



QF

Industria y Comercio Organización CSA Ltda
SUPERINTENDENCIA

00007

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

08-9362

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "FORMULACIONES DE INMUNO-
CONJUGADO"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K39/00 // A61K31/337
A61K39/395 // A61P35/00

71. SOLICITANTE IMMUNOGEN, INC.

DOMICILIO CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO HUMBERTO TUBIO CANACHO
COD. 4134.

22. BOGOTÁ, D. C., 31 DE ENERO/2008

SS



No. 08-009362- -00000-0000

Fecha: 2008-01-31 15:15:25 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 109

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

Capítulo II

SOLICITANTE (71) Nombre: **IMMUNOGEN, INC.**
Dirección: **128 Sidney Street**
Domicilio: **CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02139-4239, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**
Lugar de constitución: **CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

REPRESENTANTE (74) Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
O APODERADO Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506** C.C. **17192.062**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** T.P. **50.007 CSJ**

INVENTOR(ES) (72) Nombre y Dirección: **VER ANEXO**

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2006/030295** Fecha **2 DE AGOSTO DE 2006**
Publicación Internacional No. **WO 2007/019232** Fecha **15 DE FEBRERO DE 2007**

TÍTULO (54) "FÓRMULACIONES DE INMUNOCONJUGADO"

Clasificación Internacional (51) **A61K39/00 // A61K31/337 // A61K39/395**
A61P35/00

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	03/08/2005	60/704,902
	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	11/08/2005	60/707,162
	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	04/05/2006	60/746,454
	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	04/05/2006	60/746,456

Comprobante de pago No. **08-7,913** Fecha: **30 DE ENERO DE 2008**

Bap

ANEXO INVENTORES

- 1) **Wei ZHANG**
1815 Jfk Boulevard, #2702,
Philadelphia, Pennsylvania 19103, Estados Unidos de América
- 2) **Michael S. FLEMMING**
5 Birchwood Drive
Londonderry, New Hampshire 03053, Estados Unidos de América
- 3) **Godfrey AMPHLETT**
8 1/2 Ash Street Place,
Cambridge, Massachusetts 02138, Estados Unidos de América
- 4) **Hung-Wei CHIH**
1910 Garden Drive, #210,
Burlingame, California 94010, Estados Unidos de América
- 5) **Elizabeth BARTLETT**
55 Magazine Street,
Cambridge, Massachusetts 02139, Estados Unidos de América

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN:

(71) SOLICITANTE: **IMMUNOGEN, INC.**

(30) PRIORIDAD:

ESTADOUNIDENSE

(31) No. DE SOLICITUD: **60/704,902**
60/707,162
60/746,454
60/746,456

(72) INVENTORES: **Wei ZHANG**
Michael S. FLEMMING
Godfrey AMPHLETT
Hung-Wei CHIH
Elizabeth BARTLETT

(32) FECHA DE

(21) PRESENTACIÓN:

3 DE AGOSTO DE 2005
11 DE AGOSTO DE 2005
4 DE MAYO DE 2006
4 DE MAYO DE 2006

(33) PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA (74) APODERADO:

Humberto RUBIO CAMACHO

Solicitud Internacional No. **PCI/US2006/030295** Fecha **2 DE AGOSTO DE 2006**
Publicación Internacional No. **WO 2007/019232** Fecha **15 DE FEBRERO DE 2007**

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TÍTULO: **FÓRMULACIONES DE INMUNOCONJUGADO**

RESUMEN:

Una formulación de inmunoconjugado que comprende:

(a) un inmunoconjugado; y (b) uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende sacarosa, polisorbato 20, polisorbato 80, ciclodextrina, dextrosa, glicerol, polietilen glicol, manitol, cloruro de sodio, y un aminoácido, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6.

ANEXOS

- X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- X Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. *Copia autentica reposa en el Exp 06-046036*
- X Poderes, si fuere el caso. *Copia autentica reposa en el Exp. 06-046.036*
- Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- Declaraciones
- X Copia de la publicación PCT
- X Copia informe búsqueda internacional.
- Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- X Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- Copia del informe del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional (IPEA). (Incluye modificaciones)
- Traducción de los anexos del examen preliminar internacional.
- Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo 28 PCT en Fase Nacional.
- 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
- De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- X De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- Otros

Figura característica:

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA



C.C. 17'192.062 de Bogotá

T.P. 50.007 Consejo Superior de la Judicatura

PAPA HUBERTINO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 7,913
FECHA : ENERO 30 DE 2008



***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA AROGCONSIGNACION		BANCO DE BOGOTA	062754387	128036	30/01/2008	1,925,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 February 2007 (15.02.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/019232 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(74) Agents: MACK, Susan, J. et al.; SUGHRUE MION, PLLC, 2100 Pennsylvania Ave., NW, Suite 800, Washington, DC 20037-3213 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2006/030295

(22) International Filing Date: 2 August 2006 (02.08.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/704,902 3 August 2005 (03.08.2005) US
60/707,162 11 August 2005 (11.08.2005) US
60/746,454 4 May 2006 (04.05.2006) US
60/746,456 4 May 2006 (04.05.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNOGEN, INC. [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139-4239 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ZHANG, Wei [CN/US]; 1815 Jfk Boulevard, #2702, Philadelphia, Pennsylvania 19103 (US). FLEMMING, Michael S. [US/US]; 5 Birchwood Drive, Londonderry, New Hampshire 03053 (US). AMPHLETT, Godfrey [US/US]; 8 1/2 Ash Street Place, Cambridge, Massachusetts 02138 (US). CHIH, Hung-Wei [CN/US]; 1910 Garden Drive, #210, Burlingame, California 94010 (US). BARTLETT, Elizabeth [US/US]; 55 Magazine Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, IS, IT, LT, LU, LV, 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.

(54) Title: IMMUNOCONJUGATE FORMULATIONS

(57) Abstract: The present invention provides an immunoconjugate formulation that is substantially free of particles, the immunoconjugate formulation comprising: an immunoconjugate and one or more excipients selected from the group consisting of: sucrose, polysorbate 20, polysorbate 80, cyclodextrin, dextrose, glycerol, polyethylene glycol, mannitol, sodium chloride, and an amino acid, wherein the formulation is a buffered aqueous solution having a pH of 4.5 to 7.6. The present invention also provides an immunoconjugate formulation that is substantially free of aggregates, the immunoconjugate formulation comprising: an immunoconjugate and one or more excipients selected from the group consisting of histidine, sucrose, glycine and sodium chloride, wherein the formulation is a buffered aqueous solution having a pH of 4.5 to 7.6. The present invention further provides an immunoconjugate formulation that is substantially free of both particles and aggregates.

WO 2007/019232 A2

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 February 2007 (15.02.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/019232 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)

(74) Agents: MACK, Susan, J. et al.; SUGHRUE MION, PLLC, 2100 Pennsylvania Ave., NW, Suite 800, Washington, DC 20037-3213 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2006/030295

(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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 2 August 2006 (02.08.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/704,902 3 August 2005 (03.08.2005) US
60/707,162 11 August 2005 (11.08.2005) US
(51) 60/746,454 4 May 2006 (04.05.2006) US
60/746,456 4 May 2006 (04.05.2006) US

(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, IS, IT, LT, LU, LV, 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).

(71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNOGEN, INC. [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139-4239 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ZHANG, Wei [CN/US]; 1815 Jfk Boulevard, #2702, Philadelphia, Pennsylvania 19103 (US). FLEMMING, Michael S. [US/US]; 5 Birchwood Drive, Londonderry, New Hampshire 03053 (US). AMPHLETT, Godfrey [US/US]; 8 1/2 Ash Street Place, Cambridge, Massachusetts 02138 (US). CHIH, Hung-Wei [CN/US]; 1910 Garden Drive, #210, Burlingame, California 94010 (US). BARTLETT, Elizabeth [US/US]; 55 Magazine Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (US).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
28 June 2007

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.

(54) Title: IMMUNOCONJUGATE FORMULATIONS

(57) Abstract: The present invention provides an immunoconjugate formulation that is substantially free of particles, the immunoconjugate formulation comprising: an immunoconjugate and one or more excipients selected from the group consisting of: sucrose, polysorbate 20, polysorbate 80, cyclodextrin, dextrose, glycerol, polyethylene glycol, mannitol, sodium chloride, and an amino acid, wherein the formulation is a buffered aqueous solution having a pH of 4.5 to 7.6. The present invention also provides an immunoconjugate formulation that is substantially free of aggregates, the immunoconjugate formulation comprising: an immunoconjugate and one or more excipients selected from the group consisting of histidine, sucrose, glycine and sodium chloride, wherein the formulation is a buffered aqueous solution having a pH of 4.5 to 7.6. The present invention further provides an immunoconjugate formulation that is substantially free of both particles and aggregates.

WO 2007/019232 A3

FÓRMULACIONES DE INMUNOCONJUGADO

Esta solicitud reclama el beneficio según 35 U.S. C. §119(e) para las Solicitudes Nos. 60/704,902 presentada el 3 de agosto de 2005; 60/707,162 presentada el 1 de agosto de 2005; 60/746,454 presentada el 4 de mayo de 2006; y 60/746,456 presentada el 4 de mayo de 2006, las descripciones de cada una de las cuales están incorporadas mediante referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para la preparación de formulaciones estables de immunoconjugados, que son compuestos farmacéuticos que están compuestos de un anticuerpo y una o varias moléculas enlazadas de manera covalente de un fármaco.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los immunoconjugados son desarrollados como agentes altamente potentes y específicos para el tratamiento de cáncer y otras condiciones. Un immunoconjugado está compuesto de un anticuerpo que reconoce de forma específica un antígeno de célula de objetivo, tal como un antígeno de célula tumoral, y una o varias moléculas enlazadas de manera covalente de un fármaco, en particular un fármaco citotóxico tal como un maitansinoide, un taxano, o un análogo CC-1065. Otro nombre utilizado para dichos immunoconjugados son los conjugados anticuerpo-fármaco. Los immunoconjugados son inactivos durante la circulación aunque se unen a superficies de célula de objetivo, por lo cual son internalizados por las células. A través de mecanismos aún no comprendidos en su totalidad, los fármacos son liberados de modo subsecuente desde el anticuerpo y pueden ejercer su efecto farmacológico.

El suministro dirigido de los fármacos citotóxicos a células de objetivo, tales como las células que conforman el tejido canceroso, mejora potencialmente los índices terapéuticos de los fármacos citotóxicos. De manera común, los fármacos citotóxicos utilizados como immunoconjugados son 100 hasta 1000-veces más potentes que los fármacos de quimioterapia convencionales. Ejemplos de dichos immunoconjugados se describen en la Solicitudes Internacionales de Patente (PCT) Nos. WO 00/02587, 02/060955, y 02/092127; Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,475,092, 6,340,701, 6,171,586, 6,706,708 B2, y 6,756,397 B2; y Chari et al, Cáncer Res., 52, 127-131 (1992).

Los compuestos farmacéuticos tales como los immunoconjugados por lo general son combinados con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, y/o estabilizadores a fin de proporcionar una composición farmacéutica que permite la

administración a pacientes y el almacenamiento y transporte del compuesto farmacéutico. Al igual que otros farmacéuticos de proteína, los inmunoconjugados están propensos a la degradación tal como oxidación, desamidación, así como formación de partícula y agregado, etc. (Manning et al., Pharm. Res. 6, 903-918 (1989); Ahern y Manning, Stability of Protein Pharmaceuticals: Part A, Chemical y Physical pathways of Protein Degradation, Plenum, New York, (1992); y Cleland et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 10, 307-377 (1993)).

La formación de particular en los farmacéuticos de proteína, en particular, puede desestabilizar los compuestos farmacéuticos, haciendo por lo tanto menos potente a la formulación o incluso peligrosa para uso clínico. Por ejemplo, las partículas en formulaciones farmacéuticas inyectadas pueden ocasionar lesión significativa a las venas o venastasis prolongada en los pacientes can. Además, la formación de agregado es una trayectoria de degradación importante de los farmacéuticos de proteína (Chari et al., Pharm Res. 20, 1325-1336 (2003)), y puede conducir a efectos indeseables tales como la inmunogenicidad.

La conjugación de los fármacos, en especial de los fármacos citotóxicos, que con frecuencia son pequeñas moléculas hidrofóbicas, para anticuerpos monoclonales hidrofílicos, introduce inestabilidad adicional a los inmunoconjugados. La resolución de las propiedades atribuibles al componente de anticuerpo de los inmunoconjugados es crítica para la generación de formulaciones farmacéuticas líquidas o liofilizadas estables. Para este propósito, WO 2004/004639 A2 y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2004/0,241,174 A1 describe composiciones de inmunoconjugados. Sin embargo, estas composiciones no resuelven de forma adecuada la formación de partícula y agregado en composiciones farmacéuticas de inmunoconjugados.

Por lo tanto, existe aún la necesidad de composiciones farmacéuticas de inmunoconjugados que, de modo adecuado, están libres de partículas y/o agregados y están sustancialmente libres de partículas y/o agregados, y permanecen sustancialmente libres de partículas y/o agregados durante el almacenamiento y transporte.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas de inmunoconjugados que están sustancialmente libres de partículas y/o agregados y evitan la formación de partículas y/o agregados durante el almacenamiento y/o transporte. Se proporcionan también métodos para el uso de las composiciones farmacéuticas. Estas y otras ventajas de la invención, así como características inventivas adicionales, serán evidentes a partir de las descripciones de la invención proporcionada en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el hallazgo de que se puede inhibir la formación de partícula y agregado en composiciones farmacéuticas de inmunoconjugados a través del uso de ciertos excipientes. Las formulaciones novedosas proporcionan mayo

estabilidad y vidas en almacenamiento sustancialmente más prolongadas para los compuestos farmacéuticos y aseguran la protección del paciente.

Un aspecto de la presente invención proporciona una formulación de inmunoconjugado que está sustancialmente libre de partículas, la formulación de inmunoconjugado que comprende: un inmunoconjugado y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que consta de: sacarosa, polisorbato 20, polisorbato 80, ciclodextrina, dextrosa, glicerol, polietilen glicol, manitol, cloruro de sodio, y un aminoácido, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6.

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona una formulación de inmunoconjugado que está sustancialmente libre de agregados, la formulación de inmunoconjugado que comprende: un inmunoconjugado y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende histidina, sacarosa, glicina y cloruro de sodio, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6.

La presente invención proporciona además una formulación de inmunoconjugado que está sustancialmente libre tanto de partículas como de agregados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas estables de inmunoconjugados que están sustancialmente libres de partículas y/o agregados y permanecen sustancialmente libres de partículas y/o agregados durante un período prolongado de almacenamiento y durante el transporte. La presente invención se basa en el hallazgo de que se puede inhibir la formación de partícula y/o agregado en las composiciones farmacéuticas de inmunoconjugados a través de la utilización de ciertos excipientes. Las formulaciones novedosas producen mayor estabilidad y vidas de almacenamiento sustancialmente más prolongadas para los compuestos farmacéuticos y aseguran la protección del paciente.

Dichas formulaciones son preparadas por medio de la inclusión de un excipiente que inhibe o reduce la formación de partículas visibles (mayores a 50 μm) y subvisibles (mayores a 5 μm). Como se utiliza en la presente, una composición que se encuentra "sustancialmente libre de partículas" pasará la prueba de US Pharmacopeia (USP) <788>, la cual requiere que las partículas con un tamaño superior a 10 μm serán menores a 6000 conteos por recipiente y las partículas con un tamaño superior a 25 μm serán menores a 600 conteos por recipiente. Véase USP 28, Chapter 788 "Particulate Matter in Injections," 2004, editado por United States Pharmacopeia, Rockville, MD. Como se utiliza en la presente, una composición que se encuentra "sustancialmente libre de agregados" permanecerá libre de agregados durante el almacenamiento y transporte de manera que el nivel de monómero inmunoconjugado permanece sobre 95% a través de la vida útil de

la composición.

Una vida de almacenamiento típica opera las composiciones de inmunoconjugado de la presente invención es de aproximadamente 1 hasta 5 años, de preferencia 1 a 4 años, de mayo preferencia de 2 hasta 4 años, a 4°C.

Una formulación de inmunoconjugado de la invención que está sustancialmente libre de partículas comprende un inmunoconjugado y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que consta de sacarosa, polisorbato 20, polisorbato 80, ciclodextrina, dextrosa, glicerol, polietilen glicol, manitol, cloruro de sodio, y un amino ácido, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene a pH de 4.5 hasta 7.6. La formulación puede comprender uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende: (i) 0.1-12% sacarosa, (ii) 0.005-1.0% polisorbato 20, (iii) 0.5-2% beta-ciclodextrina, (iv) 2-8% glicerol, (v) 1 -5% PEG6000, (vi) 2-8% manitol, (vii) 0.005-1.0% polisorbato 80, (viii) 5-20 mM histidina, (ix) 100-300 mM glicina, y (x) 50-300 mM cloruro de sodio.

En ciertas modalidades preferidas, la formulación de la invención que está sustancialmente libre de partículas comprende de preferencia uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende: (i) 5-10% sacarosa; (ii) 0.005-0.2 % polisorbato 20; (iii) 0.5-1% beta-ciclodextrina; (iv) 2-5% glicerol; (v) 2-3% PEG6000; (vi) 3-5% manitol; (vii) 0.005-0.2 % polisorbato 80; (viii) 10-15 mM histidina; (ix) 130-250 mM glicina, y (x) 100-200 mM cloruro de sodio.

En modalidades preferidas la solución acuosa regulada en su pH puede contener uno o más de histidina, succinato, citrato, fosfato, y acetato, y el pH es de preferencia desde 5.0 hasta 7.0. El pH de la formulación es de mayo preferencia desde 5.0 hasta 6.0.

En ciertas modalidades de la invención, el inmunoconjugado de la formulación comprende un anticuerpo humanizado seleccionado a partir del grupo que comprende huMy9-6, huC242, huN901, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab; y/o el inmunoconjugado comprende un fármaco citotóxico seleccionado a partir del grupo que comprende un maitansinoide, un taxano, y un CC-1065. La concentración de inmunoconjugado en la formulación de la invención puede variar desde aproximadamente 0.5 hasta 20.0 mg por ml. De preferencia, la concentración de inmunoconjugado es 0.5 hasta 10 mg por ml.

Una formulación de inmunoconjugado de la invención que está sustancialmente libre de agregados comprende: un inmunoconjugado; y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende histidina, sacarosa, glicina y cloruro de sodio, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6. De preferencia, la formulación de inmunoconjugado comprende uno o más excipientes seleccionados a partir de 5-200 mM histidina, 100-200 mM glicina, y 2-8% sacarosa.

En ciertas modalidades preferidas, los excipientes son 5-100 mM histidina o 100-150 mM glicina, o la formulación contiene 2-8% sacarosa y 100-150 mM glicina. En otras

modalidades preferidas, la formulación contiene 10 mM histidina, 5% sacarosa y 130 mM glicina.

En modalidades preferidas la solución acuosa regulada en su pH puede contener uno o más de histidina, succinato, citrato, fosfato, y acetato, y el pH es de preferencia desde 5.0 hasta 7.0. El pH de la formulación es de mayo preferencia desde 5.0 hasta 6.0.

En otro aspecto de la invención, la formulación que está sustancialmente libre de agregados comprende además polisorbato 20 y/o polisorbato 80, de manera que la formulación también está sustancialmente libre de partículas.

En ciertas modalidades de la invención, el inmunoconjugado de la formulación comprende un anticuerpo humanizado seleccionado a partir del grupo que comprende huMy9-6, huC242, huN901, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab; y/o el inmunoconjugado comprende un fármaco citotóxico seleccionados a partir del grupo que comprende a maitansinoide, a taxano, y un CC-1065. La concentración de inmunoconjugado en la formulación de la invención puede variar desde aproximadamente 0.5 hasta 20.0 mg por ml. De preferencia, la concentración de inmunoconjugado es de 0.5 hasta 10 mg por ml.

En ciertas modalidades preferidas de la invención, la formulación de inmunoconjugado está sustancialmente libre tanto de agregados y partículas. Por ejemplo, la presente invención proporciona una formulación de inmunoconjugado que consiste esencialmente de: huN901-DMI inmunoconjugado a una concentración desde 0.5-10 mg/ml; 5-15 mM histidina y/o 5-15 mM succinato; 0.1-10 % sacarosa y/o 100-300 mM glicina; 0.005-0.2% polisorbato 80 y/o 0.005-0.2% polisorbato 20, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH desde 5-6. De manera opcional se pueden agregar ingredientes adicionales en tanto que la formulación permanezca sustancialmente libre tanto de agregados como de partículas.

En otro ejemplo, una formulación de inmunoconjugado consiste esencialmente de: (a) huC242-DM4 inmunoconjugado a una concentración desde 0.5-10 mg/ml; 5-15 mM histidina; 0.1-10 % sacarosa y/o 100-300 mM glicina; 0.005-0.2% polisorbato 80 y/o 0.005-0.2% polisorbato 20; en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH desde 5-6. De manera opcional se pueden agregar ingredientes adicionales en tanto que la formulación permanezca sustancialmente libre tanto de agregados como de partículas.

De modo general, los excipientes adecuados que se pueden utilizar en conjunción con la presente invención se pueden seleccionar a partir de una variedad de categorías, incluyendo pero sin limitarse a sales inorgánicas, ácidos orgánicos, sacáridos, amino ácidos, polisorbatos, polietilen glicol y combinaciones de los mismos. Los excipientes preferidos son seleccionados a partir del grupo que comprende sales inorgánicas, ácidos carboxílicos inorgánicos, sacáridos, amino ácidos, polisorbatos, polietilen glicol, albuminas, glicerol, y combinaciones de los mismos.

Ejemplos de sales inorgánicas adecuadas incluyen pero no se limitan a cloruro de

sodio, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de sodio, y combinaciones de los mismos. El cloruro de sodio es un excipiente preferido para uso en la presente invención.

Ejemplos de ácidos carboxílicos orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido tartárico (el cual incluye ácido tartárico racémico, ácido D-tartárico y ácido L-tartárico) ácido maléico, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido glucurónico y combinaciones de los mismos. "Ácido" como se utiliza en la presente se refiere al ácido y un hidrato y sales del mismo, es decir, citratos y succinatos. El ácido succínico es un excipiente preferido para uso en la presente invención.

Ejemplos de sacáridos apropiados incluyen pero no se limitan a, sacarosa, trehalosa, dextrosa, manitol, ciclodextrina y combinaciones de los mismos. Sacarosa y ciclodextrina son excipientes preferidos para uso en la presente invención.

Ejemplos de amino ácidos adecuados incluyen pero no se limitan a, histidina, glicina, lisina, arginina y combinaciones de los mismos. La histidina y la glicina son excipientes preferidos para uso en la presente invención.

Ejemplos de albuminas adecuadas incluyen albumina de suero humano.

Los ejemplos de polietilen glicoles apropiados son los polietilen glicoles con un peso molecular de aproximadamente 200 hasta 20,000 Da. Los polietilen glicoles preferidos son PEG 4000, PEG 5000, PEG 6000, PEG 8000, y PEG 10000.

Los ejemplos de polisorbatos adecuados son polisorbato 20 (TWEEN-20™) y polisorbato 80.

Los ejemplos de ciclodextrinas apropiadas son alfa-, beta-, y gama-ciclodextrina.

A partir de las enseñanzas de esta invención, alguien con experiencia en la técnica puede determinar con facilidad los excipientes que proporcionarían mejor una formulación que esté sustancialmente libre de partículas y/o agregados, dada una solución de inmunoconjugado particular.

De preferencia, la tonicidad de la formulación de inmunoconjugado es aproximadamente aquella de la sangre humana (es decir, isotónica).

Los ejemplos de agentes de tonicificación adecuados son sales, amino ácidos, y azúcares. Las sales preferibles incluyen sales de sodio monovalentes. Los amino ácidos preferibles incluyen histidina, glicina, lisina y arginina. La más preferida es la glicina. Los azúcares preferibles incluyen monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos lineales, y oligosacáridos cíclicos. Un disacárido preferido es la sacarosa. Cantidades apropiadas de sales, sacáridos, y/o amino ácidos pueden ser agregadas a la formulación de la invención para obtener una tonicidad deseable.

Los compuestos farmacéuticos son un inmunoconjugado compuesto de un anticuerpo que reconoce de manera específica un antígeno de célula de objetivo y una o varias moléculas covalentemente enlazadas de un fármaco citotóxico, tal como un maitansinoide, un taxano, o un análogo CC-1065.

El anticuerpo puede ser específico para cualquier clase de célula, aunque por lo

general las células de objetivo que van a ser destruidas, tales como las células tumorales (en particular células de tumor sólido), células infectadas por virus, células infectadas por microorganismo, células infectadas por parásito, células autoinmunes (células que producen autoanticuerpos), células activadas (aquellas involucradas en rechazo de injerto o enfermedad injerto vs. huésped), o cualquier otro tipo de células enfermas o anormales.

Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase actualmente conocida, o que se llegue a conocer, y pueden incluir cualquier inmunoglobulina, cualquier fragmento de inmunoglobulina, tal como diacuerpos y triacuerpos Fab, $F(ab')_2$, dsFv, sFv, o quimera inmunoglobulina, que puede unirse a un antígeno en la superficie de una célula (por ejemplo, que contiene una región que determina la complementación (CDR)). Se puede utilizar cualquier anticuerpo adecuado como el agente de enlace celular. Alguien con experiencia en la técnica apreciará que la selección de un anticuerpo adecuado dependerá de la población celular a la que se dirige. A este respecto, el tipo y número de moléculas de superficie celular (es decir, antígenos) que son expresadas en una población celular particular (de manera común y preferible una población celular enferma) controlarán la selección de un anticuerpo apropiado para uso en la composición de la invención. Los perfiles de expresión de superficie celular son conocidos para una amplia variedad de tipos de célula, incluyendo tipos de células tumorales, o si se desconocen, se pueden determinar utilizando técnicas rutinarias de biología molecular e histoquímica.

El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, aunque de mayor preferencia es un anticuerpo monoclonal. Como se usa en la presente, anticuerpos "policlonales" se refiere a poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo, contenidas de manera común en el suero de animales inmunizados. Anticuerpos "monoclonales" se refiere a poblaciones homogéneas de moléculas de anticuerpo que son específicas para un antígeno particular. Los anticuerpos monoclonales son producidos de modo común por medio de un clon individual de linfocitos B ("células B"). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener empleando una variedad de técnicas conocidas por aquellos con experiencia en la técnica, incluyendo la tecnología de hibridoma estándar (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol., 5: 511-519 (1976), Harlow y Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), y CA. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). En resumen, el método de hibridoma para producir anticuerpos monoclonales implica comúnmente inyectar un antígeno (es decir un "inmunogen") a cualquier animal adecuado, por lo general y de preferencia un ratón. De modo subsecuente, el animal es sacrificado y las células B aisladas de su bazo se fusionan con células de mieloma humano. Se produce una célula híbrida (es decir, un "hibridoma"), que prolifera de manera indefinida y secreta de modo continuo altos niveles de un anticuerpo con la especificidad deseada in vitro. Se puede utilizar cualquier método apropiado conocido en la técnica para identificar células de hibridoma que produce un anticuerpo con la especificidad deseada. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente enzima-enlazado (ELISA), análisis de

tinción Western, y radioinmunoensayo. La población de hibridomas es tamizada para aislar clones individuales, cada uno de los cuales secreta una especie de anticuerpo individual para el antígeno. Debido a que cada hidridoma es un clon derivado a partir de fusión con una célula B individual, todas las moléculas de anticuerpo que ella produce son idénticas en estructura, incluyendo su sitio de enlace de antígeno e isotipo. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser generados utilizando otras técnicas adecuadas que incluyen tecnología EBV-hibridoma (véase, por ejemplo, Haskard y Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2): 361-67 (1984), y Roder et al., *Methods Enzymol*, 121: 140-67 (1986)), sistemas de expresión de vector bacteriófago (véase por ejemplo, Huse et al., *Science*, 246: 1275-81 (1989)), o bibliotecas de exhibición de fago que comprenden fragmentos de anticuerpo, tales como Fab y scFv (región variable de cadena individual) (véase por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,885,793 y 5,969,108, y Solicitudes de Patente Internacional WO 92/01,047 y WO 99/06,587).

El anticuerpo monoclonal puede ser aislado a partir de o producido a partir de cualquier animal adecuado, aunque de preferencia es producido en un mamífero, de mayor preferencia un ratón o un ser humano, y de mayor preferencia un humano. Los métodos para producir un anticuerpo en ratones son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica y se describen en la presente. Con respecto a los anticuerpos humanos, alguien con experiencia en la técnica apreciará que los anticuerpos policlonales pueden ser aislados a partir del suero de humanos vacunados o inmunizados con un antígeno apropiado. De manera alternativa, los anticuerpos humanos pueden ser generados a través de la adaptación de técnicas conocidas para producir anticuerpos humanos en animales no humanos tales como ratones (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,545,806, 5,569,825, y 5,714,352, y Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2002/0,197,266 A1).

En tanto que son la elección ideal para aplicaciones terapéuticas en humanos, los anticuerpos humanos, en particular los anticuerpos humanos monoclonales, comúnmente son más difíciles de generar que los anticuerpos monoclonales de ratón. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales de ratón, inducen una rápida respuesta de anticuerpo huésped cuando son administrados a humanos, lo cual puede reducir el potencial terapéutico o de diagnóstico del conjugado anticuerpo-fármaco. Para superar estas complicaciones, de preferencia un anticuerpo monoclonal de preferencia no es reconocido como "extraño" por el sistema inmune humano.

Para este fin, se puede utilizar la exhibición de fago para generar el anticuerpo. A este respecto, las bibliotecas de fago que codifican dominios de anticuerpo variables (V) de enlace a antígeno se pueden generar utilizando técnicas estándar de biología molecular y ADN recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbo Laboratory Press, New York (2001)). Se selecciona la codificación de fago de una región variable con la especificidad deseada para enlace específico al antígeno deseado, y se reconstituye un

anticuerpo humano completo que comprende el dominio variable seleccionado. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo reconstituido son introducidas en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma empleada para la producción de hibridoma, de manera que los anticuerpos humanos que tienen las características de los anticuerpos monoclonales son secretados por la célula (véase, por ejemplo, Janeway et al., supra, Huse et al., supra, y Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,265,150). De manera alternativa, los anticuerpos monoclonales pueden ser generados a partir de ratones que son transgénicos para genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana específica. Dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,545,806 y 5,569,825, y Janeway et al., supra.

De mayor preferencia, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Como se utiliza en la presente, un anticuerpo "humanizado" es uno en el cual las regiones que determinan el complemento (CDR) de un anticuerpo monoclonal de ratón, el cual forma los ciclos de enlace de antígeno del anticuerpo, son injertadas en la estructura en la estructura de una molécula de anticuerpo humano. Debido a la similitud de las estructuras de los anticuerpos de ratón y humanos, se acepta en la técnica de forma general que este enfoque produce un anticuerpo monoclonal que es antigénicamente idéntico a un anticuerpo humano aunque se enlaza al mismo antígeno que el anticuerpo monoclonal de ratón a partir del cual se derivaron las secuencias CDR. Los métodos para generar anticuerpos humanizados son bien conocidos en la técnica y se describen en detalle, por ejemplo, en Janeway et al., supra, Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,225,539, 5,585,089 y 5,693,761, Patente Europea No. 0,239,400 B1, y Patente del Reino Unido No. 2,188,638. Los anticuerpos humanizados también pueden ser generados utilizando la tecnología de recubrimiento de anticuerpo descrita en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,639,641 y Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235: 959-973 (1994). En tanto que el anticuerpo empleado en el inmunoconjugado de la composición de la invención es, de mayor preferencia, un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal humano y un anticuerpo monoclonal de ratón, como se describió antes, también está dentro del alcance de la invención.

Los fragmentos de anticuerpo que tienen por lo menos un sitio de enlace de antígeno, y reconocen por tanto y se enlazan a por lo menos un antígeno o receptor presente en la superficie de una célula de objetivo, se encuentran también dentro del alcance de la invención. A este respecto, la división proteolítica de una molécula de anticuerpo intacta puede producir una variedad de fragmentos de anticuerpo que mantienen la habilidad para reconocer y enlazar antígenos. Por ejemplo, la digestión limitada de una molécula de anticuerpo con la proteasa papaina comúnmente produce tres fragmentos, dos de los cuales son idénticos y son referidos como los fragmentos Fab, ya que mantienen la actividad de enlace de antígeno de la molécula de anticuerpo padre. La división de una molécula de anticuerpo con la enzima pepsina produce de manera

normal dos fragmentos de anticuerpo, uno de los cuales retiene ambos segmentos de enlace de antígeno de la molécula de anticuerpo, y por tanto es referido como el fragmento $F(ab')_2$. La reducción de un fragmento $F(ab')_2$ con ditioneitol o mercaptoetilamina produce un fragmento referido como un fragmento Fab' . Un fragmento de anticuerpo de región variable de cadena simple (sFv), que consta de un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo enlazado a un dominio V de una cadena de anticuerpo ligera a través de un péptido sintético, se puede generar utilizando técnicas rutinarias de ADN recombinante (véase por ejemplo, Janeway et al., *supra*). De manera similar, los fragmentos de región variable disulfuro-estabilizados (dsFv) se pueden preparar a través de tecnología de ADN recombinante (véase por ejemplo, Reiter et al., *Protein Engineering*, 7: 697-704 (1994)). Sin embargo, los fragmentos de anticuerpo en el contexto de la invención, no están limitados a estos tipos ilustrativos de fragmentos de anticuerpo. Se puede emplear cualquier fragmento de anticuerpo adecuado que reconoce y se enlaza a un receptor de superficie celular o antígeno deseado. Los fragmentos de anticuerpo se describen de manera adicional, por ejemplo, en Parham, J. *Immunol*, 131: 2895-2902 (1983), Spring et al., *J. Immunol*, 113: 470-478 (1974), y Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 89: 230-244 (1960). El enlace anticuerpo-antígeno se puede ensayar utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, como por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, tinción Western, inmunoprecipitación, y ensayos de inhibición competitiva (véase, por ejemplo, Janeway et al., *supra*, y Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2002/0,197,266 A1).

Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o un fragmento que enlaza antígeno del mismo. Por "quimérico" se representa que el anticuerpo comprende por lo menos dos inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, obtenidos o derivados a partir de por lo menos dos especies diferentes (por ejemplo, dos inmunoglobulinas diferentes, tales como una región constante de inmunoglobulina humana combinada con una variable de inmunoglobulina de murino). El anticuerpo también puede ser un anticuerpo de dominio (dAb) o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, como por ejemplo, un anticuerpo de camélido (véase, por ejemplo, Desmyter et al., *Nature Struct. Biol.*, 3: 752, (1996)), o un anticuerpo de tiburón, como por ejemplo, un nuevo receptor de antígeno (IgNAR) (véase, por ejemplo, Greenberg et al., *Nature*, 374: 168 (1995), y Stanfield et al., *Science*, 305: 1770-1773 (2004)).

Es posible utilizar cualquier anticuerpo adecuado en el contexto de la invención. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal J5 es un anticuerpo IgG2a de murino que es específico para el Antígeno de Leucemia Linfoblástica Aguda Común (CALLA) (Ritz et al., *Nature*, 283: 583-585 (1980)), y puede ser utilizado para células de objetivo que expresan CALLA (por ejemplo, células de leucemia linfoblástica aguda). El anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG1 de murino que se enlaza de manera específica al antígeno CD33 (Griffin et al., *Leukemia Res.*, 8: 521 (1984)), y puede ser empleado para células de

objetivo que expresan CD33 (por ejemplo, células de leucemia mielogénica aguda (AML)).

De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 (referido también como B4) es un anticuerpo IgG1 de murino que se enlaza al antígeno CD19 en las células B (Nadler et al., *J. Immunol.*, 131: 244-250 (1983)), y se pueden usar para células B de objetivo o células enfermas que expresan CD 19 (por ejemplo, células de linfoma no-Hodgkin y células de leucemia linfoblástica crónica). N901 es un anticuerpo monoclonal de murino que se enlaza al antígeno CD56 (molécula de adhesión celular neural) encontrado en las células de origen neuroendócrino, que incluyen pequeña célula de tumor pulmonar, las cuales pueden ser utilizadas en el inmunoconjugado para fármacos de objetivo para células de origen neuroendócrino. De manera preferible, los anticuerpos J5, MY9, y B4 son recubiertos o humanizados antes de su uso como parte del inmunoconjugado. El recubrimiento o humanización de los anticuerpos se describe, por ejemplo, en Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 969-73 (1994).

Además, el anticuerpo monoclonal C242 enlaza al antígeno CanAg (véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,552,293), y se puede utilizar para dirigir el inmunoconjugado hacia tumores que expresan CanAg, tales como cánceres colorectal, pancreático, pulmonar de célula no pequeña y gástrico. HuC242 es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal C242 (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,552,293). El hibridoma a partir del cual se produce HuC242 es depositado con ECACC número de identificación 90012601. HuC242 se puede preparar utilizando metodología de injerto CDR (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,585,089, 5,693,761, y 5,693,762) o tecnología de recubrimiento (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,639,641). Se puede utilizar para dirigir el inmunoconjugado hacia células tumorales que expresan el antígeno CanAg, tales como, por ejemplo, células de cáncer colorectal, pancreático, pulmonar de célula no pequeña y gástrico.

Para dirigirse a células de cáncer de ovario y de cáncer de próstata, se puede usar un anticuerpo anti-MUC1 como el agente de enlace celular en el inmunoconjugado. Los anticuerpos anti-MUC1 incluyen, por ejemplo, anti-HMFG-2 (véase, por ejemplo, Taylor-Papadimitriou et al., *Int. J. Cancer*, 28: 17-21 (1981)), hCTMOI (véase, por ejemplo, van Hof et al., *Cancer Res.*, 56: 5179-5185 (1996)), y DS6. Las células de cáncer prostático también pueden ser apuntadas con el inmunoconjugado al utilizar un antígeno de membrana anti-próstata-específica (PSMA) como el agente de enlace celular, tal como J591 (véase, por ejemplo, Liu et al., *Cancer Res.*, 57: 3629-3634 (1997)). Además, las células de cáncer que expresan el antígeno Her2, tales como cánceres de mama, próstata y ovarios, pueden ser apuntadas utilizando el anticuerpo trastuzumab. Los anticuerpos anti-IGF-IR que se enlazan al receptor de factor de crecimiento similar a insulina también pueden ser utilizados en el inmunoconjugado.

Los anticuerpos particularmente preferidos son anticuerpos monoclonales

humanizados, los ejemplos de los cuales incluyen huN901, huMy9-6, huB4, huC242, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,639,641 y 5,665,357; Publicación de Solicitud Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2005-0118183 A1, Solicitud de Patente Internacional WO 02/16,401, Pedersen et al., supra, Roguska et al., supra, Liu et al., supra, Nadler et al., supra, Colomer et al., *Cáncer Invest.*, 19: 49-56 (2001), Heider et al., *Eur. J. Cáncer*, 31A: 2385-2391 (1995), Welt et al., *J. Clin. Oncol.*, 12: 1193-1203 (1994), y Maloney et al., *Blood*, 90: 2188-2195 (1997)). De mayor preferencia, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal humanizado huN901 o el anticuerpo monoclonal humanizado huMy9-6. Otros anticuerpos monoclonales humanizados son conocidos en la técnica y se pueden utilizar en conexión con la invención.

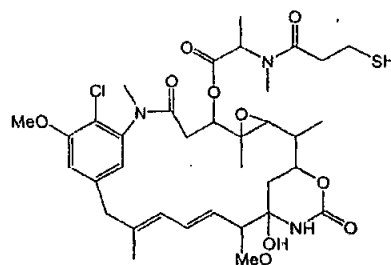
El inmunoconjugado puede comprender cualquier fármaco comprende cualquier fármaco adecuado, de manera común un agente citotóxico. Un "agente citotóxico," como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier compuesto que resulta en la muerte de una célula, induce la muerte celular, o disminuye la viabilidad celular. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoide, taxoides, CC-1065 y análogos CC-1065, y dolastatina y análogos de dolastatina. En una modalidad preferida de la invención, el agente citotóxico es un maitansinoide, que incluye maitansinol y análogos de maitansinol. Maitansinoides son compuestos que inhiben la formación de microtúbulo y son altamente tóxicos para las células de mamíferos. Ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides están descritos por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,256,746, 4,294,757, 4,307,016, 4,313,946, 4,315,929, 4,322,348, 4,331,598, 4,361,650, 4,362,663, 4,364,866, 4,424,219, 4,371,533; 4,450,254, 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, y 6,333,410.

Ejemplos de análogos de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen: (1) C-19-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,256,746) (preparado mediante reducción LAH de ansamitocina P2), (2) C-20-hidroxi (o C-20-demetilo) +/-C-19-decloro (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,361,650 y 4,307,016) (preparados mediante desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o desclorinación utilizando LAH), y (3) C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,294,757) (preparado mediante acilación utilizando cloruros de acilo).

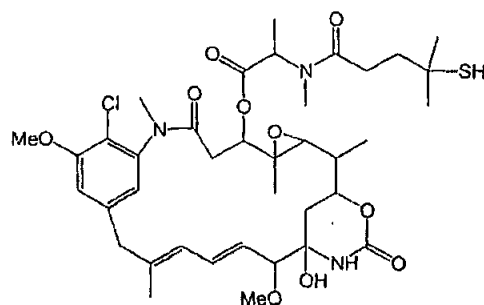
Ejemplos de análogos de maitansinol que tiene modificaciones de posiciones diferentes a aquellas de un anillo aromático incluyen: (1) C-9-SH (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,424,219) (preparado mediante la reacción de maitansinol con H_2S o P_2S_5), (2) C-14-alcoximetilo (demetoxi/ CH_2OR) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,331,598), (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH_2OH o CH_2OAc) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,450,254) (preparado a

partir de Nocardid), (4) C-15- hidroxil/aciloxil (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,364,866) (preparado mediante la conversión de maitansinol a través de Streptomyces), (5) C-15-metoxil (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,313,946 y 4,315,929) (aislado a partir de Trewia nudiflora), (6) C-18-N-demetilil (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,362,663 y 4,322,348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por medio de Streptomyces), y (7) 4,5-deoxil (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,371,533) (preparado mediante la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

En una modalidad preferida de la invención, el inmunocombinado utiliza el maitansinoide que contiene tiol DMI, también conocido como N2'-deacetil-N2'-(3-mercapto-l-oxopropil)-maitansina, como el agente citotóxico. La estructura de DMI está representada por la fórmula (I):



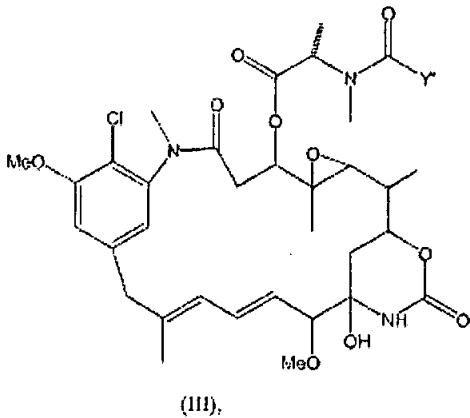
En otra modalidad preferida de la invención, el inmunocombinado utiliza el maitansinoide que contiene tiol DM4, conocido también como N-2'-deacetil-N-2'-(4-metil-4-mercapto-l-oxopentil)-maitansina, como el agente citotóxico. La estructura de DM4 está representada por la fórmula (II):



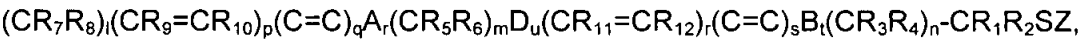
Se pueden utilizar otras maitansinas en el contexto de la invención, incluyendo por ejemplo, maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que poseen una sustitución mono- o di-alquilo en el átomo de carbono que tiene el átomo de azufre. Se prefiere de manera particular un maitansinoide que tiene en la posición C3, la funcionalidad C14hidroximetilil, el C15 hidroxil, o el C20 desmetilil, una cadena lateral de amino ácido acilado con un grupo acilo que tiene un grupo sulfhidrilo impedido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que tiene la funcionalidad tiol posee uno o dos sustituyentes, los sustituyentes que son CH3, C2H5, alquilo o alquencilil lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquencilil cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilil,

fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y en donde además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

Las maitansinas adicionales para uso en el contexto de la invención incluyen compuestos representados por la fórmula (III):



en donde Y' representa



en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y en donde R2 también puede ser H,

en donde A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o heterocíclico aromático o radical heterocicloalquilo.

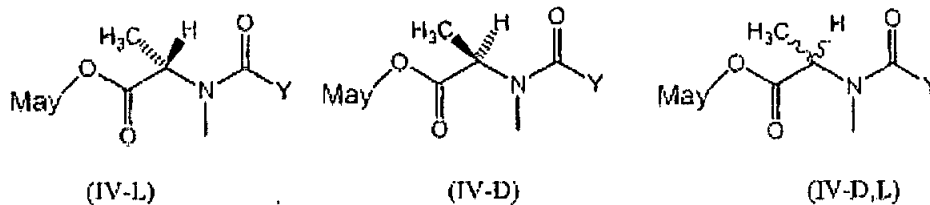
en donde R3,R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 y R12 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico, o heterocicloalquilo.

en donde l, m, n, p, q, r, s, u y t son cada uno, de manera independiente cero o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que dichos por lo menos dos de l, m, n, p, q, r, s, u, y t no sean cero a la vez, y

en donde Z es H, SR, o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

Las modalidades preferidas de la fórmula III incluyen compuestos de la fórmula (III) en donde (a) R1 es H, R2 es metilo y Z es H, (b) R1 y R2 son metilo y Z es H, (c) R1 es H, R2 es metilo y Z es -SCH3, y (d) R1 y R2 son metilo y Z es -SCH3.

Dichas maitansinas incluyen también compuestos representados por la fórmula (IV-L), (IV-D, o (IV-D,L)



en donde R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente H, alquilo lineal, o alquenilo que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH₃ o C₂H₅, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

en donde R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH₃ o C₂H₅, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

en donde l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser cero,

en donde Z es H, SR, o COR en donde R es metilo, alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y

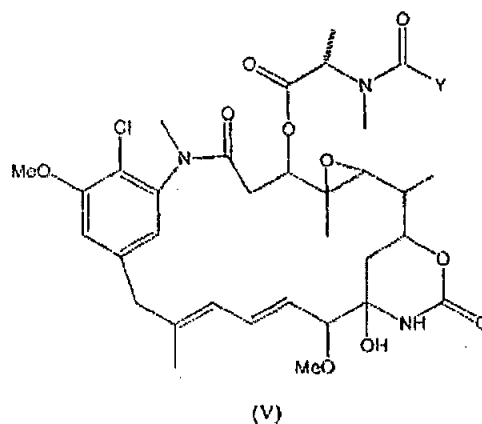
en donde May representa un maitansinoide que tiene la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15-hidroxi, o C-20 desmetilo.

Las modalidades preferidas de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D₅L) incluyen compuestos de las fórmulas (IV-L), (W-D) y (W-D₅L) en donde (a) R₁ es H, R₂ es metilo,

R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada una 1, n es 0, y Z es H, (b) R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son cada una 1, n es 0, y Z es H, (c) R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃, o (d) R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

De preferencia el agente citotóxico está representado por la fórmula (IV-L).

Las maitansinas adicionales preferidas también incluyen compuestos representados por la fórmula (V):



en donde Y representa

en donde Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

5 en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente H, alquilo lineal, o alquenilo que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

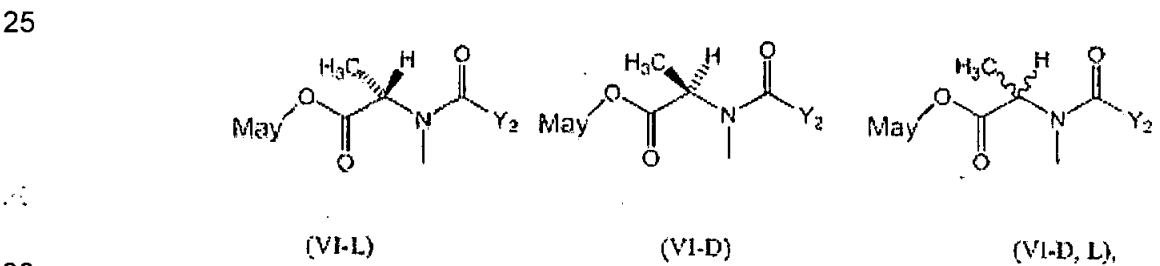
10 en donde R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H. alquilo o alquenilo lineal que tiende de 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

en donde l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además puede n ser cero, y

15 en donde Z es H, SR, o COR en donde R es metilo, alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

Las modalidades preferidas de la fórmula (V) incluyen compuestos de la fórmula (V) en donde (a) R1 es H, R2 es metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0; y Z es H, (b) R1 y R2 son metilo; R5, R6, R7, R8 son cada uno H, l y m son 1; n es 0; y Z es H, (c) R1 es H, R2 es metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH3, o (d) R1 y R2 son metilo, R5, R6, R7, R8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH3.

Además las maitansinas preferidas incluyen también compuestos representados por la fórmula (VI-L), (VI-D, o (VI-D,L)



en donde Y2 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

35 en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente H, alquilo lineal, o alquenilo que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R2 también puede ser H.

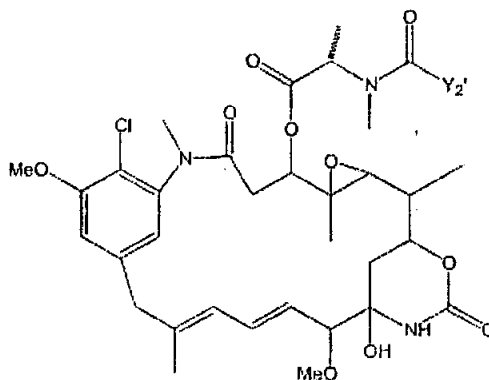
40 en donde R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H. alquilo o alquenilo lineal que tiende de 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

en donde l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser cero,

en donde Z₂ es H, SR, o COR en donde R es metilo, alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y

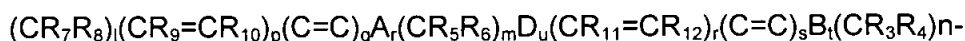
en donde May es un maitansinoide.

Maitansinas adicionales preferidas incluyen compuestos representados por la fórmula (VII):



(VII),

en donde Y' representa



CR₁R₂SZ₂, en donde R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH₃ o C₂H₅, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y en donde R₂ también puede ser H,

en donde A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,

en donde R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ y R₁₂ son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH₃ o C₂H₅, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

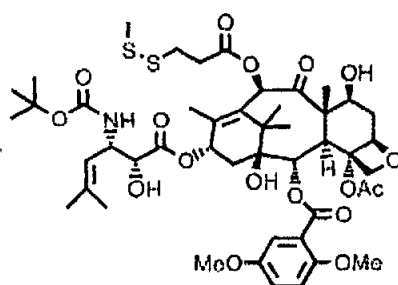
en donde l, m, n, p, q, r, s, t y u son cada uno, de manera independiente cero o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que dichos por lo menos dos de l, m, n, p, q, s, t y u no sean cero a la vez, y

en donde Z₂ es H, SR, o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

Las modalidades preferidas de la fórmula (VII) incluyen compuestos de la fórmula (VII), en donde R₁ es H y R₂ es metilo.

Además de los maitansinoides, el agente citotóxico usado en el inmunoconjugado puede ser un taxano o derivado del mismo. Los taxanos son una familia de compuestos que incluye paclitaxel (Taxol®), un producto natural citotóxico, y docetaxel (Taxotere®), un derivado semi-sintético, los cuales son ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer. Los taxanos son venenos de eje mitótico que inhiben la despolimerización de tubulina, dando como resultado la muerte de la célula. En tanto que docetaxel y paclitaxel son agentes útiles en el tratamiento del cáncer, su actividad antitumoral es limitada debido a su toxicidad no específica hacia las células normales. Además, los compuestos como paclitaxel y docetaxel no son suficientemente potentes para ser utilizados en inmunoconjugados.

Un taxano preferido para uso en la preparación de un inmunoconjugado citotóxico es el taxano de la fórmula (VIII):



(VIII)

Los métodos para sintetizar taxanos que se pueden utilizar en el contexto de la invención, junto con los métodos para conjugar taxanos para agentes de enlace celular tales como anticuerpos, se describen en detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, 6,436,931, 6,596,757, 6,706,708, y 6,716,821, y en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2004/0,024,049 A1.

El agente citotóxico también puede ser CC-1065 o un derivado del mismo.

CC-1065 es un potente antibiótico anti-tumoral aislado a partir del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1000-veces más potente in vitro que los fármacos anticancerígenos utilizados, tales como doxorubicina, metotrexato, y vincristina (Bhuyan et al., *Cáncer Res.*, 42: 3532-3537 (1982)). CC-1065 y sus análogos se describen en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,585,499, 5,846,545, 6,340,701, y 6,372,738. La potencia citotóxica de CC-1065 ha sido correlacionada con su actividad de alquilación y su actividad de enlace ADN o intercalación ADN. Estas dos actividades residen en partes separadas de la molécula. A este respecto, la actividad de alquilación es contenida en la subunidad ciclopropapirroloindol (CPI) y la actividad de enlace ADN reside en las dos subunidades pirroloindol de CC-1065.

Se conocen en la técnica varios análogos CC-1065 y también pueden ser utilizados como el agente citotóxico in el inmunoconjugado (véase, por ejemplo, Warpehoski et al., *J. Med. Chem.*, 31: 590-603 (1988)). Se ha desarrollado una serie de

análogos CC-1065 en los cuales la porción CPI es reemplazada por medio de una porción ciclopropabenzindol (CBI) (Boger et al., J. Org. Chem., 55: 5823-5833 (1990), y Boger et al., Bioorg. Med. Chem. Lett, 1: 115-120 (1991)). Estos análogos CC-1065 mantienen la elevada potencia in vitro del fármaco relacionado, sin ocasionar toxicidad retardada en ratones. Al igual que CC-1065, estos compuestos son agentes de alquilación que enlazan de manera covalente a la ranura menor de ADN para ocasionar la muerte celular.

La eficacia terapéutica de los análogos CC-1065 se puede mejorar en gran medida al cambiar la distribución in vivo a través de la distribución dirigida hacia un sitio tumoral, dando como resultado baja toxicidad para tejidos no apuntados, y por tanto, baja toxicidad sistémica. Para este fin, se han generado conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con agentes de enlace celular que se dirigen de manera específica a células tumorales (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,475,092, 5,585,499, y 5,846,545). Estos conjugados exhiben de manera común alta citotoxicidad específica de objetivo in vitro, y actividad anti-tumoral en modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones (véase, por ejemplo, Chari et al., Cáncer Res., 55: 4079-4084 (1995)).

Los métodos para sintetizar análogos CC-1065 se describen en detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, 6,534,660, 6,586,618, y 6,756,397 y Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2003/0,195,365 A1.

Los fármacos tales como metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalano, mitomicina C, clorambucil, caliqueamicina, tubulisina y análogos de tubulisina, duocarmicina y análogos de duocarmicina, dolastatina y análogos de dolastatina también pueden ser utilizados en el contexto de la invención. Doxorubicina y compuestos de daunorubicina (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,630,579) también pueden ser utilizados como el fármaco.

Los inmunoconjugados pueden ser preparados a través de métodos in vitro. A fin de enlazar un fármaco o profármaco al anticuerpo, se utiliza un grupo de enlace. Los grupos de enlace adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles peptidasa, y grupos lábiles esterasa. Los grupos de enlace preferidos son grupos disulfuro. Por ejemplo, los inmunoconjugados se pueden elaborar empleando una reacción de intercambio de disulfuro entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco. Las moléculas del fármaco también se pueden enlazar a un anticuerpo a una molécula portadora intermediaria tal como albumina del suero.

El anticuerpo puede ser modificado a través de la reacción con un reactivo de entrelazamiento bifuncional, resultando por tanto en la unión covalente de una molécula enlazadora para el anticuerpo. Como se usa en la presente, un "reactivo de entrelazamiento bifuncional" es cualquier porción química que enlaza de manera covalente un agente de enlace celular a un fármaco, tales como los fármacos descritos en

la presente. En una modalidad preferida de la invención, una porción de la porción de enlace es proporcionada por el fármaco. A este respecto, el fármaco comprende una porción de enlace que es parte de una molécula de enlace más grande que aquella utilizada para unir el anticuerpo al fármaco. Por ejemplo, para formar el maitansinoide DMI, la cadena lateral en el grupo hidroxilo C-3 de la maitansina es modificado para tener un grupo sulfhidrilo libre (SH). Esta forma tiolada de maitansina puede reaccionar con un anticuerpo modificado para formar un inmunoconjugado. Por lo tanto, el enlazador final es ensamblado a partir de dos componentes, uno de los cuales es proporcionado por el reactivo de entrelazamiento, mientras que el otro es proporcionado por la cadena lateral de DMI.

Cualquier reactivo de entrelazamiento bifuncional adecuado puede ser usado en relación con la invención, en tanto que el reactivo de enlace proporcione la retención de las características terapéuticas, por ejemplo, citotoxicidad, y de direccionamiento del fármaco y el anticuerpo, respectivamente. De preferencia, la molécula de enlace une el fármaco al anticuerpo a través de enlaces químicos (como se describió con anterioridad), de manera que el fármaco y el anticuerpo son acoplados químicamente (por ejemplo, enlazados de manera covalente) uno con el otro. De preferencia, el reactivo de enlace es un enlazador separable. De mayor preferencia, el enlazador es separado bajo condiciones moderadas, es decir, condiciones dentro de una célula bajo las cuales no se afecta la actividad del fármaco. Los ejemplos de enlazadores separables adecuados incluyen enlazadores disulfuro, enlazadores lábiles ácidos, enlazadores fotolábiles, enlazadores lábiles de peptidasa y enlazadores lábiles esterasa. Los enlazadores que contienen disulfuro son enlazadores separables a través de intercambio de disulfuro, el cual puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas. Los enlazadores lábiles ácidos son enlazadores separables en un pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimientos intracelulares, tales como endosomas y lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5), y proporcionan condiciones adecuadas para separar los enlazadores lábiles ácidos. Los enlazadores fotolábiles son útiles en la superficie del cuerpo y en muchas cavidades corporales que son accesibles a la luz. Además, la luz infrarroja puede penetrar el tejido. Los enlazadores lábiles de peptidasa pueden ser utilizados para separar ciertos péptidos dentro o fuera de las células (véase, por ejemplo, Trouet et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 626-629 (1982), y Umemoto et al., Int. J. Cáncer, 43: 677-684 (1989)).

De preferencia el fármaco es enlazado a un anticuerpo a través de un enlace disulfuro. La molécula de enlace comprende un grupo químico reactivo que puede reaccionar con el anticuerpo. Los grupos químicos reactivos preferidos para reacción con el anticuerpo son ésteres de N-succinimidilo y ésteres de N-sulfosuccinimidilo. De manera adicional, la molécula de enlace comprende un grupo químico reactivo, de preferencia un grupo ditiopiridilo que puede reaccionar con el fármaco para formar un enlace disulfuro. Las moléculas de enlace particularmente preferidas incluyen, por ejemplo, N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (véase, por ejemplo, Carlsson et al., Biochem. J, 173:

723-737 (1978)), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB) (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,563,304), y N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) (véase, por ejemplo, CAS Registry number 341498-08-6).

En tanto que los enlazadores separables son utilizados de manera preferible en el método de la invención, también se puede utilizar un enlazador no separable para generar el inmunoconjugado antes descrito. Un enlazador no separable es cualquier porción química que sea capaz de enlazar un fármaco, tal como un maitansinoide, un taxano, o un análogo CC-1065, a un agente de enlace celular, tal como un anticuerpo, de una manera covalente, estable. Por lo tanto, los enlazadores no separables son sustancialmente resistentes a la separación inducida por ácido, separación inducida por luz, separación inducida por peptidasa, separación inducida por esterasa, y separación de enlace de disulfuro, en condiciones bajo las cuales el fármaco o el anticuerpo permanecen activos.

Los reactivos de entrelazamiento adecuados que forman enlazadores no separables entre un fármaco y un agente de enlace celular son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de enlazadores no separables incluyen enlazadores que tienen un éster de N-succinimidilo o porción éster de N-sulfosuccinimidilo para reacción con el agente de enlace celular, así como una porción en base a maleimido- o haloacetilo para reacción con el fármaco. Los reactivos de entrelazamiento que comprenden una porción en base a maleimido incluyen N-succinimidilo 4-(maleimidometil)ciclohexancarboxilato (SMCC), N-succinimidilo-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproato), el cual es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), éster de N-succinimidilo de ácido K-maleimidoundecanoico (KMUA), éster de N-succinimidilo de ácido γ -maleimidobutirico (GMBS), éster de N-hidroxisuccinimida de ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)-hexanoato (SMPH), N-succinimidilo 4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB), y N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI). Los reactivos de entrelazamiento que comprende una porción en base a haloacetilo incluye N-succinimidil-4-(iodoacetilo)-arninobenzoato (SLAB), iodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA), y N-succinimidilo 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP).

Otros reactivos de entrelazamiento que carecen de un átomo de azufre que forma enlazadores no separables también pueden ser empleados en el método de la invención. Dichos enlazadores pueden ser derivados a partir de porciones en base a ácido dicarboxílico. Las porciones adecuadas en base a ácido dicarboxílico incluyen, pero no se limitan a, ácidos α,ω -dicarboxílicos de la fórmula general (IX):



en donde X es un grupo alquilo, alquenilo, o alquinilo lineal o ramificado que tiene

2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo que ostenta de 3 hasta 10 átomos de carbono, Z es a

grupo aromático sustituido o no sustituido que tiene de 6 hasta 10 átomos de carbono, o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el hetero átomo es
5 seleccionado a partir de N, O o S, y en donde l, m, y n son cada uno 0 o 1, a condición de que l, m, y n no sean todos cero al mismo tiempo.

Muchos de los enlazadores no separables descritos en la presente se describen en detalle en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2005-0169933 A1.

10 De manera alternativa, como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,441,163 B1, el fármaco puede ser modificado primero para introducir un éster reactivo adecuado para reaccionar con un anticuerpo. La reacción de estos maitansinoides que contienen una porción de enlace activada con un anticuerpo proporciona otro método para producir un conjugado de maitansinoide de anticuerpo
15 separable o no separable.

Los procesos para la elaboración de dichas composiciones farmacéuticas involucran intercambio de regulador de pH de la composición farmacéutica en el regulador de pH de formulación apropiado mediante cromatografía o diafiltración y agregar después los excipientes adecuados en la cantidad deseada, ya sea como solución o como sólido.
20 También se puede ejecutar el ajuste final de la concentración de proteína y/o el pH para lograr la composición deseada.

Los inmunoconjugados de la invención son administrados al paciente en la forma de una formulación farmacéutica descrita en esta solicitud y un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o diluyente de la misma. Como se utiliza,
25 "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos agentes que son útiles en el tratamiento o diagnóstico de mamíferos, de preferencia humanos. El modo de administración preferido es parenteral, en particular a través de ruta intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, o intralinfática. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., 1980, Mack Publishing Company,
30 editado por Osol et al. Dichas composiciones pueden incluir proteínas, tales como proteínas del suero, por ejemplo, albumina de suero humano, reguladores de pH o sustancias reguladoras de pH tales como fosfatos, otras sales, o electrolitos, y similares. Los diluyentes adecuados pueden incluir, por ejemplo, agua estéril, solución salina isotónica, dextrosa acuosa diluida, un alcohol polihídrico o mezclas de dichos alcoholes,
35 por ejemplo, glicerina, propilen glicol, polietilen glicol y similares. Las formulaciones pueden contener conservadores tales como alcohol fenético, metil y propil parabenos, y similares. Si se desea, la formulación puede incluir 0.05 hasta aproximadamente 0.20 por ciento en peso de un antioxidante.

La administración puede ser a través de cualquier ruta conocida por ser efectiva
40 por el médico de experiencia ordinaria. La administración parenteral es la preferida. Las

5 rutas parenterales preferidas para administrar las formulaciones de la presente invención incluyen rutas de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intraarterial. Las rutas de administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, y subcutánea de los compuestos usados en la presente invención son las rutas de administración parenteral más preferidas. Las rutas de administración intravenosa, intraperitoneal, y subcutánea de las formulaciones de la presente invención son de más alta preferencia.

10 La administración a través de ciertas rutas parenterales pueden involucrar la introducción de de las formulaciones de la presente invención en el cuerpo de un paciente a través de una aguja o un catéter. De manera opcional, dicha administración puede ser impulsada por medio de una jeringa estéril o algún otro dispositivo mecánico tal como un sistema de infusión continua. Una formulación proporcionada por la presente invención puede administrada utilizando una jeringa, inyector, bomba, o cualquier otro dispositivo o mediante gravedad reconocidos en la técnica para administración parenteral. La formulación puede ser administrada de forma parenteral, en formas de dosis líquida estéril. Estas formulaciones pueden ser administradas por vía intravenosa como un bolo o infusión rápida, las cuales pueden, además de su efecto terapéutico, de diagnóstico o medicinal deseado, ocasionar la liberación del inmunoconjugado.

20 Los inmunoconjugados de la invención son efectivos en rango un amplio rango de dosis dependiendo de los factores tales como el estado de enfermedad que se va a tratar o el efecto biológico que se va a modificar, la manera en la cual el inmunoconjugado es administrado, la edad, peso y condición del paciente así como otros factores que serán determinados por el médico tratante. Por tanto, la cantidad administrada a cualquier paciente se puede determinar en una base individual.

25 La cantidad de una formulación de la presente invención que es administrada para tratar a un paciente puede depender de un número de factores, entre los cuales están incluidos, sin limitación, el sexo, peso y edad del paciente, las causas subyacentes de la condición o enfermedad que se va a tratar, la ruta de administración y la biodisponibilidad, la persistencia del inmunoconjugado administrado en el cuerpo, la formulación, y la potencia del inmunoconjugado. Cuando la administración es intermitente, la cantidad por administración también considerará el intervalo entre las dosis, y la biodisponibilidad del inmunoconjugado a partir de la formulación. La administración de la formulación de la presente invención podría ser continua. Está dentro de la habilidad ordinaria de un médico el determinar la dosis y velocidad de infusión o frecuencia de administración de la formulación de la presente invención a fin de lograr el resultado clínico deseado.

35 La dosis administrada variará, por supuesto, dependiendo de factores conocidos tales como las características farmacodinámicas del agente particular, y su modo y ruta de administración; edad, estado de salud y peso del receptor; naturaleza y extensión de los síntomas, clase de tratamiento concurrente, frecuencia del tratamiento, y el efecto deseado. Usualmente una dosis diaria del compuesto terapéuticamente significativo

puede ser de aproximadamente 0.1 hasta 100 miligramos por kilogramo de peso corporal.

Las formas de dosis para administración interna contienen desde aproximadamente 1 miligramo hasta aproximadamente 500 miligramos de compuesto terapéuticamente significativo por unidad. En estas composiciones farmacéuticas el compuesto terapéuticamente significativo estará presente de manera ordinaria en una cantidad de aproximadamente 0.05-2% en peso en una formulación líquida y 2- 50% en la formulación liofilizada antes de la reconstitución en base al peso total de la composición.

La presente invención proporciona también un polvo liofilizado de la formulación antes descrita. De preferencia, la formulación liofilizada comprende uno o más componentes adicionales, tales como un lioprotector y/o un agente de acumulación. El polvo liofilizado puede ser reconstituido con agua para crear una solución reconstituida. La presente formulación puede ser liofilizada y reconstituida como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2004/0,241,174 A1, cuya descripción está incorporada a la presente mediante referencia, y que describe formulaciones liofilizadas que comprenden inmunoconjugados.

Antes de la reconstitución de la composición liofilizada, las cantidades relativas de cada componente que comprende la composición liofilizada de la invención se pueden describir en términos de mg de excipiente (por ejemplo, regulador de pH, agente tensioactivo, agente de acumulación, crioprotector) por mg de conjugado.

En tanto que cualquier agente de regulación de pH adecuado descrito en la presente puede ser utilizado en relación con la composición liofilizada de la invención, la composición liofilizada comprende de preferencia un regulador de pH de succinato de sodio. El agente regulador de pH puede estar presente en la composición liofilizada de la invención en cualquier cantidad adecuada. En particular, la composición liofilizada comprende de manera deseable aproximadamente 0.1 mg hasta aproximadamente 2 mg del agente regulador de pH por mg del conjugado (por ejemplo, aproximadamente 0.1 mg hasta aproximadamente 0.5 mg de agente regulador de pH por mg del conjugado, aproximadamente 0.5 mg hasta aproximadamente 1 mg de agente regulador de pH por mg del conjugado, o aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 2 mg de agente regulador de pH por mg del conjugado). De mayor preferencia, la composición liofilizada comprende aproximadamente 0.3 mg de regulador de pH de succinato de sodio por mg del conjugado.

La composición liofilizada comprende de manera deseable aproximadamente 0.005 mg hasta aproximadamente 0.1 mg de polisorbato por mg del conjugado, y de preferencia aproximadamente 0.005 mg hasta aproximadamente 0.01 mg de polisorbato por mg del conjugado, 0.01 mg hasta aproximadamente 0.05 mg de polisorbato por mg del conjugado, o aproximadamente 0.05 mg de polisorbato hasta aproximadamente 0.1 mg de polisorbato por mg del conjugado. Cuando el polisorbato es polisorbato 20, la composición liofilizada de preferencia comprende aproximadamente 0.02 mg de polisorbato 20 por mg del conjugado.

A fin de evitar la degradación de los ingredientes activos de la composición durante la congelación y secado, la composición liofilizada de la invención comprende además un crioprotector, de preferencia un crioprotector amorfo. El término "crioprotector," como se utiliza en la presente, se refiere a un excipiente que protege las moléculas inestables durante la congelación. Los crioprotectores adecuados para uso en la composición liofilizada son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica, e incluyen, por ejemplo, glicerol, dimetil sulfoxido (DMSO), polietilen glicol (PEG), dextrano, glucosa, trehalosa, y sacarosa. De mayor preferencia, el crioprotector es sacarosa. El crioprotector puede estar presente en la composición liofilizada de la invención en cualquier cantidad adecuada. La composición liofilizada que comprende de manera deseable aproximadamente 0.5 mg hasta aproximadamente 5 mg, por ejemplo, aproximadamente 0.5 mg hasta aproximadamente 2 mg del crioprotector por mg del conjugado, aproximadamente 0.8 mg del crioprotector por mg del conjugado, aproximadamente 2 mg del crioprotector por mg del conjugado, o aproximadamente 4 mg del crioprotector por mg del conjugado. Cuando el crioprotector es sacarosa, la composición liofilizada de preferencia comprende aproximadamente 0.5 mg hasta aproximadamente 2 mg (por ejemplo, aproximadamente 1 mg) sacarosa por mg del conjugado.

La composición liofilizada puede contener además un agente de acumulación, de preferencia un agente de acumulación cristalizable. Los agentes de acumulación comúnmente son utilizados en la técnica para proporcionar estructura y peso a la "torta" producida como resultado de la liofilización. Cualquier agente de acumulación adecuado conocido en la técnica puede ser utilizado en relación con la composición liofilizada de la invención. Los agentes de acumulación adecuados incluyen, por ejemplo, manitol, dextran, y glicina. De mayor preferencia, el agente de acumulación usado en la composición de la invención es glicina. La composición liofilizada puede contener cualquier cantidad adecuada del agente de acumulación, aunque de preferencia la composición liofilizada comprende aproximadamente 2 mg hasta aproximadamente 20 mg del agente de acumulación por mg del conjugado, y de preferencia aproximadamente 2 mg hasta aproximadamente 10 mg del agente de acumulación por mg del conjugado, aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 10 mg del agente de acumulación por mg del conjugado, aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 15 mg del agente de acumulación por mg del conjugado, o aproximadamente 15 mg hasta aproximadamente 20 mg del agente de acumulación por mg del conjugado. Cuando el agente de acumulación es glicina, la composición liofilizada de preferencia comprende aproximadamente 3.8 mg glicina por mg del conjugado.

Por tanto, de acuerdo con la invención, los contenidos de una composición liofilizada que se van a reconstituir para contener 5 mg/mL de conjugado (por ejemplo, de preferencia un conjugado comprende huN901 químicamente acoplado a DMI) de preferencia comprende (i) aproximadamente 0.3 mg regulador de pH de succinato de

sodio por mg del conjugado, (ii) aproximadamente 0.02 mg polisorbato 20 por mg del conjugado, (iii) aproximadamente 1 mg sacarosa por mg del conjugado, y (iv) aproximadamente 3.8 mg glicina por mg del conjugado. Una vez reconstituida con agua, dicha composición liofilizada tiene de preferencia un pH de aproximadamente 5.5.

Además, cuando la composición liofilizada es reconstituida con agua, las descripciones de las concentraciones relativas de los excipientes antes establecidos en relación con la formulación líquida son aplicables para la composición liofilizada antes mencionada.

Los métodos de liofilización son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Wang, W., Int. J. Pharm., 203, 1-60 (2000). Por ejemplo, la composición liofilizada de la invención puede ser producida usando un ciclo de liofilización que comprende las siguientes etapas: (1) pre-enfriamiento a una temperatura de anaquel de 4° C. y presión de cámara ambiente durante 2.5 horas, (2) congelar a una temperatura de anaquel de -50° C. y presión de cámara ambiente durante 14 horas, (3) recristalización de glicina a una temperatura de anaquel de -20° C. y presión de cámara ambiente durante 6 horas, (4) re-congelación a una temperatura de anaquel de -50° C y presión de cámara ambiente durante 16 horas, (5) secado primario a una temperatura de anaquel de -13° C. y 100 mTorr de presión durante 24 horas, (6) secado secundario a una temperatura de anaquel de 24° C. y 100 mTorr de presión durante 10 horas, y (7) fase de tapón temperatura de anaquel de 24° C. y presión de cámara ambiente. Sin embargo, la composición liofilizada, no está limitada a las composiciones producidas a través del método antes descrito. De hecho, se puede utilizar cualquier método de liofilización para producir la composición liofilizada, y será evidente para aquellos con experiencia en la técnica que los parámetros de liofilización seleccionados (por ejemplo, tiempos de secado) variarán dependiendo de una gama de factores, que incluyen el volumen de la solución que se va a liofilizar.

En otra modalidad, la presente invención está dirigida a un equipo para la preparación de una formulación acuosa, cuyo equipo comprende un primer recipiente que contiene un polvo liofilizado y un segundo recipiente que contiene una formulación acuosa que comprende un estabilizador de reconstitución. La concentración del polvo liofilizado en la solución, el volumen de la solución que es cargado dentro de cada recipiente y la capacidad de los recipientes son parámetros interrelacionados que pueden ser adecuadamente modificados, dependiendo de la concentración deseada del principio activo en la unidad de dosis final. Por lo tanto, estos parámetros pueden variar en rangos amplios.

Todas las patentes, publicaciones, y otras referencias citadas en la presente están expresamente incorporadas mediante referencia en su totalidad.

La presente invención está descrita además por los siguientes ejemplos, los cuales son ilustrativos del proceso y no serán considerados como limitantes de la invención. Los parámetros de proceso dados a continuación pueden ser adoptados y adaptados por la persona experimentada para adecuarlos a la necesidad particular.

EJEMPLO 1

5 Este ejemplo muestra el efecto de los siguientes excipientes de formulación sobre la apariencia visual de las muestras de conjugado MAb-DMI formuladas.

10 Muestras de huN901-SPP-DMI fueron colocadas en 1.0 mg/mL in 10 mM de regulador de pH de fosfato pH 6.5 con 140 mM NaCl con cada uno de los excipientes listados a continuación. Los excipientes fueron agregados de manera directa a la muestra de huN901-SPP-DMI en una base de %p/p (peso de excipiente / peso de solución).
15 Inmediatamente después de la adición del excipiente, las formulaciones fueron filtradas, y se condujeron pruebas de apariencia y conteo de partícula. Las muestras fueron almacenadas después a 4°C durante el tiempo de estudio, y fueron probadas de nuevo en los puntos de tiempo de 2 semanas y 1 mes. Para la apariencia, las muestras fueron probadas a través de la examinación de por lo menos 1.0 mL de solución contra un fondo blanco para claridad y contra un fondo negro bajo luz blanca para la presencia o ausencia de partículas visibles. Los resultados se reportaron como presencia o ausencia de partículas visibles. Las partículas subvisibles con un tamaño de más de 5 µm también fueron medidas con un contador de partículas HIAC calibrado para medir tamaño de partícula entre 2 y 100 µm.

20

Apariencia:

Excipiente	Inicial	2 Semanas	1 Mes
5% sacarosa	Transparente	Transparente	Transparente
25 10% sacarosa	Transparente	Transparente	Transparente
0.1% tween20	Transparente	Transparente	Transparente
0.8% tween20	Transparente	Partículas	Transparente
1 % ciclodextrina	Transparente	Transparente	Transparente
1 % dextrosa	Transparente	Transparente	Partículas
30 5% glicerol	Transparente	Transparente	Partículas
2% PEG6000	Transparente	Transparente	Partículas
5% manitol	Transparente	Partículas	Partículas
Control filtrado*	Transparente	Transparente	Partículas

*filtrado poco antes del punto de tiempo inicial

35 **Conteo de partícula (conteos > 5 µm per mL):**

Excipiente	Conteos de particular acumulativos		
	Inicial	2 Semanas	1 Mes
5% sacarosa	94	120	84

10% sacarosa	68	14	58
0.1% Tween20	40	76	76
0.8% Tween20	86	120	120
1% Beta-Ciclodextrina	8	4	10
1% Dextrosa	388	608	502
5% Glicerol	4	32	42
2% PEG	12	6	72
5% manitol	46	144	70
Control filtrado	222	284	720

Se observaron los efectos positivos de la sacarosa, TWEEN-20™, beta-ciclodextrina, dextrosa, glicerol, manitol y polietilen glicol (PEG).

5 EJEMPLO 2

Este ejemplo muestra el efecto de los amino ácidos en la estabilidad de huN901-SPP-DMI con respecto a la agregación de conjugado.

10 Muestras de huN901-SPP-DMI fueron colocadas en 5.0 mg/mL en los siguientes reguladores de pH y almacenadas a 2-8 y 25°C durante 12 meses. El contenido agregado de conjugado fue probado con una prueba cromatográfica en los puntos de tiempo de 1, 3, 6 y 12 meses.

- 15 (1) 10 mM fosfato de sodio, 140 mM NaCl, pH 6.5.
(2) 10 mM citrato de sodio, 135 mM NaCl, 0.01 % polisorbato 20, pH 5.5.
(3) 10 mM citrato de sodio, 130 mM histidina, 0.01 % polisorbato 20, pH 5.5
(4) 10 mM citrato de sodio, 110 mM glicina, 80 mM NaCl, 0.01 % polisorbato 20, pH 5.5.

20

Formulación	T0	2-8°C				25°C			
		1 mes	3 meses	6 meses	12 meses	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses
Composición 1	5.3	6.7	8.1	8.6	8.9	8.7	10.2	10.4	11.8
Composición 2	4.5	5.0	5.4	5.6	5.5	5.8	6.6	7.2	8.2
Composición 3	4.1	4.1	4.2	4.1	3.8	4.5	4.7	5.0	6.1
Composición 4	4.2	4.5	4.8	4.9	4.9	5.2	5.8	6.2	7.3

El ejemplo 1 muestra que la histidina mejora la formulación con respecto a evitar la formación de agregado del conjugado. La glicina también tuvo beneficios.

25

EJEMPLO 3

Este ejemplo muestra el efecto de la histidina en la estabilidad del conjugado huMy9-6-SPDB-DM4 en términos del agregado de conjugado.

El conjugado huMy9-6-SPDB-DM4 fue formulado a 5.0 mg/mL en:

- 5
- (1) 10 mM citrato de sodio, 135 mM NaCl, pH 5.5
- (2) 150 mM histidina/cloruro de histidina, pH 5.5

Las muestras fueron incubadas a 2-8°C y 25°C durante 6 meses, después de lo cual fueron probadas para agregado del conjugado mediante ensayo cromatográfico.

10

Formulación	T0	2-8 °C, 6 mon	25 °C, 6 mon
Composición 1	3.5	4.0	8 2
Composición 2	3.2	3.2	7 1

Los datos muestran los efectos benéficos de la histidina en la prevención de la formación de agregado.

EJEMPLO 4

15

Este ejemplo muestra el efecto del agente regulador de pH, azúcar y amino ácido en la estabilidad de huC242-SPDB-DM4 con respecto al agregado de conjugado.

Las muestras de huC242-SPDB-DM4 a 5.0 mg/mL en:

- 20
- (1) 10 mM citrato de sodio, 135mM NaCl, pH 5.5
- (2) 10 mM citrato de sodio, 5% sacarosa, 130 mM glicina, 0.1% polisorbato 80, pH 5.5
- (3) 10 mM histidina/cloruro de histidina, 5% sacarosa, 130 mM glicina, pH 5.5

Se ejecutaron las pruebas para contenido de monómero y agregado de conjugado a T₀, y después de 3 meses de almacenamiento a 2-8°C y 25°C.

25

Formulación	Agregado (%)		
	T0	2-8°C, 3 meses	25°C, 3 meses
Composición 1	4.0	4.3	9.1
Composición 2	3.2	3.7	5.9
Composición 3	2.4	2.3	3.8

Los datos muestran que la sacarosa y la glicina, juntas en la combinación anterior, mejoran la formulación con respecto a la protección contra la agregación de conjugado. La mejora más importante se observó cuando la combinación de sacarosa y glicina es usada con histidina.

30

EJEMPLO 5

Este ejemplo muestra el efecto de varias formulaciones que contienen sacarosa con y sin glicina en el contenido de agregado de conjugado huN901-SPP-DMI.

Las muestras de huN901-SPP-DMI a una concentración de 5.0 mg/mL en cada una de las siguientes formulaciones líquidas fueron probadas para contenidos de monómero y agregado.

- (1) 10 mM citrato de sodio, 135 mM NaCl, 0.01% polisorbato 20, pH 5.5
- (2) 10 mM citrato de sodio, 60 mM NaCl, 5% sacarosa, pH 5.5
- (3) 10 mM citrato de sodio, 60 mM NaCl, 0.01% polisorbato 20, 5 % sacarosa, pH 5.5
- (4) 10 mM fosfato de sodio, 140 mM NaCl pH 6.5
- (5) 10 mM succinato de sodio, 0.25 M glicina, 0.01% polisorbato 20, 0.5% sacarosa, pH 5.5

Las muestras almacenadas a 25°C fueron probadas para contenidos de agregado en los puntos de tiempo de 3, 6 y 12 meses.

Formulación	Agregado (%)		
	3 meses	6 meses	12 meses
Composición 1	6.7	7.3	8.2
Composición 2	5.2	5.7	6.2
Composición 3	5.6	5.4	6.5
Composición 4	10.0	10.4	11.8
Composición 5	4.4	4.7	4.4

En todos los casos las formulaciones que contienen sacarosa tienen menor contenido de agregado que aquellas con glicina. La formulación que contiene glicina (composición 5) tuvo la mejor estabilidad en este ejemplo.

EJEMPLO 6

Este ejemplo muestra el efecto de polisorbato 80 en la formación de partícula inducida por agitación. Se espera que esta condición de tensión (agitación) imite las tensiones encontradas durante el embarque y manejo del conjugado liquido, en oposición a las tensiones encontradas durante el almacenamiento estático (las cuales se resolvieron en el Ejemplo 1).

Las muestras de huC242-SPDB-DM4 fueron colocadas en 1 mg/mL en los siguientes reguladores de pH y colocadas en envases de vidrio USP Tipo 1 (5mL en un envase de 10 mL) los cuales fueron sellados con Flurotec® Stoppers. Los envases fueron agitados durante 48 horas a 100 rpm a temperatura ambiente, utilizando un Agitador Orbital Lab-Line.

- (1) 10 mM citrato de sodio, 135 mM cloruro de sodio, pH 5.5
- (2) 10 mM histidina, 5% sacarosa, 130 mM glicina, pH 5.5
- (3) 10 mM histidina, 5% sacarosa, 130 mM glicina, 0.1% polisorbato 80, pH 5.5
- (4) 10 mM histidina, 1% sacarosa, 250 mM glicina, pH 5.5
- 5 (5) 10 mM histidina, 1% sacarosa, 250 mM glicina, 0.1% polisorbato 80, pH 5.5
- (6) 10 mM histidina, 280 mM glicina, pH 5.5
- (7) 10 mM histidina, 280 mM glicina, 0.1% polisorbato 80, pH 5.5
- (8) 10 mM histidina, 10% sacarosa, pH 5.5
- (9) 10 mM histidina, 10% sacarosa, 0.1% polisorbato 80, pH 5.5

10 Después de la agitación durante 48 horas todos los envases fueron inspeccionados visualmente. Aquellos que contenían polisorbato 80 (Composiciones 3, 5, 7 y 9) permanecieron transparentes, en tanto que todos aquellos que no contenían polisorbato 80 (1, 2, 4, 6 y 8) estuvieron turbios. Estos datos demuestran el efecto benéfico del polisorbato 80 en la reducción de partículas debidas a la agitación, tal como

15 se puede encontrar durante el embarque y manejo del conjugado líquido.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de inmunoconjugado que comprende:

(a) un inmunoconjugado; y

5 (b) uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende sacarosa, polisorbato 20, polisorbato 80, ciclodextrina, dextrosa, glicerol, polietilen glicol, manitol, cloruro de sodio, y un amino ácido, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6.

10 2. La formulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la formulación comprende uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende:

(i) 0.1-12% sacarosa,

(ii) 0.005-1.0% polisorbato 20,

(iii) 0.5-2% beta-ciclodextrina,

15 (iv) 2-8% glicerol,

(v) 1-5% PEG6000,

(vi) 2-8% manitol,

(vii) 0.005-1.0% polisorbato 80,

(viii) 5-20 mM histidina,

20 (ix) 100-300 mM glicina, and

(x) 50-300 mM cloruro de sodio.

3. La formulación de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la formulación comprende uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende:

25 (i) 5-10% sacarosa,

(ii) 0.005 - 0.2 % polisorbato 20,

(iii) 0.5-1% beta-ciclodextrina,

(iv) 2-5% glicerol,

(v) 2-3% PEG6000,

30 (vi) 3-5% manitol,

(vii) 0.005 - 0.2 % polisorbato 80, (viii) 10-15 mM histidina, (ix) 130-250 mM glicina, y (x) 100-200 mM cloruro de sodio.

4. La formulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la solución acuosa regulada en su pH contiene uno o más de histidina, succinato, citrato, fosfato, y acetato.

5. La formulación de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque el pH es desde 5.0 hasta 7.0.

6. La formulación de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque el pH es desde 5.0 hasta 6.0.

40 7. La formulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el

inmunoconjugado comprende un anticuerpo humanizado seleccionado a partir del grupo que comprende huMy9-6, huC242, huN901, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab.

5 8. La formulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el inmunoconjugado comprende un fármaco citotóxico seleccionados a partir del grupo que comprende a maitansinoide, un taxano, y un CC-1065.

9. Una formulación de inmunoconjugado que comprende:

(a) un inmunoconjugado; y

10 (b) uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende histidina, sacarosa, glicina y cloruro de sodio, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6.

10. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque la formulación comprende uno o más excipientes seleccionados a partir de 5-200 mM histidina, 100-200 mM glicina, y 2-8% sacarosa.

15 11. La formulación de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque el excipiente es 5- 100 mM histidina o 100- 150 mM glicina.

12. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque la formulación contiene 2-8% sacarosa y 100-150 mM glicina.

20 13. La formulación de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque la formulación contiene 10 mM histidina, 5% sacarosa y 130 mM glicina.

14. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque la solución acuosa regulada en su pH contiene uno o más de histidina, succinato, citrato, fosfato, y acetato.

25 15. La formulación de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque el pH es desde 5.0 hasta 7.0.

16. La formulación de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque el pH es desde 5.0 hasta 6.0.

17. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, que comprende además polisorbato 20 y/o polisorbato 80.

30 18. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque el inmunoconjugado comprende un anticuerpo humanizado seleccionado a partir del grupo que comprende huMy9-6, huC242, huN901, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab.

35 19. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque el inmunoconjugado comprende a fármaco citotóxico seleccionados a partir del grupo que comprende un maitansinoide, un taxano, y un CC-1065.

20. Una formulación de inmunoconjugado que consta esencialmente de:

(a) inmunoconjugado huN901-DML a una concentración desde 0.5-10 mg/ml;

(b) 5-15 mM histidina y/o 5-15 mM succinato;

40 (c) 0.1-10 % sacarosa y/o 100-300 mM glicina;

(d) 0.005-0.2% polisorbato 80 y/o 0.005-0.2% polisorbato 20, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH desde 5-6.

21. Una formulación de inmunoconjugado que consta esencialmente de:

(a) inmunoconjugado huC242-DM4 a una concentración desde 0.5-10 mg/ml;

5

(b) 5-15 mM histidina;

(c) 0.1-10 % sacarosa y/o 100-300 mM glicina;

(d) 0.005-0.2% polisorbato 80 y/o 0.005-0.2% polisorbato 20; en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH desde 5-6.

RESUMEN

La presente invención proporciona una formulación de inmunoconjugado que está sustancialmente libre de partículas, la formulación de inmunoconjugado que comprende:

5 un inmunoconjugado y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende: sacarosa, polisorbato 20, polisorbato 80, ciclodextrina, dextrosa, glicerol, polietilen glicol, manitol, cloruro de sodio, y un amino ácido, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6. La presente invención proporciona también una formulación de inmunoconjugado que está

10 sustancialmente libre de agregados, la formulación de inmunoconjugado que comprende: un inmunoconjugado y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende histidina, sacarosa, glicina y cloruro de sodio, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6. La presente invención proporciona además una formulación de inmunoconjugado que está

15 sustancialmente libre tanto de partículas como de agregados.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To: Susan J. Mack
Sughrue Mion, PLLC
2100 Pennsylvania Ave., NW
Suite 800
Washington, DC 20037-3213

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year) **30 MAR 2007**

Applicant's or agent's file reference
F206822

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US 06/30295

International filing date
(day/month/year) **02 August 2006 (02.08.2006)**

Applicant **Immungen, Inc.**

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

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

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

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 740 14 35

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

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

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
 - ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

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

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

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

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

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

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/220 (January 2004)

(See notes on accompanying sheet)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference F206822	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 06/30295	International filing date (day/month/year) 02 August 2006 (02.08.2006)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 03 August 2005 (03.08.2005)
Applicant Immungen, 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 9 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
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 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 No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. 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:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box 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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/30295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/00; C07K 16/00 (2007.01)

USPC - 424/178.1

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

USPC - 424/178.1, 530/391.1

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

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

WEST(USPT,USOC,EPAB,JPAB); Hun901, dm1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0241174 A1 (Amphlet et al.) 02 December 2004 (02.12.2004) entire document, especially paragraphs 7, 15, 19, 23, 25-26, 30, 37, 77	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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 application or patent 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 Feb 2007 (12.02.2007)

Date of mailing of the international search report

30 MAR 2007

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

To: Susan J. Mack
Sughrue Mion, PLLC
2100 Pennsylvania Ave., NW
Suite 800
Washington, DC 20037-3213

Date of mailing
(day/month/year) **30 MAR 2007**

Applicant's or agent's file reference
F206822

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US 06/30295

International filing date (day/month/year)
02 August 2006 (02.08.2006)

Priority date (day/month/year)
03 August 2005 (03.08.2005)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - A61K 39/00; C07K 16/00 (2007.01)
USPC - 424/178.1

Applicant **Immungen, Inc.**

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

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that 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 66.1bis(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 3 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.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion
12 Feb 2007 (12.02.2007)

Authorized officer:
Lee W. Young

PCT Helpdesk: 671-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (April 2005)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 06/30295

Box No. I Basis of this 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
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) 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

- ☐ on paper
☐ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☐ contained in the international application as filed
☐ filed together with the international application in electronic 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(s) 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:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 06/30295

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

1. Statement

Novelty (N)	Claims	13, 21	YES
	Claims	1-12, 14-20	NO
Inventive step (IS)	Claims	None	YES
	Claims	1-21	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims	None	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-12 and 14-20 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2004/0241174 A1 to Amphlett et al. (hereafter 'Amphlett').

As per claims 1-9 and 14-20, Amphlett teaches a composition comprising an immunoconjugate of hun901 and DM1 (DM1 is a maytansinoid), 0.15% sucrose, 0.01% polysorbate 20, 5.5 mM succinate, 233 mM glycine, and a pH of 5.5 (para [37]).

As per claims 10 and 11, Amphlett teaches a composition comprising an immunoconjugate and 3.8 mg glycine per mg of immunoconjugate, and a pH of 5.5 (para [37]). Amphlett further teaches that any combination of elements is encompassed by the invention (para [77]). Amphlett further teaches that the immunoconjugate may be present at 3mg/mL (para [23]). Following the formulation guideline of 3.8 mg glycine per mg of immunoconjugate, at 3 mg/mL of immunoconjugate, the formulation would comprise 100-150 mM glycine (about 140 mM).

As per claim 12, Amphlett further teaches that the composition comprises 1mg sucrose per mg of immunoconjugate (para [37]). Following the formulation guideline of 3.8 mg sucrose per mg of immunoconjugate, at 3 mg/mL of immunoconjugate, the formulation would comprise 2-8% sucrose (3% sucrose).

Claims 13 and 21 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious Amphlett.

As per claim 13, Amphlett teaches a composition comprising an immunoconjugate, sucrose, succinate, glycine, and a pH of 5.5 (para [37]). Amphlett further teaches that succinate and histidine are useful in the compositions as buffers. Amphlett does not teach a composition comprising an immunoconjugate, 10mM histidine, 5% sucrose, 130 mM glycine, and a pH of 4.5-7.6. It would have been obvious to a skilled artisan at the time the invention was made to formulate the composition with an immunoconjugate, 10mM histidine, 5% sucrose, 130 mM glycine, and a pH of 4.5-7.6 to obtain the invention as claimed based on routine experimentation and design.

As per claim 21, Amphlett teaches a composition comprising an immunoconjugate of an antibody chemically coupled to a maytansinoid and with a pH of 5-6 (para [7]). Amphlett further teaches that the immunoconjugate can be in an amount of about 5 mg/mL (para [23]). Amphlett further teaches that the antibody can be huC242 (para [15]). Amphlett further teaches that the maytansinoid can be DM4 (para [19]). Amphlett further teaches that composition can comprise histidine in an amount of about 5-15mM (para [25]). Amphlett further teaches that the composition can comprise 5% sucrose (para [30]). Amphlett further teaches that the polysorbate 20 in an amount of about 0.01% (para [26]). Amphlett does not specifically make the necessary selection of the above-cited optional components, however, a skilled artisan would have found it obvious at the time the invention was made to make the appropriate selection to obtain the invention as claimed based on routine experimentation and design.

Claims 1-21 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.005.180 MT/FOP 20060401/0.20.4rc.2.7
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	F206822
I	Title of Invention	IMMUNOCONJUGATE FORMULATIONS
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	IMMUNOGEN, INC.
II-5	Address	128 Sidney Street Cambridge, Massachusetts 02139-4239 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	202-293-7060
II-9	Facsimile No.	202-293-7860
III-1	Applicant and/or Inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	ZHANG, Wei
III-1-5	Address	1815 JFK Boulevard, #2702 Philadelphia, Pennsylvania 19103 United States of America
III-1-6	State of nationality	CN
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	FLEMMING, Michael S.
III-2-5	Address	5 Birchwood Drive Londonderry, New Hampshire 03053 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	AMPHLETT, Godfrey
III-3-5	Address	8 1/2 Ash Street Place Cambridge, Massachusetts 02138 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	CHIH, Hung-Wei
III-4-5	Address	1910 Garden Drive, #210 Burlingame, California 94010 United States of America
III-4-6	State of nationality	CN
III-4-7	State of residence	US
III-5	Applicant and/or inventor	
III-5-1	This person is	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	BARTLETT, Elizabeth
III-5-5	Address	55 Magazine Street Cambridge, Massachusetts 02139 United States of America
III-5-6	State of nationality	US
III-5-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IV-1	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
IV-1-1	Name (LAST, First)	MACK, Susan, J.
IV-1-2	Address	SUGHRUE MION, PLLC 2100 Pennsylvania Ave., NW Suite 800 Washington, District of Columbia 20037-3213 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	202-293-7060
IV-1-4	Facsimile No.	202-293-7860
IV-1-6	Agent's registration No.	30,951
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	HAYMAN, Mark L. (51,793); KASPER, Alan, J. (25,426)
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	03 August 2005 (03.08.2005)
VI-1-2	Number	60/704,902
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority claim of earlier national application	
VI-2-1	Filing date	11 August 2005 (11.08.2005)
VI-2-2	Number	60/707,162
VI-2-3	Country	US
VI-3	Priority claim of earlier national application	
VI-3-1	Filing date	04 May 2006 (04.05.2006)
VI-3-2	Number	60/746,454
VI-3-3	Country	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VI-4	Priority claim of earlier national application		
VI-4-1	Filing date	04 May 2006 (04.05.2006)	
VI-4-2	Number	60/746,456	
VI-4-3	Country	US	
VI-5	Priority document request		
	The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2, VI-3, VI-4	
VII-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description	38	-
IX-3	Claims	4	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	0	-
IX-7	TOTAL	48	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

X-1	Signature of applicant, agent or common representative	
X-1-1	Name (LAST, First)	MACK, Susan, J.
X-1-2	Name of signatory	
X-1-3	Capacity	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of	Docket No: A8985
Wei ZHANG, et al.	
Appln. No.: 11/498,139	Group Art Unit: 1644
Confirmation No.: 8359	Examiner: YUNSOO, Kim
Filed: August 3, 2006	
For: IMMUNOCONJUGATE FORMULATIONS	

PRELIMINARY AMENDMENT

MAIL STOP AMENDMENT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Prior to examination, please amend the above-identified application as follows on the accompanying pages.

TABLE OF CONTENTS

AMENDMENTS TO THE SPECIFICATION	2
REMARKS	9

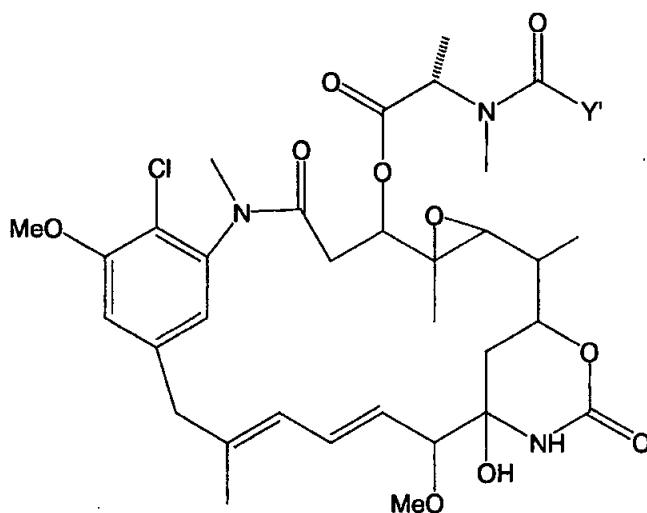
AMENDMENTS TO THE SPECIFICATION

Please replace the paragraph no. 60 with the following amended paragraph:

Other maytansines may be used in the context of the invention, including, for example, thiol and disulfide-containing maytansinoids bearing a mono or di-alkyl substitution on the carbon atom bearing the sulfur atom. Particularly preferred is a maytansinoid having at the C₃ position, the C₁₄ hydroxymethyl, the C₁₅ hydroxy, or the C₂₀ desmethyl functionality, an acylated amino acid side chain with an acyl group bearing a hindered sulfhydryl group, wherein the carbon atom of the acyl group bearing the thiol functionality has one or two substituents, said substituents being CH₃, C₂H₅, linear or branched alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or ~~heterocycloalkyl~~heterocyclic radical, and further wherein one of the substituents can be H, and wherein the acyl group has a linear chain length of at least three carbon atoms between the carbonyl functionality and the sulfur atom.

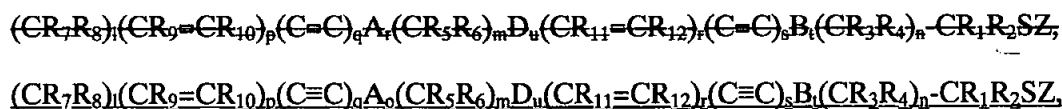
Please replace the paragraph no. 61 with the following amended paragraph:

Additional maytansines for use in the context of the invention include compounds represented by formula (III):



(III),

wherein Y' represents



wherein R₁ and R₂ are each independently linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, preferably CH₃ or C₂H₅, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or ~~heterocycloalkyl~~heterocyclic radical, and wherein R₂ also can be H,

wherein A, B, D are cycloalkyl or cycloalkenyl having 3-10 carbon atoms, simple or substituted aryl, or heterocyclic aromatic, or ~~heterocycloalkyl~~heterocyclic radical,

wherein R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, and R₁₂ are each independently H, linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, preferably CH₃ or C₂H₅, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic, or ~~heterocycloalkyl~~heterocyclic radical,

wherein l, m, n, o, p, q, r, s, t and u, ~~and t~~ are each independently zero or an integer from 1 to 5, provided that at least two of l, m, n, o, p, q, r, s, t and u, ~~and t~~ are not zero at any one time, and

wherein Z is H, SR or COR, wherein R is linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic, or ~~heterocycloalkyl~~heterocyclic radical.

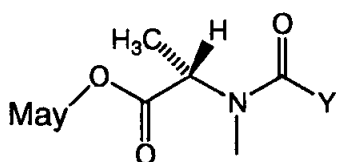
Please replace the paragraph no. 62 with the following amended paragraph:

Preferred embodiments of formula (III) include compounds of formula (III) wherein (a)

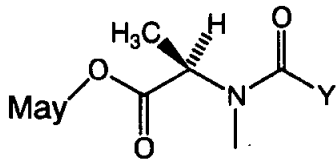
R₁ is ~~Hmethyl~~, R₂ is ~~Hmethyl~~ and Z is H, (b) R₁ and R₂ are methyl and Z is H, (c) R₁ is ~~Hmethyl~~, R₂ is ~~Hmethyl~~, and Z is -SCH₃, and (d) R₁ and R₂ are methyl, and Z is -SCH₃.

Please replace the paragraph no. 63 with the following amended paragraph:

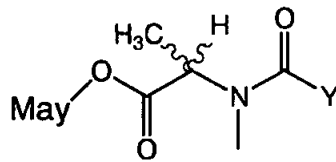
Such additional maytansines also include compounds represented by formula (IV-L), (IV-D), or (IV-D,L):



(IV-L)



(IV-D)



(IV-D,L)

wherein Y represents $(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_5\text{R}_6)_m(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$,

wherein R_1 and R_2 are each independently H, linear alkyl, or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, preferably CH_3 or C_2H_5 , branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or ~~heterocycloalkyl~~ heterocyclic radical,

wherein R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are each independently H, linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, preferably CH_3 or C_2H_5 , branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or ~~heterocycloalkyl~~ heterocyclic radical,

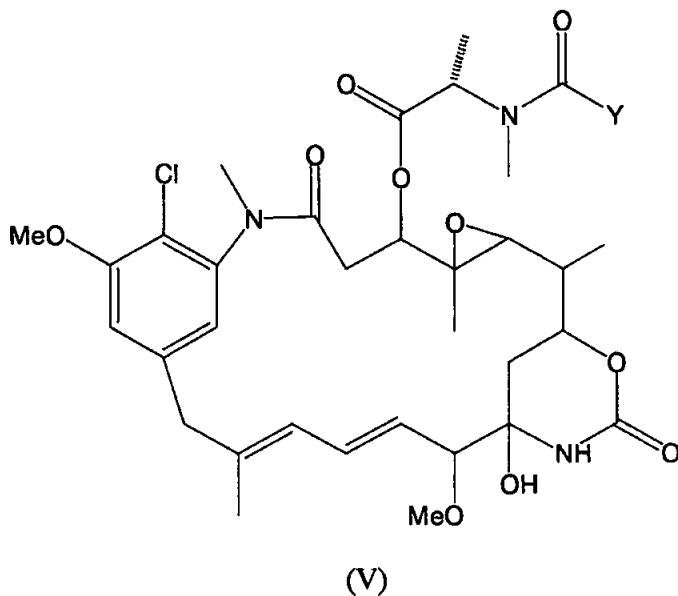
wherein l, m, and n are each independently an integer of from 1 to 5, and in addition n can be zero,

wherein Z is H, SR, or COR wherein R is methyl, linear or branched alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or ~~heterocycloalkyl~~ heterocyclic radical, and

wherein May represents a maytansinoid which bears the side chain at C-3, C-14 hydroxymethyl, C-15 hydroxy, or C-20 desmethyl.

Please replace the paragraph no. 66 with the following amended paragraph:

Additional preferred maytansines also include compounds represented by formula (V):



wherein Y represents $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

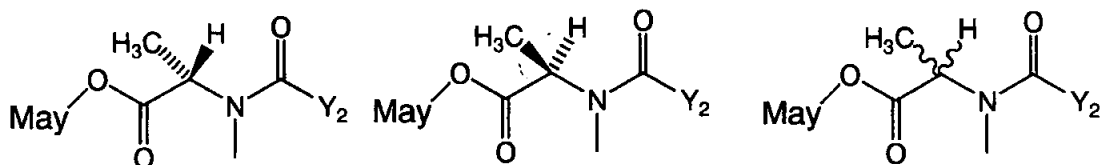
wherein R₁ and R₂ are each independently H, linear alkyl, or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, preferably CH₃ or C₂H₅, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or ~~heterocyclic~~heterocyclic radical, wherein R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, and R₈ are each independently H, linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, preferably CH₃ or C₂H₅, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl, or heterocyclic aromatic or ~~heterocyclic~~heterocyclic radical,

wherein l, m, and n are each independently an integer of from 1 to 5, and in addition n can be zero, and

wherein Z is H, SR or -COR, wherein R is methyl, linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl or heterocyclic radical.

Please replace the paragraph no. 68 with the following amended paragraph:

Still further preferred maytansines include compounds represented by formula (VI-L), (VI-D), or (VI-D,L):



(VI-L)

(VI-D)

(VI-D, L),

wherein Y_2 represents $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

wherein R_1 and R_2 are each independently linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, preferably CH_3 or C_2H_5 , branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or ~~heterocycloalkyl~~ heterocyclic radical, and wherein R_2 also can be H,

wherein R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are each independently H, linear cyclic alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, preferably CH_3 or C_2H_5 , branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or ~~heterocycloalkyl~~ heterocyclic radical,

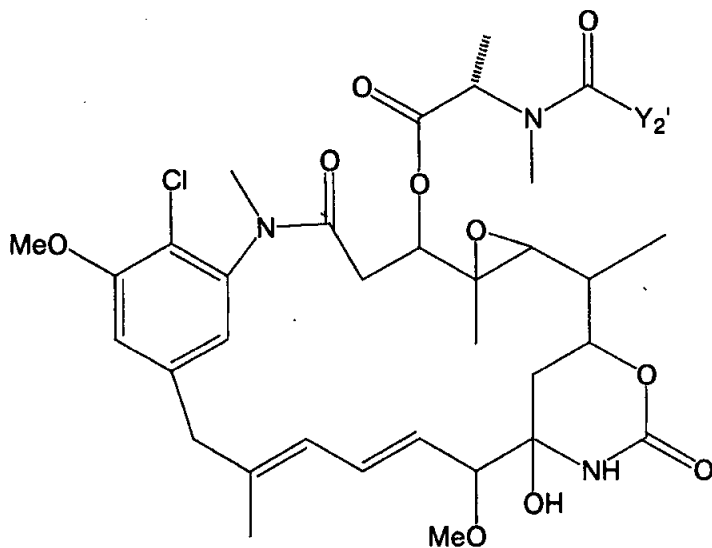
wherein l , m , and n are each independently an integer of from 1 to 5, and in addition n can be zero,

wherein Z_2 is SR or COR, wherein R is linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or ~~heterocycloalkyl~~ heterocyclic radical, and

wherein May is a maytansinoid.

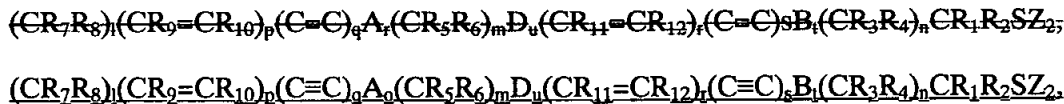
Please replace the paragraph no. 69 with the following amended paragraph:

Additional preferred maytansines include compounds represented by formula (VII):



(VII),

wherein Y_2' represents



wherein R_1 and R_2 are each independently H, linear branched or alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, preferably CH_3 or C_2H_5 , cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocyclic radical, wherein A, B, and D each independently is cycloalkyl or cycloalkenyl having 3 to 10 carbon atoms, simple or substituted aryl, or heterocyclic aromatic or heterocyclic radical,

wherein $R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}$, and R_{12} are each independently H, linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, preferably CH_3 or C_2H_5 , branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms; phenyl, substituted phenyl or heterocyclic aromatic or heterocyclic radical,

wherein l, m, n, o, p, q, r, s, t, and u are each independently zero or an integer of from 1 to 5, provided that at least two of l, m, n, o, p, q, r, s, t, and u are not zero at any one time, and

wherein Z₂ is SR or -COR, wherein R is linear alkyl or alkenyl having from 1 to 10 carbon atoms, branched or cyclic alkyl or alkenyl having from 3 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic aromatic or ~~heterocycloalkyl~~ heterocyclic radical.

Please replace the paragraph no. 70 with the following amended paragraph:

Preferred embodiments of formula (VII) include compounds of formula (VII), wherein R₁ is Hmethyl and R₂ is Hmethyl.

REMARKS

In paragraphs 61 and 69, the definitions of Y' and Y₂' have been amended to correct obvious clerical errors. Specifically, the group A has been given the subscript "o" rather than "r," because "r" is also the subscript for the group (CR₁₁=CR₁₂). In addition, the double bond in the alkyne groups has been corrected to a triple bond.

In paragraphs 62 and 70, the definitions of R₁ and R₂ have been reversed, because there is no antecedent basis in the formulae (III) or (VII) for R₁ to be H, whereas R₂ can be H.

In paragraphs 60, 61, 63, 66, 68 and 69, the phrase "heterocyclic aromatic or heterocycloalkyl radical" has been revised to more correctly read "heterocyclic aromatic or heterocyclic radical."

Entry and consideration of this Amendment are respectfully requested.

Respectfully submitted,

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860

WASHINGTON OFFICE

23373

CUSTOMER NUMBER

Susan J. Mack
Registration No. 30,951

Date: September 13, 2007

SOLICITUD DE PATENTE**EN LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS
UNIDOS DE NORTEAMÉRICA**

En referencia a la solicitud No. de Caso: A8985
Wei ZHANG, et al.
Solicitud No.: 11/498,139 Unidad de Grupo Técnico: 1644
No. de Confirmación: 8359 Examinador: YUNSOO, Kim
Presentada: 3 de agosto de 2006
Para: **FORMULACIONES DE INMUNOCONJUGADO**

ENMIENDA PRELIMINAR**MAIL STOP AMENDMENT**

Comisionado de Patentes
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Señor:

Previo a la examinación, favor de enmendar la solicitud arriba
identificada como sigue en las páginas adjuntas.

CONTENIDOS

ENMIENDAS A LA ESPECIFICACIÓN	2
COMENTARIOS	9

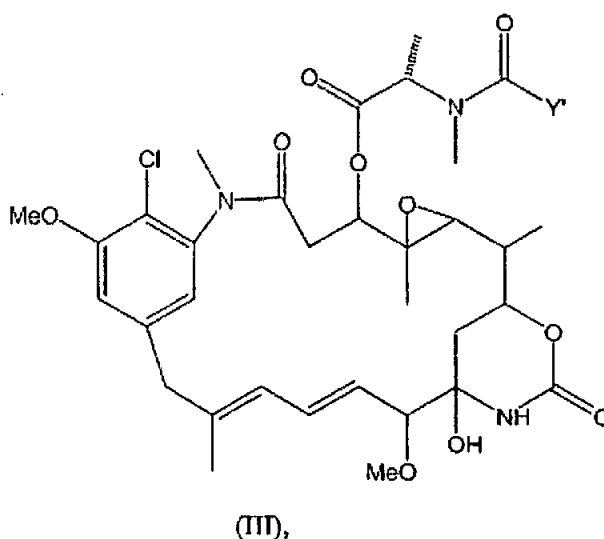
ENMIENDAS A LA ESPECIFICACIÓN

Favor de reemplazar el párrafo no 60 con el siguiente párrafo enmendado:

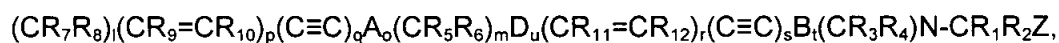
Se pueden utilizar otras maitansinas en el contexto de la invención, incluyendo por ejemplo, maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que poseen una sustitución mono- o di-alquilo en el átomo de carbono que tiene el átomo de azufre. Se prefiere de manera particular un maitansinoide que tiene en la posición C3, la funcionalidad C14hidroximetilo, el C15 hidroxilo, o el C20 desmetilo, una cadena lateral de amino ácido acilado con un grupo acilo que tiene un grupo sulfhidrilo impedido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que tiene la funcionalidad tiol posee uno o dos sustituyentes, los sustituyentes que son CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y en donde además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

Favor de reemplazar el párrafo no 61 con el siguiente párrafo enmendado:

Las maitansinas adicionales para uso en el contexto de la invención incluyen compuestos representados por la fórmula (III):



en donde Y' representa



en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y en donde R2 también puede ser H,

en donde A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 y R12 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de

carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno, de manera independiente cero o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que dichos por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, s, t y u no sean cero a la vez, y

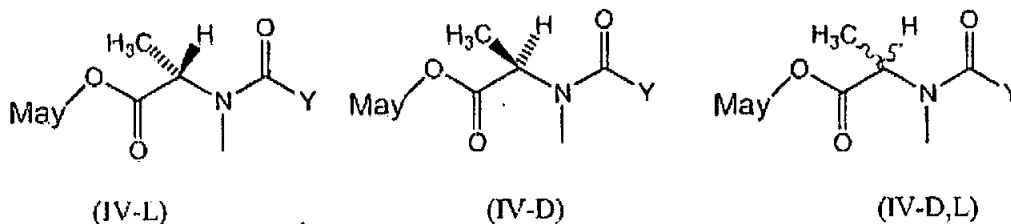
en donde Z es H, SR, o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico.

Favor de reemplazar el párrafo no 62 con el siguiente párrafo enmendado:

Las modalidades preferidas de la fórmula III incluyen compuestos de la fórmula (III) en donde (a) R1 es metilo, R2 es H y Z es H, (b) R1 y R2 son metilo y Z es H, (c) R1 es metilo, R2 es H y Z es -SCH3, y (d) R1 y R2 son metilo y Z es -SCH3.

Favor de reemplazar el párrafo no 63 con el siguiente párrafo enmendado:

Dichas maitansinas incluyen también compuestos representados por la fórmula (IV-L), (IV-D, o (IV-D,L)



en donde Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente H, alquilo lineal, o alquenoilo que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH₃ o C₂H₅, alquilo o alquenoilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H. alquilo o alquenoilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH₃ o C₂H₅, alquilo o alquenoilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

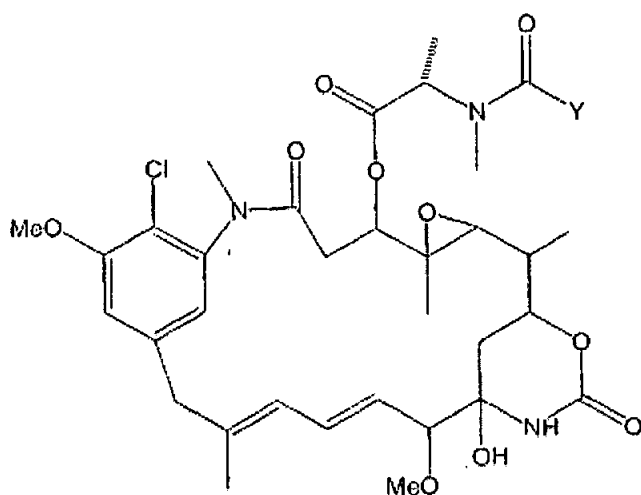
en donde l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser cero,

en donde Z es H, SR, o COR en donde R es metilo, alquilo o alquenoilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenoilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y

en donde May representa un maitansinoide que tiene la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15-hidroxi, o c-20 desmetilo.

Favor de reemplazar el párrafo no 66 con el siguiente párrafo enmendado:

Las maitansinas adicionales preferidas también incluyen compuestos representados por la fórmula (V):



(V)

en donde Y representa

en donde Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente H, alquilo lineal, o alquenilo que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

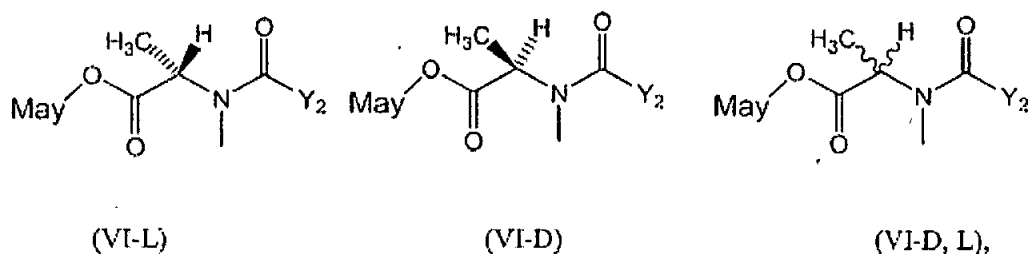
en donde R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además puede n ser cero, y

en donde Z es H, SR, o COR en donde R es metilo, alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico.

Favor de reemplazar el párrafo no 68 con el siguiente párrafo enmendado:

Además las maitansinas preferidas incluyen también compuestos representados por la fórmula (VI-L), (VI-D, o (VI-D,L)



en donde Y_2 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente H, alquilo lineal, o alquenilo que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H. alquilo o alquenilo lineal que tiende de 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono,

fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

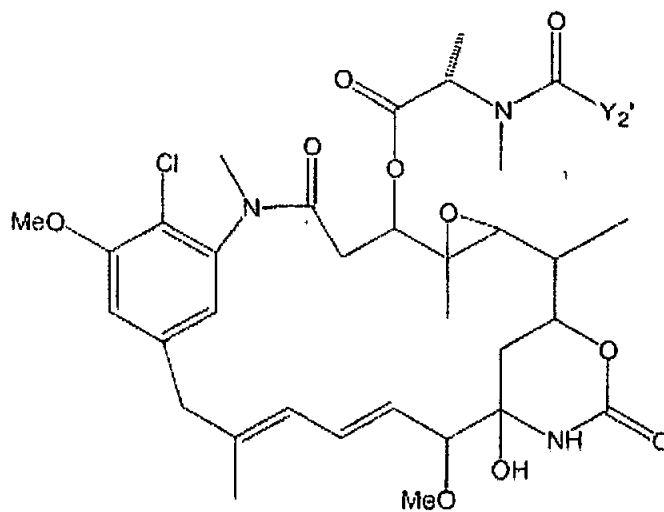
en donde l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser cero,

en donde Z2 es H, SR, o COR en donde R es metilo, alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y

en donde May es un maitansinoide.

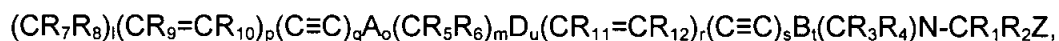
Favor de reemplazar el párrafo no 69 con el siguiente párrafo enmendado:

Maitansinas adicionales preferidas incluyen compuestos representados por la fórmula (VII):



(VII),

en donde Y' representa



en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y en donde R2 también puede ser H,

en donde A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 y R12 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno, de manera independiente cero o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que dichos por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, s, t y u no sean cero a la vez, y

en donde Z es H, SR, o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico

Favor de reemplazar el párrafo no. 70 con el siguiente

párrafo enmendado:

Las modalidades preferidas de la fórmula (VII) incluyen compuestos de la fórmula (VII), en donde R1 es metilo y R2 es H.

COMENTARIOS

En los párrafos 61 y 69, las definiciones de Y' y Y2' han sido enmendadas para corregir errores obvios. De manera específica, al grupo A se le ha dado el subíndice "o" en vez de "r", debido a que "r" también es el subíndice para el grupo (CR11=CR12). Además, el enlace doble en los grupos alquilo se ha corregido para un triple enlace.

En los párrafos 62 y 70, las definiciones de R1 y R2 se han invertido, debido a que no hay base antecedente en las fórmulas (III) o (IV) para que R1 sea H, en tanto que R2 puede ser H.

En los párrafos 60, 61, 63, 66, 68 y 69, la frase "radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo" ha sido revisada para leerse de manera más correcta "radical aromático heterocíclico o heterocíclico".

Se solicitan respetuosamente el registro y la consideración de esta Enmienda.

Respetuosamente presentada

SUGHRUE MION, PLLC

Susan J. Mack

Teléfono: (202) 293-7060

No. de -Registro 30,951

Facsímile: (202) 293-7860

OFICINA WASHINGTON

23373

NÚMERO DE CLIENTE

Fecha: 13 de septiembre de 2007

FÓRMULACIONES DE INMUNOCONJUGADO

Esta solicitud reclama el beneficio según 35 U.S. C. §119(e) para las Solicitudes Nos: 60/704,902 presentada el 3 de agosto de 2005; 60/707,162 presentada el 1 de agosto de 2005; 60/746,454 presentada el 4 de mayo de 2006; y 60/746,456 presentada el 4 de mayo de 2006, las descripciones de cada una de las cuales están incorporadas mediante referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para la preparación de formulaciones estables de inmunoconjugados, que son compuestos farmacéuticos que están compuestos de un anticuerpo y una o varias moléculas enlazadas de manera covalente de un fármaco.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los inmunoconjugados son desarrollados como agentes altamente potentes y específicos para el tratamiento de cáncer y otras condiciones. Un inmunoconjugado está compuesto de un anticuerpo que reconoce de forma específica un antígeno de célula de objetivo, tal como un antígeno de célula tumoral, y una o varias moléculas enlazadas de manera covalente de un fármaco, en particular un fármaco citotóxico tal como un maitansinoide, un taxano, o un análogo CC-1065. Otro nombre utilizado para dichos inmunoconjugados son los conjugados anticuerpo-fármaco. Los inmunoconjugados son inactivos durante la circulación aunque se unen a superficies de célula de objetivo, por lo cual son internalizados por las células. A través de mecanismos aún no comprendidos en su totalidad, los fármacos son liberados de modo subsecuente desde el anticuerpo y pueden ejercer su efecto farmacológico.

El suministro dirigido de los fármacos citotóxicos a células de objetivo, tales como las células que conforman el tejido canceroso, mejora potencialmente los índices terapéuticos de los fármacos citotóxicos. De manera común, los fármacos citotóxicos utilizados como inmunoconjugados son 100 hasta 1000-veces más potentes que los fármacos de quimioterapia convencionales. Ejemplos de dichos inmunoconjugados se describen en la Solicitudes Internacionales de Patente (PCT) Nos. WO 00/02587, 02/060955, y 02/092127; Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,475,092, 6,340,701, 6,171,586, 6,706,708 B2, y 6,756,397 B2; y Chari et al, Cáncer Res., 52, 127-131 (1992).

Los compuestos farmacéuticos tales como los inmunoconjugados por lo general son combinados con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, y/o estabilizadores a fin de proporcionar una composición farmacéutica que permite la

administración a pacientes y el almacenamiento y transporte del compuesto farmacéutico. Al igual que otros farmacéuticos de proteína, los inmunoconjugados están propensos a la degradación tal como oxidación, desamidación, así como formación de partícula y agregado, etc. (Manning et al., Pharm. Res. 6, 903-918 (1989); Ahern y Manning, Stability of Protein Pharmaceuticals: Part A, Chemical y Physical pathways of Protein Degradation, Plenum, New York, (1992); y Cleland et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 10, 307-377 (1993)).

La formación de particular en los farmacéuticos de proteína, en particular, puede desestabilizar los compuestos farmacéuticos, haciendo por lo tanto menos potente a la formulación o incluso peligrosa para uso clínico. Por ejemplo, las partículas en formulaciones farmacéuticas inyectadas pueden ocasionar lesión significativa a las venas o venastasis prolongada en los pacientes can. Además, la formación de agregado es una trayectoria de degradación importante de los farmacéuticos de proteína (Chari et al., Pharm Res. 20, 1325-1336 (2003)), y puede conducir a efectos indeseables tales como la inmunogenicidad.

La conjugación de los fármacos, en especial de los fármacos citotóxicos, que con frecuencia son pequeñas moléculas hidrofóbicas, para anticuerpos monoclonales hidrofílicos, introduce inestabilidad adicional a los inmunoconjugados. La resolución de las propiedades atribuibles al componente de anticuerpo de los inmunoconjugados es crítica para la generación de formulaciones farmacéuticas líquidas o liofilizadas estables. Para este propósito, WO 2004/004639 A2 y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2004/0,241,174 A1 describe composiciones de inmunoconjugados. Sin embargo, estas composiciones no resuelven de forma adecuada la formación de partícula y agregado en composiciones farmacéuticas de inmunoconjugados.

Por lo tanto, existe aún la necesidad de composiciones farmacéuticas de inmunoconjugados que, de modo adecuado, están libres de partículas y/o agregados y están sustancialmente libres de partículas y/o agregados, y permanecen sustancialmente libres de partículas y/o agregados durante el almacenamiento y transporte.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas de inmunoconjugados que están sustancialmente libres de partículas y/o agregados y evitan la formación de partículas y/o agregados durante el almacenamiento y/o transporte. Se proporcionan también métodos para el uso de las composiciones farmacéuticas. Estas y otras ventajas de la invención, así como características inventivas adicionales, serán evidentes a partir de las descripciones de la invención proporcionada en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el hallazgo de que se puede inhibir la formación de partícula y agregado en composiciones farmacéuticas de inmunoconjugados a través del uso de ciertos excipientes. Las formulaciones novedosas proporcionan mayo

estabilidad y vidas en almacenamiento sustancialmente más prolongadas para los compuestos farmacéuticos y aseguran la protección del paciente.

Un aspecto de la presente invención proporciona una formulación de inmunoconjugado que está sustancialmente libre de partículas, la formulación de inmunoconjugado que comprende: un inmunoconjugado y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que consta de: sacarosa, polisorbato 20, polisorbato 80, ciclodextrina, dextrosa, glicerol, polietilen glicol, manitol, cloruro de sodio, y un aminoácido, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6.

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona una formulación de inmunoconjugado que está sustancialmente libre de agregados, la formulación de inmunoconjugado que comprende: un inmunoconjugado y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende histidina, sacarosa, glicina y cloruro de sodio, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6.

La presente invención proporciona además una formulación de inmunoconjugado que está sustancialmente libre tanto de partículas como de agregados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas estables de inmunoconjugados que están sustancialmente libres de partículas y/o agregados y permanecen sustancialmente libres de partículas y/o agregados durante un período prolongado de almacenamiento y durante el transporte. La presente invención se basa en el hallazgo de que se puede inhibir la formación de partícula y/o agregado en las composiciones farmacéuticas de inmunoconjugados a través de la utilización de ciertos excipientes. Las formulaciones novedosas producen mayor estabilidad y vidas de almacenamiento sustancialmente más prolongadas para los compuestos farmacéuticos y aseguran la protección del paciente.

Dichas formulaciones son preparadas por medio de la inclusión de un excipiente que inhibe o reduce la formación de partículas visibles (mayores a 50 μm) y subvisibles (mayores a 5 μm). Como se utiliza en la presente, una composición que se encuentra "sustancialmente libre de partículas" pasará la prueba de US Pharmacopeia (USP) <788>, la cual requiere que las partículas con un tamaño superior a 10 μm serán menores a 6000 conteos por recipiente y las partículas con un tamaño superior a 25 μm serán menores a 600 conteos por recipiente. Véase USP 28, Chapter 788 "Particulate Matter in Injections," 2004, editado por United States Pharmacopeia, Rockville, MD. Como se utiliza en la presente, una composición que se encuentra "sustancialmente libre de agregados" permanecerá libre de agregados durante el almacenamiento y transporte de manera que el nivel de monómero inmunoconjugado permanece sobre 95% a través de la vida útil de

la composición.

Una vida de almacenamiento típica opera las composiciones de inmunoconjugado de la presente invención es de aproximadamente 1 hasta 5 años, de preferencia 1 a 4 años, de mayo preferencia de 2 hasta 4 años, a 4°C.

Una formulación de inmunoconjugado de la invención que está sustancialmente libre de partículas comprende un inmunoconjugado y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que consta de sacarosa, polisorbato 20, polisorbato 80, ciclodextrina, dextrosa, glicerol, polietilen glicol, manitol, cloruro de sodio, y un amino ácido, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene a pH de 4.5 hasta 7.6. La formulación puede comprender uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende: (i) 0.1-12% sacarosa, (ii) 0.005-1.0% polisorbato 20, (iii) 0.5-2% beta-ciclodextrina, (iv) 2-8% glicerol, (v) 1 -5% PEG6000, (vi) 2-8% manitol, (vii) 0.005-1.0% polisorbato 80, (viii) ' 5-20 mM histidina, (ix) 100-300 mM glicina, y (x) 50-300 mM cloruro de sodio.

En ciertas modalidades preferidas, la formulación de la invención que está sustancialmente libre de partículas comprende de preferencia uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende: (i) 5-10% sacarosa; (ii) 0.005-0.2 % polisorbato 20; (iii) 0.5-1% beta-ciclodextrina; (iv) 2-5% glicerol; (v) 2-3% PEG6000; (vi) 3-5% manitol; (vii) 0.005-0.2 % polisorbato 80; (viii) 10-15 mM histidina; (ix) 130-250 mM glicina, y (x) 100-200 mM cloruro de sodio.

En modalidades preferidas la solución acuosa regulada en su pH puede contener uno o más de histidina, succinato, citrato, fosfato, y acetato, y el pH es de preferencia desde 5.0 hasta 7.0. El pH de la formulación es de mayo preferencia desde 5.0 hasta 6.0.

En ciertas modalidades de la invención, el inmunoconjugado de la formulación comprende un anticuerpo humanizado seleccionado a partir del grupo que comprende huMy9-6, huC242, huN901, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab; y/o el inmunoconjugado comprende un fármaco citotóxico seleccionado a partir del grupo que comprende un maitansinoide, un taxano, y un CC-1065. La concentración de inmunoconjugado en la formulación de la invención puede variar desde aproximadamente 0.5 hasta 20.0 mg por ml. De preferencia, la concentración de inmunoconjugado es 0.5 hasta 10 nig por ml.

Una formulación de inmunoconjugado de la invención que está sustancialmente libre de agregados comprende: un inmunoconjugado; y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende histidina, sacarosa, glicina y cloruro de sodio, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6. De preferencia, la formulación de inmunoconjugado comprende uno o más excipientes seleccionados a partir de 5-200 mM histidina, 100-200 mM glicina, y 2-8% sacarosa.

En ciertas modalidades preferidas, los excipientes son 5-100 mM histidina o 100-150 mM glicina, o la formulación contiene 2-8% sacarosa y 100-150 mM glicina. En otras

modalidades preferidas, la formulación contiene 10 mM histidina, 5% sacarosa y 130 mM glicina.

En modalidades preferidas la solución acuosa regulada en su pH puede contener uno o más de histidina, succinato, citrato, fosfato, y acetato, y el pH es de preferencia desde 5.0 hasta 7.0. El pH de la formulación es de mayor preferencia desde 5.0 hasta 6.0.

En otro aspecto de la invención, la formulación que está sustancialmente libre de agregados comprende además polisorbato 20 y/o polisorbato 80, de manera que la formulación también está sustancialmente libre de partículas.

En ciertas modalidades de la invención, el inmunoconjugado de la formulación comprende un anticuerpo humanizado seleccionado a partir del grupo que comprende huMy9-6, huC242, huN901, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab; y/o el inmunoconjugado comprende un fármaco citotóxico seleccionados a partir del grupo que comprende a maitansinoide, a taxano, y un CC-1065. La concentración de inmunoconjugado en la formulación de la invención puede variar desde aproximadamente 0.5 hasta 20.0 mg por ml. De preferencia, la concentración de inmunoconjugado es de 0.5 hasta 10 mg por ml.

En ciertas modalidades preferidas de la invención, la formulación de inmunoconjugado está sustancialmente libre tanto de agregados y partículas. Por ejemplo, la presente invención proporciona una formulación de inmunoconjugado que consiste esencialmente de: huN901-DMI inmunoconjugado a una concentración desde 0.5-10 mg/ml; 5-15 mM histidina y/o 5-15 mM succinato; 0.1-10 % sacarosa y/o 100-300 mM glicina; 0.005-0.2% polisorbato 80 y/o 0.005-0.2% polisorbato 20, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH desde 5-6. De manera opcional se pueden agregar ingredientes adicionales en tanto que la formulación permanezca sustancialmente libre tanto de agregados como de partículas.

En otro ejemplo, una formulación de inmunoconjugado consiste esencialmente de: (a) huC242-DM4 inmunoconjugado a una concentración desde 0.5-10 mg/ml; 5-15 mM histidina; 0.1-10 % sacarosa y/o 100-300 mM glicina; 0.005-0.2% polisorbato 80 y/o 0.005-0.2% polisorbato 20; en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH desde 5-6. De manera opcional se pueden agregar ingredientes adicionales en tanto que la formulación permanezca sustancialmente libre tanto de agregados como de partículas.

De modo general, los excipientes adecuados que se pueden utilizar en conjunción con la presente invención se pueden seleccionar a partir de una variedad de categorías, incluyendo pero sin limitarse a sales inorgánicas, ácidos orgánicos, sacáridos, amino ácidos, polisorbatos, polietilen glicol y combinaciones de los mismos. Los excipientes preferidos son seleccionados a partir del grupo que comprende sales inorgánicas, ácidos carboxílicos inorgánicos, sacáridos, amino ácidos, polisorbatos, polietilen glicol, albuminas, glicerol, y combinaciones de los mismos.

Ejemplos de sales inorgánicas adecuadas incluyen pero no se limitan a cloruro de

sodio, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de sodio, y combinaciones de los mismos. El cloruro de sodio es un excipiente preferido para uso en la presente invención.

Ejemplos de ácidos carboxílicos orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido tartárico (el cual incluye ácido tartárico racémico, ácido D-tartárico y ácido L-tartárico) ácido maléico, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido glucurónico y combinaciones de los mismos. "Ácido" como se utiliza en la presente se refiere al ácido y un hidrato y sales del mismo, es decir, citratos y succinatos. El ácido succínico es un excipiente preferido para uso en la presente invención.

Ejemplos de sacáridos apropiados incluyen pero no se limitan a, sacarosa, trehalosa, dextrosa, manitol, ciclodextrina y combinaciones de los mismos. Sacarosa y ciclodextrina son excipientes preferidos para uso en la presente invención.

Ejemplos de amino ácidos adecuados incluyen pero no se limitan a, histidina, glicina, lisina, arginina y combinaciones de los mismos. La histidina y la glicina son excipientes preferidos para uso en la presente invención.

Ejemplos de albuminas adecuadas incluyen albumina de suero humano.

Los ejemplos de polietilen glicoles apropiados son los polietilen glicoles con un peso molecular de aproximadamente 200 hasta 20,000 Da. Los polietilen glicoles preferidos son PEG 4000, PEG 5000, PEG 6000, PEG 8000, y PEG 10000.

Los ejemplos de polisorbatos adecuados son polisorbato 20 (TWEEN-20™) y polisorbato 80.

Los ejemplos de ciclodextrinas apropiadas son alfa-, beta-, y gama-ciclodextrina.

A partir de las enseñanzas de esta invención, alguien con experiencia en la técnica puede determinar con facilidad los excipientes que proporcionarían mejo una formulación que esté sustancialmente libre de partículas y/o agregados, dada una solución de inmunoconjugado particular.

De preferencia, la tonicidad de la formulación de inmunoconjugado es aproximadamente aquella de la sangre humana (es decir, isotónica).

Los ejemplos de agentes de tonicificación adecuados son sales, amino ácidos, y azúcares. Las sales preferibles incluyen sales de sodio monovalentes. Los amino ácidos preferibles incluyen histidina, glicina, lisina y arginina. La más preferida es la glicina. Los azúcares preferibles incluyen monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos lineales, y oligosacáridos cíclicos. Una disacárido preferido es la sacarosa. Cantidades apropiadas de sales, sacáridos, y/o amino ácidos pueden ser agregadas a la formulación de la invención para obtener una tonicidad deseable.

Los compuestos farmacéuticos son un inmunoconjugado compuesto de un anticuerpo que reconoce de manera específica un antígeno de célula de objetivo y una o varias moléculas covalentemente enlazadas de un fármaco citotóxico, tal como un maitansinoide, un taxano, o un análogo CC-1065.

El anticuerpo puede ser específico para cualquier clase de célula, aunque por lo

general las células de objetivo que van a ser destruidas, tales como las células tumorales (en particular células de tumor sólido), células infectadas por virus, células infectadas por microorganismo, células infectadas por parásito, células autoinmunes (células que producen autoanticuerpos), células activadas (aquellas involucradas en rechazo de injerto o enfermedad injerto vs. huésped), o cualquier otro tipo de células enfermas o anormales.

Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase actualmente conocida, o que se llegue a conocer, y pueden incluir cualquier inmunoglobulina, cualquier fragmento de inmunoglobulina, tal como diacuerpos y triacuerpos Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, o quimera inmunoglobulina, que puede unirse a un antígeno en la superficie de una célula (por ejemplo, que contiene una región que determina la complementación (CDR)). Se puede utilizar cualquier anticuerpo adecuado como el agente de enlace celular. Alguien con experiencia en la técnica apreciará que la selección de un anticuerpo adecuado dependerá de la población celular a la que se dirige. A este respecto, el tipo y número de moléculas de superficie celular (es decir, antígenos) que son expresadas en una población celular particular (de manera común y preferible una población celular enferma) controlarán la selección de un anticuerpo apropiado para uso en la composición de la invención. Los perfiles de expresión de superficie celular son conocidos para una amplia variedad de tipos de célula, incluyendo tipos de células tumorales, o si se desconocen, se pueden determinar utilizando técnicas rutinarias de biología molecular e histoquímica.

El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, aunque de mayor preferencia es un anticuerpo monoclonal. Como se usa en la presente, anticuerpos "policlonales" se refiere a poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo, contenidas de manera común en el suero de animales inmunizados. Anticuerpos "monoclonales" se refiere a poblaciones homogéneas de moléculas de anticuerpo que son específicas para un antígeno particular. Los anticuerpos monoclonales son producidos de modo común por medio de un clon individual de linfocitos B ("células B"). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener empleando una variedad de técnicas conocidas por aquellos con experiencia en la técnica, incluyendo la tecnología de hibridoma estándar (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol., 5: 511-519 (1976), Harlow y Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), y CA. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). En resumen, el método de hibridoma para producir anticuerpos monoclonales implica comúnmente inyectar un antígeno (es decir un "inmunogen") a cualquier animal adecuado, por lo general y de preferencia un ratón. De modo subsecuente, el animal es sacrificado y las células B aisladas de su bazo se fusionan con células de mieloma humano. Se produce una célula híbrida (es decir, un "hibridoma"), que prolifera de manera indefinida y secreta de modo continuo altos niveles de un anticuerpo con la especificidad deseada in vitro. Se puede utilizar cualquier método apropiado conocido en la técnica para identificar células de hibridoma que produce un anticuerpo con la especificidad deseada. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente enzima-enlazado (ELISA), análisis de

tinción Western, y radioinmunoensayo. La población de hibridomas es tamizada para aislar clones individuales, cada uno de los cuales secreta una especie de anticuerpo individual para el antígeno. Debido a que cada hidridoma es un clon derivado a partir de fusión con una célula B individual, todas las moléculas de anticuerpo que ella produce son idénticas en estructura, incluyendo su sitio de enlace de antígeno e isotipo. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser generados utilizando otras técnicas adecuadas que incluyen tecnología EBV-hibridoma (véase, por ejemplo, Haskard y Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2): 361-67 (1984), y Roder et al., *Methods Enzymol*, 121: 140-67 (1986)), sistemas de expresión de vector bacteriófago (véase por ejemplo, Huse et al., *Science*, 246: 1275-81 (1989)), o bibliotecas de exhibición de fago que comprenden fragmentos de anticuerpo, tales como Fab y scFv (región variable de cadena individual) (véase por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,885,793 y 5,969,108, y Solicitudes de Patente Internacional WO 92/01,047 y WO 99/06,587).

El anticuerpo monoclonal puede ser aislado a partir de o producido a partir de cualquier animal adecuado, aunque de preferencia es producido en un mamífero, de mayor preferencia un ratón o un ser humano, y de mayor preferencia un humano. Los métodos para producir un anticuerpo en ratones son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica y se describen en la presente. Con respecto a los anticuerpos humanos, alguien con experiencia en la técnica apreciará que los anticuerpos policlonales pueden ser aislados a partir del suero de humanos vacunados o inmunizados con un antígeno apropiado. De manera alternativa, los anticuerpos humanos pueden ser generados a través de la adaptación de técnicas conocidas para producir anticuerpos humanos en animales no humanos tales como ratones (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,545,806, 5,569,825, y 5,714,352, y Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2002/0,197,266 A1).

En tanto que son la elección ideal para aplicaciones terapéuticas en humanos, los anticuerpos humanos, en particular los anticuerpos humanos monoclonales, comúnmente son más difíciles de generar que los anticuerpos monoclonales de ratón. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales de ratón, inducen una rápida respuesta de anticuerpo huésped cuando son administrados a humanos, lo cual puede reducir el potencial terapéutico o de diagnóstico del conjugado anticuerpo-fármaco. Para superar estas complicaciones, de preferencia un anticuerpo monoclonal de preferencia no es reconocido como "extraño" por el sistema inmune humano.

Para este fin, se puede utilizar la exhibición de fago para generar el anticuerpo. A este respecto, las bibliotecas de fago que codifican dominios de anticuerpo variables (V) de enlace a antígeno se pueden generar utilizando técnicas estándar de biología molecular y ADN recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbo Laboratory Press, New York (2001)). Se selecciona la codificación de fago de una región variable con la especificidad deseada para enlace específico al antígeno deseado, y se reconstituye un

anticuerpo humano completo que comprende el dominio variable seleccionado. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo reconstituido son introducidas en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma empleada para la producción de hibridoma, de manera que los anticuerpos humanos que tienen las características de los anticuerpos monoclonales son secretados por la célula (véase, por ejemplo, Janeway et al., supra, Huse et al., supra, y Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,265,150). De manera alternativa, los anticuerpos monoclonales pueden ser generados a partir de ratones que son transgénicos para genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana específica. Dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,545,806 y 5,569,825, y Janeway et al., supra.

De mayor preferencia, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Como se utiliza en la presente, un anticuerpo "humanizado" es uno en el cual las regiones que determinan el complemento (CDR) de un anticuerpo monoclonal de ratón, el cual forma los ciclos de enlace de antígeno del anticuerpo, son injertadas en la estructura en la estructura de una molécula de anticuerpo humano. Debido a la similitud de las estructuras de los anticuerpos de ratón y humanos, se acepta en la técnica de forma general que este enfoque produce un anticuerpo monoclonal que es antigénicamente idéntico a un anticuerpo humano aunque se enlaza al mismo antígeno que el anticuerpo monoclonal de ratón a partir del cual se derivaron las secuencias CDR. Los métodos para generar anticuerpos humanizados son bien conocidos en la técnica y se describen en detalle, por ejemplo, en Janeway et al., supra, Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,225,539, 5,585,089 y 5,693,761, Patente Europea No. 0,239,400 B1, y Patente del Reino Unido No. 2,188,638. Los anticuerpos humanizados también pueden ser generados utilizando la tecnología de recubrimiento de anticuerpo descrita en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,639,641 y Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235: 959-973 (1994). En tanto que el anticuerpo empleado en el inmunoconjugado de la composición de la invención es, de mayor preferencia, un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal humano y un anticuerpo monoclonal de ratón, como se describió antes, también está dentro del alcance de la invención.

Los fragmentos de anticuerpo que tienen por lo menos un sitio de enlace de antígeno, y reconocen por tanto y se enlazan a por lo menos un antígeno o receptor presente en la superficie de una célula de objetivo, se encuentran también dentro del alcance de la invención. A este respecto, la división proteolítica de una molécula de anticuerpo intacta puede producir una variedad de fragmentos de anticuerpo que mantienen la habilidad para reconocer y enlazar antígenos. Por ejemplo, la digestión limitada de una molécula de anticuerpo con la proteasa papaina comúnmente produce tres fragmentos, dos de los cuales son idénticos y son referidos como los fragmentos Fab, ya que mantienen la actividad de enlace de antígeno de la molécula de anticuerpo padre. La división de una molécula de anticuerpo con la enzima pepsina produce de manera

normal dos fragmentos de anticuerpo, uno de los cuales retiene ambos segmentos de enlace de antígeno de la molécula de anticuerpo, y por tanto es referido como el fragmento F(ab')₂. La reducción de un fragmento F(ab')₂ con ditioneitol o mercaptoetilamina produce un fragmento referido como un fragmento Fab'. Un fragmento de anticuerpo de región variable de cadena simple (sFv), que consta de un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo enlazado a un dominio V de una cadena de anticuerpo ligera a través de un péptido sintético, se puede generar utilizando técnicas rutinarias de ADN recombinante (véase por ejemplo, Janeway et al., supra). De manera similar, los fragmentos de región variable disulfuro-estabilizados (dsFv) se pueden preparar a través de tecnología de ADN recombinante (véase por ejemplo, Reiter et al., *Protein Engineering*, 7: 697-704 (1994)). Sin embargo, los fragmentos de anticuerpo en el contexto de la invención, no están limitados a estos tipos ilustrativos de fragmentos de anticuerpo. Se puede emplear cualquier fragmento de anticuerpo adecuado que reconoce y se enlaza a un receptor de superficie celular o antígeno deseado. Los fragmentos de anticuerpo se describen de manera adicional, por ejemplo, en Parham, J. *Immunol*, 131: 2895-2902 (1983), Spring et al., *J. Immunol*, 113: 470-478 (1974), y Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 89: 230-244 (1960). El enlace anticuerpo-antígeno se puede ensayar utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, como por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, tinción Western, inmunoprecipitación, y ensayos de inhibición competitiva (véase, por ejemplo, Janeway et al., supra, y Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2002/0,197,266 A1).

Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o un fragmento que enlaza antígeno del mismo. Por "quimérico" se representa que el anticuerpo comprende por lo menos dos inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, obtenidos o derivados a partir de por lo menos dos especies diferentes (por ejemplo, dos inmunoglobulinas diferentes, tales como una región constante de inmunoglobulina humana combinada con una variable de inmunoglobulina de murino). El anticuerpo también puede ser un anticuerpo de dominio (dAb) o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, como por ejemplo, un anticuerpo de camélido (véase, por ejemplo, Desmyter et al., *Nature Struct. Biol.*, 3: 752, (1996)), o un anticuerpo de tiburón, como por ejemplo, un nuevo receptor de antígeno (IgNAR) (véase, por ejemplo, Greenberg et al., *Nature*, 374: 168 (1995), y Stanfield et al., *Science*, 305: 1770-1773 (2004)).

Es posible utilizar cualquier anticuerpo adecuado en el contexto de la invención. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal J5 es un anticuerpo IgG2a de murino que es específico para el Antígeno de Leucemia Linfoblástica Aguda Común (CALLA) (Ritz et al., *Nature*, 283: 583-585 (1980)), y puede ser utilizado para células de objetivo que expresan CALLA (por ejemplo, células de leucemia linfoblástica aguda). El anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG1 de murino que se enlaza de manera específica al antígeno CD33 (Griffin et al., *Leukemia Res.*, 8: 521 (1984)), y puede ser empleado para células de

objetivo que expresan CD33 (por ejemplo, células de leucemia mielogénica aguda (AML)).

De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 (referido también como B4) es un anticuerpo IgG1 de murino que se enlaza al antígeno CD19 en las células B (Nadler et al., J. Immunol, 131: 244-250 (1983)), y se pueden usar para células B de objetivo o células enfermas que expresan CD 19 (por ejemplo, células de linfoma no-Hodgkin y células de leucemia linfoblástica crónica). N901 es un anticuerpo monoclonal de murino que se enlaza al antígeno CD56 (molécula de adhesión celular neural) encontrado en las células de origen neuroendócrino, que incluyen pequeña célula de tumor pulmonar, las cuales pueden ser utilizadas en el inmunoconjugado para fármacos de objetivo para células de origen neuroendócrino. De manera preferible, los anticuerpos J5, MY9, y B4 son recubiertos o humanizados antes de su uso como parte del inmunoconjugado. El recubrimiento o humanización de los anticuerpos se describe, por ejemplo, en Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 91: 969-73 (1994).

Además, el anticuerpo monoclonal C242 enlaza al antígeno CanAg (véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,552,293), y se puede utilizar para dirigir el inmunoconjugado hacia tumores que expresan CanAg, tales como cánceres colorectal, pancreático, pulmonar de célula no pequeña y gástrico. HuC242 es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal C242 (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,552,293). El hibridoma a partir del cual se produce HuC242 es depositado con ECACC número de identificación 90012601. HuC242 se puede preparar utilizando metodología de injerto CDR (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,585,089, 5,693,761, y 5,693,762) o tecnología de recubrimiento (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,639,641). Se puede utilizar para dirigir el inmunoconjugado hacia células tumorales que expresan el antígeno CanAg, tales como, por ejemplo, células de cáncer colorectal, pancreático, pulmonar de célula no pequeña y gástrico.

Para dirigirse a células de cáncer de ovario y de cáncer de próstata, se puede usar un anticuerpo anti-MUC1 como el agente de enlace celular en el inmunoconjugado. Los anticuerpos anti-MUC1 incluyen, por ejemplo, anti-HMFG-2 (véase, por ejemplo, Taylor-Papadimitriou et al., Int. J. Cáncer, 28: 17-21 (1981)), hCTMO1 (véase, por ejemplo, van Hof et al., Cáncer Res., 56: 5179-5185 (1996)), y DS6. Las células de cáncer prostático también pueden ser apuntadas con el inmunoconjugado al utilizar un antígeno de membrana anti-próstata-específica (PSMA) como el agente de enlace celular, tal como J591 (véase, por ejemplo, Liu et al., Cáncer Res., 57: 3629-3634 (1997)). Además, las células de cáncer que expresan el antígeno Her2, tales como cánceres de mama, próstata y ovarios, pueden ser apuntadas utilizando el anticuerpo trastuzumab. Los anticuerpos anti-IGF-IR que se enlazan al receptor de factor de crecimiento similar a insulina también pueden ser utilizados en el inmunoconjugado.

Los anticuerpos particularmente preferidos son anticuerpos monoclonales

humanizados, los ejemplos de los cuales incluyen huN901, huMy9-6, huB4, huC242, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,639,641 y 5,665,357; Publicación de Solicitud Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2005-0118183 A1, Solicitud de Patente Internacional WO 02/16,401, Pedersen et al., supra, Roguska et al., supra, Liu et al., supra, Nadler et al., supra, Colomer et al., *Cáncer Invest.*, 19: 49-56 (2001), Heider et al., *Eur. J. Cáncer*, 31A: 2385-2391 (1995), Welt et al., *J. Clin. Oncol.*, 12: 1193-1203 (1994), y Maloney et al., *Blood*, 90: 2188-2195 (1997)). De mayor preferencia, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal humanizado huN901 o el anticuerpo monoclonal humanizado huMy9-6. Otros anticuerpos monoclonales humanizados son conocidos en la técnica y se pueden utilizar en conexión con la invención.

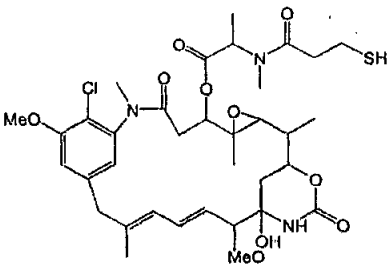
El inmunoconjugado puede comprender cualquier fármaco comprende cualquier fármaco adecuado, de manera común un agente citotóxico. Un "agente citotóxico," como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier compuesto que resulta en la muerte de una célula, induce la muerte celular, o disminuye la viabilidad celular. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoide, taxoides, CC-1065 y análogos CC-1065, y dolastatina y análogos de dolastatina. En una modalidad preferida de la invención, el agente citotóxico es un maitansinoide, que incluye maitansinol y análogos de maitansinol. Maitansinoides son compuestos que inhiben la formación de microtúbulo y son altamente tóxicos para las células de mamíferos. Ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides están descritos por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,256,746, 4,294,757, 4,307,016, 4,313,946, 4,315,929, 4,322,348, 4,331,598, 4,361,650, 4,362,663, 4,364,866, 4,424,219, 4,371,533; 4,450,254, 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, y 6,333,410.

Ejemplos de análogos de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen: (1) C-19-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,256,746) (preparado mediante reducción LAH de ansamitocina P2), (2) C-20-hidroxi (o C-20-demetilo) +/-C-19-decloro (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,361,650 y 4,307,016) (preparados mediante desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o desclorinación utilizando LAH), y (3) C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,294,757) (preparado mediante acilación utilizando cloruros de acilo).

Ejemplos de análogos de maitansinol que tiene modificaciones de posiciones diferentes a aquellas de un anillo aromático incluyen: (1) C-9-SH (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,424,219) (preparado mediante la reacción de maitansinol con H_2S o P_2S_5), (2) C-14-alcoximetilo (demetoxi/ CH_2OR) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,331,598), (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH_2OH o CH_2OAc) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,450,254) (preparado a

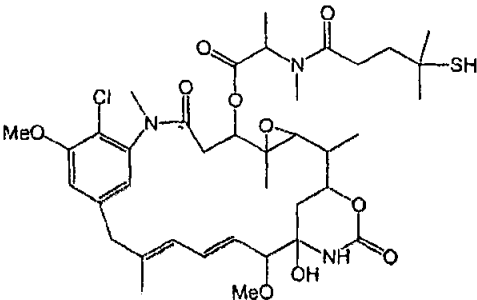
partir de Nocardid), (4) C-15- hidroxil/aciloxil (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,364,866) (preparado mediante la conversi3n de maitansinol a trav3s de Streptomyces), (5) C-15-metoxil (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,313,946 y 4,315,929) (aislado a partir de Trewia nudiflora), (6) C-18-N-demetilo (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,362,663 y 4,322,348) (preparado mediante la desmetilaci3n de maitansinol por medio de Streptomyces), y(7) 4,5-deoxil (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,371,533) (preparado mediante la reducci3n con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

En una modalidad preferida de la invenci3n, el inmunoc3njugado utiliza el maitansinoide que contiene tiol DMI, tambi3n conocido como N2'-deacetil-N2'-(3-mercapto-l-oxopropil)-maitansina, como el agente citot3xico. La estructura de DMI est3 representada por la f3rmula (I):



(I)

En otra modalidad preferida de la invenci3n, el inmunoc3njugado utiliza el maitansinoide que contiene tiol DM4, conocido tambi3n como N-2'-deacetil-N-2'-(4-metil-4-mercapto-l-oxopentil)-maitansina, como el agente citot3xico. La estructura de DM4 est3 representada por la f3rmula (II):

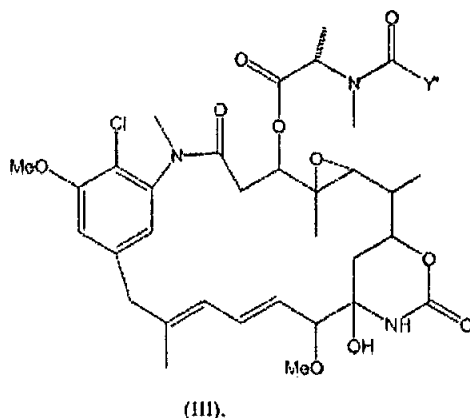


(II)

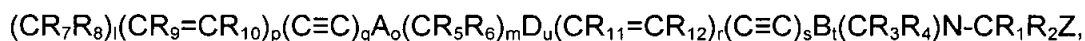
Se pueden utilizar otras maitansinas en el contexto de la invenci3n, incluyendo por ejemplo, maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que poseen una sustituci3n mono- o di-alquilo en el 3tomo de carbono que tiene el 3tomo de azufre. Se prefiere de manera particular un maitansinoide que tiene en la posici3n C3, la funcionalidad C14hidroximetilo, el C15 hidroxil, o el C20 desmetilo, una cadena lateral de amino 3cido acilatado con un grupo acilo que tiene un grupo sulfhidrilo impedido, en donde el 3tomo de carbono del grupo acilo que tiene la funcionalidad tiol posee uno o dos sustituyentes, los sustituyentes que son CH3, C2H5, alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 3tomos de carbono, alquilo o alquenilo c3clico que tiene de 3 hasta 10 3tomos de carbono, fenilo,

fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y en donde además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

Las maitansinas adicionales para uso en el contexto de la invención incluyen compuestos representados por la fórmula (III):



en donde Y' representa



en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y en donde R2 también puede ser H,

en donde A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

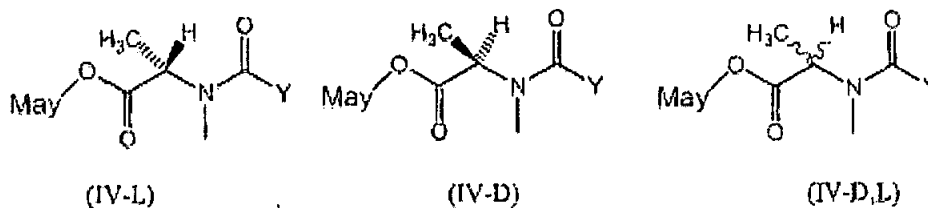
en donde R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 y R12 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno, de manera independiente cero o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que dichos por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, s, t y u no sean cero a la vez, y

en donde Z es H, SR, o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico.

Las modalidades preferidas de la fórmula III incluyen compuestos de la fórmula (III) en donde (a) R1 es metilo, R2 es H y Z es H, (b) R1 y R2 son metilo y Z es H, (c) R1 es metilo, R2 es H y Z es -SCH3, y (d) R1 y R2 son metilo y Z es -SCH3.

Dichas maitansinas incluyen también compuestos representados por la fórmula (IV-L), (IV-D, o (IV-D,L)



en donde R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente H, alquilo lineal, o alqueno que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH₃ o C₂H₅, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno de manera independiente H, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH₃ o C₂H₅, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser cero,

en donde Z es H, SR, o COR en donde R es metilo, alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y

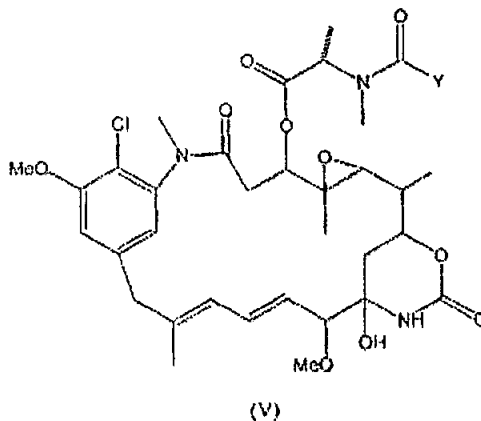
en donde May representa un maitansinoide que tiene la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15-hidroxi, o C-20 desmetilo.

Las modalidades preferidas de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D₅L) incluyen compuestos de las fórmulas (IV-L), (W-D) y (W-D₅L) en donde (a) R₁ es H, R₂ es metilo,

R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada una 1, n es 0, y Z es H, (b) R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son cada una 1, n es 0, y Z es H, (c) R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃, o (d) R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

De preferencia el agente citotóxico está representado por la fórmula (IV-L).

Las maitansinas adicionales preferidas también incluyen compuestos representados por la fórmula (V):



en donde Y representa

en donde Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente H, alquilo lineal, o alquenoilo que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenoilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

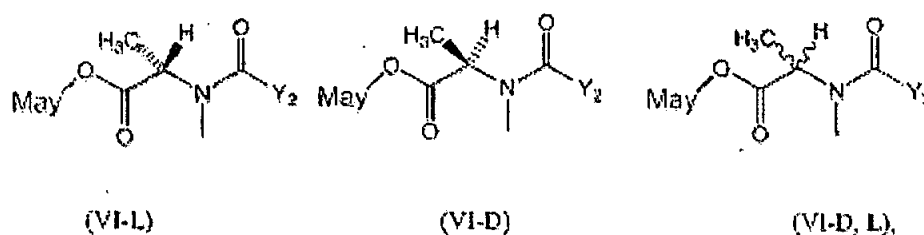
en donde R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenoilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenoilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además puede n ser cero, y

en donde Z es H, SR, o COR en donde R es metilo, alquilo o alquenoilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenoilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico.

Las modalidades preferidas de la fórmula (V) incluyen compuestos de la fórmula (V) en donde (a) R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0; y Z es H, (b) R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1; n es 0; y Z es H, (c) R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃, o (d) R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

Además las maitansinas preferidas incluyen también compuestos representados por la fórmula (VI-L), (VI-D), o (VI-D, L)



en donde Y₂ representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente H, alquilo lineal, o alquenoilo que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenoilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenoilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenoilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

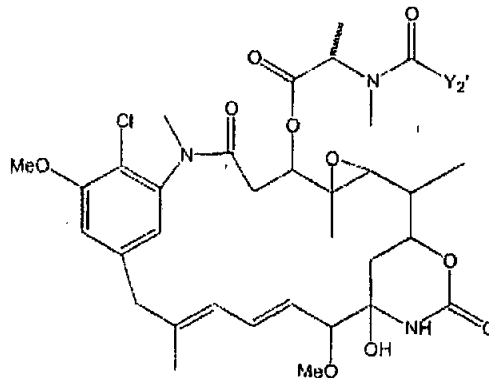
en donde l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde

1 hasta 5, y además n puede ser cero,

en donde Z2 es H, SR, o COR en donde R es metilo, alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y

en donde May es un maitansinoide.

Maitansinas adicionales preferidas incluyen compuestos representados por la fórmula (VII):



(VII),

en donde Y' representa

$(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p(\text{C}\equiv\text{C})_q\text{A}_o(\text{CR}_5\text{R}_6)_m\text{D}_u(\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r(\text{C}\equiv\text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{R}_4)\text{N}-\text{CR}_1\text{R}_2\text{Z}$,

en donde R1 y R2 son cada uno de manera independiente alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico, y en donde R2 también puede ser H,

en donde A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 y R12 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico,

en donde l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno, de manera independiente cero o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que dichos por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, s, t y u no sean cero a la vez, y

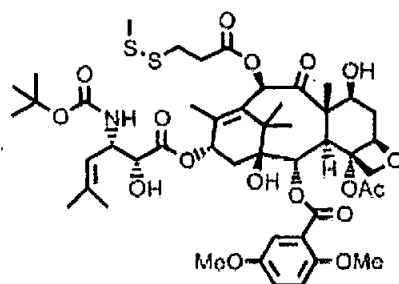
en donde Z es H, SR, o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocíclico.

Las modalidades preferidas de la fórmula (VII) incluyen compuestos de la fórmula (VII), en donde R1 es metilo y R2 es H.

Además de los maitansinoides, el agente citotóxico usado en el inmunoconjugado puede ser un taxano o derivado del mismo. Los taxanos son una familia de compuestos

que incluye paclitaxel (Taxol®), un producto natural citotóxico, y docetaxel (Taxotere®), un derivado semi-sintético, los cuales son ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer. Los taxanos son venenos de eje mitótico que inhiben la despolimerización de tubulina, dando como resultado la muerte de la célula. En tanto que docetaxel y paclitaxel son agentes útiles en el tratamiento del cáncer, su actividad antitumoral es limitada debido a su toxicidad no específica hacia las células normales. Además, los compuestos como paclitaxel y docetaxel no son suficientemente potentes para ser utilizados en inmunoconjugados.

Un taxano preferido para uso en la preparación de un inmunoconjugado citotóxico es el taxano de la fórmula (VIII):



(VIII)

Los métodos para sintetizar taxanos que se pueden utilizar en el contexto de la invención, junto con los métodos para conjugar taxanos para agentes de enlace celular tales como anticuerpos, se describen en detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, 6,436,931, 6,596,757, 6,706,708, y 6,716,821, y en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2004/0,024,049 A1.

El agente citotóxico también puede ser CC-1065 o un derivado del mismo.

CC-1065 es un potente antibiótico anti-tumoral aislado a partir del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1000-veces más potente in vitro que los fármacos anticancerígenos utilizados, tales como doxorubicina, metotrexato, y vincristina (Bhuyan et al., *Cáncer Res.*, 42: 3532-3537 (1982)). CC-1065 y sus análogos se describen en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,585,499, 5,846,545, 6,340,701, y 6,372,738. La potencia citotóxica de CC-1065 ha sido correlacionada con su actividad de alquilación y su actividad de enlace ADN o intercalación ADN. Estas dos actividades residen en partes separadas de la molécula. A este respecto, la actividad de alquilación es contenida en la subunidad ciclopropapirroloindol (CPI) y la actividad de enlace ADN reside en las dos subunidades pirroloindol de CC-1065.

Se conocen en la técnica varios análogos CC-1065 y también pueden ser utilizados como el agente citotóxico in el inmunoconjugado (véase, por ejemplo, Warpehoski et al., *J. Med. Chem.*, 31: 590-603 (1988)). Se ha desarrollado una serie de análogos CC-1065 en los cuales la porción CPI es reemplazada por medio de una porción ciclopropabenzindol (CBI) (Boger et al., *J. Org. Chem.*, 55: 5823-5833 (1990), y Boger et

al., Bioorg. Med. Chem. Lett, 1: 115-120 (1991)). Estos análogos CC-1065 mantienen la elevada potencia in vitro del fármaco relacionado, sin ocasionar toxicidad retardada en ratones. Al igual que CC-1065, estos compuestos son agentes de alquilación que enlazan de manera covalente a la ranura menor de ADN para ocasionar la muerte celular.

La eficacia terapéutica de los análogos CC-1065 se puede mejorar en gran medida al cambiar la distribución in vivo a través de la distribución dirigida hacia un sitio tumoral, dando como resultado baja toxicidad para tejidos no apuntados, y por tanto, baja toxicidad sistémica. Para este fin, se han generado conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con agentes de enlace celular que se dirigen de manera específica a células tumorales (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,475,092, 5,585,499, y 5,846,545). Estos conjugados exhiben de manera común alta citotoxicidad específica de objetivo in vitro, y actividad anti-tumoral en modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones (véase, por ejemplo, Chari et al., Cáncer Res., 55: 4079-4084 (1995)).

Los métodos para sintetizar análogos CC-1065 se describen en detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, 6,534,660, 6,586,618, y 6,756,397 y Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2003/0,195,365 A1.

Los fármacos tales como metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalano, mitomicina C, clorambucil, caliqueamicina, tubulisina y análogos de tubulisina, duocarmicina y análogos de duocarmicina, dolastatina y análogos de dolastatina también pueden ser utilizados en el contexto de la invención. Doxorubicina y compuestos de daunorubicina (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,630,579) también pueden ser utilizados como el fármaco.

Los inmunoconjugados pueden ser preparados a través de métodos in vitro. A fin de enlazar un fármaco o profármaco al anticuerpo, se utiliza un grupo de enlace. Los grupos de enlace adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles peptidasa, y grupos lábiles esterasa. Los grupos de enlace preferidos son grupos disulfuro. Por ejemplo, los inmunoconjugados se pueden elaborar empleando una reacción de intercambio de disulfuro entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco. Las moléculas del fármaco también se pueden enlazar a un anticuerpo a una molécula portadora intermediaria tal como albumina del suero.

El anticuerpo puede ser modificado a través de la reacción con un reactivo de entrelazamiento bifuncional, resultando por tanto en la unión covalente de una molécula enlazadora para el anticuerpo. Como se usa en la presente, un "reactivo de entrelazamiento bifuncional" es cualquier porción química que enlaza de manera covalente un agente de enlace celular a un fármaco, tales como los fármacos descritos en la presente. En una modalidad preferida de la invención, una porción de la porción de enlace es proporcionada por el fármaco. A este respecto, el fármaco comprende una

porción de enlace que es parte de una molécula de enlace más grande que aquella utilizada para unir el anticuerpo al fármaco. Por ejemplo, para formar el maitansinoide DMI, la cadena lateral en el grupo hidroxilo C-3 de la maitansina es modificado para tener un grupo sulfhidrilo libre (SH). Esta forma tiolada de maitansina puede reaccionar con un anticuerpo modificado para formar un inmunoconjugado. Por lo tanto, el enlazador final es ensamblado a partir de dos componentes, uno de los cuales es proporcionado por el reactivo de entrelazamiento, mientras que el otro es proporcionado por la cadena lateral de DMI.

Cualquier reactivo de entrelazamiento bifuncional adecuado puede ser usado en relación con la invención, en tanto que el reactivo de enlace proporcione la retención de las características terapéuticas, por ejemplo, citotoxicidad, y de direccionamiento del fármaco y el anticuerpo, respectivamente. De preferencia, la molécula de enlace une el fármaco al anticuerpo a través de enlaces químicos (como se describió con anterioridad), de manera que el fármaco y el anticuerpo son acoplados químicamente (por ejemplo, enlazados de manera covalente) uno con el otro. De preferencia, el reactivo de enlace es un enlazador separable. De mayor preferencia, el enlazador es separado bajo condiciones moderadas, es decir, condiciones dentro de una célula bajo las cuales no se afecta la actividad del fármaco. Los ejemplos de enlazadores separables adecuados incluyen enlazadores disulfuro, enlazadores lábiles ácidos, enlazadores fotolábiles, enlazadores lábiles de peptidasa y enlazadores lábiles esterasa. Los enlazadores que contienen disulfuro son enlazadores separables a través de intercambio de disulfuro, el cual puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas. Los enlazadores lábiles ácidos son enlazadores separables en un pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimientos intracelulares, tales como endosomas y lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5), y proporcionan condiciones adecuadas para separar los enlazadores lábiles ácidos. Los enlazadores fotolábiles son útiles en la superficie del cuerpo y en muchas cavidades corporales que son accesibles a la luz. Además, la luz infrarroja puede penetrar el tejido. Los enlazadores lábiles de peptidasa pueden ser utilizados para separar ciertos péptidos dentro o fuera de las células (véase, por ejemplo, Trouet et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 626-629 (1982), y Umemoto et al., Int. J. Cáncer, 43: 677-684 (1989)).

De preferencia el fármaco es enlazado a un anticuerpo a través de un enlace disulfuro. La molécula de enlace comprende un grupo químico reactivo que puede reaccionar con el anticuerpo. Los grupos químicos reactivos preferidos para reacción con el anticuerpo son ésteres de N-succinimidilo y ésteres de N-sulfosuccinimidilo. De manera adicional, la molécula de enlace comprende un grupo químico reactivo, de preferencia un grupo ditiopiridilo que puede reaccionar con el fármaco para formar un enlace disulfuro. Las moléculas de enlace particularmente preferidas incluyen, por ejemplo, N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (véase, por ejemplo, Carlsson et al., Biochem. J, 173: 723-737 (1978)), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB) (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,563,304), y N-succinimidil 4-(2-

piridilditio)pentanoato (SPP) (véase, por ejemplo, CAS Registry number 341498-08-6).

En tanto que los enlazadores separables son utilizados de manera preferible en el método de la invención, también se puede utilizar un enlazador no separable para generar el inmunoconjugado antes descrito. Un enlazador no separable es cualquier porción química que sea capaz de enlazar un fármaco, tal como un maitansinoide, un taxano, o un análogo CC-1065, a un agente de enlace celular, tal como un anticuerpo, de una manera covalente, estable. Por lo tanto, los enlazadores no separables son sustancialmente resistentes a la separación inducida por ácido, separación inducida por luz, separación inducida por peptidasa, separación inducida por esterasa, y separación de enlace de disulfuro, en condiciones bajo las cuales el fármaco o el anticuerpo permanecen activos.

Los reactivos de entrelazamiento adecuados que forman enlazadores no separables entre un fármaco y un agente de enlace celular son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de enlazadores no separables incluyen enlazadores que tienen un éster de N-succinimidilo o porción éster de N-sulfosuccinimidilo para reacción con el agente de enlace celular, así como una porción en base a maleimido- o haloacetilo para reacción con el fármaco. Los reactivos de entrelazamiento que comprenden una porción en base a maleimido incluyen N-succinimidilo 4-(maleimidometil)ciclohexancarboxilato (SMCC), N-succinimidilo-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproato), el cual es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), éster de N-succinimidilo de ácido K-maleimidoundecanoico (KMUA), éster de N-succinimidilo de ácido γ-maleimidobutirico (GMBS), éster de N-hidroxisuccinimida de ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α-maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β-maleimidopropionamido)-hexanoato (SMPH), N-succinimidilo 4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB), y N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI). Los reactivos de entrelazamiento que comprende una porción en base a haloacetilo incluye N-succinimidil-4-(iodoacetilo)-arninobenzoato (SLAB), iodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA), y N-succinimidilo 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP).

Otros reactivos de entrelazamiento que carecen de un átomo de azufre que forma enlazadores no separables también pueden ser empleados en el método de la invención. Dichos enlazadores pueden ser derivados a partir de porciones en base a ácido dicarboxílico. Las porciones adecuadas en base a ácido dicarboxílico incluyen, pero no se limitan a, ácidos α,ω-dicarboxílicos de la fórmula general (IX):



en donde X es un grupo alquilo, alquenilo, o alquinilo lineal o ramificado que tiene 2 a 20 átomos de carbono, Y es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo que ostenta de 3 hasta 10 átomos de carbono, Z es a

grupo aromático sustituido o no sustituido que tiene de 6 hasta 10 átomos de carbono, o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido en donde el hetero átomo es seleccionado a partir de N, O o S, y en donde l, m, y n son cada uno 0 o 1, a condición de que l, m, y n no sean todos cero al mismo tiempo.

5 Muchos de los enlazadores no separables descritos en la presente se describen en detalle en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2005-0169933 A1.

De manera alternativa, como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,441,163 B1, el fármaco puede ser modificado primero para introducir
10 un éster reactivo adecuado para reaccionar con un anticuerpo. La reacción de estos maitansinoides que contienen una porción de enlace activada con un anticuerpo proporciona otro método para producir un conjugado de maitansinoide de anticuerpo separable o no separable.

Los procesos para la elaboración de dichas composiciones farmacéuticas
15 involucran intercambio de regulador de pH de la composición farmacéutica en el regulador de pH de formulación apropiado mediante cromatografía o diafiltración y agregar después los excipientes adecuados en la cantidad deseada, ya sea como solución o como sólido. También se puede ejecutar el ajuste final de la concentración de proteína y/o el pH para lograr la composición deseada.

20 Los inmunoconjugados de la invención son administrados al paciente en la forma de una formulación farmacéutica descrita en esta solicitud y un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o diluyente de la misma. Como se utiliza, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos agentes que son útiles en el tratamiento o diagnóstico de mamíferos, de preferencia humanos. El modo de
25 administración preferido es parenteral, en particular a través de ruta intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, o intralinfática. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., 1980, Mack Publishing Company, editado por Osol et al. Dichas composiciones pueden incluir proteínas, tales como proteínas del suero, por ejemplo, albumina de suero humano, reguladores de pH o
30 sustancias reguladoras de pH tales como fosfatos, otras sales, o electrolitos, y similares. Los diluyentes adecuados pueden incluir, por ejemplo, agua estéril, solución salina isotónica, dextrosa acuosa diluida, un alcohol polihídrico o mezclas de dichos alcoholes, por ejemplo, glicerina, propilen glicol, polietilen glicol y similares. Las formulaciones pueden contener conservadores tales como alcohol fenético, metil y propil parabenos, y
35 similares. Si se desea, la formulación puede incluir 0.05 hasta aproximadamente 0.20 por ciento en peso de un antioxidante.

La administración puede ser a través de cualquier ruta conocida por ser efectiva por el médico de experiencia ordinaria. La administración parenteral es la preferida. Las rutas parenterales preferidas para administrar las formulaciones de la presente invención
40 incluyen rutas de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal,

intraarterial. Las rutas de administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, y subcutánea de los compuestos usados en la presente invención son las rutas de administración parenteral más preferidas. Las rutas de administración intravenosa, intraperitoneal, y subcutánea de las formulaciones de la presente invención son de más alta preferencia.

La administración a través de ciertas rutas parenterales pueden involucrar la introducción de de las formulaciones de la presente invención en el cuerpo de un paciente a través de una aguja o un catéter. De manera opcional, dicha administración puede ser impulsada por medio de una jeringa estéril o algún otro dispositivo mecánico tal como un sistema de infusión continua. Una formulación proporcionada por la presente invención puede administrada utilizando una jeringa, inyector, bomba, o cualquier otro dispositivo o mediante gravedad reconocidos en la técnica para administración parenteral. La formulación puede ser administrada de forma parenteral, en formas de dosis líquida estéril. Estas formulaciones pueden ser administradas por vía intravenosa como un bolo o infusión rápida, las cuales pueden, además de su efecto terapéutico, de diagnóstico o medicinal deseado, ocasionar la liberación del inmunoconjugado.

Los inmunoconjugados de la invención son efectivos en rango un amplio rango de dosis dependiendo de los factores tales como el estado de enfermedad que se va a tratar o el efecto biológico que se va a modificar, la manera en la cual el inmunoconjugado es administrado, la edad, peso y condición del paciente así como otros factores que serán determinados por el médico tratante. Por tanto, la cantidad administrada a cualquier paciente se puede determinar en una base individual.

La cantidad de una formulación de la presente invención que es administrada para tratar a un paciente puede depender de un número de factores, entre los cuales están incluidos, sin limitación, el sexo, peso y edad del paciente, las causas subyacentes de la condición o enfermedad que se va a tratar, la ruta de administración y la biodisponibilidad, la persistencia del inmunoconjugado administrado en el cuerpo, la formulación, y la potencia del inmunoconjugado. Cuando la administración es intermitente, la cantidad por administración también considerará el intervalo entre las dosis, y la biodisponibilidad del inmunoconjugado a partir de la formulación. La administración de la formulación de la presente invención podría ser continua. Está dentro de la habilidad ordinaria de un médico el determinar la dosis y velocidad de infusión o frecuencia de administración de la formulación de la presente invención a fin de lograr el resultado clínico deseado.

La dosis administrada variará, por supuesto, dependiendo de factores conocidos tales como las características farmacodinámicas del agente particular, y su modo y ruta de administración; edad, estado de salud y peso del receptor; naturaleza y extensión de los síntomas, clase de tratamiento concurrente, frecuencia del tratamiento, y el efecto deseado. Usualmente una dosis diaria del compuesto terapéuticamente significativo puede ser de aproximadamente 0.1 hasta 100 miligramos por kilogramo de peso corporal.

Las formas de dosis para administración interna contienen desde

aproximadamente 1 miligramo hasta aproximadamente 500 miligramos de compuesto terapéuticamente significativo por unidad. En estas composiciones farmacéuticas el compuesto terapéuticamente significativo estará presente de manera ordinaria en una cantidad de aproximadamente 0.05-2% en peso en una formulación líquida y 2- 50% en la formulación liofilizada antes de la reconstitución en base al peso total de la composición.

La presente invención proporciona también un polvo liofilizado de la formulación antes descrita. De preferencia, la formulación liofilizada comprende uno o más componentes adicionales, tales como un lioprotector y/o un agente de acumulación. El polvo liofilizado puede ser reconstituido con agua para crear una solución reconstituida. La presente formulación puede ser liofilizada y reconstituida como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2004/0,241,174 A1, cuya descripción está incorporada a la presente mediante referencia, y que describe formulaciones liofilizadas que comprenden inmunoconjugados.

Antes de la reconstitución de la composición liofilizada, las cantidades relativas de cada componente que comprende la composición liofilizada de la invención se pueden describir en términos de mg de excipiente (por ejemplo, regulador de pH, agente tensioactivo, agente de acumulación, crioprotector) por mg de conjugado.

En tanto que cualquier agente de regulación de pH adecuado descrito en la presente puede ser utilizado en relación con la composición liofilizada de la invención, la composición liofilizada comprende de preferencia un regulador de pH de succinato de sodio. El agente regulador de pH puede estar presente en la composición liofilizada de la invención en cualquier cantidad adecuada. En particular, la composición liofilizada comprende de manera deseable aproximadamente 0.1 mg hasta aproximadamente 2 mg del agente regulador de pH por mg del conjugado (por ejemplo, aproximadamente 0.1 mg hasta aproximadamente 0.5 mg de agente regulador de pH por mg del conjugado, aproximadamente 0.5 mg hasta aproximadamente 1 mg de agente regulador de pH por mg del conjugado, o aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 2 mg de agente regulador de pH por mg del conjugado). De mayor preferencia, la composición liofilizada comprende aproximadamente 0.3 mg de regulador de pH de succinato de sodio por mg del conjugado.

La composición liofilizada comprende de manera deseable aproximadamente 0.005 mg hasta aproximadamente 0.1 mg de polisorbato por mg del conjugado, y de preferencia aproximadamente 0.005 mg hasta aproximadamente 0.01 mg de polisorbato por mg del conjugado, 0.01 mg hasta aproximadamente 0.05 mg de polisorbato por mg del conjugado, o aproximadamente 0.05 mg de polisorbato hasta aproximadamente 0.1 mg de polisorbato por mg del conjugado. Cuando el polisorbato es polisorbato 20, la composición liofilizada de preferencia comprende aproximadamente 0.02 mg de polisorbato 20 por mg del conjugado.

A fin de evitar la degradación de los ingredientes activos de la composición durante la congelación y secado, la composición liofilizada de la invención comprende

además un crioprotector, de preferencia un crioprotector amorfo. El término "crioprotector," como se utiliza en la presente, se refiere a un excipiente que protege las moléculas inestables durante la congelación. Los crioprotectores adecuados para uso en la composición liofilizada son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica, e incluyen, por ejemplo, glicerol, dimetil sulfoxido (DMSO), polietilen glicol (PEG), dextrano, glucosa, trehalosa, y sacarosa. De mayor preferencia, el crioprotector es sacarosa. El crioprotector puede estar presente en la composición liofilizada de la invención en cualquier cantidad adecuada. La composición liofilizada que comprende de manera deseable aproximadamente 0.5 mg hasta aproximadamente 5 mg, por ejemplo, aproximadamente 0.5 mg hasta aproximadamente 2 mg del crioprotector por mg del conjugado, aproximadamente 0.8 mg del crioprotector por mg del conjugado, aproximadamente 2 mg del crioprotector por mg del conjugado, o aproximadamente 4 mg del crioprotector por mg del conjugado. Cuando el crioprotector es sacarosa, la composición liofilizada de preferencia comprende aproximadamente 0.5 mg hasta aproximadamente 2 mg (por ejemplo, aproximadamente 1 mg) sacarosa por mg del conjugado.

La composición liofilizada puede contener además un agente de acumulación, de preferencia un agente de acumulación cristizable. Los agentes de acumulación comúnmente son utilizados en la técnica para proporcionar estructura y peso a la "torta" producida como resultado de la liofilización. Cualquier agente de acumulación adecuado conocido en la técnica puede ser utilizado en relación con la composición liofilizada de la invención. Los agentes de acumulación adecuados incluyen, por ejemplo, manitol, dextran, y glicina. De mayor preferencia, el agente de acumulación usado en la composición de la invención es glicina. La composición liofilizada puede contener cualquier cantidad adecuada del agente de acumulación, aunque de preferencia la composición liofilizada comprende aproximadamente 2 mg hasta aproximadamente 20 mg del agente de acumulación por mg del conjugado, y de preferencia aproximadamente 2 mg hasta aproximadamente 10 mg del agente de acumulación por mg del conjugado, aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 10 mg del agente de acumulación por mg del conjugado, aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 15 mg del agente de acumulación por mg del conjugado, o aproximadamente 15 mg hasta aproximadamente 20 mg del agente de acumulación por mg del conjugado. Cuando el agente de acumulación es glicina, la composición liofilizada de preferencia comprende aproximadamente 3.8 mg glicina por mg del conjugado.

Por tanto, de acuerdo con la invención, los contenidos de una composición liofilizada que se van a reconstituir para contener 5 mg/mL de conjugado (por ejemplo, de preferencia un conjugado comprende huN901 químicamente acoplado a DMI) de preferencia comprende (i) aproximadamente 0.3 mg regulador de pH de succinato de sodio por mg del conjugado, (ii) aproximadamente 0.02 mg polisorbato 20 por mg del conjugado, (iii) aproximadamente 1 mg sacarosa por mg del conjugado, y (iv)

aproximadamente 3.8 mg glicina por mg del conjugado. Una vez reconstituida con agua, dicha composición liofilizada tiene de preferencia un pH de aproximadamente 5.5. Además, cuando la composición liofilizada es reconstituida con agua, las descripciones de las concentraciones relativas de los excipientes antes establecidos en relación con la formulación líquida son aplicables para la composición liofilizada antes mencionada.

Los métodos de liofilización son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Wang, W., Int. J. Pharm., 203, 1-60 (2000). Por ejemplo, la composición liofilizada de la invención puede ser producida usando un ciclo de liofilización que comprende las siguientes etapas: (1) pre-enfriamiento a una temperatura de anaquel de 4° C. y presión de cámara ambiente durante 2.5 horas, (2) congelar a una temperatura de anaquel de -50° C. y presión de cámara ambiente durante 14 horas, (3) recristalización de glicina a una temperatura de anaquel de -20° C. y presión de cámara ambiente durante 6 horas, (4) re-congelación a una temperatura de anaquel de -50° C y presión de cámara ambiente durante 16 horas, (5) secado primario a una temperatura de anaquel de - 13° C. y 100 mTorr de presión durante 24 horas, (6) secado secundario a una temperatura de anaquel de 24° C. y 100 mTorr de presión durante 10 horas, y (7) fase de tapón temperatura de anaquel de 24° C. y presión de cámara ambiente. Sin embargo, la composición liofilizada, no está limitada a las composiciones producidas a través del método antes descrito. De hecho, se puede utilizar cualquier método de liofilización para producir la composición liofilizada, y será evidente para aquellos con experiencia en la técnica que los parámetros de liofilización seleccionados (por ejemplo, tiempos de secado) variarán dependiendo de una gama de factores, que incluyen el volumen de la solución que se va a liofilizar.

En otra modalidad, la presente invención está dirigida a un equipo para la preparación de una formulación acuosa, cuyo equipo comprende un primer recipiente que contiene un polvo liofilizado y un segundo recipiente que contiene una formulación acuosa que comprende un estabilizador de reconstitución. La concentración del polvo liofilizado en la solución, el volumen de la solución que es cargado dentro de cada recipiente y la capacidad de los recipientes son parámetros interrelacionados que pueden ser adecuadamente modificados, dependiendo de la concentración deseada del principio activo en la unidad de dosis final. Por lo tanto, estos parámetros pueden variar en rangos amplios.

Todas las patentes, publicaciones, y otras referencias citadas en la presente están expresamente incorporadas mediante referencia en su totalidad.

La presente invención está descrita además por los siguientes ejemplos, los cuales son ilustrativos del proceso y no serán considerados como limitantes de la invención. Los parámetros de proceso dados a continuación pueden ser adoptados y adaptados por la persona experimentada para adecuarlos a la necesidad particular.

EJEMPLO 1

Este ejemplo muestra el efecto de los siguientes excipientes de formulación sobre la apariencia visual de las muestras de conjugado MAb-DMI formuladas.

Muestras de huN901-SPP-DMI fueron colocadas en 1.0 mg/mL in 10 mM de regulador de pH de fosfato pH 6.5 con 140 mM NaCl con cada uno de los excipientes listados a continuación. Los excipientes fueron agregados de manera directa a la muestra de huN901-SPP-DMI en una base de %p/p (peso de excipiente / peso de solución). Inmediatamente después de la adición del excipiente, las formulaciones fueron filtradas, y se condujeron pruebas de apariencia y conteo de partícula. Las muestras fueron almacenadas después a 4°C durante el tiempo de estudio, y fueron probadas de nuevo en los puntos de tiempo de 2 semanas y 1 mes. Para la apariencia, las muestras fueron probadas a través de la examinación de por lo menos 1.0 mL de solución contra un fondo blanco para claridad y contra un fondo negro bajo luz blanca para la presencia o ausencia de partículas visibles. Los resultados se reportaron como presencia o ausencia de partículas visibles. Las partículas subvisibles con un tamaño de más de 5 µm también fueron medidas con un contador de partículas HIAC calibrado para medir tamaño de partícula entre 2 y 100 µm.

Apariencia:				
Excipiente	Inicial	2 Semanas	1 Mes	
5% sacarosa	Transparente	Transparente	Transparente	
10% sacarosa	Transparente	Transparente	Transparente	
0.1% tween20	Transparente	Transparente	Transparente	
0.8% tween20	Transparente	Partículas	Transparente	
1 % ciclodextrina	Transparente	Transparente	Transparente	
1 % dextrosa	Transparente	Transparente	Partículas	
5% glicerol	Transparente	Transparente	Partículas	
2% PEG6000	Transparente	Transparente	Partículas	
5% manitol	Transparente	Partículas	Partículas	
Control filtrado*	Transparente	Transparente	Partículas	

*filtrado poco antes del punto de tiempo inicial

Conteo de partícula (conteos > 5 µm per mL):

Excipiente	Conteos de particular acumulativos		
	Inicial	2 Semanas	1 Mes
5% sacarosa	94	120	84
10% sacarosa	68	14	58
0.1% Tween20	40	76	76

0.8% Tween20	86	120	120
1% Beta-Ciclodextrina	8	4	10
1% Dextrosa	388	608	502
5% Glicerol	4	32	42
2% PEG	12	6	72
5% manitol	46	144	70
Control filtrado	222	284	720

Se observaron los efectos positivos de la sacarosa, TWEEN-20™, beta-ciclodextrina, dextrosa, glicerol, manitol y polietilen glicol (PEG).

5 **EJEMPLO 2**

Este ejemplo muestra el efecto de los amino ácidos en la estabilidad de huN901-SPP-DMI con respecto a la agregación de conjugado.

10 Muestras de huN901-SPP-DMI fueron colocadas en 5.0 mg/mL en los siguientes reguladores de pH y almacenadas a 2-8 y 25°C durante 12 meses. El contenido agregado de conjugado fue probado con una prueba cromatográfica en los puntos de tiempo de 1, 3, 6 y 12 meses.

- (1) 10 mM fosfato de sodio, 140 mM NaCl, pH 6.5.
- (2) 10 mM citrato de sodio, 135 mM NaCl, 0.01 % polisorbato 20, pH 5.5.
- 15 (3) 10 mM citrato de sodio, 130 mM histidina, 0.01 % polisorbato 20, pH 5.5
- (4) 10 mM citrato de sodio, 110 mM glicina, 80 mM NaCl, 0.01 % polisorbato 20, pH 5.5.

20

Formulación	T0	2-8°C				25°C			
		1 mes	3 meses	6 meses	12 meses	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses
Composición 1	5.3	6.7	8.1	8.6	8.9	8.7	10.2	10.4	11.8
Composición 2	4.5	5.0	5.4	5.6	5.5	5.8	6.6	7.2	8.2
Composición 3	4.1	4.1	4.2	4.1	3.8	4.5	4.7	5.0	6.1
Composición 4	4.2	4.5	4.8	4.9	4.9	5.2	5.8	6.2	7.3

El ejemplo 1 muestra que la histidina mejora la formulación con respecto a evitar la formación de agregado del conjugado. La glicina también tuvo beneficios.

25

EJEMPLO 3

Este ejemplo muestra el efecto de la histidina en la estabilidad del conjugado

huMy9-6-SPDB-DM4 en términos del agregado de conjugado.

El conjugado huMy9-6-SPDB-DM4 fue formulado a 5.0 mg/mL en:

- (1) 10 mM citrato de sodio, 135 mM NaCl, pH 5.5
- (2) 150 mM histidina/cloruro de histidina, pH 5.5

5 Las muestras fueron incubadas a 2-8°C y 25°C durante 6 meses, después de lo cual fueron probadas para agregado del conjugado mediante ensayo cromatográfico.

Formulación	T0	2-8 °C, 6 mon	25 °C, 6 mon
Composición 1	3.5	4.0	8 2
Composición 2	3.2	3.2	7 1

Los datos muestran los efectos benéficos de la histidina en la prevención de la formación de agregado.

EJEMPLO 4

Este ejemplo muestra el efecto del agente regulador de pH, azúcar y amino ácido en la estabilidad de huC242-SPDB-DM4 con respecto al agregado de conjugado.

Las muestras de huC242-SPDB-DM4 a 5.0 mg/mL en:

- (1) 10 mM citrato de sodio, 135mM NaCl, pH 5.5
- (2) 10 mM citrato de sodio, 5% sacarosa, 130 mM glicina, 0.1% polisorbato 80, pH 5.5
- (3) 10 mM histidina/cloruro de histidina, 5% sacarosa, 130 mM glicina, pH 5.5

Se ejecutaron las pruebas para contenido de monómero y agregado de conjugado a T₀, y después de 3 meses de almacenamiento a 2-8°C y 25°C.

Formulación	Agregado (%)		
	T0	2-8°C, 3 meses	25°C, 3 meses
Composición 1	4.0	4.3	9.1
Composición 2	3.2	3.7	5.9
Composición 3	2.4	2.3	3.8

Los datos muestran que la sacarosa y la glicina, juntas en la combinación anterior, mejoran la formulación con respecto a la protección contra la agregación de conjugado. La mejora más importante se observó cuando la combinación de sacarosa y glicina es usada con histidina.

EJEMPLO 5

Este ejemplo muestra el efecto de varias formulaciones que contienen sacarosa

con y sin glicina en el contenido de agregado de conjugado huN901-SPP-DMI.

Las muestras de huN901-SPP-DMI a una concentración de 5.0 mg/mL en cada una de las siguientes formulaciones líquidas fueron probadas para contenidos de monómero y agregado.

- 5
- (1) 10 mM citrato de sodio, 135 mM NaCl, 0.01% polisorbato 20, pH 5.5
- (2) 10 mM citrato de sodio, 60 mM NaCl, 5% sacarosa, pH 5.5
- (3) 10 mM citrato de sodio, 60 mM NaCl, 0.01% polisorbato 20, 5 % sacarosa, pH 5.5
- 10
- (4) 10 mM fosfato de sodio, 140 mM NaCl pH 6.5
- (5) 10 mM succinato de sodio, 0.25 M glicina, 0.01% polisorbato 20, 0.5% sacarosa, pH 5.5

Las muestras almacenadas a 25°C fueron probadas para contenidos de agregado en los puntos de tiempo de 3, 6 y 12 meses.

Formulación	Agregado (%)		
	3 meses	6 meses	12 meses
Composición 1	6.7	7.3	8.2
Composición 2	5.2	5.7	6.2
Composición 3	5.6	5.4	6.5
Composición 4	10.0	10.4	11.8
Composición 5	4.4	4.7	4.4

En todos los casos las formulaciones que contienen sacarosa tienen menor contenido de agregado que aquellas con glicina. La formulación que contiene glicina (composición 5) tuvo la mejor estabilidad en este ejemplo.

EJEMPLO 6

Este ejemplo muestra el efecto de polisorbato 80 en la formación de partícula inducida por agitación. Se espera que esta condición de tensión (agitación) imite las tensiones encontradas durante el embarque y manejo del conjugado liquido, en oposición a las tensiones encontradas durante el almacenamiento estático (las cuales se resolvieron en el Ejemplo 1).

Las muestras de huC242-SPDB-DM4 fueron colocadas en 1 mg/mL en los siguientes reguladores de pH y colocadas en envases de vidrio USP Tipo 1 (5mL en un envase de 10 mL) los cuales fueron sellados con Flurotec® Stoppers. Los envases fueron agitados durante 48 horas a 100 rpm a temperatura ambiente, utilizando un Agitador Orbital Lab-Line.

- (1) 10 mM citrato de sodio, 135 mM cloruro de sodio, pH 5.5
- (2) 10 mM histidina, 5% sacarosa, 130 mM glicina, pH 5.5

- (3) 10 mM histidina, 5% sacarosa, 130 mM glicina, 0.1% polisorbato 80, pH 5.5
- (4) 10 mM histidina, 1% sacarosa, 250 mM glicina, pH 5.5
- (5) 10 mM histidina, 1% sacarosa, 250 mM glicina, 0.1% polisorbato 80, pH 5.5
- (6) 10 mM histidina, 280 mM glicina, pH 5.5
- 5 (7) 10 mM histidina, 280 mM glicina, 0.1% polisorbato 80, pH 5.5
- (8) 10 mM histidina, 10% sacarosa, pH 5.5
- (9) 10 mM histidina, 10% sacarosa, 0.1% polisorbato 80, pH 5.5

Después de la agitación durante 48 horas todos los envases fueron inspeccionados visualmente. Aquellos que contenían polisorbato 80 (Composiciones 3, 5, 7 y 9) permanecieron transparentes, en tanto que todos aquellos que no contenían polisorbato 80 (1, 2, 4, 6 y 8) estuvieron turbios. Estos datos demuestran el efecto benéfico del polisorbato 80 en la reducción de partículas debidas a la agitación, tal como se puede encontrar durante el embarque y manejo del conjugado líquido.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de inmunoconjugado que comprende:

(a) un inmunoconjugado; y

5 (b) uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende sacarosa, polisorbato 20, polisorbato 80, ciclodextrina, dextrosa, glicerol, polietilen glicol, manitol, cloruro de sodio, y un amino ácido, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6.

2. La formulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la
10 formulación comprende uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende:

(i) 0.1-12% sacarosa,

(ii) 0.005-1.0% polisorbato 20,

(iii) 0.5-2% beta-ciclodextrina,

15 (iv) 2-8% glicerol,

(v) 1-5% PEG6000,

(vi) 2-8% manitol,

(vii) 0.005-1.0% polisorbato 80,

(viii) 5-20 mM histidina,

20 (ix) 100-300 mM glicina, and

(x) 50-300 mM cloruro de sodio.

3. La formulación de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la formulación comprende uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende:

25 (i) 5-10% sacarosa,

(ii) 0.005 - 0.2 % polisorbato 20,

(iii) 0.5-1% beta-ciclodextrina,

(iv) 2-5% glicerol,

(v) 2-3% PEG6000,

30 (vi) 3-5% manitol,

(vii) 0.005 - 0.2 % polisorbato 80, (viii) 10-15 mM histidina, (ix) 130-250 mM glicina,

y (x) 100-200 mM cloruro de sodio.

4. La formulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la solución acuosa regulada en su pH contiene uno o más de histidina, succinato, citrato,
35 fosfato, y acetato.

5. La formulación de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque el pH es desde 5.0 hasta 7.0.

6. La formulación de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque el pH es desde 5.0 hasta 6.0.

40 7. La formulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el

inmunoconjugado comprende un anticuerpo humanizado seleccionado a partir del grupo que comprende huMy9-6, huC242, huN901, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab.

5 8. La formulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el inmunoconjugado comprende un fármaco citotóxico seleccionados a partir del grupo que comprende a maitansinoide, un taxano, y un CC-1065.

9. Una formulación de inmunoconjugado que comprende:

(a) un inmunoconjugado; y

10 (b) uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende histidina, sacarosa, glicina y cloruro de sodio, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6.

10. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque la formulación comprende uno o más excipientes seleccionados a partir de 5-200 mM histidina, 100-200 mM glicina, y 2-8% sacarosa.

15 11. La formulación de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque el excipiente es 5- 100 mM histidina o 100- 150 mM glicina.

12. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque la formulación contiene 2-8% sacarosa y 100-150 mM glicina.

20 13. La formulación de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque la formulación contiene 10 mM histidina, 5% sacarosa y 130 mM glicina.

14. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque la solución acuosa regulada en su pH contiene uno o más de histidina, succinato, citrato, fosfato, y acetato.

25 15. La formulación de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque el pH es desde 5.0 hasta 7.0.

16. La formulación de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque el pH es desde 5.0 hasta 6.0.

17. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, que comprende además polisorbato 20 y/o polisorbato 80.

30 18. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque el inmunoconjugado comprende un anticuerpo humanizado seleccionado a partir del grupo que comprende huMy9-6, huC242, huN901, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab.

35 19. La formulación de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque el inmunoconjugado comprende a fármaco citotóxico seleccionados a partir del grupo que comprende un maitansinoide, un taxano, y un CC-1065.

20. Una formulación de inmunoconjugado que consta esencialmente de:

(a) inmunoconjugado huN901-DMI a una concentración desde 0.5-10 mg/ml;

(b) 5-15 mM histidina y/o 5-15 mM succinato;

40 (c) 0.1-10 % sacarosa y/o 100-300 mM glicina;

(d) 0.005-0.2% polisorbato 80 y/o 0.005-0.2% polisorbato 20, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH desde 5-6.

21. Una formulación de inmunoconjugado que consta esencialmente de:

(a) inmunoconjugado huC242-DM4 a una concentración desde 0.5-10 mg/ml;

5

(b) 5-15 mM histidina;

(c) 0.1-10 % sacarosa y/o 100-300 mM glicina;

(d) 0.005-0.2% polisorbato 80 y/o 0.005-0.2% polisorbato 20; en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH desde 5-6.

RESUMEN

La presente invención proporciona una formulación de inmunoconjugado que está sustancialmente libre de partículas, la formulación de inmunoconjugado que comprende:

5 un inmunoconjugado y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende: sacarosa, polisorbato 20, polisorbato 80, ciclodextrina, dextrosa, glicerol, polietilen glicol, manitol, cloruro de sodio, y un amino ácido, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6. La presente invención proporciona también una formulación de inmunoconjugado que está

10 sustancialmente libre de agregados, la formulación de inmunoconjugado que comprende: un inmunoconjugado y uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende histidina, sacarosa, glicina y cloruro de sodio, en donde la formulación es una solución acuosa regulada en su pH que tiene un pH de 4.5 hasta 7.6. La presente invención proporciona además una formulación de inmunoconjugado que está

15 sustancialmente libre tanto de partículas como de agregados.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-009362- -00000-0000

Fecha: 2008-01-31 15:15:25 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 109



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que 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 y fotográfica 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 se 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 trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudia M. Neva Cortés
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Commutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@slc.gov.co

www.slc.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

111

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RUBIO CAMACHO HUMBERTO
Apoderado(a) y/o Representante de
IMMUNOGEN, INC

REFERENCIA	Radicación No.	8 9362
	Solicitud internacional	PCT/US2006/030295
	Fecha inicio fase nacional	03/03/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	4627

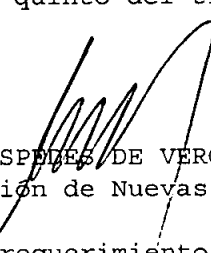
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se 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. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular Única 5.2.9)

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 Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 11 ABR 2008
adpall