones
25 variables (V) de enlace de antígeno de anticuerpos pueden

ser generadas usando técnicas de biología molecular estándar y de DNA recombinante (ver, por ejemplo, Sambrook y colaboradores (eds.), *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3a. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). El fago que codifica a una región variable con la especificidad deseada es seleccionado para enlace específico al antígeno deseado, y es reconstituido un anticuerpo humano completo que comprende la región variable seleccionada. Secuencias de ácido nucleico que codifican al anticuerpo reconstituido son introducidas en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma usada para la producción de hibridoma, de modo que anticuerpos humanos que tienen las características de anticuerpos monoclonales son secretados por las células (ver, por ejemplo, Janeway y colaboradores, *supra*, Huse y colaboradores, *supra*, y Patente U.S. 6,265,150). De manera alternativa, pueden ser generados anticuerpos monoclonales a partir de ratones que son transgénicos para genes de inmunoglobulinas de cadenas ligera y pesada humanos específicos. Dichos métodos son conocidos en el arte y descritos en, por ejemplo las Patentes U.S. 5,545,806 y 5,569,825, y Janeway y colaboradores, *supra*. Más preferiblemente el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Como se usa en la presente, un anticuerpo

"humanizado" es uno en el cual las regiones determinantes de complementaridad (CDR) de un anticuerpo monoclonal de ratón, el cual forma el ciclo de enlace antigénico del anticuerpo, son injertados sobre la estructura principal de una molécula de anticuerpo humano. Debido a la similaridad de las estructuras de los anticuerpos de ratón y humanos, es aceptado de manera general en el arte que este procedimiento produce un anticuerpo monoclonal que sea idéntico antigénicamente a un anticuerpo humano pero enlaza al mismo antígeno que el anticuerpo monoclonal de ratón del cual se derivaron las secuencias de CDR. Métodos para generar anticuerpos humanizados son bien conocidas en el arte y se describen en detalle en, por ejemplo, Janeway y colaboradores, *supra*, Patentes U.S. 5,225,539, 5,585,089 y 5,693,761, Patente Europea No. 0239400 B1, y Patente de United Kingdom No. 2188638. Los anticuerpos humanizados pueden también ser generados usando la tecnología de renovación de las capas superficiales del anticuerpo descrita en la Patente U.S. 5,639,641 y Pederson y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 235, 959-973 (1994). Mientras el anticuerpo empleado en el conjugado de la composición de la invención debe de ser preferiblemente un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal de ratón, como se describió anteriormente, están también

en el alcance de la invención. Los fragmentos de anticuerpos que tienen al menos un sitio de enlace antigénico, y por consiguiente reconocen y enlazan a al menos un antígeno o receptor presente sobre la superficie de una célula objetivo, también están en el alcance de la invención. A este respecto, la fragmentación proteolítica de una molécula de anticuerpo intacta puede producir una variedad de fragmentos de anticuerpo que retienen la habilidad para reconocer y enlazar antígenos. Por ejemplo, la digestión limitada de una molécula de anticuerpo con la proteasa papaína produce típicamente tres fragmentos, dos de los cuales son idénticos y son mencionados como los fragmentos Fab, cuando retienen la actividad de enlace antigénico de la molécula de anticuerpo precursor. La fragmentación de una molécula de anticuerpo con la enzima pepsina normalmente produce dos fragmentos de anticuerpo, uno de los cuales retiene ambos brazos de enlace antigénico de la molécula de anticuerpo, y es por consiguiente mencionada como el fragmento $F(ab')_2$. Un fragmento de anticuerpo del fragmento de región variable de cadena única (sFv), que consiste de un fragmento Fab truncado que comprende la región variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo unida a una región V de una cadena ligera de anticuerpo vía un péptido sintético, puede ser generado usando técnicas de

tecnología de DNA recombinante de rutina (ver, por ejemplo, Janeway y colaboradores, *supra*). De manera similar, fragmentos de región variable estabilizadas por disulfuro (dsFv) pueden ser preparados por tecnología de DNA recombinante (ver, por ejemplo, Reiter y colaboradores, *Protein Engineering*, 7, 697-704 (1994)).

Los fragmentos de anticuerpo de la presente invención, no obstante, no se limitan a estos tipos de ejemplares de fragmentos de anticuerpos. Puede emplearse cualquier fragmento de anticuerpo adecuado que reconozca y enlace a un receptor o antígeno de superficie celular deseado. Puede ensayares el enlace antígeno-anticuerpo usando cualquier método conocido en el arte, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, Tinción Western, inmunoprecipitación, y ensayos por inhibición comparativa (ver, por ejemplo, Janeway y colaboradores, *supra*, y la Publicación de Solicitud de Patente No. 2002/0197266 A1).

Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico. Por "quimérico" se quiere decir que el anticuerpo comprende al menos dos inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, obtenidos o derivados de al menos dos especies diferentes (por ejemplo, dos inmunoglobulinas diferentes, una región constante de inmunoglobulina humana combinada con una región variable de inmunoglobulina de roedor).

SS
54

Puede usarse cualquier anticuerpo adecuado en la composición de la invención. Anticuerpos preferidos de manera particular son anticuerpos monoclonales humanizados, ejemplos de los cuales incluyen huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab (ver por ejemplo, la Patente U.S. 5,639, 641, Solicitud de Patente Provisional U.S. No. 60/424,332, Solicitud de Patente Internacional (PCT) No. WO 02/16401, Pedersen y colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 235, 959-973 (1994), Roguska y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 969-73 (1994), Liu y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8618-8623 (1996), Nadler y colaboradores, *J. Immunol.*, 131, 244-250 (1983), Colomer y colaboradores, *Cancer Invest.*, 19, 49-56 (2001), Heider y colaboradores, *Eur. J. Cancer*, 31^a, 2385-2391 (1995), Welt y colaboradores, *J. Clin. Oncol.*, 12, 1193-1203 (1994), Maloney y colaboradores, *Blood*, 90, 2188-2195 (1997), u la Patente U.S. 5,665, 357). Más preferiblemente, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal humanizado huN901 o el anticuerpo monoclonal humanizado huMy9-6. Otros anticuerpos monoclonales humanizados son conocidos en el arte y pueden ser usados en conexión con la composición de la invención.

De conformidad con la invención, el anticuerpo anteriormente descrito es acoplado químicamente a

cualquier agente citotóxico, particularmente a un agente citotóxico que induce citotoxicidad de células de tumor, para formar un conjugado como se describe anteriormente. Como un resultado de mecanismos de eliminación farmacológica normales, un anticuerpo empleado en un fármaco conjugado contacta y enlaza a células objetivo solamente en cantidades limitadas. Por consiguiente, el agente citotóxico empleado en el conjugado debe de ser muy tóxico de modo que tenga lugar suficiente destrucción celular par provocar un efecto terapéutico. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen nuevos taxanos (ver, por ejemplo, las Solicitudes de Patentes Internacionales (PCT) Nos. WO 01/38318 y PCT/ US 03/ 02675), agentes alquilantes de DNA (por ejemplo, CC-1065 análogos), antraciclinas, análogos de tubulisin, análogos de duocarmicina, auristatina E, y agentes citotóxicos que comprenden una porción polietilen glicol reactiva (ver, por ejemplo, Sasse y colaboradores, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 53, 879-85 (2000), Suzawa y colaboradores, *Bioorg. Med. Chem.* 8, 2175-84 (2000), Ichimura y colaboradores, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 44, 1045-53 (1991), Francisco y colaboradores, *Blood* (2003) (publicación electrónica previa a la publicación impresa), Patentes U.S. 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, y 6,436,931, Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2001/0036923 A1,

Solicitudes de Patentes U.S Pendientes Nos. 10/024,290 y 10/116,053, y Solicitud de Patente Internacional (PCT) No. WO 01/49698). De manera alternativa y más preferiblemente, el anticuerpo es acoplado químicamente a
5 un maytansinoide para formar el conjugado de la composición de la invención.

Los maytansinoides fueron aislados originalmente del arbusto de Africa del Este perteneciente al género *Maytenus*, pero posteriormente se descubrió también que
10 son metabolitos de bacterias del suelo, tal como *Actinosynnema pretiosum* (ver, por ejemplo, Patente U.S. 3,896,111). Los maytansinoides inducen citotoxicidad a través de inhibición micótica. La evidencia experimental sugiere que los maytansinoides inhiben la mitosis por
15 inhibición de la polimerización de la tubulina de la proteína del microtúbulo, previniendo así la formación de microtúbulos (ver el ejemplo, la Patente U.S. No. 6,441,163 y Remillard y colaboradores, *Science*, 189, 1002-1005 (1975)). Se ha mostrado que los maytansinoides
20 inhiben el crecimiento de células tumorales *in vitro* usando modelos de cultivo celular, e *in vivo* usando sistemas animales de laboratorio. Además, la citotoxicidad de maytansinoides es 1,000 veces mayor que la de los agentes quimioterapéuticos convencionales,
25 tales como, por ejemplo, metotrexate, daunorubicina, y

SS
87

vincristina (ver, por ejemplo, la Patente U.S. 5,208,020). Los maytansinoides son conocidos en el arte por incluir maytansina, maytansinol, ésteres de C-3 de maytansinol, y otros análogos y derivados de maytansinol

5 (ver, por ejemplo, las Patentes U.S. 5,208,020 y 6,441,163). Los C-3 ésteres de maytansinol pueden encontrarse de manera natural o derivados sintéticamente. Además, tanto los C-3 ésteres de maytansinol como se encuentran de manera natural como los sintéticos pueden

10 ser clasificados como un C-3 éster con ácidos carboxílicos simples, o un C-3 éster con derivados de N-metil-L-alanina, siendo éste más tóxico que el formador. Los análogos de maytansinoides sintéticos también son conocidos en el arte y se describen en , por ejemplo,

15 Kupchan y colaboradores, *J. Med. Chem.* 21, 31-37 (1978). Métodos para generar maytansinol y análogos y derivados del mismos se describen por ejemplo en la Patente U.S. 4,151,042.

Maytansinoides adecuados para uso en la composición

20 de la invención pueden ser aislados a partir de fuentes naturales, producidos sintéticamente, o producidos semi-sintéticamente usando métodos conocidos en el arte. Además, el maytansinoide puede ser modificado de cualquier manera adecuada, mientras que se conserve

25 suficiente toxicidad en la molécula conjugada final. A

este respecto, los maytansinoides carecen de grupos
funcionales adecuados a los cuales pueden unirse los
anticuerpos. Una porción de unión deseablemente es
utilizada para unir al maytansinoide al anticuerpo para
5 formar el conjugado. La porción de unión contiene un
enlace químico que permite la activación de la
citotoxicidad del maytansinoide en un sitio particular.
Los enlaces químicos adecuados son conocidos en el arte e
incluyen enlaces disulfuros, enlaces de ácidos lábiles,
10 enlaces fotolábiles, enlaces peptidasa lábiles, enlaces
tioéter formados entre grupos sulfhidrilo y maleinimida,
y enlaces estearasa lábiles. Más preferiblemente, la
porción de enlace comprende un enlace disulfuro o un
enlace tioéter. De conformidad con la invención, la
15 porción de enlace comprende preferiblemente un grupo
químico reactivo. Los grupos químicos reactivos
particularmente preferidos son ésteres de N-succinimidilo
y ésteres de N- sulfosuccinimidilo. En una modalidad
preferida, el grupo químico reactivo puede ser enlazado
20 covalentemente al maytansinoide vía enlace disulfuro
entre grupos tioles. Por consiguiente, un maytansinoide
modificado como se describe en la presente
preferiblemente comprende un grupo tiol. Un experto en la
materia apreciará que un grupo tiol contiene un átomo de
25 azufre enlazado a un átomo de hidrógeno y es también

60
5/9

mencionado en el arte como un grupo sulfhidrilo, el cual puede ser denotado como "-SH" o "RSH".

Los maytansinoides particularmente preferidos que comprenden una porción de unión que contiene un grupo químico reactivo son C-3 ésteres de maytansinol y sus
5 análogos en las que la porción de unión contiene un enlace disulfuro y el grupo químico reactivo comprende un N-succinimidil o N- sulfosuccinimidil éster. Muchas posiciones sobre los maytansinoides pueden servir como la
10 posición para enlazar químicamente a la porción de enlace. Por ejemplo, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxil y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxil son todos útiles. Más
15 preferiblemente el maytansinoide usado en conexión con la composición de la invención es N^{2'}- desacetil- N^{2'}- (3 mercapto- 1- oxopropil)- maytansina (DM1) o N^{2'}- desacetil- N^{2'}- (4- mercapto- 4- metil- 1- oxopentil- maytansina (DM4).

20 Las porciones de enlace con otros enlaces químicos también pueden ser usados en el contexto de la invención, como lo pueden ser otros maytansinoides. Ejemplos específicos de otros enlaces químicos incluyen enlaces ácidos lábiles, enlaces tioéster, enlaces fotolábiles,
25 enlaces peptidasa lábiles y enlaces estearasa lábiles.

Los métodos para producir maytansinoides con porciones de unión se describen en, por ejemplo, las Patentes U.S. 5,208,020, 5,416,064, y 6,333,410.

La porción de enlace de un maytansinoide típica y
5 preferiblemente es parte de una molécula enlazadora más grande que es usada para unir el anticuerpo al maytansinoide. Cualquier molécula enlazadora puede ser usada en conexión con la invención, mientras que la molécula enlazadora se proporciona para retención de la
10 toxicidad y de las características de selección del objetivo del maytansinoide y el anticuerpo respectivamente. La molécula objetivo une al maytansinoide con el anticuerpo por medio de enlaces químicos (como se describió anteriormente), de modo que
15 el maytansinoide y el anticuerpo sean acoplados químicamente (por ejemplo enlazados covalentemente) entre sí. De manera deseable, la molécula enlazadora acopla químicamente el maytansinoide al anticuerpo por medio de enlaces disulfuro o de enlaces tioéteres. Más
20 preferiblemente, el anticuerpo es acoplado químicamente al maytansinoide vía enlaces disulfuro.

Las moléculas enlazadoras particularmente preferidas incluyen, por ejemplo, 3- (2- piridilditio) propionato de N-succinimidilo (SPDP) (ver, por ejemplo, Carlsson y
25 colaboradores, Biochem. J., 173, 723, 723-737 (1978)), 4-

(2-piridilditio) butanoato de N-succinimidilo (SPDP)
(ver, por ejemplo la Patente U.S. No. 4,563,304), 4- (2-
piridilditio) pentanoato de N- succinimidilo (SPP) (ver,
por ejemplo, Registro CAS número 341498-08-06), 4- (N-
5 maleimidometil) ciclohexan- 1- carboxilato de N-
succinimidilo (SMCC) (ver, por ejemplo, Yoshitake y
colaboradores, Eur. J. Biochem., 101, 395-399 (1979)), y
4- metil- 4- [2- (5- nitro- piridil)- ditio] pentanoato
de N-succinimidilo (SMNP) (ver, por ejemplo, la Patente
10 4,563,304). Las moléculas enlazadoras más preferidas para
uso en la composición de la invención son SPP, SMCC, y
SPDB.

La composición de la invención comprende una
cantidad efectiva terapéuticamente de un conjugado que
15 comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un
maytansinoide. Una "cantidad efectiva terapéuticamente"
significa una cantidad suficiente para mostrar un
beneficio significativo en un individuo, por ejemplo,
promover al menos un aspecto de citotoxicidad de células
20 tumoral, o tratamiento, curación, prevención, o
mejoramiento de otras condiciones médicas relevantes
asociadas con un cáncer particular. Las cantidades
efectivas terapéuticamente pueden variar dependiendo del
efecto biológico deseado en el individuo, condición a ser
25 tratada, y/o las características específicas del

conjugado, y el individuo. Por consiguiente, de conformidad con los métodos descritos en la presente, los médicos tratantes (u otro profesional médico responsable de administrar la composición) decidirán típicamente la cantidad de la composición con la cual tratar a cada paciente individual. La concentración del conjugado en la composición de la invención deseablemente es de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 0.5 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, o aproximadamente 5 mg/ml). En una modalidad preferida la concentración del conjugado en la composición de la invención es de aproximadamente 1 mg/ml o mayor (por ejemplo 2 mg/ml o mayor, aproximadamente 3 mg/ml o mayor, o aproximadamente 4 mg/ml o mayor). Más preferiblemente, la concentración del conjugado en la composición de la invención es de aproximadamente 5 mg/ml. Aunque composiciones que comprenden al menos 1 mg/ml del conjugado son particularmente preferidas, concentraciones de conjugado de menos de 1 mg/ml (por ejemplo, concentraciones de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 0.9 mg/ml) también pueden mantenerse establemente en la composición de la invención, y por consiguiente están en el alcance de la invención. Las composiciones que comprenden más de 1 mg/ml de la molécula conjugada son ventajosas para uso clínico y

64
63

comercial, en los que dichas concentraciones facilitan que dosis únicas de la composición sean preparadas en un volumen más conveniente (es decir, más pequeño) para administración.

5 La composición de la invención deseablemente es formulada para ser aceptable para uso farmacéutico, tal como, por ejemplo, administración a un huésped humano en necesidad del mismo. Para este fin, la molécula conjugada es formulada en una composición que comprende un portador
10 aceptable farmacéuticamente (por ejemplo, excipiente o diluyente). Los portadores aceptables fisiológicamente son bien conocidos y están fácilmente disponibles, e incluyen agentes reguladores, antioxidantes, bacteriostatos, sales, y solutos que convierten la
15 solución en isotónica con la sangre u otros fluidos corporales del paciente humano, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes (por ejemplo, surfactantes), y
20 conservadores. La selección del portador será determinada, al menos parcialmente, por la localización del tejido y/o células objetivo, y por el método particular usado para administrar la composición. Ejemplos de portadores y excipientes adecuados para uso
25 en las formulaciones del fármaco conjugado se describen

en, por ejemplo, las Solicitudes de Patentes Internacionales (PCT) Nos. WO 00/02587, WO 02/060955, y WO 02/092127, y Ghetie y colaboradores, *J. Immunol. Methods*, 112, 267-277 (1988). Más preferiblemente, la
5 composición de la invención comprende un agente regulador, un surfactante, una cantidad tonicificadora de cloruro de sodio, y agua.

Puede usarse cualquier agente regulador aceptable farmacéuticamente adecuado, en conexión con la
10 composición de la invención. Ejemplos de agentes reguladores particularmente preferidos incluyen citrato, acetato, succinato, fosfato, e histidina. La composición de la invención, no obstante, no se limita a estos agentes reguladores ejemplares. El agente regulador puede
15 estar presente en la composición de la invención en cualquier concentración adecuada, siempre que se logre suficiente estabilidad de la composición bajo las condiciones deseadas. A este respecto, la concentración del agente regulador en la composición, preferiblemente
20 es de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM (por ejemplo 2 - 10 mM, aproximadamente 10 - 20 mM, aproximadamente 20-30 mM, aproximadamente 30- 40 mM, o aproximadamente 40 - 50 mM). Más preferiblemente, la concentración del agente regulador en la composición es
25 de aproximadamente 5 - 15 mM (por ejemplo,

aproximadamente 10 mM). El agente regulador es deseablemente succinato de sodio o acetato de sodio, pero más preferiblemente es citrato de sodio. Típicamente, el agente regulador (típicamente está presente en la
5 composición de la invención de modo que el pH sea mantenido en un intervalo deseado. A este respecto, la composición de la invención preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 5-6 (por ejemplo, de aproximadamente 5, 5.5 o 6). Se cree que las composiciones con un pH más
10 elevado (por ejemplo, aproximadamente pH de 6 o más alto) son menos estables que composiciones con un pH más bajo (es decir, aproximadamente pH de 6 o menos). Por consiguiente la composición de la invención más preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 5.5.

15 Además, del agente regulador discutido anteriormente, la composición de la invención también contiene opcionalmente un surfactante. Puede usarse cualquier surfactante adecuado en conexión con la invención. Los surfactantes adecuados son bien conocidos
20 por los expertos en la materia. De conformidad con la composición de la invención, deseablemente el surfactante es un polisorbato, y preferiblemente es polisorbato 20 o polisorbato 80. Más preferiblemente, el surfactante es polisorbato 20. El surfactante puede estar presente en la
25 composición de la invención en cualquier concentración,

67
f6

siempre que se logre suficiente estabilidad de la composición bajo las condiciones deseadas. A este respecto, la concentración del surfactante preferiblemente es de aproximadamente 0.002 % a 5 aproximadamente 0.1 % en peso/volumen (por ejemplo, aproximadamente 0.002 - 0.01 %, aproximadamente 0.005 - 0.02 %, o aproximadamente 0.01 - 0.1 % en peso/volumen) del volumen total de la composición. Más preferiblemente, la concentración del surfactante en la composición es de 10 aproximadamente 0.005 - 0.02 % en peso/volumen (por ejemplo, aproximadamente 0.01 % en peso/volumen) del volumen total de la composición. Aunque se prefieren las composiciones formuladas con surfactantes, las composiciones formuladas sin surfactantes están en el 15 alcance de la invención.

Como un agente estabilizante adicional, también se añade cloruro de sodio a la composición de la invención. A este respecto, la composición de la invención comprende una cantidad adecuada, preferiblemente una cantidad 20 tonicificadora, de cloruro de sodio (NaCl). Por la frase "cantidad tonicificadora de cloruro de sodio", se quiere decir que la concentración de NaCl en la composición es tal que la tonicidad de la composición es la misma que la tonicidad de la sangre humana (es decir, isotónica). A 25 este respecto, el NaCl puede ser preparado en la

composición de la invención en cualquier concentración adecuada, siempre que se logre suficiente tonicidad en la composición de la invención. Deseablemente, la concentración de cloruro de sodio en la composición es de

5 aproximadamente 50 mM a 500 mM (por ejemplo, aproximadamente 50 - 10 mM, aproximadamente 100 - 150 mM, aproximadamente 150 - 250 mM, aproximadamente 250 - 350 mM, o aproximadamente 350 - 450 mM). Mientras que concentraciones más altas de cloruro de sodio (por

10 ejemplo 150 mM o más) pueden convertir la composición de la invención hipertónica en vez de isotónica, la dilución de dichas composiciones con cualquier solvente isotónico adecuado tal como, preferiblemente, dextrosa a 1 5 % en agua ("D5W") o solución salina normal ("NS") antes de la

15 administración a un ser humano volvería dichas composiciones solamente ligeramente hipertónica y adecuada para uso en la invención. Preferiblemente, la concentración de cloruro de sodio en la composición es de

aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM (por

20 ejemplo, aproximadamente 100 - 140 mM, aproximadamente 130 - 170 mM, o aproximadamente 160 - 200 mM). Más preferiblemente, la concentración de cloruro de sodio en la composición es de aproximadamente 110 - 150 mM (por

ejemplo, aproximadamente 110 mM - 130 mM, o

25 aproximadamente 120 mM).

En una modalidad particularmente preferida de la invención, la composición comprende (i) aproximadamente 5 mg/ml de un conjugado que comprende huN901 acoplado químicamente a DM1, (ii) aproximadamente 10 mM de regulador de citrato de sodio, (iii) aproximadamente 0.01 % de polisorbato 20, (iv) aproximadamente 120 mM de cloruro de sodio, y (v) agua (preferiblemente agua adecuada para inyección (WFI)), en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5.5. En otra modalidad preferida, la composición comprende (i) aproximadamente 1 mg/ml o más (por ejemplo aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, 3 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, o varía entre éstos) de un conjugado que comprende huMy9-6 acoplado químicamente a DM1, (ii) aproximadamente 10 mM de regulador de citrato de sodio, (iii) opcionalmente aproximadamente 0.01 % de polisorbato 20, (iv) aproximadamente 135 mM de cloruro de sodio, y (v) agua, en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5.5. En aún otra modalidad preferida, la composición comprende (i) aproximadamente 1 mg/ml o más (por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, 3 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, o varía entre éstos) de un conjugado que comprende huMy9-6 acoplado químicamente a DM4, (ii) aproximadamente 10 mM de regulador de citrato de sodio, (iii) opcionalmente

aproximadamente 0.01 % de polisorbato 20, (iv) aproximadamente 135 mM de cloruro de sodio, y (v) agua, en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5.5. En una modalidad adicional preferida, la composición

5 comprende (i) aproximadamente 1 mg/ml o más (por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, 3 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, o varía entre éstos) de un conjugado que comprende huN901 acoplado químicamente a DM1 vía un enlazador de SMCC, (ii) aproximadamente 10 mM

10 de regulador de citrato de sodio, (iii) opcionalmente aproximadamente 0.01 % de polisorbato 20, (iv) aproximadamente 130 mM de cloruro de sodio, y (v) agua, en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5.5.

15 Composiciones que contienen anticuerpos (o proteínas en general) se convierten en inestables por la oxidación. Por consiguiente, en otra modalidad de la invención, la composición comprende adicionalmente un antioxidante. Puede ser usado cualquier antioxidante adecuado en la

20 composición de la invención. Los antioxidantes adecuados son conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, tocotrienoles, polifenoles, zinc, manganeso selenio, vitamina C, vitamina E, beta carotenos, cisteína, y

25 metionina. El antioxidante usado en conexión con la

71
70

composición de la invención más preferiblemente es metionina. El antioxidante puede estar presente en la composición en cualquier concentración adecuada. De manera deseable, la concentración del antioxidante en la
5 composición es de aproximadamente 100 μ M a aproximadamente 100 mM (por ejemplo, aproximadamente 0.25 - 1 mM, aproximadamente 0.5 - 2 mM, aproximadamente 5 - 15 mM, aproximadamente 20 - 70 mM, o aproximadamente 60 - 90 mM). Más preferiblemente, la concentración del
10 antioxidante en la composición es de aproximadamente 5 - 15 mM (por ejemplo, aproximadamente 10 mM).

Además de antioxidantes, la composición de la invención puede adicionalmente ser estabilizada por medio de la adición de sacarosa. El uso de sacarosa para
15 estabilizar formulaciones de anticuerpos es conocido por los expertos en la materia. Puede usarse cualquier cantidad adecuada de sacarosa en la composición de la invención, pero la concentración de sacarosa en la composición deseablemente es de aproximadamente 0.1 % a
20 aproximadamente 10 % en peso/volumen (por ejemplo, de aproximadamente 0.1 - 1 %, aproximadamente de 2 - 5 %, o aproximadamente de 7 - 10 % en peso/volumen) del volumen total de la composición. Más preferiblemente, la concentración de sacarosa en la composición es de
25 aproximadamente 4 - 6 % en peso/volumen (por ejemplo,

aproximadamente 5 % en peso/volumen) del volumen total de la composición.

La invención proporciona adicionalmente una composición empacada que comprende un contenedor sellado
5 que tiene la composición de la invención dispersa en él, y una capa superpuesta de gas inerte. La composición empacada puede ser recubierta con cualquier gas inerte adecuado, siempre que la composición de la invención sea mantenida establemente en la composición empacada. El gas
10 inerte preferiblemente es nitrógeno o argón. La composición empacada puede presentarse en contenedores sellados de dosis unitaria o de dosis múltiples, tales como ampolletas o frasquitos.

Además de las composiciones que contienen agua
15 descritas en la presente (también mencionadas en la presente como una composición "líquida" o "acuosa"), la invención también proporciona una composición liofilizada que comprende (i) una cantidad efectiva terapéuticamente de un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado
20 químicamente a un maytansinoide, (ii) un agente regulador, (iii) un surfactante, (iv) un crioprotector, y (v) un ingrediente para carga, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5 - 6 cuando es reconstituida con agua. Por "liofilizado" se quiere decir
25 que la composición ha sido secada por congelación al

vacío. La liofilización se logra típicamente por congelación de una formulación particular de modo que los solutos sean separados de los solventes. El solvente es entonces retirado, por sublimación (es decir, secado
5 primario) y después por desorcpción (es decir, secado secundario). Descripciones del conjugado (es decir, el anticuerpo químicamente acoplado al maytansinoide), agente regulador, surfactante, y componentes de los mismos, expuestos anteriormente en conexión con otras
10 modalidades de la invención son también aplicables a aquellos aspectos iguales de las composiciones liofilizadas anteriormente mencionadas. Antes de reconstitución de la composición liofilizada, las cantidades relativas de cada componente que comprenden la
15 composición liofilizada de la invención pueden ser descritas en términos de mg de excipiente (por ejemplo, regulador, surfactante, ingrediente de carga, crioprotector) por mg de conjugado.

Aunque puede usarse cualquier agente regulador
20 descrito en la presente en conexión con la composición liofilizada de la invención, la composición liofilizada de la invención preferiblemente comprende un regulador de succinato de sodio. El agente regulador puede estar presente en la composición liofilizada de la invención en
25 cualquier cantidad adecuada. En particular, la

74
73

composición liofilizada deseablemente comprende
aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 2 mg del agente
regulador' por mg del conjugado (por ejemplo,
aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 0.5 mg de agente
5 regulador por mg del conjugado, aproximadamente 0.5 mg a
aproximadamente 1 mg de agente regulador por mg del
conjugado, o aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2 mg
de agente regulador por mg de conjugado). Más
preferiblemente, la composición liofilizada comprende
10 aproximadamente aproximadamente 0.3 mg de regulador de
succinato de sodio por mg del conjugado.

Aunque puede usarse cualquier surfactante adecuado
descrito en la presente en conexión con la composición
liofilizada de la invención, deseablemente, el
15 surfactante es un polisorbato, y preferiblemente el
polisorbato es polisorbato 20 o polisorbato 80.
Mayormente se prefiere que el surfactante sea polisorbato
20. El surfactante puede estar presente en la composición
liofilizada de la invención en cualquier cantidad
20 adecuada, siempre que se logre estabilidad suficiente de
la composición liofilizada bajo las condiciones deseadas.
A este respecto, la composición liofilizada deseablemente
comprende aproximadamente 0.005 mg a aproximadamente 0.1
mg del surfactante por mg del conjugado (por ejemplo,
25 aproximadamente 0.005 mg a aproximadamente 0.01 mg de

25
74

surfactante por mg del conjugado, aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 0.05 mg de surfactante por mg del conjugado, o aproximadamente 0.05 mg a aproximadamente 0.1 mg de surfactante por mg del conjugado). Cuando el surfactante es polisorbato 20, la composición liofilizada preferiblemente comprende aproximadamente 0.02 mg de polisorbato 20 por mg del conjugado.

A fin de prevenir la degradación de los ingredientes activos de la composición durante la congelación y el secado, la composición liofilizada de la invención comprende adicionalmente un crioprotector, preferiblemente un crioprotector amorfo. El término "crioprotector", como se usa en la presente, se refiere a un excipiente que protege moléculas inestables durante la congelación. Crioprotectores adecuados para uso en la composición de la invención son conocidos por los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo, glicerol, dimetil sulfoxida (DMSO), polietilen glicol (PEG), dextrano, glucosa, trehalosa, y sacarosa. Más preferiblemente, el crioprotector es sacarosa. El crioprotector puede estar presente en la composición liofilizada de la invención en cualquier cantidad adecuada. La composición liofilizada deseablemente comprende aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 5 mg (por ejemplo, aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 2

mg) del crioprotector por mg del conjugado (por ejemplo, aproximadamente 0.8 mg de crioprotector por mg del conjugado, aproximadamente 2 mg de crioprotector por mg del conjugado, o aproximadamente 4 mg de crioprotector por mg del conjugado). Cuando el crioprotector es sacarosa, la composición liofilizada preferiblemente comprende aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 2 mg (por ejemplo, aproximadamente 1 mg) de sacarosa por mg del conjugado.

10 La composición liofilizada de la invención puede contener adicionalmente un ingrediente de carga, preferiblemente un ingrediente de carga cristalizable. Los ingredientes de carga típicamente son usados en el arte para proporcionar estructura y peso a la "torta"

15 producida como un resultado de la liofilización. Cualquier ingrediente de carga adecuado conocido en el arte puede ser usado en conexión con la composición de liofilización de la invención. Los ingredientes de carga adecuados incluyen, por ejemplo, manitol, dextrano, y

20 glicina. El ingrediente de carga usado en la composición de la invención más preferiblemente es glicina. El ingrediente de carga usado en la composición de la invención más preferiblemente es glicina. La composición liofilizada puede contener cualquier cantidad adecuada

25 del ingrediente de carga, pero preferiblemente la

composición liofilizada comprende aproximadamente 2 mg a aproximadamente 20 mg del ingrediente de carga por mg del conjugado (por ejemplo, aproximadamente 2 mg a aproximadamente 10 mg de ingrediente de carga por mg del conjugado, aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg de ingrediente de carga por mg del conjugado, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 15 mg de ingrediente de carga por mg del conjugado, o aproximadamente 15 mg a aproximadamente 20 mg de ingrediente de carga por mg del conjugado). Cuando el ingrediente de carga es glicina, la composición liofilizada comprende preferiblemente aproximadamente 3.8 mg de glicina por mg del conjugado.

Por consiguiente, de conformidad con la invención, el contenido de una composición liofilizada que está para ser reconstituido contiene 5 mg/ml de conjugado (por ejemplo, preferiblemente un conjugado que comprende huN901 acoplado químicamente a DM1) preferiblemente comprende (i) aproximadamente 0.3 mg de regulador de succinato de sodio por mg del conjugado, (ii) aproximadamente 0.02 mg de polisorbato 20 por mg del conjugado, (iii) aproximadamente 1 mg de sacarosa por mg del conjugado, y (iv) aproximadamente 3.8 mg de glicina por mg del conjugado. Una vez reconstituido con agua, una composición liofilizada tal preferiblemente tiene un pH

de aproximadamente 5.5. Además, cuando la composición liofilizada es reconstituida con agua, las descripciones de las concentraciones relativas del conjugado, el agente regulador, y el surfactante expuesto anteriormente en
5 conexión con la composición líquida de la invención también son aplicables a la composición liofilizada anteriormente mencionada. Los métodos de liofilización son bien conocidos en el arte y se describen en, por ejemplo, Wang, W., *Int. J. Pharm.*, 203, 1-60 (2000). Por
10 ejemplo, la composición liofilizada de la invención puede ser producida usando un ciclo de liofilización que comprende las etapas siguientes: (i) pre-enfriar a una temperatura de anaquel de 4 °C y presión de cámara ambiental por 2.5 horas, (2) congelación a una
15 temperatura de anaquel de - 50 °C y presión de cámara ambiental por 14 horas, (3) recristalización de glicina a una temperatura de anaquel de - 20 °C y presión de cámara ambiental por 6 horas, (4) re-congelación a una
temperatura de anaquel de - 50 °C y presión de cámara
20 ambiental por 16 horas, (5) secado primario a una temperatura de anaquel de - 15 °C y 100 mTorr de presión por 24 horas, (6) secado secundario a una temperatura de anaquel de 24 °C y 100 mTorr de presión por 10 horas, y
(7) fase de detención a una temperatura de anaquel de 24

29
78

°C y presión de cámara ambiental. La composición liofilizada de la invención, sin embargo, no se limita a composiciones producidas por medio del método anteriormente descrito. Realmente, puede usarse cualquier
5 método de liofilización adecuado para producir la composición liofilizada de la invención, y será obvio para los expertos en la materia que los parámetros de liofilización seleccionados (por ejemplo, tiempos de secado) variaran dependiendo de una variedad de factores,
10 incluyendo el volumen de la solución a ser liofilizada.

Además de las modalidades preferidas descritas en la presente, la composición de la invención (ya sea en forma líquida o liofilizada) puede comprender agentes activos biológicamente o terapéuticos adicionales. Por ejemplo,
15 pueden estar presentes factores terapéuticos útiles en el tratamiento de una indicación particular (por ejemplo, cáncer). Los factores que controlan la inflamación, tal como ibuprofeno o esteroides, pueden ser parte de la composición para reducir la hinchazón y la inflamación
20 asociada con administración in vivo de la composición y agotamiento fisiológico. Pueden incluirse mejoradores inmunes en la composición para sobre regular las defensas naturales del cuerpo contra la enfermedad. Pueden co-administrarse con la composición vitaminas y minerales,
25 antioxidantes, y micronutrientes. Pueden estar presentes

antibióticos, es decir, microbicidas y fungicidas, para reducir el riesgo de infección perteneciente a los procedimientos asociados con la administración de la composición y de otros trastornos.

5 La invención proporciona adicionalmente un método para destruir una célula en un humano que comprende administrar al humano una composición que comprende (i) una cantidad efectiva terapéuticamente de un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un
10 maytansinoide, (ii) un agente regulador, (iii) un surfactante, (iv) una cantidad tonicificante de cloruro de sodio, y (v) agua, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5 - 6, de modo que el anticuerpo enlace a la superficie de la célula y se active la
15 citotoxicidad del maytansinoide, con lo que la célula es destruida. Descripciones del conjugado (es decir, el anticuerpo acoplado químicamente al maytansinoide), excipientes (por ejemplo, agente regulador, surfactante, cloruro de sodio, etc.), y componentes de los mismos,
20 expuestos anteriormente en conexión con otras modalidades de la invención también son aplicables a los mismos aspectos del método de la invención anteriormente mencionado.

El método de la invención involucra administrar la
25 composición de la invención a un humano. De manera

ideal, el método de la invención es usado para seleccionar y destruir células afectadas por una enfermedad, particularmente una enfermedad asociada con niveles elevados de proliferación celular, tal como

5 cáncer. Por consiguiente con respecto a esto, el método de la invención preferiblemente se usa para destruir células tumorales en un humano, dando así como resultado la prevención, el mejoramiento, y/o la cura del cáncer.

Aunque cualquier medio adecuado de administrar la

10 composición a un humano puede ser usado en el contexto de la invención, típica y preferiblemente la composición de la invención es administrada a un humano vía inyección, y más preferiblemente vía infusión. Por el término "inyección" se quiere decir que la composición es

15 forzosamente introducida en un tejido objetivo del humano. Por el término "infusión", se quiere decir que la composición es introducida en un tejido, típica y preferiblemente una vena, del humano. La composición puede ser administrada al humano por cualquier ruta

20 adecuada, pero preferiblemente es administrada por ruta intravenosa o intraperitonealmente. Cuando se emplea el método de la invención para destruir células tumorales, sin embargo, se prefiere particularmente la administración intratumoral de la composición de la

25 invención. Cuando se administra la composición de la

invención por inyección, cualquier dispositivo de inyección adecuado puede ser usado para administrar la composición directamente a un tumor. Por ejemplo, la jeringa médica común puede ser usada para inyectar
5 directamente la composición en un tumor subcutáneo. De manera alternativa, la composición puede ser aplicada tópicamente al tumor bañando el tumor en la composición líquida de la invención. De manera similar, el tumor puede ser perfusionado con la composición de la invención
10 durante un período de tiempo usando cualquier dispositivo de liberación adecuado, por ejemplo, un catéter. Aunque menos preferidas, pueden usarse otras rutas de administración para liberar la composición en el humano. Realmente, aunque puede usarse más de una ruta para
15 administrar la composición de la invención, una ruta particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra ruta. Por ejemplo, aunque no particularmente preferida, la composición de la invención puede ser aplicada o instilada en cavidades corporales,
20 absorbidas a través de la piel, inhaladas, o administradas parenteralmente vía, por ejemplo, administración intramuscular o intra arterial. Preferiblemente, la composición de la invención administrada parenteralmente a un humano es

específicamente seleccionada para células particulares, por ejemplo, células cancerosas.

Como se describe en la presente, el conjugado comprende un anticuerpo, el cual es preferiblemente un anticuerpo monoclonal humanizado, tal como huN901, huMy9-6, huB4, o huC242. Otros anticuerpos adecuados incluyen, por ejemplo, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab. Cuando las composiciones que comprenden dichos conjugados son empleadas en el método de la invención, el anticuerpo selecciona al conjugado en una célula deseada (por ejemplo, célula tumoral) a través de interacciones con antígenos (por ejemplo, antígenos específicos de tumor) expresados en la superficie de la célula (por ejemplo, célula tumoral). Los antígenos específicos de tumor han sido descritos extensivamente en el arte previo por una variedad de tumores, incluyendo, por ejemplo, cánceres epiteliales (por ejemplo, MUC1), y cáncer de seno y de ovario (por ejemplo, HER2/neu), (ver, por ejemplo, Bartnes, *Tidsskr. Nor. Laegeforen.*, 121, 2941-5 (2001), y von Mensdorff-Pouilly y colaboradores, *Int. J. Biol. Markers*, 15, 343-356 (2000)).

En una modalidad de la invención, el anticuerpo (por ejemplo, huMy9-6) enlaza al antígeno CD33, que es expresado, por ejemplo, por células de leucemia mieloide aguda. En otra modalidad preferida, el anticuerpo (por

83

ejemplo huB4) enlaza al antígeno CD19, el cual es expresado, por ejemplo, por células de linfoma de células B humana. Alternativamente, el anticuerpo (por ejemplo, huC242) enlaza al antígeno CanAg, el cual es expresado por un número tipos de células cancerosas, que incluyen, por ejemplo, cánceres colon rectal, pancreático, gástrico, y otros cánceres gastrointestinales, y la mayoría de cánceres de pulmón de células no pequeñas. Más preferiblemente. Más preferiblemente, el anticuerpo (por ejemplo, huN901) enlaza al antígeno NCAM/CD56, el cual es expresado, por ejemplo, por células de carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC), y por otros cánceres de origen neuroendocrino. Otros antígenos preferidos a los cuales el anticuerpo puede enlazar incluyen el antígeno. Otros antígenos preferidos a los cuales el anticuerpo puede enlazar incluyen el antígeno GD₃, PSMA, el receptor de alfa-folato, Her2/neu, CD44v6, el antígeno pancreático fetoacinar (FAP), el antígeno Cripto-1, el antígeno CA6, CD20, CA 55.1, MN/CA IX, condroitin sulfato de proteoglicano (ver, por ejemplo, Chang y colaboradores, *Cancer Res.*, 59, 3192-98 (1999), Miotti y colaboradores, *Int. J. Cancer*, 39, 297-303, (1987), Colomer y colaboradores, *supra*, Heider y colaboradores, *supra*, Welt y colaboradores, *supra*, LePage y colaboradores, *American Assn. For Cancer Research (AACR)*,

2003 Annual Meeting, Poster Abstract No. 749, Kearse y colaboradores, *Int. J. Cancer*, 88, 866-72 (2000), Maloney y colaboradores, *supra*, Opavsky y colaboradores, *Genomics*, 33, 480-87 (1996), Behm y colaboradores, *Blood*, 87, 1134-39 (1996), y la Patente U.S. 5,665,357). A partir del enlace del conjugado a una célula objetivo (es decir tumor) vía cualquiera de los antígenos específicos de tumor o receptores descritos en la presente, la citotoxicidad del maytansinoide es activada. Ejemplos de mecanismos por los cuales puede ser activada la citotoxicidad del maytansinoide incluyen la liberación del maytansinoide libre en el interior de la célula vía fragmentación del enlace disulfuro entre el anticuerpo y el maytansinoide, la degradación del anticuerpo en la célula, y la activación de la citotoxicidad del maytansinoide en la superficie celular. El método de la invención, no se limita a estas modalidades ejemplares de la activación de maytansinoide. Realmente, cualquier mecanismo que active la citotoxicidad del maytansinoide está en el alcance del método de la invención.

Para los propósitos de administración a humanos, la composición líquida de la invención descrita en la presente puede ser administrada (por ejemplo infundida) directamente a un humano, o diluida con un diluyente adecuado inmediatamente antes de administración. Los

~~85~~

diluyentes adecuados son conocidos en el arte e incluyen D5W y solución salina normal (NS). Son posibles diluciones de 1:1, 1:2, 1:3, o más (por ejemplo, 1:5, 1:10, o aún 1:50) con diluyentes adecuados. La dilución
5 de la composición de la invención deseablemente no reduce la concentración de la molécula conjugada en la composición inferior a aproximadamente 0.1 mg/ml. Después de diluir la composición líquida, las concentraciones descritas previamente de cada uno de los componentes (por
10 ejemplo, agente regulador, surfactante, y cloruro de sodio) de la composición son correspondientemente reducidas.

Cuando la composición liofilizada de la invención descrita en la presente es administrada a un humano, la
15 composición debe de ser primero reconstituida por adición de un excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua adecuada para inyección, D5W, o NS, inmediatamente antes de uso. Por consiguiente, la invención proporciona adicionalmente un método para destruir una célula en un
20 humano que comprende (a) proporcionar la composición liofilizada como se describe en la presente, (b) añadir agua a la composición liofilizada para proporcionar una composición reconstituida, y (c) administrar la composición reconstituida al humano de modo que el
25 anticuerpo enlaza en la superficie de la célula y el

maytansinoide es internalizado por la célula, con lo cual la célula es destruida. Las descripciones de la composición liofilizada, rutas de administración, antígenos específicos de tumor, y componentes de los mismos, expuestos anteriormente en conexión con otras modalidades de la invención también son aplicables a los mismos aspectos del método de la invención anteriormente mencionado. Además, como se discute en la presente, después de que la composición liofilizada de la invención con agua, las descripciones de las concentraciones relativas del conjugado y excipientes (por ejemplo, agente regulador, surfactante, crioprotector, e ingrediente de carga) descritos anteriormente en conexión con la composición líquida de la invención también son aplicables a los mismos aspectos del método de la invención anteriormente mencionados. Como se discutió anteriormente, el método de la invención, ya sea que se emplee una composición líquida o una composición liofilizada, preferiblemente es usado en conexión con el tratamiento del cáncer. El método de la invención puede ser usado para tratar cáncer de cualquier tipo, incluyendo, por ejemplo, cáncer del pulmón, seno, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario, sangre, y órganos linfáticos. Aunque menos preferida, la composición de la invención puede ser usada para tratar otras enfermedades

87

asociadas con la proliferación celular incluyendo enfermedades autoinmunes (por ejemplo lupus generalizado, artritis reumatoide, y esclerosis múltiple), rechazos de injertos (por ejemplo, rechazo de trasplante renal, 5 rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante cardíaco, y rechazo de trasplante de médula ósea), injerto versus la enfermedad del huésped, infecciones virales (por ejemplo, infección por CMV, infección por HIV, AIDS, etc.), e infecciones 10 parasitarias (por ejemplo, giardiasis, amibiasis, esquistosomiasis), y otros.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero, por supuesto, no se construyeron en manera alguna como limitantes del alcance.

15

EJEMPLO 1

Este ejemplo demuestra la producción de una composición que comprende un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide, agente regulador, surfactante, cantidad tonicificante de 20 cloruro de sodio, y agua.

La generación de un conjugado que comprende el anticuerpo monoclonal huN901 acoplado químicamente al maytansinoide DM1 vía enlaces disulfuro ("huN901:DM1") han sido descritos previamente (ver por ejemplo, la 25 Patente U.S. 6,441,163). Se prepararon individualmente

las formulaciones que contienen ya sea 1 mg/ml o 5 mg/ml del conjugado huN901:DM1 en la presencia de cada uno de los excipientes anteriormente descritos. Se evaluó la estabilidad de las formulaciones usando los siguientes
5 ensayos: inspección visual para detectar partículas, un método cromatográfico para medir especies relacionadas con el fármaco libre, y cromatografía por exclusión de tamaño por HPLC (SEC-HPLC) para detectar especies relacionadas con conjugados de peso molecular alto y
10 bajo. Con respecto a la inspección visual, la presencia de partículas son indicadores de inestabilidad y, por consiguiente, son consideradas indeseables, aunque una solución clara es indicador de una formulación estable. Se usó el ensayo cromatográfico para medir la cantidad de
15 fármaco libre a 4 °C y 25 °C. Los resultados de estos ensayos sugirieron que una formulación que contenga aproximadamente 5 mg/ml del conjugado huN901:DM1, aproximadamente 10 mM de citrato de sodio, aproximadamente 0.01 % de polisorbato y cloruro de sodio
20 a pH de 5.5 (es decir, la composición líquida de la invención) tendría actividad superior.

Para confirmar la estabilidad de la formulación anteriormente descrita con respecto a la formación de dímeros, lo cual también es indicador de inestabilidad,
25 el conjugado huN901:DM1 fue concentrado y formulado ya

90
89

sea en solución salina regulada con fosfato (PBS), pH de 6.5 (Formulaciones 1A-1C), o 10 mM de citrato de sodio, 0.01 % de polisorbato 20, 60 mM de NaCl, pH de 5.5 (Formulación 1D). Después de 6 meses a 4 °C o 25 °C las 5 muestras fueron ensayadas por SEC-HPLC. Los resultados de este análisis se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1

Formulación	Concentración del Conjugado (mg/ml)	Agente Regulador	Surfactante	NaCl	% de dímeros de conjugado después de 6 meses a	
					4 °C	25 °C
1A (Comparativo)	5.0	PBS, pH 6.5	Nada	Nada	5.5	9.3
1B (Comparativo)	3.8	PBS, pH 6.5	Nada	Nada	5.5	8.4
1C (Comparativo)	1.2	PBS, pH 6.5	Nada	Nada	4.9	6.0
1D (Invención)	5.0	Citrato de sodio, pH de 5.5	Polisorbato 20 al 0.01 %	60 mM	5.1	6.0

15 Estos resultados demuestran que composiciones de la invención (como se representan por la Formulación 1D) protegen contra la formación del dímero del conjugado. Por consiguiente, los resultados combinados del ensayo de 20 inspección visual, el ensayo cromatográfico, y el ensayo de SEC-HPLC indican que la composición de la invención fue la más estable de las formulaciones probadas.

EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra la producción de una 25 composición que comprende un conjugado que comprende un

anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide, agente regulador, surfactante o sacarosa, cantidad tonicificante de cloruro de sodio, y agua.

Se preparó un conjugado que comprende el anticuerpo
5 monoclonal huN901 acoplado químicamente al maytansinoide
DM1 vía un 4- (2- piridilditio) pentanoato de N-
succinimidilo (SPP) enlazador ("huN901-SPP-DM1"). Usando
los métodos descritos en la presente y conocidos en el
arte (ver, por ejemplo, la Patente U.S. 6,441,163). El
10 conjugado huN901-SPP-DM1 fue formulado ya sea en (a) PBS,
pH de 6.5 (Formulaciones 2A y 2B) o bien (b) 10 mM de
citrato de sodio, polisorbato 20 al 0.01 %, 135 mM de
NaCl, pH de 5.5 (Formulación 2C) en concentraciones
variables. Se incubaron muestras de cada una de las
15 formulaciones a 4 °C y 25 °C por 6 meses, después de lo
cual las formulaciones fueron probadas para la presencia
del fármaco y dímeros del conjugado por medio de ensayos
cromatográficos. Los resultados de estos análisis se
exponen en la Tabla 2.

20

25

25

20

15

10

5

Tabla 2

Formulación C	Concentración del Conjugado (mg/ml)	Agente Regulador	Surfactante	% de Dímero			% de Fármaco Libre		
				Tiempo Cero	6 meses		Tiempo Cero	6 meses	
					4 °C	25 °C		4 °C	25 °C
2A (Comparativo)	10	PBS, pH de 6.5	Nada	4.8	5.8	6.1	1.1	1.6	4.6
2B (Comparativo)	50	PBS, pH de 6.5	Nada	5.2	8.5	10.1	1.1	1.6	4.9
2C (Invención)	50	Citrato de Sodio, pH de 5.5	Polisorbato al 0.01 %	4.4	5.5	6.4	0.4	1.2	2.9

50

47

q3
#2

Además de los resultados citados en la Tabla 2, las formulaciones fueron inspeccionadas visualmente para material en forma de partículas. La formulación de la invención (Formulación 2C) fue visualmente clara después
5 de 6 meses de almacenamiento a 4 °C, mientras que se observaron partículas y sedimentos en las formulaciones comparativas (que se representaron por las Formulaciones 2A y 2B).

Estos resultados demostraron la estabilidad mejorada
10 de composiciones de la invención.

EJEMPLO 3

Este ejemplo demuestra la producción de una composición que comprende un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide,
15 agente regulador, surfactante, cantidad tonicificante de cloruro de sodio, un antioxidante, y agua.

Se preparó un conjugado que comprende el anticuerpo monoclonal huN901 acoplado químicamente al maytansinoide DM1 vía un 4- (N-maleimidometil) ciclohexano- 1-
20 carboxilato de N- succinimidilo (SMCC) enlazador ("huN901-SMCC-SM1"), usando los métodos descritos en la presente conocidos en el arte (ver, por ejemplo, la Patente U.S. 6,441,163). Se formuló 1 mg/ml del conjugado huN901-SMCC-DM1 ya sea en (a) solución salina regulada
25 con fosfato (PBS), pH de 6.5 (Formulación 3A), (b) 10 mM

94
63

de citrato de sodio, polisorbato 20 al 0.01 %, 130 mM de NaCl, pH de 5.5 (Formulación 3B), o bien (c) 10 mM de citrato de sodio, polisorbato 20 al 0.01 %, 130 mM de NaCl, 10 mM de metionina, pH de 5.5 (Formulación 3C).

5 Después de una incubación de 3.5 meses a 25 °C y 37 °C, muestras de cada una de las formulaciones fueron probadas para la presencia de dímeros del conjugado por medio de un ensayo cromatográfico. Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 3.

10 **Tabla 3**

Formulación	Agente Regulador	Surfactante	Antioxidante	% de Dímero		
				Tiempo Caro	3.5 meses	
					25 °C	37 °C
3A (Comparativo)	PBS, pH de 6.5	Nada	Nada	4.0	5.8	11.2
15 3B (Invención)	Citrato de Sodio, pH de 5.5	Polisorbato 20 al 0.01 %	Nada	4.0	4.7	6.3
3C (Invención)	Citrato de Sodio, pH de 5.5	Polisorbato 20 al 0.01 %	10 mM de Metionina	4.0	4.4	4.8

Estos resultados demostraron que composiciones de la invención (como se representan por las Formulaciones 3B y 20 3C) proporcionaron estabilidad mejorada.

EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra la producción de una composición que comprende un conjugado que comprende el anticuerpo monoclonal huMy9-6 acoplado químicamente al 25 maytansinoide DM1, agente regulador, cantidad

95
97

tonicificante de cloruro de sodio, y agua, con o sin un surfactante y sacarosa.

Se preparó un conjugado que comprende el anticuerpo monoclonal huMy9-6 acoplado químicamente al maytansinoide DM1 vía un 4- (2- piridilditio) pentanoato de N-succinimidinilo (SPP) enlazador ("huMy9-6-SPP-DM1"), usando los métodos descritos en la presente y conocidos en el arte (ver, por ejemplo, la Patente U.S. 6,441,163). Se formuló 1 mg/ml del conjugado huMy9-6-SPP-DM1 ya sea en (a) solución salina regulada con fosfato (PBS), pH de 6.5 (Formulación 4A), (b) 10 mM de citrato de sodio, 135 mM de NaCl, pH de 5.5 (Formulación 4B), (c) 10 mM de citrato de sodio, polisorbato 20 al 0.01 %, 135 mM de NaCl, pH de 5.5 (Formulación 4C), o (d) 10 mM de citrato de sodio, sacarosa al 5 %, 60 mM de NaCl, pH de 5.5 (Formulación 4D). Después de tres meses de incubación a 4 °C o 25 °C, se ensayaron muestras de cada una de las formulaciones por medio de SEC-HPLC para medir especies de alto peso molecular (HMW), y por medio de un ensayo cromatográfico para medir especies de fármaco libre. Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 4.

25

20

15

10

5

Tabla 4

Formulación	Agente Regulador	NaCl (mM)	Surfactante	Estabilizante	% de Fármaco Libre			Especies de Alto P.M.		
					Tiempo Cero	3 meses		Tiempo Cero	3 meses	
						4 °C	25 °C		4 °C	25 °C
4A (Comparativo)	PBS, pH de 8.5	Nada	Nada	Nada	0.2	1.3	3.2	0.5	1.4	2.0
4B (Invención)	Citrato de Sodio, pH de 5.5	135	Nada	Nada	0.1	1.0	1.8	0.4	0.7	1.4
4C (Invención)	Citrato de Sodio, pH de 5.5	135	Polisorbato 20 al 0.01 %	Nada	0.1	1.0	1.8	0.5	0.8	1.8
4D (Invención)	Citrato de Sodio, pH de 5.5	60	Nada	Sacarosa al 5%	0.1	1.1	1.9	0.4	0.5	0.8

54

95

76
92

Además, muestras de las Formulaciones 4A y 4B fueron incubadas a 4 °C y 25 °C por tres meses, y luego fueron probadas para formación de dímeros de conjugado como se discutió anteriormente. Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 5.

Tabla 5

Formulación	Agente Regulador	% de Dímero		
		Tiempo Cero	3 meses	
			4 °C	25 °C
4A (Comparativo)	PBS, pH de 6.5	6.3	10.8	12.3
4B (Comparativo)	Citrato de Sodio pH de 5.5	5.7	7.0	7.7

Estos resultados demuestran que composiciones de la invención (como se representó por las Formulaciones 4B, 4C, y 4D) proporcionan estabilidad mejorada, y que la sacarosa añade beneficios estabilizantes adicionales.

EJEMPLO 5

Este ejemplo demuestra que la producción de una composición que comprende un conjugado que comprende el anticuerpo monoclonal huMy9-6 acoplado químicamente al maytansinoide DM4, agente regulador, cantidad tonicificadora de cloruro de sodio, y agua, con o sin un surfactante.

Se preparó un conjugado que comprende el anticuerpo monoclonal huMy9-6 acoplado químicamente al maytansinoide

98
97

DM4 vía un 4-(2-piridilditio) butanoato de N-succinimidilo (SPDB) enlazador ("huMy9-6-SPDB-DM4"), usando los métodos descritos en la presente y conocidos en el arte (ver, por ejemplo la Patente U.S. No. 6,441,163). Se formuló 1 mg/ml del conjugado huMy9-6-SPDB-DM4 en ya sea (a) solución salina regulada con fosfato (PBS), pH de 6.5, (b) 10 mM de citrato de sodio, 135 mM de NaCl, pH de 5.5, o (c) 10 mM de citrato de sodio, polisorbato de sodio al 0.01 %, 135 mM de NaCl, pH de 5.5. Para confirmar la estabilidad de las formulaciones anteriormente descritas, se probaron muestras de cada una de las formulaciones por la presencia de partículas usando un contador de partículas HIAC después de una incubación de seis meses a - 80 °C. Se probaron también muestras de cada una de las formulaciones por la presencia de especies de fármaco libre como se describió anteriormente después de una incubación de seis meses a 4 °C o 25 °C. Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 6.

20 **Tabla 6**

Formulación	Agente Regulador	Surfactante	NaCl mM	Partículas de >5µm después de 6 meses a - 80 °C	% de Fármaco Libre Después de 6 meses	
					4 °C	25 °C
5A (Comparativo)	PBS, pH de 6.5	Nada	Nada	21218	1.6	5.0
5B (Invención)	Citrato de Sodio, pH de 5.5	Nada	135	8778	1.2	2.5
25 5C (Invención)	Citrato de Sodio, pH de 5.5	Polisorbato 20 al 0.01 %	135	776	1.1	2.8

99
98

Estos resultados demuestran que las composiciones de la invención (como se representaron por Formulaciones 5B y 5C) protegidas contra la formación de especies de fármaco libre y partículas, y que la presencia de polisorbato añadió estabilidad adicional y protección contra la formación de partículas.

EJEMPLO 6

Este ejemplo demuestra la producción de una composición liofilizada que comprende un conjugado que comprende el anticuerpo monoclonal huN901 acoplado químicamente al maytansinoide DM1.

La generación de un conjugado que comprende el anticuerpo monoclonal humano huN901 acoplado químicamente al maytansinoide DM1 vía enlaces disulfuro ("huN901:DM1") ha sido previamente descrita (ver por ejemplo, la Patente U.S. No. 6,441,163). Se prepararon cuatro formulaciones, designadas Formulaciones 6A-6D. Cada formulación contuvo (a) 1 mg/ml de huN901-DM1, (b) ya sea 10 mM de citrato de sodio o 10 mM de succinato de sodio, (c) sacarosa al 0.5 % en peso/volumen, (d) 250 mM de glicina, y (e) agua, con o sin polisorbato 20 al 0.01 % en peso/volumen, a un pH de 5.5, como se expone en la Tabla 7.

100
99

Tabla 7

	Formulación	Agente Regulador	Surfactante	Crioprotector	Ingredientes de Carga
	6A (Comparativo)	Citrato de Sodio	Nada	Sacarosa	Glicina
5	6B (Comparativo)	Citrato de Sodio	Poliisorbato 20	Sacarosa	Glicina
	6C (Comparativo)	Succinato de Sodio	Nada	Sacarosa	Glicina
	6D (Invencción)	Succinato de Sodio	Poliisorbato 20	Sacarosa	Glicina

Se liofilizaron muestras de 1 ml de cada una de las Formulaciones 6A-6D en frasquitos de 1 ml de conformidad con el esquema de liofilización citado en la Tabla 8.

Tabla 8

	Etapas de Liofilización	Temperatura de Anaqueo (°C)	Presión de Cámara (mTorr)	Duración de la Etapa (horas)
	Pre-enfriamiento	4	Ambiente	2.5
	Congelación	-50	Ambiente	14
	Recristalización de Glicina	-20	Ambiente	6
15	Re-congelación	-50	Ambiente	16
	Secado Primario	-13	100	24
	Secado Secundario	24	100	10
	Detención	24	Ambiente	-

Después de liofilización, las muestras de cada una de las Formulaciones 6A-6D presentaron tortas blancas uniformes, sólidas, y muestras de todas las formulaciones resuspendidas rápidamente (es decir, menos de 20 segundos para disolución completa) cuando se reconstituyeron en agua destilada. Se analizaron las muestras reconstituidas por apariencia visual y especies de alto peso molecular por medio cromatografía por exclusión de tamaño por HPLC

101
700

(SEC-HPLC). La presencia de material en forma de partículas y/o una especie de alto peso molecular son indicadores de inestabilidad y, por consiguiente, se consideran indeseables, aunque una solución clara es
5 indicadora de una formulación estable. Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9

Formulación	Post-reconstitución	
	Apariencia	Alto Peso Molecular (%)
10 6A (Comparativo)	Opalescente, partículas	0.3
6B (Comparativo)	Partículas	0
6C (Comparativo)	Clara, sin partículas	0.39
6D (Invención)	Clara, sin partículas	0.05

15 Con base en estos resultados, la composición liofilizada de la invención (es decir, la Formulación 6D) fue solamente la composición que efectivamente previno la formación de material en forma de partículas y especies de alto peso molecular a partir de la liofilización. La
20 composición liofilizada de la invención fue la más estable de las formulaciones probadas.

EJEMPLO 7

Este ejemplo demuestra la estabilidad de una composición liofilizada que comprende un conjugado que

102
+01

comprende el anticuerpo monoclonal huN901 acoplado químicamente al maytansinoide DM1.

Se preparó un conjugado que comprende el anticuerpo monoclonal huN901 acoplado químicamente al maytansinoide DM1 vía un 4- (2- piridilditio) pentanoato (SPP) enlazador ("huN901-SPP-DM1") como se describe en la presente. Se formularon 5 mg/ml del conjugado huN901-SPP-DM1 en ya sea (a) PBS, pH de 6.5 y se almacenó como un líquido o (b) 10 mM de succinato de sodio, sacarosa al 0.5 %, polisorbato al 0.01 %, 250 mM de glicina, pH de 5.5, y se liofilizó como se describe en el Ejemplo 6. Se incubaron las muestras a 4 °C y 25 °C por 6 meses, después de lo cual se probaron por la presencia de partículas, dímeros del conjugado, y especies de fármaco libre como se describe en la presente. Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 10.

20

25

25

20

15

10

5

Tabla 10

Formulación	Apariencia			Partículas (≥ 5 μm)	% de Dímero			% de Fármaco libre			
	Tiempo 0	6 meses			Tiempo Cero	6 meses		Tiempo Cero	6 meses		
		4°C	25°C			25°C	4°C		25°C	4°C	25°C
7A líquido (Comparativo)	Clara	partículas y sedimento	Clara	1122	5.2	8.5	10.1	1.1	1.6	4.9	
7B liofilizado (Invención)	Torta sólida blanca, 20-seg tiempo de reconstitución, solución clara sin partículas	Torta sólida blanca, 18-seg tiempo de reconstitución, solución clara sin partículas	Torta sólida blanca, 16-seg tiempo de reconstitución, solución clara sin partículas	24	3.8	4.1	4.6	0.6	0.6	0.9	

207

Estos resultados demuestran la estabilidad de la composición liofilizada de la invención, como se pone en evidencia por la reducción en partículas, dímeros del conjugado, y fármaco libre en comparación con las composiciones líquidas formuladas en PBS.

Todas las referencias, incluyendo publicaciones, solicitudes de patentes, y patentes, citadas se incorporan a la presente como referencia en la misma medida que si cada referencia fuera individual y específicamente indicada como incorporada como referencia y se exponen íntegramente en la presente.

El uso de los términos "un, uno" y "el, la" y similares referentes en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) son para ser construidos para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en la presente o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye", y "que contiene" se construyeron como términos de finalidad abierta (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a") a menos que se haga notar de otra manera. La cita de intervalos de valores en la presente es meramente

105
~~104~~

prevista para servir como un método abreviado de
mencionar individualmente a cada valor separado que caiga
en el intervalo, a menos que se indique de otra manera en
la presente, y cada valor separado es incorporado en la
5 especificación como si fuera citado individualmente en la
presente. Todos los métodos descritos en la presente
pueden ser realizados en cualquier orden adecuado a
menos que se indique de otra manera o se contradiga
claramente de otra manera en el contexto. El uso de
10 alguno y de todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por
ejemplo, "tal como") proporcionado en la presente, es
previsto meramente para iluminar mejor la invención y no
presenta una limitación en el alcance de la invención a
menos que se reclamar de otra manera. Ningún lenguaje en
15 la especificación se construyó como indicador de
cualquier elemento no reclamado como esencial a la
práctica de la invención.

Se describen en la presente modalidades preferidas
de la invención, incluyendo el mejor modo de conocer a
20 los inventores para llevar a cabo la invención.
Variaciones de las modalidades preferidas pueden ser
obvias para los expertos en la materia a partir de la
lectura de la descripción anterior. Los inventores
esperan que los expertos empleen dichas variaciones como
25 apropiadas, y los inventores pretenden que la invención

106
105

sea practicada de otra manera diferente a como se describe específicamente en la presente. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del tema citado en las
5 reivindicaciones anexas a la presente como permitidas por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos está abracada por la invención a menos que se indique de otra manera en la
10 presente o se contradiga claramente en el contexto.

15

20

25

107
+06**NOVEDAD DE LA INVENCION**

Habiendo descrito la presente invención, se
5 considera como novedad, y por lo tanto se reclama como
propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1. Una composición caracterizada porque comprende
(i) una cantidad efectiva terapéuticamente de un
conjugado que comprende un anticuerpo acoplado
químicamente a un maytansinoide, (ii) un agente regulador,
(iii) un surfactante, (iv) una cantidad tonicificante de
15 cloruro de sodio, y (v) agua, en donde la composición
tiene un pH de aproximadamente 5 - 6.

2. La composición de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizada porque la concentración
del conjugado en la composición es de aproximadamente 0.1
20 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml.

3. La composición de conformidad con la
reivindicación 2, caracterizada porque la concentración
del conjugado en la composición es de aproximadamente 1
mg/ml o más.

108
f07

4. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la concentración del conjugado en la composición es de aproximadamente 5 mg/ml.

5 5. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, caracterizada porque el agente regulador es seleccionado del grupo que consiste de un regulador de citrato, un regulador de acetato, un regulador de succinato, un regulador de fosfato, y un
10 regulador de histidina.

6. La composición de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la concentración del agente regulador en la composición es de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM.

15 7. La composición de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque la composición comprende un regulador de citrato de sodio en una concentración de aproximadamente 10 mM y el pH de la composición es de aproximadamente 5.5.

20 8. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1.- 7, caracterizada porque el surfactante es polisorbato 20 o polisorbato 80.

9. La composición de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque la concentración
25 del surfactante en la composición es de aproximadamente

0.002 % a aproximadamente 0.1 % del volumen total de la composición.

10. La composición de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque el surfactante es
5 polisorbato 20.

11. La composición de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque la concentración de polisorbato 20 en la composición es de aproximadamente 0.01 % del volumen total de la composición.

10 12. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11, caracterizada porque la concentración de cloruro de sodio en la composición es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM.

13. La composición de conformidad con la
15 reivindicación 12, caracterizada porque la concentración de cloruro de sodio en la composición es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM.

14. La composición de conformidad con la
20 reivindicación 13, caracterizada porque la concentración de cloruro de sodio en la composición es de aproximadamente 120 mM.

15. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la composición comprende (i) aproximadamente 5 mg/ml de un conjugado que
25 comprende huN901 acoplado químicamente a DM1, (ii)

110
~~109~~

aproximadamente 10 mM de regulador de citrato de sodio,
(iii) aproximadamente polisorbato 20 al 0.01 %, (iv)
aproximadamente 120 mM de cloruro de sodio, y (v) agua,
en donde el pH de la composición es de aproximadamente
5 5.5.

16. La composición de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizada porque comprende (i)
aproximadamente 1 mg/ml o más de un conjugado que
comprende huMy9-6 acoplado químicamente a DM1,
10 (ii) aproximadamente 10 mM de regulador de citrato de
sodio, (iii) polisorbato 20 al 0.01 %, (iv)
aproximadamente 135 mM de cloruro de sodio, y (v) agua,
en donde el pH de la composición es de aproximadamente
5.5.

15 17. La composición de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizada porque comprende (i)
aproximadamente 1 mg/ml o más de un conjugado que
comprende huMy9-6 acoplada químicamente a DM4, (ii)
aproximadamente 10 mM de regulador de citrato de sodio,
20 (iii) aproximadamente 0.01 % de polisorbato 20, (iv)
aproximadamente 135 mM de cloruro de sodio, y (v) agua,
en donde el pH de la composición es de aproximadamente
5.5.

18. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 17, caracterizada porque la composición comprende adicionalmente un antioxidante.

19. La composición de conformidad con la
5 reivindicación 18, caracterizada porque la concentración del antioxidante en la composición es de aproximadamente 100 μ M a aproximadamente 100 mM.

20. La composición de conformidad con la
10 reivindicación 19, caracterizada porque el antioxidante es seleccionada del grupo que consiste de superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, tocotrienoles, polifenoles, zinc, manganeso, selenio, vitamina C, vitamina E, beta caroteno, cisteína, y metionina.

21. La composición de conformidad con la
15 reivindicación 20, caracterizada porque el antioxidante es metionina.

22. La composición de conformidad con la
reivindicación 21, caracterizada porque la concentración de metionina en la composición es de aproximadamente 10
20 mM.

23. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 22, caracterizada porque la composición comprende sacarosa.

24. La composición de conformidad con la
25 reivindicación 23, caracterizada porque la concentración

112

de sacarosa en la composición es de aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 10 % del volumen total de la composición.

25. La composición de conformidad con la reivindicación 24, caracterizada porque la concentración de sacarosa en la composición es de aproximadamente 5 % del volumen total de la composición.

26. Una composición empacada caracterizada porque comprende un contenedor sellado y dispersa en él la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 26 y una capa sobrepuesta de gas inerte.

27. La composición empacada de conformidad con la reivindicación 26, caracterizada porque el gas inerte es nitrógeno o argón.

28. Un método para destruir una célula en un humano caracterizada porque comprende administrar al humano una composición que comprende (i) una cantidad efectiva terapéuticamente de un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide, (ii) un agente regulador, (iii) un surfactante, (iv) una cantidad tonicificante de cloruro de sodio, y (v) agua, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5 - 6, de modo que el anticuerpo enlaza a la superficie de

la célula y se activa la citotoxicidad del maytansinoide, con lo cual la células es destruida.

29. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque la concentración del conjugado en la composición es de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml.

30. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque la concentración del conjugado en la composición es de aproximadamente 1 mg/ml o más.

10 31. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque la concentración del conjugado en la composición es de aproximadamente 5 mg/ml.

32. El método de conformidad con la reivindicación 28 - 31, caracterizado porque el surfactante es 15 polisorbato 20 o polisorbato 80.

33. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el surfactante es polisorbato 20.

34. El método de conformidad con cualquiera de las 20 reivindicaciones 28 - 33, caracterizado porque la composición comprende adicionalmente un antioxidante.

35. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el antioxidante es seleccionado del grupo que consiste de superóxido dismutasa, glutatión 25 peroxidasa, tocotrienoles, polifenoles, zinc, manganeso,

114
H3

selenio, vitamina C, vitamina E, beta caroteno, cisteína, y metionina.

36. El método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque el antioxidante es metionina.

5 37. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 - 36, caracterizado porque la composición comprende sacarosa.

38. Una composición liofilizada caracterizada porque comprende (i) una cantidad efectiva terapéuticamente de
10 un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide, (ii) un agente regulador, (iii) un surfactante, (iv) un crioprotector, y (v) un ingrediente de carga, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5 - 6 cuando es
15 reconstituida con agua.

39. La composición de conformidad con las reivindicaciones 1 - 14 o la reivindicación 38, caracterizada porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

20 40. La composición de conformidad con la reivindicación 39, caracterizada porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.

41. La composición de conformidad con la reivindicación 39, caracterizada porque el anticuerpo es
25 seleccionado del grupo que consiste de huN901, huMy9-6,

huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab.

42. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14 o las reivindicaciones 38 - 5 41, caracterizada porque el maytansinoide comprende un grupo tiol.

43. La composición de conformidad con la reivindicación 42, caracterizada porque el maytansinoide es DM1.

10 44. La composición de conformidad con la reivindicación 42, caracterizada porque el maytansinoide es DM4.

45. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14 o 38 - 44, caracterizada 15 porque el anticuerpo es acoplado químicamente al maytansinoide vía enlaces químicos seleccionados del grupo que consiste de enlaces disulfuro, enlaces ácido lábiles, enlaces fotolábiles, enlaces peptidasa lábiles, enlaces tioéter, y enlaces estearasa lábiles.

20 46. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 38-45, caracterizada porque el agente regulador es seleccionado del grupo que consiste de un regulador de citrato, un regulador de acetato, un regulador de succinato, un regulador de fosfato, y un 25 regulador de histidina.

47. La composición de conformidad con la reivindicación 46, caracterizada porque la composición comprende aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 2 mg del agente regulador por mg del conjugado.

5 48. La composición de conformidad con la reivindicación 47, caracterizada porque la composición comprende aproximadamente 0.3 mg de regulador de succinato de sodio por mg del conjugado.

49. La composición de conformidad con cualquiera de
10 las reivindicaciones 38 - 48, caracterizada porque el surfactante es polisorbato 20 o polisorbato 80.

50. La composición de conformidad con la reivindicación 49, caracterizada porque la composición comprende aproximadamente 0.005 mg a aproximadamente 0.1
15 mg del surfactante por mg del conjugado.

51. La composición de conformidad con la reivindicación 50, caracterizada porque el surfactante es polisorbato 20.

52. La composición de conformidad con la
20 reivindicación 51, caracterizada porque la composición comprende aproximadamente 0.02 mg de polisorbato 20 por mg del conjugado.

53. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 38 - 52, caracterizada porque la
25 composición comprende aproximadamente 0.5 mg a

117
176

aproximadamente 5 mg del crioprotector por mg del conjugado.

54. La composición de conformidad con la reivindicación 53, caracterizada porque el crioprotector es sacarosa.

55. La composición de conformidad con la reivindicación 54, caracterizada porque la composición comprende aproximadamente 1 mg de sacarosa por mg del conjugado.

56. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 38 - 55, caracterizada porque la composición comprende aproximadamente 2 mg a aproximadamente 20 mg del ingrediente de carga por mg del conjugado.

57. La composición de conformidad con la reivindicación 56, caracterizada porque el ingrediente de carga es glicina.

58. La composición de conformidad con la reivindicación 57, caracterizada porque la composición comprende aproximadamente 3.8 mg de glicina por mg del conjugado.

59. La composición de conformidad con la reivindicación 38, caracterizada porque la composición comprende (i) un conjugado que comprende huN901 acoplado químicamente a DM1, (ii) aproximadamente 0.3 mg de

regulador de succinato de sodio por mg de conjugado, (iii) aproximadamente 0.02 mg de polisorbato 20 por mg del conjugado, (iv) aproximadamente 1 mg de sacarosa por mg del conjugado, y (v) aproximadamente 3.8 mg de glicina 5 por mg del conjugado.

60. Un método para destruir una célula en un humano, caracterizado porque comprende (a) proporcionar la composición liofilizada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 38 - 59, (b) añadir agua a la 10 composición liofilizada para proporcionar una composición reconstituida, y (c) administrar la composición reconstituida al humano de modo que el anticuerpo enlace a la superficie de la célula y la citotoxicidad del maytansinoide es activada, con lo cual la célula es 15 destruida.

61. El método de conformidad con las reivindicaciones 28 - 37 o la reivindicación 60, caracterizado porque la células es una célula tumoral.

62. El método de conformidad con las 20 reivindicaciones 28 - 37 o las reivindicaciones 60 - 61, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

63. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo 25 monoclonal humanizado.

64. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque el anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste de huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab y rituximab.

5 65. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 - 64, caracterizado porque el maytansinoide comprende un grupo tiol.

66. El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el maytansinoide es DM1.

10 67. El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el maytansinoide es DM4.

68. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 - 37 o las reivindicaciones 60 - 67, caracterizado porque el anticuerpo es acoplado
15 químicamente al maytansinoide vía enlaces químicos seleccionados del grupo que consiste de enlaces disulfuro, enlaces ácido lábiles, enlaces fotolábiles, enlaces peptidasa lábiles, enlaces tioéteres, y enlaces estearasa lábiles.

20 69. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 - 37 o cualquiera de las reivindicaciones 60 - 68, caracterizado porque el anticuerpo enlaza a un antígeno presente sobre la superficie de la célula.

70. El método de conformidad con la reivindicación 69, caracterizado porque el antígeno es seleccionado del grupo que consiste de NCAM/CD56, CD33, CD19, GD₃, CanAg, PSMA, receptor de alfa-folato, Her2/neu, CD44v6, antígeno
5 pancreático fetoacinar (FAP), Cripto-1, CA6, CD20, CA55.1, MN/CAI X, proteoglican sulfato de condroitina.

71. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 - 70, caracterizado porque la concentración del conjugado en la composición
10 reconstituida es de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml.

72. El método de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque la concentración del conjugado en la composición reconstituida es de aproximadamente 1
15 mg/ml o más.

73. El método de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque la concentración del conjugado en la composición reconstituida es de aproximadamente 5 mg/ml.

20 74. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 - 73, caracterizado porque el agente regulador es seleccionado del grupo que consiste de un regulador de citrato, un regulador de acetato, un regulador de succinato, un regulador de fosfato, y un
25 regulador de histidina.

121
720

75. El método de conformidad con la reivindicación 74, caracterizado porque la concentración del agente regulador en la composición reconstituida es de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM.

5 76. El método de conformidad con la reivindicación 75, caracterizado porque la composición reconstituida comprende un regulador de succinato de sodio en una concentración de aproximadamente 10 mM y el pH de la composición reconstituida es de aproximadamente 5.5.

10 77. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 - 76, caracterizado porque el surfactante es polisorbato 20 o polisorbato 80.

15 78. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque la concentración del surfactante en la composición reconstituida es de aproximadamente 0.002 % a aproximadamente 0.1 % del volumen total de la composición reconstituida.

20 79. El método de conformidad con la reivindicación 78, caracterizada porque el surfactante es polisorbato 20.

80. El método de conformidad con la reivindicación 89, caracterizado porque la concentración de polisorbato 20 en la composición reconstituida es de aproximadamente 0.01 % del volumen total de la composición reconstituida.

81. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 -80, caracterizado porque la concentración del crioprotector en la composición reconstituida es de aproximadamente 0.1 % a 5 aproximadamente 3 % del volumen total de la composición reconstituida.

82. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el crioprotector es sacarosa.

83. El método de conformidad con la reivindicación 10 82, caracterizado porque la concentración de sacarosa en la composición reconstituida es de aproximadamente 0.5 % del volumen total de la composición reconstituida.

84. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 - 83, caracterizado porque la 15 concentración del ingrediente de carga en la composición reconstituida es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM.

85. El método de conformidad con la reivindicación 84, caracterizado porque el ingrediente de carga es 20 glicina.

86. El método de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado porque la concentración de glicina en la composición reconstituida es de aproximadamente 250 mM.

87. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 - 37 o las reivindicaciones 60 - 86, caracterizado porque la composición es administrada al humano intravenosa, intraperitoneal, o intratumoralmente.

5 88. Una composición caracterizada porque comprende (i) una cantidad efectiva terapéuticamente de un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide, (ii) un agente regulador, (iii) una cantidad tonicificante de cloruro de
10 sodio, y (iv) agua, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5 - 6.

89. Un método para destruir una célula en un humano caracterizado porque comprende administrar al humano una composición que comprende (i) una cantidad efectiva
15 terapéuticamente de un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide, (ii) un agente regulador, (iii) una cantidad tonicificante de cloruro de sodio, y (iv) agua, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5 - 6, de modo que el
20 anticuerpo enlaza a la superficie de la célula y la citotoxicidad del maytansinoide es activada, con lo cual la célula es destruida.

90. Una composición liofilizada caracterizada porque comprende (i) una cantidad efectiva terapéuticamente de
25 un conjugado que comprende un anticuerpo acoplado

químicamente a un maytansinoide, (ii) un agente regulador, (iii) un crioprotector, y (iv) un ingrediente de carga, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5 - 6 cuando es reconstituida con agua.

5

10

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona una composición líquida y una composición liofilizada que comprende una cantidad efectiva terapéuticamente de un conjugado que comprende
5 un anticuerpo acoplado químicamente a un maytansinoide. La invención proporciona adicionalmente un método para destruir una célula en un humano que comprende administrar al humano cualquiera de las composiciones de modo que el anticuerpo enlace a la superficie de la
10 célula y es activada la citotoxicidad del maytansinoide, con lo cual es destruida la célula.

15

20

25

3
126
~~125~~

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 228670	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2004/015376	International filing date (day/month/year) 14/05/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 14/05/2003
Applicant IMMUNOGEN, INC.		

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

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.

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

1. Basis of the report

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

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

b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

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

LEYDIG, VOIT & MAYER
RECEIVED

JUN 24 2005

PAT/TM Due Date _____

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 36.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

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

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

LAH

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/015376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/001587 A1 (ERICKSON SHARON ET AL) 3 January 2002 (2002-01-03) page 20 - page 23	1-90
X	WO 01/00244 A (GENENTECH, INC; ERICKSON, SHARON; SCHWALL, RALPH; SLIWKOWSKI, MARK, X) 4 January 2001 (2001-01-04) page 37 - page 42	1-90
	— — — — — — / —	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 June 2005

Date of mailing of the international search report

16/06/2005

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentstrasse 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pinheiro Vieira, E

127
26

128
TCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/015376

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 28-37,60,61-87,89 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

129
728

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/015376

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002001587	A1	03-01-2002	AU 5632900 A	31-01-2001
			BR 0012196 A	19-03-2002
			CA 2370466 A1	04-01-2001
			CN 1387444 A	25-12-2002
			EP 1191944 A2	03-04-2002
			HU 0201616 A2	28-08-2002
			JP 2003503365 T	28-01-2003
			MX PA01013240 A	21-06-2002
			NZ 515975 A	30-01-2004
			PL 352678 A1	08-09-2003
			WO 0100244 A2	04-01-2001
			US 2002035736 A1	21-03-2002
WO 0100244	A	04-01-2001	AU 5632900 A	31-01-2001
			AU 5763200 A	31-01-2001
			BR 0012196 A	19-03-2002
			BR 0012198 A	02-04-2002
			CA 2370466 A1	04-01-2001
			CA 2376596 A1	04-01-2001
			CH 694589 A5	15-04-2005
			CN 1387444 A	25-12-2002
			CN 1370082 A	18-09-2002
			CZ 20014596 A3	12-02-2003
			DE 10084743 T0	14-08-2002
			EP 1191944 A2	03-04-2002
			EP 1189641 A2	27-03-2002
			GB 2368796 A ,B	15-05-2002
			HU 0201616 A2	28-08-2002
			HU 0201695 A2	28-09-2002
			JP 2003503365 T	28-01-2003
			JP 2003503366 T	28-01-2003
			MX PA01013240 A	21-06-2002
			MX PA01013458 A	30-07-2002
			NO 20016329 A	25-02-2002
			NZ 515975 A	30-01-2004
			NZ 516830 A	30-07-2004
			PL 352321 A1	11-08-2003
			PL 352678 A1	08-09-2003
			TR 200103756 T2	21-06-2002
			WO 0100244 A2	04-01-2001
			WO 0100245 A2	04-01-2001
			US 2003086924 A1	08-05-2003
			US 2004013667 A1	22-01-2004
			ZA 200109786 A	28-11-2002
			ZA 200110263 A	13-12-2002
			US 2002035736 A1	21-03-2002
			US 2002001587 A1	03-01-2002
WO 0124763	A	12-04-2001	AU 775373 B2	29-07-2004
			AU 7988500 A	10-05-2001
			CA 2385528 A1	12-04-2001
			EP 1229934 A2	14-08-2002
			JP 2003528034 T	24-09-2003
			WO 0124763 A2	12-04-2001
WO 9704801	A	13-02-1997	US 6267958 B1	31-07-2001
			AT 225185 T	15-10-2002
			AU 716785 B2	09-03-2000

127
130

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/015376

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9704801	A	AU 6599296 A	26-02-1997
		AU 715338 B2	20-01-2000
		AU 6638196 A	26-02-1997
		BR 9609743 A	02-03-1999
		CA 2226575 A1	13-02-1997
		CA 2226624 A1	13-02-1997
		CN 1191490 A ,C	26-08-1998
		CN 1539505 A	27-10-2004
		DE 69624116 D1	07-11-2002
		DE 69624116 T2	18-06-2003
		DK 841946 T3	10-02-2003
		EP 1516628 A1	23-03-2005
		EP 0845997 A1	10-06-1998
		EP 0841946 A1	20-05-1998
		ES 2186796 T3	16-05-2003
		IL 122733 A	13-09-2001
		IL 122910 A	23-05-2002
		JP 11510170 T	07-09-1999
		JP 11510172 T	07-09-1999
		NO 980335 A	26-03-1998
		NZ 313503 A	28-01-2000
		NZ 500539 A	30-11-2001
		PT 841946 T	28-02-2003
		RU 2229288 C2	27-05-2004
		WO 9704801 A1	13-02-1997
		WO 9704807 A1	13-02-1997
		US 2001014326 A1	16-08-2001
		ZA 9606075 A	19-01-1998
		ZA 9606240 A	23-01-1998
		US 2003202972 A1	30-10-2003
		US 6821515 B1	23-11-2004

4
131
130

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

To:

see form PCT/ISA/220

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2004/015376

International filing date (day/month/year)
14.05.2004

Priority date (day/month/year)
14.05.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K47/48

Applicant
IMMUNOGEN, INC.

LEYDIG, VOLT & MAYER
RECEIVED

JUN 24 2005

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

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
☒ Box No. II Priority
☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☐ Box No. IV Lack of unity of invention
☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐ Box No. VI Certain documents cited
☐ Box No. VII Certain defects in the international application
☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

PAT/TM Due Date 9-16-05

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 56.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

To: JB2 cc: ImmunoGen
LVM 228670

JMG

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523856 apmu d
Fax: +49 89 2399 - 4485

Authorized Officer

Pinhoiro Vieira, E

Telephone No. +49 89 2399-7865

LAH



132

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/015376

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ in written format
 - ☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

..

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

132
133

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/015376

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 28-37,60,61-87,89

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 28-37,60,61-87,89 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
- the written form ☐ has not been furnished
☐ does not comply with the standard
- the computer readable form ☐ has not been furnished
☐ does not comply with the standard
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2004/015376

Re Item III.

III.1 Claims 28-37, 60, 61-87, 89 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V.

V.1 Reference is made to the following documents:

D1 : US 2002/001587 A1 (ERICKSON SHARON ET AL) 3 January 2002

D2 : WO 01/00244 A (GENENTECH, INC; ERICKSON, SHARON; SCHWALL, RALPH; SLIWKOWSKI, MARK, X) 4 January 2001 (2001-01-04)

D3 : WO 01/24763 A (IMMUNOGEN, INC; CHARI, RAVI, V., J) 12 April 2001

D4 : WO 97/04801 A (GENENTECH, INC) 13 February 1997 (1997-02-13)

V.2 D1 concerns a composition comprising a maytansinoid-antibody conjugate a buffer (e.g. sodium succinate at pH 5.0), a surfactant (e.g. polysorbate), a bulking agent, sodium chloride, and sucrose.

D2 discloses maytansinoid-antibody conjugates and compositions comprising the same where the compositions contain a buffer, a surfactant, a cryoprotectant, a bulking agent, and salt-forming counter-ions such as sodium.

D3 concerns a composition comprising a conjugate (antibody+maytansinoid), buffering agent (phosphate), surfactant (ethanol), sodium chloride, water at a pH of about 6.5..

D4 concerns stable lyophilized protein formulations which can be reconstituted with a suitable diluent to generate a high protein concentration reconstituted formulation, suitable for subcutaneous administration.

V.2 Novelty, inventive step and Industrial applicability (Art. 33 PCT).

2.1 The present application concerns a composition comprising a maytansinoid antibody conjugate, a buffering agent, a surfactant, NaCl, water where the composition has a pH of about 5-6; a lyophilized composition comprising a maytansinoid-antibody

134
135

Agents' Reference 228670

IN THE IPEA/EP

International application No. PCT/US2004/015376	International filing date (<i>day/month/year</i>) 14 May 2004 (14.05.2004)	(Earliest) Priority date (<i>day/month/year</i>) 14 May 2003 (14.05.2003)
Title of invention DRUG CONJUGATE COMPOSITION		
Applicant(s) IMMUNOGEN, INC.		

RESPONSE TO WRITTEN OPINION

IPEA/EP
Attention: Examiner Pinheiro
D-80298 Munich
GERMANY

Dear Examiner Vieira E. Pinheiro,

In response to the Written Opinion dated June 16, 2005, please find enclosed substitute sheets numbered 30-38. Please also consider the following remarks.

Substitute Sheets

The substitute sheets serve to effect amendments to the claims. Originally filed independent claims 1, 28, 38, and 90 (now claims 1, 27, 37, and 86) have been amended to incorporate specific buffering agents that were originally present in now cancelled dependent claims. The amended claims are fully supported in the originally filed specification. Originally filed claims 5, 8, 32, 46, 49, 74, 77, and 88-89 have been cancelled. The remaining claims have been re-numbered so that they are consecutive, and their dependencies have been amended accordingly. No new matter has been added.

The Written Opinion

The IPEA asserts that original claims 1-90 (now claims 1-88) lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by Erickson et al. (U.S. Patent Application No. 2002/001587), Genentech (WO 01/00244), ImmunoGen (WO 01/24763), and Genentech (WO 97/04801), which are referenced to as D1-D4, respectively. The IPEA asserts that original claims 1-90 (now claims 1-88) lack an inventive step under PCT Article 33(3) as

136
~~135~~

International application No. PCT/US2004/015376

LVM 228670

being obvious in view of the above-identified documents, cited in the international search report. The IPEA considers original claims 28-37, 60-87, and 89 (now claims 27-36, 60-85) to lack industrial applicability under PCT Article 33(4). Reconsideration is hereby requested.

The Present Invention

The present invention, as defined by the amended claim set, is a composition comprising an antibody-maytansinoid conjugate, a particular buffering agent, a surfactant, sodium chloride, and water, at a pH of about 5-6, as well as a related lyophilized composition with and without a surfactant, and related methods of using such compositions. The inventive compositions have improved stability as compared to other compositions, as evidenced by the data set forth in the application (see Examples).

Discussion of Examiner's Observations

Originally filed independent claims 1, 28, 38, and 90 (now claims 1, 27, 37 and 86) have been amended to recite specific buffering agents in the inventive composition. None of the cited references discloses or suggests a composition with the particular combination of components recited in the pending claims, and, therefore, the pending claims define novel and inventive subject matter.

D1 discloses an ErbB receptor antibody-maytansinoid immunoconjugate. However, D1 provides no direction to assist one skilled in the art in choosing particular agents for the antibody-maytansinoid conjugate composition, let alone the particular combination of recited components in the pending claims. D1 discloses a laundry list of carriers, excipients, and stabilizers such as buffers, as well as antioxidants, preservatives, low molecular weight polypeptides, proteins, hydrophilic polymers, amino acids, disaccharides, chelating agents, sugars, salt-forming counter-ions, metal complexes, and non-ionic surfactants, etc. (see pages 22-23, especially paragraph 0202). Such a list gives only general guidance as to how to formulate pharmaceutical compositions and does not address the specific requirements of formulating a composition containing an antibody-drug conjugate. Given the enormous number of potential combinations of the listed carriers, excipients, and stabilizers and the absence of further guidance in D1 as to which are preferred, this general guidance cannot be considered as disclosing or suggesting the compositions of the present invention.

137
136

D1, thus, provides little practical direction to assist one skilled in the art in choosing particular agents for formulation of an antibody-maytansinoid conjugate composition, let alone the particular combination of recited components in the pending claims, nor does it disclose the final pH at which the formulation will work. Yet the choice of components and final pH range are quite important. As shown in the examples of the instant application as well as the accompanying declaration of Godfrey Amphlett, the antibody-maytansinoid conjugate formulations containing the claimed buffers exhibited increased stability, and those formulations that did not contain those buffers had decreased stability. Therefore, D1 is not an anticipatory reference, nor does it render obvious the present invention.

D2 is virtually identical to D1 and suffers the same deficiencies. D2 does not teach or suggest the particular combination of components recited in the pending claims. Therefore, D2 is not an anticipatory reference, nor does it render obvious the present invention.

D3 teaches an antibody-drug conjugate used in combination with an additional chemotherapeutic agent. While D3 discloses that the immunoconjugate and the chemotherapeutic agent may be used with suitable pharmaceutically acceptable carriers, diluents, and/or excipients, such as Dulbecco's phosphate buffer, saline, or dextrose (see page 29, lines 13-27), D3 does not disclose or suggest the particular combination of components recited in the pending claims. Therefore, D3 does not anticipate or render obvious the present invention.

D4 discloses lyophilized protein compositions. While the protein may be an antibody, D4 does not teach or suggest a composition containing an antibody-maytansinoid immunoconjugate, let alone a composition containing the particular combination of components recited in the pending claims. Therefore, D4 does not anticipate or render obvious the present invention.

As regards the observations concerning industrial applicability, Applicant will address any industrial applicability issues in the regional/national phase.

Conclusion

In view of the amendments and remarks, the application is considered to be in good and proper form, and the Examiner is respectfully requested to indicate the acceptability of the present application in the International Preliminary Examination Report. If, in the opinion of

138
137

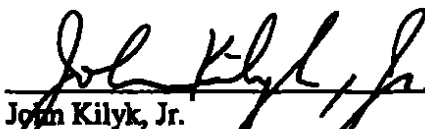
International application No. PCT/US2004/015376

LVM 228670

the Examiner, a telephone conference would be of assistance in considering the present application, the Examiner is invited to call the undersigned attorney.

Respectfully submitted,

By:


John Kilyk, Jr.
Agent for the Applicant
LEYDIG, VOIT & MAYER, LTD.
Two Prudential Plaza, Suite 4900
Chicago, Illinois 60601-6780 (US)
(312) 616-5600 (telephone)
(312) 616-5700 (facsimile)

Date: September 16, 2005

139
138

International application No. PCT/US2004/015376

LVM 228670

SUBSTITUTE SHEETS FOLLOW

1. A composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, and a histidine buffer, (iii) a surfactant, (iv) a tonicifying amount of sodium chloride, and (v) water, wherein the composition has a pH of about 5-6.
2. The composition of claim 1 wherein the surfactant is selected from the group consisting of polysorbate 20 and polysorbate 80.
3. The composition of any of claims 1-2, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 0.1 mg/mL to about 5 mg/mL.
4. The composition of claim 3, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 1 mg/mL or more.
5. The composition of claim 3, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 5 mg/mL.
6. The composition of any of claims 1-5, wherein the concentration of the buffering agent in the composition is about 2 mM to about 50 mM.
7. The composition of claim 6, wherein the composition comprises a sodium citrate buffer at a concentration of about 10 mM and the pH of the composition is about 5.5.
8. The composition of any of claims 1-7, wherein the concentration of the surfactant in the composition is about 0.002% to about 0.1% of the total volume of the composition.
9. The composition of any of claims 1-8, wherein the surfactant is polysorbate 20.
10. The composition of claim 9, wherein the concentration of polysorbate 20 in the composition is about 0.01% of the total volume of the composition.
11. The composition of any of claims 1-10, wherein the concentration of sodium chloride in the composition is about 50 mM to about 500 mM.

141
#40

12. The composition of claim 11, wherein the concentration of sodium chloride in the composition is about 100 mM to about 200 mM.

13. The composition of claim 12, wherein the concentration of sodium chloride in the composition is about 120 mM.

14. The composition of claim 1, wherein the composition comprises (i) about 5 mg/mL of a conjugate comprising huN901 chemically coupled to DM1, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 120 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH of the composition is about 5.5.

15. The composition of claim 1, wherein the composition comprises (i) about 1 mg/mL or more of a conjugate comprising huMy9-6 chemically coupled to DM1, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 135 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH of the composition is about 5.5.

16. The composition of claim 1, wherein the composition comprises (i) about 1 mg/mL or more of a conjugate comprising huMy9-6 chemically coupled to DM4, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 135 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH of the composition is about 5.5.

17. The composition of any of claims 1-16, wherein the composition further comprises an antioxidant.

18. The composition of claim 17, wherein the concentration of the antioxidant in the composition is about 100 μ M to about 100 mM.

19. The composition of claim 18, wherein the antioxidant is selected from the group consisting of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, tocotrienols, polyphenols, zinc, manganese, selenium, vitamin C, vitamin E, beta carotene, cysteine, and methionine.

20. The composition of claim 19, wherein the antioxidant is methionine.

21. The composition of claim 20, wherein the concentration of methionine in the composition is about 10 mM.

142
#41

22. The composition of any of claims 1-21, wherein the composition comprises sucrose.

23. The composition of claim 22, wherein the concentration of sucrose in the composition is about 0.1% to about 10% of the total volume of the composition.

24. The composition of claim 23, wherein the concentration of sucrose in the composition is about 5% of the total volume of the composition.

25. A packaged composition comprising a sealed container and dispersed therein the composition of any of claims 1-24 and an inert gas overlay.

26. The packaged composition of claim 25, wherein the inert gas is nitrogen or argon.

27. A method for killing a cell in a human comprising administering to the human a composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, and a histidine buffer, (iii) a surfactant, (iv) a tonicifying amount of sodium chloride, and (v) water, wherein the composition has a pH of about 5-6, such that the antibody binds to the surface of the cell and the cytotoxicity of the maytansinoid is activated, whereby the cell is killed.

28. The method of claim 27 wherein the surfactant is selected from the group consisting of polysorbate 20 and polysorbate 80.

29. The method of claim 28, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 0.1 mg/mL to about 5 mg/mL.

30. The method of claim 29, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 1 mg/mL or more.

31. The method of any of claims 28-29, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 5 mg/mL.

32. The method of any of claims 28-29, wherein the surfactant is polysorbate 20.

143
+42

33. The method of any of claims 27-32, wherein the composition further comprises an antioxidant.
34. The method of claim 33, wherein the antioxidant is selected from the group consisting of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, tocotrienols, polyphenols, zinc, manganese, selenium, vitamin C, vitamin E, beta carotene, cysteine, and methionine.
35. The method of claim 34, wherein the antioxidant is methionine.
36. The method of any of claims 23-35, wherein the composition comprises sucrose.
37. A lyophilized composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent is selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, and a histidine buffer, (iii) a surfactant, (iv) a cryoprotectant, and (v) a bulking agent, wherein the composition has a pH of about 5-6 when reconstituted with water.
38. The composition of claim 37 wherein the surfactant is selected from the group consisting of polysorbate 20 and polysorbate 80.
39. The composition of any of claims 1-13 or claim 37, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
40. The composition of claim 39, wherein the antibody is a humanized monoclonal antibody.
41. The composition of claim 38, wherein the antibody is selected from the group consisting of huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, and rituximab.
42. The composition of any of claims 1-13 or claims 37-41, wherein the maytansinoid comprises a thiol group.
43. The composition of claim 42, wherein the maytansinoid is DM1.
44. The composition of claim 42, wherein the maytansinoid is DM4.

144
+43

45. The composition of any of claims 1-13 or 37-44, wherein the antibody is chemically coupled to the maytansinoid via chemical bonds selected from the group consisting of disulfide bonds, acid labile bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds, thioether bonds, and esterase labile bonds.

46. The composition of any of claims 37-45, wherein the composition comprises about 0.1 mg to about 2 mg of the buffering agent per mg of the conjugate.

47. The composition of claim 46, wherein the composition comprises about 0.3 mg sodium succinate buffer per mg of the conjugate.

48. The composition of any of claims 37-47, wherein the composition comprises about 0.005 mg to about 0.1 mg of the surfactant per mg of the conjugate.

49. The composition of any of claims 38-48, wherein the surfactant is polysorbate 20.

50. The composition of claim 49, wherein the composition comprises about 0.02 mg polysorbate 20 per mg of the conjugate.

51. The composition of any of claims 37-50, wherein the composition comprises about 0.5 mg to about 5 mg of the cryoprotectant per mg of the conjugate.

52. The composition of any of claims 37-51, wherein the cryoprotectant is selected from the group consisting of glycerol, dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol, dextran, glucose, and trehalose.

53. The composition of any of claims 37-52, wherein the bulking agent is selected from the group consisting of glycine, mannitol and dextran.

54. The composition of claim 51, wherein the cyroprotectant is sucrose.

55. The composition of claim 54, wherein the composition comprises about 1 mg sucrose per mg of the conjugate.

145
H/t

56. The composition of any of claims 37-55, wherein the composition comprises about 2 mg to about 20 mg of the bulking agent per mg of the conjugate.

57. The composition of claim 56, wherein the bulking agent is glycine.

58. The composition of claim 57, wherein the composition comprises about 3.8 mg glycine per mg of the conjugate.

59. The composition of claim 37, wherein the composition comprises (i) a conjugate comprising huN901 chemically coupled to DM1, (ii) about 0.3 mg sodium succinate buffer per mg of the conjugate, (iii) about 0.02 mg polysorbate 20 per mg of the conjugate, (iv) about 1 mg sucrose per mg of the conjugate, and (v) about 3.8 mg glycine per mg of the conjugate.

60. A method for killing a cell in a human comprising (a) providing the lyophilized composition of any of claims 37-59, (b) adding water to the lyophilized composition to provide a reconstituted composition, and (c) administering the reconstituted composition to the human such that the antibody binds to the surface of the cell and the cytotoxicity of the maytansinoid is activated, whereby the cell is killed.

61. The method of any of claims 27-36 or claim 60, wherein the cell is a tumor cell.

62. The method of any of claims 27-36 or claims 60-61, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

63. The method of claim 62, wherein the antibody is a humanized monoclonal antibody.

64. The method of claim 62, wherein the antibody is selected from the group consisting of huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, and rituximab.

65. The method of any of claims 27-36 or any of claims 60-64, wherein the maytansinoid comprises a thiol group.

66. The method of claim 65, wherein the maytansinoid is DM1.

146
145

67. The method of claim 65, wherein the maytansinoid is DM4.

68. The method of any of claims 27-36 or claims 60-67, wherein the antibody is chemically coupled to the maytansinoid via chemical bonds selected from the group consisting of disulfide bonds, acid labile bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds, thioether bonds, and esterase labile bonds.

69. The method of any of claims 27-36 or any of claims 60-68, wherein the antibody binds to an antigen present on the surface of the cell

70. The method of claim 69, wherein the antigen is selected from the group consisting of NCAM/CD56, CD33, CD19, GD3, CanAg, PSMA, alpha-folate receptor, Her2/neu, CD44v6, fetoacinar pancreatic (FAP) antigen, Cripto-1, CA6, CD20, CA55.1, MN/CA IX, and chondroitin sulfate proteoglycan.

71. The method of any of claims 60-70, wherein the concentration of the conjugate in the reconstituted composition is about 0.1 mg/mL to about 5 mg/mL.

72. The method of claim 71, wherein the concentration of the conjugate in the reconstituted composition is about 1 mg/mL or more.

73. The method of claim 71, wherein the concentration of the conjugate in the reconstituted composition is about 5 mg/mL.

74. The method of any of claims 60-73, wherein the concentration of the buffering agent in the reconstituted composition is about 2 mM to about 50 mM.

75. The method of claim 74, wherein the reconstituted composition comprises a sodium succinate buffer at a concentration of about 10 mM and the pH of the reconstituted composition is about 5.5.

76. The method of any of claims 60-75, wherein the concentration of the surfactant in the reconstituted composition is about 0.002% to about 0.1% of the total volume of the reconstituted composition.

77. The method of claim 76, wherein the surfactant is polysorbate 20.

147
L46

78. The method of claim 77, wherein the concentration of polysorbate 20 in the reconstituted composition is about 0.01% of the total volume of the reconstituted composition.

79. The method of any of claims 60-78, wherein the concentration of the cryoprotectant in the reconstituted composition is about 0.1% to about 3% of the total volume of the reconstituted composition.

80. The method of claim 79, wherein the cyroprotectant is sucrose.

81. The method of claim 80, wherein the concentration of sucrose in the reconstituted composition is about 0.5% of the total volume of the reconstituted composition.

82. The method of any of claims 60-81, wherein the concentration of the bulking agent in the reconstituted composition is about 50 mM to about 500 mM.

83. The method of claim 82, wherein the bulking agent is glycine.

84. The method of claim 83, wherein the concentration of glycine in the reconstituted composition is about 250 mM.

85. The method of any of claims 26-36 or claims 57-84, wherein the composition is administered to the human intravenously, intraperitoneally, or intratumorally.

86. A lyophilized composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, and a histidine buffer, (iii) a cryoprotectant, and (iv) a bulking agent, wherein the composition has a pH of about 5-6 when reconstituted with water.

87. The composition of claim 86, wherein the cryoprotectant is selected from the group consisting of glycerol, dimethyl sufoxide, polyethylene glycol, dextran, glucose, and trehalose.

148
~~147~~

PATENT
LVM Reference No. 228670

IN THE IPEA/EP

International application No. PCT/US2004/015376	International filing date (day/month/year) 14 May 2004 (14.05.2004)	(Earliest) Priority date (day/month/year) 14 May 2003 (14.05.2003)
Title of invention DRUG CONJUGATE COMPOSITION		
Applicant(s) IMMUNOGEN, INC.		

**DECLARATION OF
GODFREY AMPHLETT**

IPRA/EP
Attention: Examiner Pinheiro
D-80298 Munich
GERMANY

I, Godfrey Amphlett, hereby declare that:

1. I am the Executive Director of Process and Product Development of ImmunoGen, Inc., and one of the co-inventors of the subject matter disclosed and claimed in the subject patent application.
2. The effect of the buffer on the stability of an antibody-maytansinoid conjugate was evaluated over time by evaluating compositions comprising an antibody-maytansinoid conjugate and different buffers.
3. In one set of experiments, two sets of the following two compositions were prepared: (1A) 10 mM sodium citrate, 5% sucrose, 130 mM glycine, 0.1% polysorbate 80, pH 5.5, (1B) 10 mM histidine/histidine chloride, 5% sucrose, 130 mM glycine, pH 5.5, with each composition also comprising 5 mg/ml of a conjugate comprising the huC242 monoclonal antibody chemically coupled to the maytansinoid DM4 via an N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate (SPDB) linker ("huC242-SPDB-DM4"). One set of the two compositions was maintained at 2-8° C for 3 months, and the other set of the three compositions was maintained at 25° C for 3 months. The conjugate aggregate content (% all

149
148

Applicant: IMMUNOGEN, INC.
Application No. PCT/US2004/015376

high molecular weight species) of each composition in each set of the two compositions was measured at initial time and at three months. The results are set forth in Table 1.

Table 1: Conjugate Aggregate Content

Formulation	Buffer	Aggregate (%)		
		T ₀	2-8°C, 3 month	25°C, 3 month
1A	Citrate	3.2	3.7	5.9
1B	Histidine	2.4	2.3	3.8

The results shown in Table 1 reflect that Composition 1B (containing histidine buffer) is at least as effective as Composition 1A (containing citrate buffer) at preventing aggregate formation on storage, thus demonstrating the stabilizing effect of histidine buffer.

4. In another set of experiments, the following seven compositions were prepared: (2A) PBS, pH 6.5, (2B) 10 mM sodium citrate, pH 5.5, (2C) 10 mM sodium citrate, pH 5.0, (2D) 10 mM sodium succinate, pH 5.5, (2E) 10 mM sodium succinate, pH 5.0, (2F) 10 mM sodium acetate, pH 5.5, and (2G) 10 mM sodium acetate, pH 5.0, with each composition also comprising 1mg/ml of a conjugate comprising the huN901 monoclonal antibody chemically coupled to the maytansinoid DM1 via an N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP) linker ("huN901-SPP-DM1"). The compositions were incubated at 25° C for 4 months, and then the conjugate aggregate content (% dimer) and free drug content (%) were measured for each composition. The results are set forth in Table 2.

Table 2: Conjugate Aggregate and Free Drug Contents

Composition	Buffer	Conjugate Dimer (%) after 4 months at 25° C	Free Drug (%) after 4 months at 25° C
2A	PBS, pH 6.5	1.9	2.6
2B	sodium citrate, pH 5.5	1.0	1.5
2C	sodium citrate, pH 5.0	1.2	1.2
2D	sodium succinate, pH 5.5	1.4	1.6
2E	sodium succinate, pH 5.0	1.2	1.1
2F	sodium acetate, pH 5.5	1.7	1.4
2G	sodium acetate, pH 5.0	1.3	1.2

The results shown in Table 2 reflect that Compositions 2B-2G exhibited less conjugate aggregate and free drug contents as compared to Composition 2A, thereby evidencing the

150
149

Applicant: IMMUNOGEN, INC.
Application No. PCT/US2004/015376

greater stabilizing effect of citrate, succinate, and acetate buffers (Compositions 2B-2G) as compared to phosphate buffer (Composition 2A) in maintaining the stability of an antibody-maytansinoid conjugate.

5. I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true, that all statements made on information and belief are believed to be true, and that willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Date: September 15, 2005

Godfrey Amphlett
Godfrey Amphlett

151
150

Amendments made in Applicants' Response to Written Opinion

1. A composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, and a histidine buffer, (iii) a surfactant, (iv) a tonicifying amount of sodium chloride, and (v) water, wherein the composition has a pH of about 5-6.
2. The composition of claim 1 wherein the surfactant is selected from the group consisting of polysorbate 20 and polysorbate 80.
3. The composition of any of claims 1-2, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 0.1 mg/mL to about 5 mg/mL.
4. The composition of claim 3, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 1 mg/mL or more.
5. The composition of claim 3, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 5 mg/mL.
6. The composition of any of claims 1-5, wherein the concentration of the buffering agent in the composition is about 2 mM to about 50 mM.
7. The composition of claim 6, wherein the composition comprises a sodium citrate buffer at a concentration of about 10 mM and the pH of the composition is about 5.5.
8. The composition of any of claims 1-7, wherein the concentration of the surfactant in the composition is about 0.002% to about 0.1% of the total volume of the composition.
9. The composition of any of claims 1-8, wherein the surfactant is polysorbate 20.
10. The composition of claim 9, wherein the concentration of polysorbate 20 in the composition is about 0.01% of the total volume of the composition.

11. The composition of any of claims 1-10, wherein the concentration of sodium chloride in the composition is about 50 mM to about 500 mM.
12. The composition of claim 11, wherein the concentration of sodium chloride in the composition is about 100 mM to about 200 mM.
13. The composition of claim 12, wherein the concentration of sodium chloride in the composition is about 120 mM.
14. The composition of claim 1, wherein the composition comprises (i) about 5 mg/mL of a conjugate comprising huN901 chemically coupled to DM1, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 120 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH of the composition is about 5.5.
15. The composition of claim 1, wherein the composition comprises (i) about 1 mg/mL or more of a conjugate comprising huMy9-6 chemically coupled to DM1, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 135 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH of the composition is about 5.5.
16. The composition of claim 1, wherein the composition comprises (i) about 1 mg/mL or more of a conjugate comprising huMy9-6 chemically coupled to DM4, (ii) about 10 mM sodium citrate buffer, (iii) about 0.01% polysorbate 20, (iv) about 135 mM sodium chloride, and (v) water, wherein the pH of the composition is about 5.5.
17. The composition of any of claims 1-16, wherein the composition further comprises an antioxidant.
18. The composition of claim 17, wherein the concentration of the antioxidant in the composition is about 100 μ M to about 100 mM.
19. The composition of claim 18, wherein the antioxidant is selected from the group consisting of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, tocotrienols, polyphenols, zinc, manganese, selenium, vitamin C, vitamin E, beta carotene, cysteine, and methionine.
20. The composition of claim 19, wherein the antioxidant is methionine.

153
F2

21. The composition of claim 20, wherein the concentration of methionine in the composition is about 10 mM.

22. The composition of any of claims 1-21, wherein the composition comprises sucrose.

23. The composition of claim 22, wherein the concentration of sucrose in the composition is about 0.1% to about 10% of the total volume of the composition.

24. The composition of claim 23, wherein the concentration of sucrose in the composition is about 5% of the total volume of the composition.

25. A packaged composition comprising a sealed container and dispersed therein the composition of any of claims 1-24 and an inert gas overlay.

26. The packaged composition of claim 25, wherein the inert gas is nitrogen or argon.

27. A method for killing a cell in a human comprising administering to the human a composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, and a histidine buffer, (iii) a surfactant, (iv) a tonicifying amount of sodium chloride, and (v) water, wherein the composition has a pH of about 5-6, such that the antibody binds to the surface of the cell and the cytotoxicity of the maytansinoid is activated, whereby the cell is killed.

28. The method of claim 27 wherein the surfactant is selected from the group consisting of polysorbate 20 and polysorbate 80.

29. The method of claim 28, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 0.1 mg/mL to about 5 mg/mL.

30. The method of claim 29, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 1 mg/mL or more.

31. The method of any of claims 28-29, wherein the concentration of the conjugate in the composition is about 5 mg/mL.

ISA
153

32. The method of any of claims 28-29, wherein the surfactant is polysorbate 20.
33. The method of any of claims 27-32, wherein the composition further comprises an antioxidant.
34. The method of claim 33, wherein the antioxidant is selected from the group consisting of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, tocotrienols, polyphenols, zinc, manganese, selenium, vitamin C, vitamin E, beta carotene, cysteine, and methionine.
35. The method of claim 34, wherein the antioxidant is methionine.
36. The method of any of claims 23-35, wherein the composition comprises sucrose.
37. A lyophilized composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent is selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, and a histidine buffer, (iii) a surfactant, (iv) a cryoprotectant, and (v) a bulking agent, wherein the composition has a pH of about 5-6 when reconstituted with water.
38. The composition of claim 37 wherein the surfactant is selected from the group consisting of polysorbate 20 and polysorbate 80.
39. The composition of any of claims 1-13 or claim 37, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
40. The composition of claim 39, wherein the antibody is a humanized monoclonal antibody.
41. The composition of claim 38, wherein the antibody is selected from the group consisting of huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, and rituximab.
42. The composition of any of claims 1-13 or claims 37-41, wherein the maytansinoid comprises a thiol group.

43. The composition of claim 42, wherein the maytansinoid is DM1.
44. The composition of claim 42, wherein the maytansinoid is DM4.
45. The composition of any of claims 1-13 or 37-44, wherein the antibody is chemically coupled to the maytansinoid via chemical bonds selected from the group consisting of disulfide bonds, acid labile bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds, thioether bonds, and esterase labile bonds.
46. The composition of any of claims 37-45, wherein the composition comprises about 0.1 mg to about 2 mg of the buffering agent per mg of the conjugate.
47. The composition of claim 46, wherein the composition comprises about 0.3 mg sodium succinate buffer per mg of the conjugate.
48. The composition of any of claims 37-47, wherein the composition comprises about 0.005 mg to about 0.1 mg of the surfactant per mg of the conjugate.
49. The composition of any of claims 38-48, wherein the surfactant is polysorbate 20.
50. The composition of claim 49, wherein the composition comprises about 0.02 mg polysorbate 20 per mg of the conjugate.
51. The composition of any of claims 37-50, wherein the composition comprises about 0.5 mg to about 5 mg of the cryoprotectant per mg of the conjugate.
52. The composition of any of claims 37-51, wherein the cryoprotectant is selected from the group consisting of glycerol, dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol, dextran, glucose, and trehalose.
53. The composition of any of claims 37-52, wherein the bulking agent is selected from the group consisting of glycine, mannitol and dextran.
54. The composition of claim 51, wherein the cryoprotectant is sucrose.

55. The composition of claim 54, wherein the composition comprises about 1 mg sucrose per mg of the conjugate.

56. The composition of any of claims 37-55, wherein the composition comprises about 2 mg to about 20 mg of the bulking agent per mg of the conjugate.

57. The composition of claim 56, wherein the bulking agent is glycine.

58. The composition of claim 57, wherein the composition comprises about 3.8 mg glycine per mg of the conjugate.

59. The composition of claim 37, wherein the composition comprises (i) a conjugate comprising huN901 chemically coupled to DM1, (ii) about 0.3 mg sodium succinate buffer per mg of the conjugate, (iii) about 0.02 mg polysorbate 20 per mg of the conjugate, (iv) about 1 mg sucrose per mg of the conjugate, and (v) about 3.8 mg glycine per mg of the conjugate.

60. A method for killing a cell in a human comprising (a) providing the lyophilized composition of any of claims 37-59, (b) adding water to the lyophilized composition to provide a reconstituted composition, and (c) administering the reconstituted composition to the human such that the antibody binds to the surface of the cell and the cytotoxicity of the maytansinoid is activated, whereby the cell is killed.

61. The method of any of claims 27-36 or claim 60, wherein the cell is a tumor cell.

62. The method of any of claims 27-36 or claims 60-61, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

63. The method of claim 62, wherein the antibody is a humanized monoclonal antibody.

64. The method of claim 62, wherein the antibody is selected from the group consisting of huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, and rituximab.

65. The method of any of claims 27-36 or any of claims 60-64, wherein the maytansinoid comprises a thiol group.
66. The method of claim 65, wherein the maytansinoid is DM1.
67. The method of claim 65, wherein the maytansinoid is DM4.
68. The method of any of claims 27-36 or claims 60-67, wherein the antibody is chemically coupled to the maytansinoid via chemical bonds selected from the group consisting of disulfide bonds, acid labile bonds, photolabile bonds, peptidase labile bonds, thioether bonds, and esterase labile bonds.
69. The method of any of claims 27-36 or any of claims 60-68, wherein the antibody binds to an antigen present on the surface of the cell
70. The method of claim 69, wherein the antigen is selected from the group consisting of NCAM/CD56, CD33, CD19, GD₃, CanAg, PSMA, alpha-folate receptor, Her2/neu, CD44v6, fetoacinar pancreatic (FAP) antigen, Cripto-1, CA6, CD20, CA55.1, MN/CA IX, and chondroitin sulfate proteoglycan.
71. The method of any of claims 60-70, wherein the concentration of the conjugate in the reconstituted composition is about 0.1 mg/mL to about 5 mg/mL.
72. The method of claim 71, wherein the concentration of the conjugate in the reconstituted composition is about 1 mg/mL or more.
73. The method of claim 71, wherein the concentration of the conjugate in the reconstituted composition is about 5 mg/mL.
74. The method of any of claims 60-73, wherein the concentration of the buffering agent in the reconstituted composition is about 2 mM to about 50 mM.
75. The method of claim 74, wherein the reconstituted composition comprises a sodium succinate buffer at a concentration of about 10 mM and the pH of the reconstituted composition is about 5.5.

76. The method of any of claims 60-75, wherein the concentration of the surfactant in the reconstituted composition is about 0.002% to about 0.1% of the total volume of the reconstituted composition.

77. The method of claim 76, wherein the surfactant is polysorbate 20.

78. The method of claim 77, wherein the concentration of polysorbate 20 in the reconstituted composition is about 0.01% of the total volume of the reconstituted composition.

79. The method of any of claims 60-78, wherein the concentration of the cryoprotectant in the reconstituted composition is about 0.1% to about 3% of the total volume of the reconstituted composition.

80. The method of claim 79, wherein the cryoprotectant is sucrose.

81. The method of claim 80, wherein the concentration of sucrose in the reconstituted composition is about 0.5% of the total volume of the reconstituted composition.

82. The method of any of claims 60-81, wherein the concentration of the bulking agent in the reconstituted composition is about 50 mM to about 500 mM.

83. The method of claim 82, wherein the bulking agent is glycine.

84. The method of claim 83, wherein the concentration of glycine in the reconstituted composition is about 250 mM.

85. The method of any of claims 26-36 or claims 57-84, wherein the composition is administered to the human intravenously, intraperitoneally, or intratumorally.

86. A lyophilized composition comprising (i) a therapeutically effective amount of a conjugate comprising an antibody chemically coupled to a maytansinoid, (ii) a buffering agent selected from the group consisting of a citrate buffer, an acetate buffer, a succinate buffer, and a histidine buffer, (iii) a cryoprotectant, and (iv) a bulking agent, wherein the composition has a pH of about 5-6 when reconstituted with water.

159
~~158~~

LVM 228670

9

87. The composition of claim 86, wherein the cryoprotectant is selected from the group consisting of glycerol, dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol, dextran, glucose, and trehalose.

88. The composition of any of claims 86-87, wherein the bulking agent is selected from the group consisting of glycine, mannitol and dextran.

5. 160
159

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 228670

Box No. I TITLE OF INVENTION
DRUG CONJUGATE COMPOSITION

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

IMMUNOGEN, INC.
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139
US

Telephone No.
(617) 995-2500

Facsimile No.
(617) 995-2510

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
US

State (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

AMPHLETT, Godfrey
8 1/2 Ash Street Place
Cambridge, MA 02138
US

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
US

State (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

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

KOLOM, Melissa E.
LEYDIG. VOIT & MAYER, LTD.
Two Prudential Plaza, Suite 4900
180 N. Stetson Av.
Chicago, IL 60601-6780
US

Telephone No.
312-616-5600

Facsimile No.
312-616-5700

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
51,860

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

161
156

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) ZHANG, Wei 1580 Massachusetts Avenue, #7B Cambridge, MA 02138 US	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: China	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) FLEMING, Michael 5 Birchwood Drive Londonderry, NH 03053 US	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) CHIH, Hung-Wei 101 Western Avenue, #63 Cambridge, MA 02139 US	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: Taiwan	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

162
761

Supplemental Box	<i>If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.</i>
1. <i>If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(f) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." (Indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:</i> (i) <i>If more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;</i> (ii) <i>If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;</i> (iii) <i>If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;</i> (iv) <i>If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;</i> (v) <i>If, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.</i> 2. <i>If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other parent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(iii) and 49bis.1(a) or (b)).</i> 3. <i>If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis.1(d)).</i>	
Continuation of Box No. IV: AIRAN, David M.; ALUL, Andrew M.; ANDERSON, Theodore W.; AUGUSTYN, John M.; BAYS, Gregory C.; BEALL, L. Scott; BELZ, John M.; BORG-BREEN, Caryn C.; BRETSCHER, John T.; BURGAN, Jeffrey B.; CHANG, Y. Kurt; CONKLIN, John B.; COONS, Gordon R.; DODSON, Richard P.; FERREBEE, A. Wesley; FILBIN, Paul J.; FONTANA, Richard E.; GAGALA, Bruce M.; GASE, John L.; GREEN, Robert F.; GRIFFITH, Christopher T.; HARRELL, Kristin J.; HARTMANN, H. Michael; HASAN, Salim A.; HEFNER, M. Daniel; HEINISCH, Andrew J.; HESTERBERG, Brett A.; JAY, Jeremy M.; JOY, Mark; KILYK, John, Jr.; KISSLING, Heather R.; KOLOM, Melissa E.; KORNICZKY, Paul J.; KOZAK, John W.; LAW, Grace; LOWE, Jeremy C.; MAKEEVER, Jeffery J.; MOTTIER, Charles H.; MUELLER, Wesley O.; MUSKAL, James B.; OSLAKOVIC, Charles S.; PETERSEN, Steven P.; PHELPS, Mark E.; PILLAI, Xavier; PIPPENGER, Phillip M.; POTEMPA, Rachel J.; ROSENQUIST, John E.; RUSCHAU, Pamela J.; SCHEMEL, Shannon D.; SCHLEMMER, Dennis R.; SCHULHOF, Scott H.; SHEPPARD, Berton Scott; SKLAR, Steven H.; SMITH, Noel I.; SONG, Victor L.; SPINA, Kenneth P.; THOMPSON, Eley O.; VASILJEVIC, Vladan M.; WINGATE, Kevin L.; WYAND, Jeffrey A.; WYLIE, Roger D.; ZALEWA, James D.	

See Notes to the request form

164
163

Sheet No. 5

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains: (a) In paper form, the following number of sheets: <table><tr><td>request (including declaration sheets)</td><td>:</td><td>29</td></tr><tr><td>description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)</td><td>:</td><td>9</td></tr><tr><td>claims</td><td>:</td><td></td></tr><tr><td>abstract</td><td>:</td><td>1</td></tr><tr><td>drawings</td><td>:</td><td>0</td></tr><tr><td>Sub-total number of sheets</td><td>:</td><td>39</td></tr><tr><td>sequence listing</td><td>:</td><td></td></tr><tr><td>tables related thereto</td><td>:</td><td></td></tr><tr><td colspan="3"><i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)</i></td></tr><tr><td>Total number of sheets</td><td>:</td><td>39</td></tr></table> (b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto (c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the ☐ sequence listing: ☐ tables related thereto: <i>(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)</i>	request (including declaration sheets)	:	29	description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	:	9	claims	:		abstract	:	1	drawings	:	0	Sub-total number of sheets	:	39	sequence listing	:		tables related thereto	:		<i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)</i>			Total number of sheets	:	39	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item): <table><tr><td>1. ☒ fee calculation sheet</td><td>:</td></tr><tr><td>2. ☐ original separate power of attorney</td><td>:</td></tr><tr><td>3. ☐ original general power of attorney</td><td>:</td></tr><tr><td>4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:</td><td>:</td></tr><tr><td>5. ☐ statement explaining lack of signature</td><td>:</td></tr><tr><td>6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):</td><td>:</td></tr><tr><td>7. ☐ translation of international application into (language):</td><td>:</td></tr><tr><td>8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material</td><td>:</td></tr><tr><td>9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)</td><td>:</td></tr><tr><td>(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)</td><td>:</td></tr><tr><td>(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter</td><td>:</td></tr><tr><td>(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column</td><td>:</td></tr><tr><td>10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)</td><td>:</td></tr><tr><td>(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)</td><td>:</td></tr><tr><td>(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)</td><td>:</td></tr><tr><td>(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column</td><td>:</td></tr><tr><td>11. ☐ other (specify):</td><td>:</td></tr></table>	1. ☒ fee calculation sheet	:	2. ☐ original separate power of attorney	:	3. ☐ original general power of attorney	:	4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:	5. ☐ statement explaining lack of signature	:	6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:	7. ☐ translation of international application into (language):	:	8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:	9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)	:	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)	:	(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	:	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column	:	10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)	:	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)	:	(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)	:	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:	11. ☐ other (specify):	:
request (including declaration sheets)	:	29																																																															
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	:	9																																																															
claims	:																																																																
abstract	:	1																																																															
drawings	:	0																																																															
Sub-total number of sheets	:	39																																																															
sequence listing	:																																																																
tables related thereto	:																																																																
<i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)</i>																																																																	
Total number of sheets	:	39																																																															
1. ☒ fee calculation sheet	:																																																																
2. ☐ original separate power of attorney	:																																																																
3. ☐ original general power of attorney	:																																																																
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:																																																																
5. ☐ statement explaining lack of signature	:																																																																
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:																																																																
7. ☐ translation of international application into (language):	:																																																																
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:																																																																
9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)	:																																																																
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)	:																																																																
(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	:																																																																
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column	:																																																																
10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)	:																																																																
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)	:																																																																
(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)	:																																																																
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:																																																																
11. ☐ other (specify):	:																																																																

Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application: English
---	--

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

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

LEYDIG, VOIT & MAYER, LTD.
Agent for the Applicants

By: Melissa E. Kolom
Melissa E. KOLOM

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

kas
764

This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application.

PCT

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Request

For receiving Office use only

International Application No.

Date stamp of the receiving Office

Applicant's or agent's
file reference

228670

Applicant

IMMUNOGEN, INC.

CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE \$ 240.00 [T]

2. SEARCH FEE \$1,920.00 [S]

International search to be carried out by

EP

(If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.)

3. INTERNATIONAL FILING FEE

Where items (b) and/or (c) of Box No. IX apply, enter Sub-total number of sheets } 39

Where items (b) and (c) of Box No. IX do not apply, enter Total number of sheets }

[i1] first 30 sheets \$1,035.00 [i1]

[i2] 9 x \$ 11.00 = \$99.00 [i2]
number of sheets fee per sheet
in excess of 30

[i3] additional component (only if sequences listing and/or tables related thereto are filed in computer readable form under Section 801(a)(i), or both in that form and on paper, under Section 801(a)(ii)):

400 x 0 = \$0.00 [i3]
fee per sheet

Add amounts entered at i1, i2 and i3 and enter total at I \$1,134.00 [I]

(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international filing fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 25% of the international filing fee.)

4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT (if applicable) \$20.00 [P]

5. TOTAL FEES PAYABLE \$3,314.00

Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box

TOTAL

MODE OF PAYMENT

☒ authorization to charge
deposit account (see below)

☐ postal money order

☐ cash

☐ coupons

☐ cheque

☐ bank draft

☐ revenue stamps

☐ other (specify):

AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT
(This mode of payment may not be available at all receiving Offices)

☒ Authorization to charge the total fees indicated above.

☒ (This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the receiving Office so permit) Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.

☒ Authorization to charge the fee for priority document.

Receiving Office: RO/ US

Deposit Account No.: 12-1216

Date: 14 May 2004

Name: Melissa E. KOLOM

Signature: Melissa E. Kolom

165
156

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/015376

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/24763 A (IMMUNOGEN, INC; CHARI, RAVI, V., J) 12 April 2001 (2001-04-12) page 29 - page 30	1-7, 12-14, 18-20, 26-31, 34-36, 42-48, 56, 60-76, 84, 87-89
A	WO 97/04801 A (GENENTECH, INC) 13 February 1997 (1997-02-13) the whole document	1-27, 38-59, 88, 90

167

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 85115788 00000000 Folios: 165
Fecha (AMB): 2005-11-15 17:39:05
Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesion de una patente ✓	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. ✓	()	()
- Descripción de la invención. ✓	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes. ✗	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas ✓	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica o fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable

Fecha

15 de 2005

168

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D'ALEMAN DILIA MARIA

2710

REFERENCIA	Radicación No.	5 115708
	Solicitud internacional	US2004/015376
	Fecha inicio fase nacional	14/12/2005
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1175

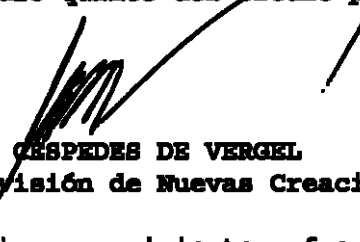
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMONA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 03 FEB. 2008
adpal