

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS

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

Doctor

Jefe División de Nuevas Creaciones

José Luis SALAZAR LOPEZ

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-009362- -00010-0000

Fecha: 2012-07-16 14:23:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 42

REF: Expediente No. 08-009362
Patente de Invención: "METODOS PARA LA PREPARACION DE FORMULACIONES ESTABLES DE INMUNOCONJUGADOS QUE ESTAN SUSTANCIALMENTE LIBRES DE PARTICULAS, LA FORMULACION DE INMUNOCONJUGADOS QUE COMPRENDE UN INMUNOCONJUGADO Y UNO O MAS EXCIPIENTES SELECCIONADOS"
Fase Nacional: PCT/US2006/030295
Clasificación Int.: A61K39/00 // A61K31/337 // A61K39/395 // A61P35/00
Titular: IMMUNOGEN, INC.

RESPUESTA A REQUERIMIENTO OFICIO No. 04110 NOTIFICADO POR ESTADO DE 14 DE MARZO DE 2012.

HUMBERTO RUBIO CAMACHO, mayor de edad, domiciliado en Bogotá, D.C., identificado con la cédula de ciudadanía número 17'192.062 de Bogotá, abogado graduado portador de la Tarjeta Profesional No. 50.007 expedida por el Consejo Superior de la Judicatura, actuando en carácter de Apoderado de IMMUNOGEN, INC, domiciliado en 830 Winter Street, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos de America; encontrándome dentro de la debida oportunidad procesal para dar respuesta al auto proferido por su Despacho, mediante Oficio No. 04110, notificado por fijación en lista de 14 de Marzo de 2012, y cuya prorroga de términos fue presentada mediante escrito presentado ante su Despacho el 12 de junio de 2012, me permito:

Manifestar:

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

a. De las Reivindicaciones:

- Las reivindicaciones 1, 17, 29 39 y 47 se refieren a un "inmunoconjugado" que se define de forma general como un anticuerpo que comprende una o más drogas citotóxicas

enlazadas covalentemente. Se aclara que esta forma de reivindicar no es adecuada porque no define inequívocamente el inmunoconjugado puesto que un anticuerpo está conformado por una sola región variable y sola región constante y dichas regiones contienen a su vez 3 CDRs las cuales deben estar claramente caracterizadas por su secuencia. Así como el ingrediente activo no se puede definir en términos de su actividad como "citotóxico".

- Además de la caracterización del inmunoconjugado, la cantidad del mismo también es una característica esencial de la composición.

- Las reivindicaciones 1, 6-8, 15-17, 20-22, 29, 33, 34, 39, 41, 42, 47 y 49 se refieren a un valor de pH que es un resultado a alcanzar, no definen la composición en si.

- Las reivindicaciones 10 y 24, que referencian al anticuerpo huN901 presentan falsa dependencia de las reivindicaciones 9 y 23 respectivamente, porque en estas últimas no se menciona este anticuerpo.

- La reivindicación 16 se encuentra dependiente de la reivindicación posterior 23, la cual a su vez es dependiente de la reivindicación 17 que reclama otra composición.

- Las reivindicaciones 9, 23, 38, 46 y 51 incluyen dentro de los anticuerpos, el anticuerpo humanizado anti-CanAg y el anticuerpo anti-CD56, definiéndolos en términos de sus antígenos. Así como las reivindicaciones 9, 10, 11, 15, 16 y 28 incluyen anticuerpos que no se encuentran caracterizados por su secuencia de región variable, región constante y sus 3 CDRs. Esta manera de reivindicar no es adecuada ya que no define al anticuerpo como tal.

- Las reivindicaciones 12, 13, 25, 26, 35, 36, 43, 44, 53 y 54 no son concisas porque definen la droga citotóxica como un maitansinoide, taxano, definiéndolo como un derivado de maitansina y como compuestos producidos por las plantas del género Taxus.

- Las reivindicaciones 12, 14, 15, 16, 25, 27, 28, 35, 37, 43, 45, 53, 55 y 56 incluyen las drogas citotóxicas CC-1065, DM1 y DM4, definiéndose por una denominación común.

- En las reivindicaciones 15, 16 y 28 los grupos enlazantes se encuentran referenciados por siglas lo que no es correcto.

- Las reivindicaciones 17, 18, 30, 31 y 32 no son claras porque incluyen dentro de los ingredientes de la formulación un agente reductor de succinato, un reductor de citrato, un reductor de fosfato, un reductor de acetato, un reductor de histidina, definiéndose por su actividad reductora no mediante un compuesto como tal, por lo tanto no permite distinguir la solicitud del estado de la técnica.

- El término mannitol de la reivindicación 29 no es conocido en el estado de la técnica y debe tratarse de un error tipográfico.

- En las reivindicaciones 39 y 47 se mencionan los ingredientes succinato y polisorbato, sin embargo estas no son concisas porque no especifican el ingrediente particular a que se refieren, por ejemplo si es el anión de la sal de succinato y no el catión, etc.

- En la reivindicación 47 el término trehalose no se ha traducido correctamente.

- El capítulo reivindicatorio no es conciso porque contiene un excesivo número de reivindicaciones independientes, lo cual hace difícil de definir cuál es el objeto que se busca proteger.

- No se encuentra soporte descriptivo de las formulaciones de las reivindicaciones independientes 29, 39 y 47 y sus dependientes.

- En el capítulo descriptivo solo se encuentra soporte de la composición cuando la sustancia citotóxica es DM1 o DM4, no así cuando es taxano o CC-1065.

b. De la Descripción:

- Existen errores tipográficos que provocan falta de consistencia entre la descripción y las reivindicaciones, por ejemplo en la descripción aparece el término DMI y en las reivindicaciones DM1, no hay definición para el radical Y_2' en el capítulo descriptivo para para las maitansinas de fórmula (VII), sin embargo si la hay para Y' .

- Es necesario definir las marcas Tween 20, Tween 80, fluorotec, etc.

c. De la Unidad de Invención:

- No hay unidad de invención porque no existe un concepto inventivo común en las composiciones reivindicadas, ya que los inmunoconjugados no son nuevos ni inventivos, de aquí que existen al menos 5 grupos inventivos, los cuales son:

1. Reivindicaciones 1-16: Composiciones de un inmunoconjugado de un anticuerpo enlazado a un maitansinoide, que contienen histidina, glicina y una sacarosa.

2. Reivindicaciones 17-28: Composiciones de un inmunoconjugado de un anticuerpo enlazado a un maitansinoide DM1 o DM4, que contienen glicina, sacarosa, polisorbato y un buffer salino de fosfato, citrato de sodio o succinato de sodio (Documento D1).

3. Reivindicaciones 29-38: Composiciones de un inmunoconjugado de un anticuerpo enlazado a un maitansinoide, que contienen manitol, sacarosa y polisorbato 20 o polisorbato 80.

4. Reivindicaciones 39-46: Composiciones de un inmunoconjugado de un anticuerpo enlazado a un maitansinoide, que contienen succinato, glicina, glicerol y polisorbato.

5. Reivindicaciones 47-56: Composiciones de un inmunoconjugado de un anticuerpo enlazado a un maitansinoide, que contienen succinato, trehalosa y polisorbato.

- Adicionalmente se generaría el grupo 6-15 si se modifica en cada una de las composiciones el inmunoconjugado con un taxano o CC-1065 como agente citotóxico.

e. Análisis de los Requisitos de Patentabilidad:

- El documento del estado de la técnica citado en este análisis como relevante para la invención es el siguiente:

D1: US 2004/0241174

- Novedad:

La reivindicación 17 consiste en una formulación líquida de inmunoconjugado que comprende:

- i) Un inmunoconjugado, el cual es un anticuerpo que comprende una o más drogas citotóxicas enlazados covalentemente;
- ii) Glicina a 130-250 mM
- iii) Sacarosa a 5-10%
- iv) Polisorbato 80 o polisorbato 20 a 0.005-0.2%
- v) Un agente reductor seleccionado del grupo que comprende un reductor de succinato, un reductor de citrato, un reductor de fosfato y un reductor de acetato,

En donde la formulación líquida tiene un pH de 4.5 a 7.6.

De la comparación de la invención con lo divulgado en D1 se concluye que las características esenciales de la composición de la reivindicación 1 (asumimos que se quiso decir la reivindicación 17) se han divulgado previamente en este documento, el cual da a conocer composiciones líquidas de inmunoconjugados tales como huN901-SPP-DM1, huN901-SMCC-DM1, huMy9-6-SPP-DM1, huMy9-6-SPDB-DM4, 250 mM de glicina, 0.5-5% de sacarosa, 0.01% de polisorbato 20, buffer salino de fosfato, citrato de sodio y succinato de sodio.

El documento D1 también enseña composiciones en las que el inmunoconjugado se encuentra en una concentración entre 1 mg/mL y 5 mg/mL. Aunque el pH no es una

característica técnica de la invención sino un resultado a alcanzar, en el documento D1 las formulaciones presentan un pH de 5.5.

En consecuencia, la reivindicación 1 no es nueva a la luz de lo divulgado en D1. Puesto que las reivindicaciones dependientes 18-28 no mencionan ninguna característica que haga nueva a la composición de la reivindicación 1, se considera que estas no son nuevas.

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

De la solicitud de patente

- De las reivindicaciones:

Con vistas a superar las objeciones emitidas en el examen de patentabilidad, adjuntamos a la presente respuesta un nuevo capítulo reivindicatorio en el cual las reivindicaciones anteriores 1-28, 30, 35, 36 y 39-56 se han eliminado. Las restantes reivindicaciones de la solicitud se han reenumerado y rectificado para reflejar las dependencias adecuadas. Dicho nuevo capítulo reivindicatorio tiene sustento íntegro en el contenido de la solicitud anteriormente presentada, al cual no se ha añadido ninguna materia adicional.

En las nuevas reivindicaciones, la reivindicación 29 anterior (ahora la nueva reivindicación 1) se ha modificado para incorporar el objeto de las reivindicaciones anteriores 30 y 36 (ahora eliminadas). Además, dicha nueva reivindicación 1 se ha enmendado para especificar que la formulación líquida del inmunoconjugado comprende de 0.5 a 20 mg/ml del inmunoconjugado. Estas modificaciones, realizadas para superar las objeciones del examinador, tienen total soporte en la descripción anterior, por ejemplo, en los párrafos 20, 25 y 40 de la solicitud PCT publicada con número WO 2007/019232 A2.

La reivindicación anterior 37 (enmendada ahora como la nueva reivindicación 6) se ha modificado para definir las siglas DM1 y DM4, tal como lo sugerido en el examen de patentabilidad.

La reivindicación anterior 38 (enmendada ahora como la nueva reivindicación 7) se ha modificado para especificar que el anticuerpo humanizado puede ser huN901 o un anticuerpo humanizado B4. Estas modificaciones se basan en la descripción de los casos, por ejemplo, en los párrafos 51 y 54 de la solicitud PCT publicada.

- Descripción

Teniendo en cuenta las objeciones del examinador hemos corregido las inconsistencias en el capítulo descriptivo, en donde se nombra el maitansinoide DM1 para que se ajuste a lo que aparece en el capítulo reivindicatorio.

Igualmente hemos realizado las correcciones en cuando al radical Y, las definiciones de las marcas Tween20 , Tween 80, por el Polisorbato 20 y Polisorbato 80, y los tapones (Flurotec)

Análisis de las objeciones emitidas en el examen de patentabilidad:

- Unidad de Invención

Como se mencionó anteriormente, las reivindicaciones anteriores 1-28, 30, 35, 36 y 39 a 56 se han eliminado en la nueva propuesta del capítulo reivindicatorio. Por lo tanto, nuestros argumentos a las objeciones de las reivindicaciones emitidas en el informe del examen de patentabilidad, solo se dirigirán a las reivindicaciones anteriores 29, 31-34, 37, y 38 (ahora las nuevas reivindicaciones 1-7).

El examinador sostiene que la definición del inmunoconjugado que aparece en las reivindicaciones 1, 17, 29, 39 y 47 es demasiado amplia. En particular, el examinador indica que las reivindicaciones deberán especificar las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera y definir de forma concisa los fármacos citotóxicos.

Además, el examinador objeta las reivindicaciones 9, 10, 11, 15, 16, 23, 28, 38, 46, 51 ya que las mismas no definen la secuencia de cada uno de los anticuerpos reivindicados. El examinador insiste en que las reivindicaciones deben modificarse para definir los anticuerpos reivindicados por las secuencias específicas de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera.

Al respecto discrepamos respetuosamente de esta opinión. Las formulaciones objetos de esta invención no se basan en un anticuerpo específico, ni su intención es proteger el anticuerpo en sí. El concepto inventivo es mucho más amplio que un anticuerpo específico incluido en una formulación de la invención, y por lo tanto no debe restringirse el alcance la reivindicación independiente a una secuencia particular de un anticuerpo. La limitación para la amplitud de una reivindicación independiente no debe basarse en criterios personales del examinador, más bien el estado de la técnica previo es el que debe determinar si el alcance solicitado es nuevo o no y sobre esa base emitirse un criterio de restricción.

Las formulaciones reivindicadas en la presente solicitud son útiles para un número de anticuerpos diferentes, de tal manera que entendemos que no es necesario modificar las reivindicaciones para restringirla a secuencias específicas de anticuerpos. En particular, los párrafos 40-54 de la solicitud PCT publicada claramente describen que un inmunoconjugado como el reivindicado, que comprende cualquier anticuerpo conocido en la técnica, se puede utilizar en las formulaciones objetos de la invención. Además, los datos presentados en los Ejemplos generalmente demuestran que la combinación específica de los excipientes, incluida en las reivindicaciones enmendadas, proporciona una formulación que está sustancialmente libre de partículas y agregados. En consecuencia, el solicitante alega que no

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS

Expediente No. 08-009362

Página 7 de 10

es necesario modificar las reivindicaciones para definir aún más el anticuerpo que forma parte de la formulación. Debe notarse además que los anticuerpos que se especifican en las reivindicaciones se proporcionan a manera de realizaciones particulares de la invención, y no por ello debe utilizarse para restringir su alcance más general.

El examinador también se opone a las reivindicaciones 12, 13, 25, 26, 35, 36, 43, 44, 53 y 54, porque en dichas reivindicaciones no se define específicamente el fármaco citotóxico. Únicamente en un esfuerzo por avanzar en la tramitación de la solicitud, la reivindicación 29 anterior (la nueva reivindicación 1) se ha enmendado para especificar que el fármaco citotóxico es un maitansinoide. Confiamos en que esta enmienda sirva para superar esta objeción del examinador sobre la definición del fármaco citotóxico.

El examinador ha solicitado además que el solicitante modifique las reivindicaciones independientes para especificar la cantidad del inmunoconjugado que se incluye en las formulaciones objetos de la invención. Únicamente en un esfuerzo por avanzar en la tramitación de la solicitud, la reivindicación 29 anterior (la nueva reivindicación 1) se ha enmendado para especificar que la formulación comprende de 0.5 a 20 mg/ml del inmunoconjugado, materia que encuentra sustento en la descripción de los casos, por ejemplo, los párrafos 20 y 25 de la solicitud PCT publicada.

Por otra parte el examinador ha objetado la inclusión de un valor de pH en las reivindicaciones 1, 6-8, 15-17, 20-22, 29, 33, 34, 39, 41, 42, 47 y 49, con el argumento de que un valor de pH es un resultado que debe alcanzarse y, por tanto, no define la composición reivindicada. Sobre esta opinión también manifestamos nuestro desacuerdo. El valor de pH es una característica definida de la composición que puede medirse fácilmente por alguien con un conocimiento ordinario en la técnica en cuestión, utilizando métodos de rutina. Más aún, el valor del pH que se establece en estas reivindicaciones es una característica técnica esencial de las formulaciones que se reivindican, y por tanto es un parámetro a considerar para la reproducibilidad de la invención.

El examinador también objeta las reivindicaciones 10, 16, y 24 por estar supuestamente mal subordinadas. Puesto que estas reivindicaciones se han eliminado de las nuevas reivindicaciones que se adjuntan, ya esta objeción es irrelevante.

El examinador objeta además las reivindicaciones 12, 14, 15, 16, 25, 27, 28, 35, 37, 43, 45, 53, 55, y 56 ya que hacen referencia a las siglas para definir el fármaco citotóxico. Puesto que las reivindicaciones anteriores 12, 14, 15, 16, 25, 27, 28, 35, 43, 45, 53, 55, y 56 se han eliminado, y la reivindicación anterior 37 (nueva reivindicación 6) se ha modificado para sustituir las siglas DM1 y DM4 con los nombres químicos completos, entendemos que esta objeción también es irrelevante.

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS
Expediente No. 08-009362
Pagina 8 de 10

Similarmente en el reporte de examen se objetan las reivindicaciones 15, 16, y 28 debido a que hacen referencia a los grupos de enlace sólo por sus iniciales. Puesto que estas reivindicaciones anteriores también se han eliminado, esta objeción también queda sin lugar.

El examinador objeta las reivindicaciones 17, 18, 30, 31 y 32 anteriores por supuesta falta de claridad, ya que las mismas se refieren a un "agente reductor" de succinato, citrato, fosfato, acetato, e histidina. Las reivindicaciones anteriores 17, 18 y 30 se han eliminado y la reivindicación anterior 29 (nueva reivindicación 1) se ha enmendado para incorporar la materia de la reivindicación anterior 30 al especificar que la formulación comprende un agente tamponante seleccionado del grupo que consiste en tampón de histidina, tampón de succinato, tampón de citrato, tampón de fosfato, y tampón de acetato. Los mencionados tampones son bien conocidos en la técnica, de tal manera que un experto con conocimientos ordinarios en la técnica, fácilmente podría comprender el alcance de la formulación mencionada en la reivindicación 1 enmendada. En consecuencia, entendemos que no es necesario modificar adicionalmente las reivindicaciones para definir el agente tamponante.

La objeción sobre la reivindicación anterior 29 (nueva reivindicación 1) por contener error tipográfico, se supera en la nueva reivindicación 1 donde se sustituye el término "mannitol" por "manitol" como corresponde.

Otras de las objeciones emitidas en el reporte del examen es que las 39 y 47 no definen con precisión los ingredientes succinato y polisorbato, así como el error de traducción que parecía en la reivindicación anterior 47. Las mencionadas reivindicaciones anteriores 39 y 47 se han eliminado de las nuevas reivindicaciones que se adjuntan, por lo tanto estas objeciones resultan improcedentes.

El examinador objeta que el capítulo reivindicatorio que no es conciso, ya que contiene un número excesivo de reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones se han enmendado para restringirse a una única reivindicación independiente (la reivindicación 1 enmendada).

El examinador además alega que no hay soporte descriptivo en el pliego de reivindicaciones de las formulaciones descritas en las reivindicaciones anteriores 29, 39 y 47. Como ya se ha aclarado, las reivindicaciones 39 y 47 anteriores se han eliminado. La reivindicación anterior 29 (nueva reivindicación 1) se ha modificado para especificar que la formulación comprende 2-8% de manitol, 0.1-12% de sacarosa, 0.005-1,0% de polisorbato 20 o polisorbato 80, y un agente tampón seleccionado del grupo que consiste en una tampón de histidina, un tampón de succinato, un tampón de citrato, un tampón de fosfato, y un tampón de acetato, en donde la formulación tiene un pH de 4.5 a 7.6.

Debe notarse que los párrafos 17-19 y en las reivindicaciones anteriores 1-6 de la solicitud PCT publicada, se describe una formulación de inmunoconjugados que comprende los excipientes mencionados en la nueva reivindicación 1 enmendada. Además, los datos

presentados en el Ejemplo 6 demuestran que una formulación que comprende histidina 10 mM, sacarosa al 10%, polisorbato 80 al 0.1% y con un pH 5.5 (véase la composición (9)) exhiben una estabilidad mejorada, y en el Ejemplo 1, además, se describen los efectos positivos de la adición de manitol a las formulaciones de los inmunos conjugados de la invención. En consecuencia, la descripción proporciona suficiente apoyo descriptivo de las formulaciones que se incluyen en las reivindicaciones modificadas.

Finalmente, el examinador alega que la descripción sólo proporciona soporte para una composición que comprende un maitansinoide que es DM1 o DM4. Nuevamente discrepamos respetuosamente del criterio del examinador. Como mencionamos anteriormente, las reivindicaciones se han modificado para especificar que el fármaco citotóxico es un maitansinoide. La descripción proporciona una descripción detallada de maitansinoides que se puede utilizar en las formulaciones reivindicadas en, por ejemplo, los párrafos 55-70. En consecuencia, las reivindicaciones modificadas son totalmente compatibles con la descripción tal como fue presentada.

Por otra parte, insistimos en el hecho de que los ejemplos de una solicitud de patente son realizaciones particulares de la invención, pero que el concepto inventivo es mucho más amplio que esas especificaciones, y por lo tanto, puesto que los ejemplos son para ilustrar la invención y no para limitarlas en su alcance, entendemos que la nueva reivindicación 1 supera esta objeción.

Con respecto al análisis sobre la unidad de la invención, el examinador ha dividido el objeto reivindicado en la solicitud anterior en cinco invenciones diferentes, que se corresponden con los grupos de 1-5 mencionados en el informe del examen de patentabilidad. En respuesta a esta objeción, el solicitante ha elegido la materia objeto del grupo 3, correspondiente a las reivindicaciones anteriores 29-38, para continuar su tramitación. Con vista a expedir este trámite, las reivindicaciones correspondientes a los restantes grupo 1, 2, 4 y 5, se han eliminado del nuevo capítulo reivindicatorio.

No obstante a lo anterior, y acogiéndome a lo expresamente autorizado en el Artículo 36 de la Decisión 486, me reservo el derecho a presentar, en cualquier momento del trámite, una o más solicitudes de patentes divisionales derivadas de la presente para la materia de las reivindicaciones eliminadas.

En cuanto a las conclusiones de la patentabilidad de la solicitud, específicamente con respecto al criterio de que las reivindicaciones 17 a 28 anteriores se anticipan en el documento del estado de la técnica No. de Publicación US 2004/0241174 (D1), como ya se mencionó previamente, las reivindicaciones 17-28 se han eliminado del presente capítulo reivindicatorio, y las actuales reivindicaciones modificadas se dirigen a la materia objeto de reivindicación 29 anterior, la cual no fue objetada en el examen de novedad.

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS

Expediente No. 08-009362

Pagina 10 de 10

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

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

ANEXO:

- (i) Capitulo descriptivo; y
- (ii) Capitulo reivindicatorio.

PETICIÓN:

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

Atentamente,



HUMBERTO RUBIO CAMACHO

C.C. 17'192.062 de Bogotá

T.P. 50.007 Consejo Superior
de la Judicatura

COD. 4134

**METODOS PARA LA PREPARACION DE FORMULACIONES ESTABLES DE
INMUNOCONJUGADOS QUE ESTAN SUSTANCIALMENTE LIBRES DE PARTICULAS, LA
FORMILACION DE INMUNOCONJUGADOS QUE COMPRENDE UN INMUNOCONJUGADO Y
UNO O MAS EXCIPIENTES SELECCIONADOS**

5

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.

10

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.

15

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.

20

25

30

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).

35

40

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 mayor

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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 mayo 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
30 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
35 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
40 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.

5 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
10 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.

15 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
20 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.

25 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
30 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
35 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.

40 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-DM1 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 (Polisorbato-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. Cáncer, 28: 17-21 (1981)), hCTMOI (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.

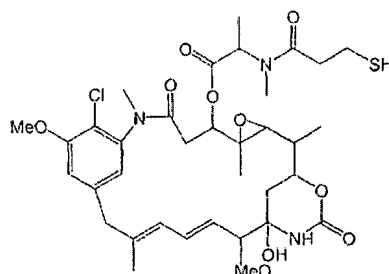
El inmunoconjugado puede comprender cualquier fármaco comprende cualquier fármaco adecuado, de manera común un agente citotóxico. Un "agente citotóxico," como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier compuesto que resulta en la muerte de una célula, induce la muerte celular, o disminuye la viabilidad celular. Los agentes citotóxicos adecuadas 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

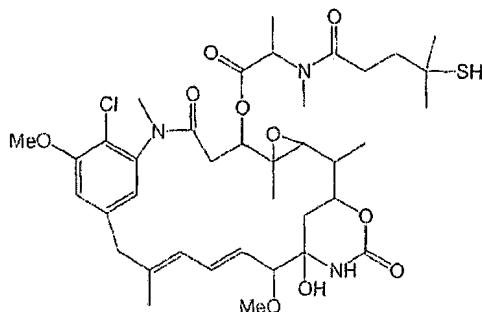
partir de Nocardid), (4) C-15- hidroxí/aciloxi (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,364,866) (preparado mediante la conversión de maitansinol a través de Streptomyces), (5) C-15-metoxi (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,313,946 y 4,315,929) (aislado a partir de Trewia nudiflora), (6) C-18-N-demetilo (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,362,663 y 4,322,348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por medio de Streptomyces), y (7) 4,5-deoxi (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 inmunoconjugado utiliza el maitansinoide que contiene tiol DM1, también conocido como N2'-deacetil-N2'-(3-mercapto-l-oxopropil)-maitansina, como el agente citotóxico. La estructura de DM1 está representada por la fórmula (I):



(I)

En otra modalidad preferida de la invención, el inmunoconjugado 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):

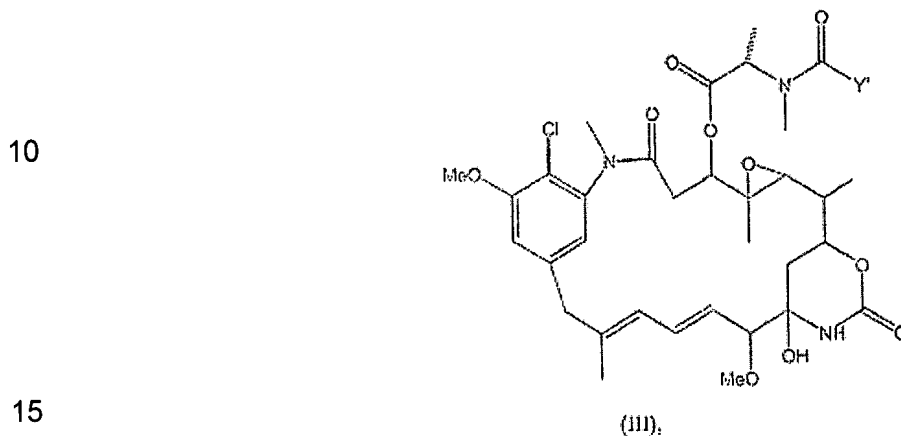


(II)

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 C14hidroximetilo, el C15 hidroxí, o el C20 desmetilo, una cadena lateral de amino ácido acilatado 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 alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo,

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.

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



en donde Y' representa

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

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.

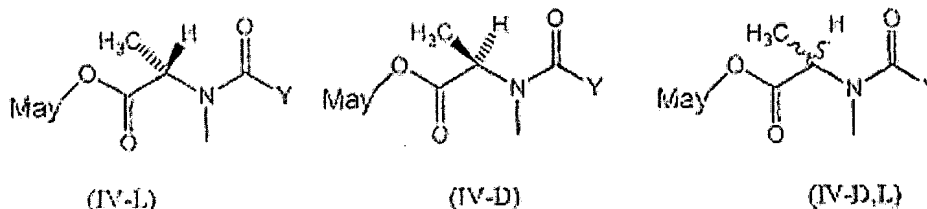
en donde R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 y R12 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical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

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 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 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 heterocicloalquilo, y

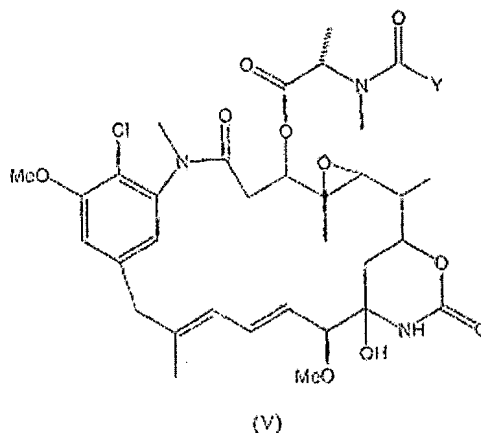
en donde May representa un maitansinoide que tiene la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15-hidroxi, o c-20 desmetilo.

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 $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

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,

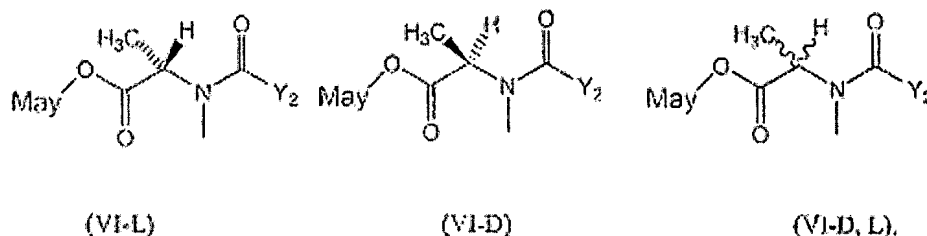
en donde R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico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

en donde l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además 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 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 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 heterocicloalquilo, y en donde R2 también puede ser H.

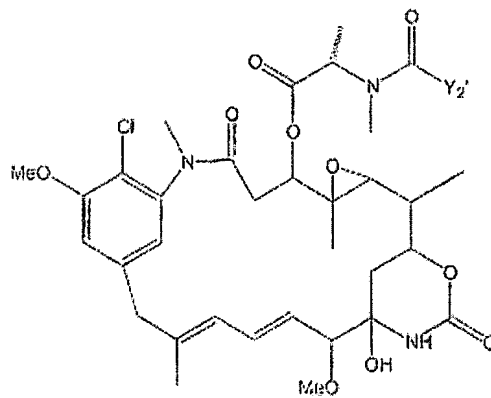
en donde R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 hasta 10 átomos de carbono, de preferencia CH3 o C2H5, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico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

$(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p(\text{C}=\text{C})_q\text{Ar}(\text{CR}_5\text{R}_6)_m\text{D}_u(\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r(\text{C}=\text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{R}_4)_n-$

$\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}_2$, 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.

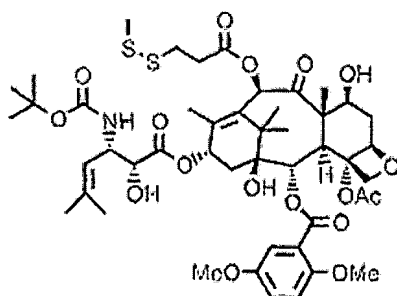
Las modalidades preferidas de la fórmula (VII) incluyen compuestos de la fórmula (VII), en donde R1 es H y R2 es metilo.

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

5 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

10 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

25 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

30 este respecto, la actividad de alquilación es contenida en la subunidad ciclopropapirrolindol (CPI) y la actividad de enlace ADN reside en las dos subunidades pirrolindol 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,

40 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 DM1, 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 DM1.

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 separable a través 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 foto lábiles 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
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 1, 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, editado por Osol et al. Dichas composiciones pueden incluir proteínas, tales como
30 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, por ejemplo, glicerina, propilen glicol, polietilen glicol y similares. Las formulaciones
35 pueden contener conservadores tales como alcohol fenílico, 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 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.

30 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 sulfóxido (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 DM1) 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.

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.

35 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-DM1 formuladas.

Muestras de huN901-SPP-DM1 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-DM1 en una base de %p/p (peso de excipiente / peso de solución).
10 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% polisorbato 20	Transparente	Transparente	Transparente
0.8% polisorbato 20	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% Polisorbato20	40	76	76
0.8% Polisorbato 20	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, Polisorbato-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-DM1 con respecto a la agregación de conjugado.

Muestras de huN901-SPP-DM1 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.
- (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.

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

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-DM1.

Las muestras de huN901-SPP-DM1 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 tapones (Flurotec®). 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 líquida de inmunoconjugado que comprende:
 - (i) 0.5-20 mg/ml de un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo
5 enlazado covalentemente a uno o más maitansinoides,
 - (ii) 2-8% de manitol,
 - (iv) 0.1-12% de sacarosa,
 - (v) 0.005-1.0% de polisorbato 20 o polisorbato 80, y
un agente tamponante seleccionado a partir de un reductor de histidina, un reductor
10 de succinato, un reductor de citrato, un reductor de fosfato y un reductor de acetato,
en donde la formulación líquida del inmunoconjugado tiene un pH de 4.5 a 7.6.
2. La formulación líquida del inmunoconjugado de la reivindicación 1, en la que el agente reductor es un reductor de succinato.
3. La formulación líquida de inmunoconjugado de la reivindicación 1, en
15 la que el agente reductor es un reductor de acetato.
4. La formulación líquida de inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el pH es de 5-7.
5. La formulación líquida de inmunoconjugado de la reivindicación 4, en la que el pH es de 5-6.
- 20 6. La formulación líquida de inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el maitansinoide es $N^{2'}$ -(deacetil- $N^{2'}$ -(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) o $N^{2'}$ -(deacetil- $N^{2'}$ -(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM-4).
7. La formulación líquida de inmunoconjugado de cualquiera de las
25 reivindicaciones 1-6, en la que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado seleccionado del grupo que consiste de huMy9-6, huN901, un anticuerpo humanizado anti-CD56, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, y rituximab.