

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0614100-5 A2**

(22) Data de Depósito: 02/08/2006
(43) Data da Publicação: 09/03/2011
(RPI 2096)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/00
C07K 16/00

(54) Título: **FORMULAÇÕES DE IMUNOCONJUGADO LÍQUIDAS**

(30) Prioridade Unionista: 03/08/2005 US 60/704,902, 11/08/2005 US 60/707,162, 04/05/2006 US 60/746,454, 04/05/2006 US 60/746,456, 04/05/2006 US 60/746,454, 11/08/2005 US 60/707,162, 04/05/2006 US 60/746,456, 04/05/2006 US 60/746,454, 04/05/2006 US 60/746,454

(73) Titular(es): IMMUNOGEN, INC.

(72) Inventor(es): Elizabeth Bartlett, Godfrey Amphlett, Hung-Wei Chih, Michael S. Flemming, Wei Zhang

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006030295 de 02/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/019232 de 15/02/2007

(57) Resumo: FORMULAÇÕES DE IMUNOCONJUGADO LÍQUIDAS. A presente invenção fornece uma formulação de imunoconjugado que é substancialmente livre de partículas, a formulação de imunoconjugado compreendendo: um imunoconjugado e um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em: sacarose, polissorbato 20, polissorbato 80, ciclodextrina, dextrose, glicerol, polietileno glicol, manitol, cloreto de sódio, e um aminoácido, em que a formulação é uma solução aquosa tamponada tendo um pH de 4,5 a 7,6. A presente invenção também fornece uma formulação de imunoconjugado que é substancialmente livre de agregados, a formulação de imunoconjugado compreendendo: um imunoconjugado e um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em histidina, sacarose, glicina e cloreto de sódio, em que a formulação é uma solução aquosa tamponada tendo um pH de 4,5 a 7,6. A presente invenção também fornece uma formulação de imunoconjugado que é substancialmente livre tanto de partículas quanto de agregados.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**FORMULAÇÕES DE IMUNOCONJUGADO LÍQUIDAS**".

Este pedido reivindica o benefício sob 35 U.S.C. §119(e) para Pedidos n^os: 60/704.902 depositado em 3 de agosto de 2005; 60/707.162
5 depositado em 11 de agosto de 2005; 60/746.454 depositado em 4 de maio de 2006; e 60/746.456 depositado em 4 de maio de 2006, as descrições dos quais são cada qual aqui incorporadas por referência em suas totalidades.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos métodos para a preparação
10 de formulações estáveis de imunocorjugados, que são compostos farmacêuticos que são constituídos de um anticorpo e uma ou várias moléculas covalentemente ligadas de um fármaco.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os imunocorjugados são desenvolvidos como agentes altamente
15 potentes e específicos para o tratamento de câncer e outras condições. Um imunocorjugado é composto de um anticorpo que especificamente reconhece um antígeno de célula alvo, tal como um antígeno de célula de tumor, e uma ou várias moléculas covalentemente ligadas de um fármaco, particularmente um fármaco citotóxico tal como um maitansinóide, um taxano,
20 ou um análogo de CC-1065. Outro nome usado para tais imunocorjugados é corjugados de anticorpo-fármaco. Imunocorjugados são inativos durante a circulação, porém ligam-se às superfícies da célula alvo, e então eles são internalizados pelas células. Por mecanismos não ainda completamente entendidos, os fármacos são subsequente-
25 dem exercer seus efeitos farmacológicos.

A liberação alvejada de fármacos citotóxicos para as células alvo, tais como células que compõem o tecido de câncer, potencialmente melhora os índices terapêuticos dos fármacos citotóxicos. Tipicamente, fármacos citotóxicos usados como imunocorjugados são 100 a 1000 vezes mais
30 potentes do que fármacos de quimioterapia convencional. Exemplos de tais imunocorjugados são descritos no Pedido de Patente Internacional (PCT) n^os WO 00/02587, 02/060955, e 02/092127; Patente dos Estados Unidos

n^{os}. 5.475.092, 6.340.701, 6.171.586, 6.706.708 B2, e 6.756.397 B2; e Chari e outro, *Cancer Res.*, 52, 127-131 (1992).

Compostos farmacêuticos tais como imunoconjugados são geralmente combinados com um ou mais veículos, excipientes, e/ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis para fornecer uma composição farmacêutica que leva em conta a administração aos pacientes e a armazenagem e transporte do composto farmacêutico. Semelhante a outros produtos farmacêuticos de proteína, os imunoconjugados são propensos à degradação tal como oxidação, desamidação, bem como formação de agregado e partícula etc. (Manning e outro, *Pharm. Res.* 6, 903-918 (1989); Ahern e Manning, *Stability of Protein Pharmaceuticals: Part A, Chemical and Physical pathways of Protein Degradation*, Plenum, New York, (1992); e Cleland e outro, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 10, 307-377 (1993)).

A formação de partícula em produtos farmacêuticos de proteína, em particular, pode desestabilizar o composto farmacêutico, desse modo tornando a formulação menos potente ou ainda prejudicial para uso clínico. Por exemplo, as partículas em formulações farmacêuticas injetadas podem causar dano significativo às veias ou estase venosa prolongada em pacientes. Além disso, a formação de agregado é a principal trilha de degradação de produtos farmacêuticos de proteína (Chari e outro, *Pharm Res.* 20, 1325-1336 (2003)), e pode levar a efeitos indesejáveis tais como imunogenicidade.

A conjugação de fármacos, especialmente fármacos citotóxicos, que são freqüentemente hidrofóbicos, moléculas pequenas, a anticorpos monoclonais hidrofílicos, introduz instabilidade adicional aos imunoconjugados. Conferir as propriedades atribuíveis ao componente de anticorpo de imunoconjugados é crucial para a geração de líquido estável ou formulações farmacêuticas liofilizadas. Para esta finalidade, WO 2004/004639 A2 e Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 2004/0.241.174 A1 descrevem composições de imunoconjugados. Entretanto, estas composições não adequadamente conferem formação de partícula e agregado nas composições farmacêuticas de imunoconjugados.

Desse modo, permanece uma necessidade para composições farmacêuticas de imunocombinados que são substancialmente livres de partículas e/ou agregados, e permanecem substancialmente livres de partículas e/ou agregados durante armazenagem e transporte.

5 A presente invenção fornece composições farmacêuticas de imunocombinados que são substancialmente livres de partículas e/ou agregados e previnem a formação de partículas e/ou agregados durante armazenagem e/ou transporte. Métodos para uso das composições farmacêuticas são também fornecidos. Estas e outras vantagens da invenção, bem como
10 características inventivas adicionais, tornar-se-ão evidentes a partir das descrições da invenção fornecida aqui.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada na descoberta de que a formação de partícula e agregado em composições farmacêuticas de imunocombinados pode ser inibida empregando-se certos excipientes. As novas formulações produzem maior estabilidade e vidas úteis substancialmente mais longas para os compostos farmacêuticos e fornecem garantia de segurança do paciente.
15

Um aspecto da presente invenção fornece uma formulação de imunocombinado que é substancialmente livre de partículas, a formulação de imunocombinado compreendendo: um imunocombinado e um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em: sacarose, polissorbato 20, polissorbato 80, ciclodextrina, dextrose, glicerol, polietileno glicol, manitol, cloreto de sódio, e um aminoácido, em que a formulação é uma solução aquosa tamponada tendo um pH de 4,5 a 7,6.
20
25

Um segundo aspecto da presente invenção fornece uma formulação de imunocombinado que é substancialmente livre de agregados, a formulação de imunocombinado compreendendo: um imunocombinado e um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em histidina, sacarose, glicina e cloreto de sódio, em que a formulação é uma solução aquosa tamponada tendo um pH de 4,5 a 7,6.
30

A presente invenção também fornece uma formulação de imu-

noconjugado que é substancialmente livre tanto de partículas quanto de agregados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 A presente invenção fornece composições farmacêuticas estáveis de imunoconjugados que são substancialmente livres de partículas e/ou agregados e permanecem substancialmente livres de partículas e/ou agregados durante um período prolongado de armazenagem e durante transporte. A presente invenção é baseada na descoberta de que a formação de partícula e/ou agregado em composições farmacêuticas de imunoconjugados
10 pode ser inibida empregando-se certos excipientes. As novas formulações produzem maior estabilidade e vidas úteis substancialmente mais longas para os compostos farmacêuticos e fornecem garantia de segurança do paciente.

Tais formulações são preparadas por inclusão de um excipiente
15 que inibe ou reduz a formação de partículas visíveis (maior do que 50 μm) e subvisíveis (maior do que 5 μm). Como empregado aqui, uma composição que é "substancialmente livre de partículas" passará pelo teste de *US Pharmacopeia* (USP) <788>, que requer que partículas com tamanho acima de 10 μm devem estar abaixo de 6000 contas por recipiente e partículas com
20 tamanho acima de 25 μm devem estar abaixo de 600 contas por recipiente. Veja USP 28, Capítulo 788 "Particulate Matter in Injections," 2004, editado por United States Pharmacopeia, Rockville, MD. Como empregado aqui, uma composição que é "substancialmente livre de agregados" permanecerá livre de agregados durante armazenagem e transporte de modo que o nível
25 de monômero de imunoconjugado permaneça acima de 95% durante toda vida útil da composição.

Uma vida útil típica para as composições de imunoconjugado da presente invenção é cerca de 1 a 5 anos, preferivelmente 1 a 4 anos, mais preferivelmente 2 a 4 anos, a 4°C.

30 Uma formulação de imunoconjugado da invenção que é substancialmente livre de partículas compreende um imunoconjugado e um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em sacarose, polissor-

bato 20, polissorbato 80, ciclodextrina, dextrose, glicerol, polietileno glicol, manitol, cloreto de sódio, e um aminoácido, em que a formulação é uma solução aquosa tamponada tendo um pH de 4,5 a 7,6. A formulação pode compreender um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em:

- 5 (i) 0,1 - 12% de sacarose, (ii) 0,005 - 1,0% de polissorbato 20, (iii) 0,5 - 2% de beta - ciclodextrina, (iv) 2 - 8% de glicerol, (v) 1 - 5% de PEG6000, (vi) 2 - 8% de manitol, (vii) 0,005 - 1,0% de polissorbato 80, (viii) 5 - 20 mM de histidina, (ix) 100 - 300 mM de glicina, e (x) 50 - 300 mM de cloreto de sódio.

10 Em certas modalidades preferidas, a formulação da invenção que é substancialmente livre de partículas preferivelmente compreende um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em: (i) 5 - 10% de sacarose; (ii) 0,005 - 0,2 % de polissorbato 20; (iii) 0,5 - 1% de beta - ciclodextrina; (iv) 2 - 5% de glicerol; (v) 2 - 3% de PEG6000; (vi) 3 - 5% de manitol; (vii) 0,005 - 0,2 % de polissorbato 80; (viii) 10 - 15 mM de histidina; (ix)
15 130 - 250 mM de glicina, e (x) 100 - 200 mM de cloreto de sódio.

Em modalidades preferidas a solução aquosa tamponada pode conter um ou mais de histidina, succinato, citrato, fosfato, e acetato, e o pH é preferivelmente de 5,0 a 7,0. O pH da formulação é mais preferivelmente de 5,0 a 6,0.

20 Em certas modalidades da invenção, o imunocombinado da formulação compreende um anticorpo humanizado selecionado do grupo consistindo em huMy9-6, huC242, huN901, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, e rituximab; e/ou o imunocombinado compreende um fármaco citotóxico selecionado do grupo consistindo em um maitansinóide, um taxano, e um CC-1065. A concentração de imunocombinado na formulação inventiva pode variar entre cerca de 0,5 a 20,0 mg por ml. Preferivelmente, a
25 concentração de imunocombinado é 0,5 a 10 mg por ml.

Uma formulação de imunocombinado da invenção que é substancialmente livre de agregados compreende: um imunocombinado; e um ou
30 mais excipientes selecionados do grupo consistindo em histidina, sacarose, glicina e cloreto de sódio, em que a formulação é uma solução aquosa tamponada tendo um pH de 4,5 a 7,6. Preferivelmente, a formulação de imuno-

conjugado compreende um ou mais excipientes selecionados de 5 - 200 mM de histidina, 100 - 200 mM de glicina, e 2 - 8% de sacarose.

Em certas modalidades preferidas, os excipientes são 5 - 100 mM de histidina ou 100 - 150 mM de glicina, ou a formulação contém 2-8% de sacarose e 100 - 150 mM de glicina. Em certas outras modalidades preferidas, a formulação contém 10 mM de histidina, 5% de sacarose e 130 mM de glicina.

Em modalidades preferidas a solução aquosa tamponada pode conter um ou mais de histidina, succinato, citrato, fosfato, e acetato, e o pH é preferivelmente de 5,0 a 7,0. O pH da formulação é mais preferivelmente de 5,0 a 6,0,

Em outro aspecto da invenção, a formulação que é substancialmente livre de agregados também compreende polissorbato 20 e/ou polissorbato 80, de modo que a formulação seja também substancialmente livre de partículas.

Em certas modalidades da invenção, o imunocombinado da formulação compreende um anticorpo humanizado selecionado do grupo consistindo em huMy9-6, huC242, huN901, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, e rituximab; e/ou o imunocombinado compreende um fármaco citotóxico selecionado do grupo consistindo em um maitansinóide, um taxano, e um CC-1065. A concentração de imunocombinado na formulação inventiva pode variar entre cerca de 0,5 a 20,0 mg por ml. Preferivelmente, a concentração de imunocombinado é 0,5 a 10 mg por ml.

Em certas modalidades preferidas da invenção, a formulação de imunocombinado é substancialmente livre tanto de agregados quanto de partículas. Por exemplo, a presente invenção fornece uma formulação de imunocombinado consistindo essencialmente de: imunocombinado huN901-DM1 em uma concentração de 0,5 - 10 mg/ml; 5 - 15 mM de histidina e/ou 5 - 15 mM de succinato; 0,1 - 10 % de sacarose e/ou 100 - 300 mM de glicina; 0,005 - 0,2% de polissorbato 80 e/ou 0,005 - 0,2% de polissorbato 20, em que a formulação é uma solução tamponada aquosa tendo um pH de 5 - 6. Ingredientes adicionais podem ser opcionalmente adicionados contanto que

a formulação permaneça substancialmente livre tanto de agregados quanto de partículas.

Em outro exemplo, uma formulação de imunoconjugado consiste essencialmente em: (a) imunoconjugado huC242-DM4 em uma concentração de 0,5 - 10 mg/ml; 5 - 15 mM de histidina; 0,1 - 10 % de sacarose e/ou 100 - 300 mM de glicina; 0,005 - 0,2% de polissorbato 80 e/ou 0,005 - 0,2% de polissorbato 20; em que a formulação é uma solução tamponada aquosa tendo um pH de 5 - 6. Ingredientes adicionais podem ser opcionalmente adicionados, contanto que a formulação permaneça substancialmente livre tanto de agregados quanto de partículas.

Geralmente, excipientes adequados que podem ser usados em conjunto com a presente invenção podem ser selecionados de uma variedade de categorias, incluindo porém não limitados a sais inorgânicos, ácidos orgânicos, sacarídeos, aminoácidos, polissorbatos, polietileno glicol e combinações dos mesmos. Excipientes preferidos são selecionados do grupo consistindo em sais inorgânicos, ácidos carboxílicos orgânicos, sacarídeos, aminoácidos, polissorbatos, polietileno glicol, albuminas, glicerol, e combinações dos mesmos.

Exemplos de sais inorgânicos adequados incluem porém não são limitados a cloreto de sódio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de magnésio, sulfato de sódio, e combinações dos mesmos. Cloreto de sódio é um excipiente preferido para uso na presente invenção.

Exemplos de ácidos carboxílicos orgânicos adequados incluem, porém não são limitados a ácido tartárico (que inclui ácido tartárico racêmico, ácido D-tartárico e ácido L-tartárico), ácido maléico, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido glucurônico, e combinações dos mesmos. "Ácido" como empregado aqui refere-se ao ácido e qualquer hidrato e sais dos mesmos, isto é, citratos e succinatos. Ácido succínico é um excipiente preferido para uso na presente invenção.

Exemplos de sacarídeos adequados incluem porém não são limitados a sacarose, trealose, dextrose, manitol, ciclodextrina e combinações dos mesmos. Sacarose e ciclodextrina são excipientes preferidos para uso

na presente invenção.

Exemplos de aminoácidos adequados incluem porém não são limitados a histidina, glicina, lisina, arginina e combinações dos mesmos. Histidina e glicina são excipientes preferidos para uso na presente invenção.

5 Exemplos de albuminas adequadas incluem albumina de soro humano.

Exemplos de polietileno glicóis adequados são polietileno glicóis com um peso molecular de cerca de 200 a 20.000 Da. Polietileno glicóis preferidos são PEG 4000, PEG 5000, PEG 6000, PEG 8000, e PEG 10000.

10 Exemplos de polissorbatos adequados são polissorbato 20 (TWEEN-20®) e polissorbato 80.

Exemplos de ciclodextrinas adequadas são alfa-, beta-, e gama-ciclodextrina.

15 A partir dos ensinamentos desta invenção, alguém versado na técnica pode facilmente determinar os excipientes que melhor forneceriam uma formulação que fosse substancialmente livre de partículas e/ou agregados, dado uma solução de imunoconjugado particular.

Preferivelmente, a tonicidade da formulação de imunoconjugado é em torno daquela do sangue humano (isto é, isotônica).

20 Exemplos de agentes de tonificação adequados são sais, aminoácidos, e açúcares. Sais preferíveis incluem sais de sódio monovalentes. Aminoácidos preferíveis incluem histidina, glicina, lisina e arginina. O mais preferido é glicina. Açúcares preferíveis incluem monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos lineares, e oligossacarídeos cíclicos. Um dissacarídeo preferido é sacarose. Quantidades adequadas de sais, sacarídeos, e/ou
25 aminoácidos podem ser adicionadas à formulação inventiva para obter uma tonicidade desejável.

O composto farmacêutico é um imunoconjugado constituído de um anticorpo que especificamente reconhece um antígeno de célula alvo, e
30 uma ou várias moléculas covalentemente ligadas de um fármaco citotóxico, tal como um maitansinóide, um taxano, ou um análogo de CC-1065.

O anticorpo pode ser específico para qualquer espécie de célula,

porém geralmente alveja células que devem ser destruídas, tais como células de tumor (particularmente células de tumor sólido), células infectadas por vírus, células infectadas por microorganismo, células infectadas por parasito, células auto-imunes (células que produzem auto-anticorpos), células ativadas (aquelas envolvidas em rejeição de enxerto ou doença enxerto vs. hospedeiro), ou qualquer outro tipo de células doentes ou anormais.

Anticorpos podem ser de qualquer espécie atualmente conhecida, ou que se tornou conhecida, e podem incluir qualquer imunoglobulina, qualquer fragmento de imunoglobulina, tal como Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, dia-
corpos, e triacoros, ou quimera de imunoglobulina, que pode ligar-se a um
antígeno na superfície de uma célula (por exemplo, que contém uma região
de determinação de complementariedade (CDR)). Qualquer anticorpo ade-
quado pode ser usado como o agente de ligação à célula. Alguém versado
na técnica apreciará que a seleção de um anticorpo apropriado dependerá
da população celular a ser alvejada. A este respeito, o tipo e número de mo-
léculas de superfície celular (isto é, antígenos) que são seletivamente ex-
pressas em uma população celular particular (tipicamente e preferivelmente
uma população celular doente) regularão a seleção de um anticorpo apro-
priado para uso na composição inventiva. Perfis de expressão de superfície
celular são conhecidos para uma ampla variedade de tipos de célula, inclu-
indo tipos de célula de tumor, ou, se desconhecidos, podem ser determina-
dos empregando-se biologia molecular de via e técnicas histoquímicas.

O anticorpo pode ser policlonal ou monoclonal, porém é mais preferivelmente um anticorpo monoclonal. Como empregado aqui, anticorpos
"policlonais" referem-se às populações heterogêneas de moléculas de anti-
corpo, tipicamente contidas nos soros de animais imunizados. Anticorpos
"monoclonais" referem-se às populações homogêneas de moléculas de anti-
corpo que são específicas para um antígeno particular. Anticorpos monoclo-
nais são tipicamente produzidos por um clone único de linfócitos B ("células
B"). Anticorpos monoclonais podem ser obtidos empregando-se uma varie-
dade de técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica, incluindo tec-
nologia de hibridoma padrão (veja, por exemplo, Köhler e Milstein, *Eur. J.*

Imunol., 5: 511-519 (1976), Harlow e Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), e C.A. Janeway e outro (eds.), *Imunobiology*, 5ª Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). Em resumo, o método de hibridoma de produção de anticorpos monoclonais tipicamente envolve injeção de qualquer animal adequado, tipicamente e preferivelmente um camundongo, com um antígeno (isto é, um "imunógeno"). O animal é subsequentemente sacrificado, e células B isoladas de seu baço são fundidas com células de mieloma humano. Uma célula híbrida é produzida (isto é, um "hibridoma"), a qual prolifera indefinidamente e continuamente secreta elevados títulos de um anticorpo com a especificidade desejada *in vitro*. Qualquer método apropriado conhecido na técnica pode ser usado para identificar células de hibridoma que produzem um anticorpo com a especificidade desejada. Tais métodos incluem, por exemplo, ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), análise *Western blot*, e rádio-imunoensaio. A população de hibridomas é peneirada para isolar clones individuais, cada um dos quais secreta uma espécie de anticorpo simples para o antígeno. Porque cada hibridoma é um clone derivado da fusão com uma célula B simples, todas as moléculas de anticorpo que ele produz são idênticas em estrutura, incluindo seu sítio de ligação de antígeno e isotipo. Anticorpos monoclonais também podem ser gerados empregando-se outras técnicas adequadas incluindo tecnologia EBV-hibridoma (veja, por exemplo, Haskard e Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2): 361-67 (1984), e Roder e outro, *Methods Enzymol.*, 121: 140-67 (1986)), sistemas de expressão de vetor bacteriófago (veja, por exemplo, Huse e outro, *Science*, 246: 1275-81 (1989)), ou bibliotecas de exibição de fago compreendendo fragmentos de anticorpo, tais como Fab e scFv (região variável de cadeia simples) (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nºs 5.885.793 e 5.969.108, e Pedidos de Patente Internacional WO 92/01.047 e WO 99/06.587).

O anticorpo monoclonal pode ser isolado de ou produzido em qualquer animal adequado, porém é preferivelmente produzido em um mamífero, mais preferivelmente um camundongo ou ser humano, e mais preferivelmente um ser humano. Métodos para produção de um anticorpo em ca-

mundongos são bem conhecidos por aqueles versados na técnica e são descritos aqui. Com respeito aos anticorpos humanos, alguém versado na técnica apreciará que anticorpos policlonais podem ser isolados dos soros de indivíduos humanos vacinados ou imunizados com um antígeno apropriado. Alternativamente, anticorpos humanos podem ser gerados por adaptação de técnicas conhecidas para produção de anticorpos humanos em animais não humanos tais como camundongos (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nºs 5.545.806, 5.569.825, e 5.714.352, e Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos nº. 2002/0.197.266 A1).

10 Ao mesmo tempo que sendo a escolha ideal para aplicações terapêuticas em seres humanos, anticorpos humanos, particularmente anticorpos monoclonais humanos, tipicamente são mais difíceis de gerar do que anticorpos monoclonais de camundongo. Anticorpos monoclonais de camundongo, entretanto, induzem uma resposta de anticorpo em hospedeiro rápida quando administrados a seres humanos, que pode reduzir o potencial terapêutico ou diagnóstico do conjugado anticorpo-fármaco. Para evitar estas complicações, um anticorpo monoclonal preferivelmente não é reconhecido como "estranho" pelo sistema imune humano.

20 Para esta finalidade, exibição de fago pode ser usada para gerar o anticorpo. Neste respeito, bibliotecas de fago que codificam domínios de variável de ligação de antígeno (V) de anticorpos podem ser geradas empregando-se técnicas de DNA recombinante e biologia molecular padrão (veja, por exemplo, Sambrook e outro (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Fagos codificando uma região variável com a especificidade desejada são selecionados para ligação específica ao antígeno desejado, e um anticorpo humano completo é reconstituído compreendendo o domínio variável selecionado. Seqüências de ácido nucléico codificando o anticorpo reconstituído são introduzidas em uma linhagem celular adequada, tal como uma célula de mieloma usada para produção de hibridoma, de modo que anticorpos humanos tendo as características de anticorpos monoclonais sejam secretados pela célula (veja, por exemplo, Janeway e outro, *supra*, Huse

e outro, *supra*, e Patente dos Estados Unidos nº. 6.265.150). Alternativamente, anticorpos monoclonais podem ser gerados de camundongos que são transgênicos para genes de imunoglobulina de cadeia leve e pesada humanos específicos. Tais métodos são conhecidos na técnica e descritos em, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nºs 5.545.806 e 5.569.825, e Janeway e outro, *supra*.

Mais preferivelmente o anticorpo é um anticorpo humanizado. Como empregado aqui, um anticorpo "humanizado" é um em que as regiões de determinação de complementariedade (CDR) de um anticorpo monoclonal de camundongo, que formam as alças de ligação de antígeno do anticorpo, são enxertadas na estrutura de uma molécula de anticorpo humano. Devido à similaridade das estruturas de anticorpos de camundongo e seres humanos, é geralmente aceito na técnica que este método produza um anticorpo monoclonal que é antigenicamente idêntico a um anticorpo humano, porém liga-se ao mesmo antígeno como o anticorpo monoclonal de camundongo do qual as seqüências de CDR foram derivadas. Métodos para gerar anticorpos humanizados são bem conhecidos na técnica e são descritos em detalhes em, por exemplo, Janeway e outro, *supra*, Patente dos Estados Unidos nºs 5.225.539, 5.585.089 e 5.693.761, Patente Européia nº 0.239.400 B1, e Patente do Reino Unido nº 2.188.638. Anticorpos humanizados podem também ser gerados empregando-se a tecnologia de recapamento de anticorpo descrita em Patente dos Estados Unidos nº 5.639.641 e Pedersen e outro, *J. Mol. Biol.*, 235: 959-973 (1994). Ao mesmo tempo que o anticorpo empregado no imunoconjugado da composição inventiva mais preferivelmente é um anticorpo monoclonal humanizado, um anticorpo monoclonal humano e um anticorpo monoclonal de camundongo, como descrito acima, incluem-se também no escopo da invenção.

Fragmentos de anticorpo que têm pelo menos um sítio de ligação de antígeno, e desse modo reconhecem e ligam-se a pelo menos um antígeno ou receptor presente na superfície de uma célula alvo, também incluem-se no escopo da invenção. Neste respeito, clivagem proteolítica de uma molécula de anticorpo intacta pode produzir uma variedade de fragmen-

tos de anticorpo que retêm a capacidade de reconhecer e ligar-se aos antígenos. Por exemplo, digestão limitada de uma molécula de anticorpo com a papaína de protease tipicamente produz três fragmentos, dois dos quais são idênticos e são referidos como os fragmentos Fab, quando eles retêm a atividade de ligação ao antígeno da molécula de anticorpo origem. Clivagem de uma molécula de anticorpo com a enzima pepsina normalmente produz dois fragmentos de anticorpo, um dos quais retém ambas as ramificações de ligação de antígeno da molécula de anticorpo, e é desse modo referido como o fragmento F(ab')₂. Redução de um fragmento F(ab')₂ com ditioneitol ou mercaptoetilamina produz um fragmento referido como um fragmento Fab'. Um fragmento de anticorpo de fragmento de região variável de cadeia única (sFv), que consiste em um fragmento Fab truncado compreendendo o domínio variável (V) de uma cadeia pesada de anticorpo ligada a um domínio V de uma cadeia de anticorpo leve por meio de um peptídeo sintético, pode ser gerado empregando-se técnicas de tecnologia de DNA recombinante de via (veja, por exemplo, Janeway e outro, *supra*). Similarmente, fragmentos de região variável estabilizada por dissulfeto (dsFv) podem ser preparados por tecnologia de DNA recombinante (veja, por exemplo, Reiter e outro, *Protein Engineering*, 7: 697-704 (1994)). Fragmentos de anticorpo no contexto da invenção, entretanto, não são limitados a estes tipos exemplares de fragmentos de anticorpo. Qualquer fragmento de anticorpo adequado que reconhece e liga-se a um receptor de superfície celular desejado ou antígeno pode ser empregado. Fragmentos de anticorpo são também descritos em, por exemplo, Parham, *J. Immunol.*, 131: 2895-2902 (1983), Spring e outro, *J. Immunol.*, 113: 470-478 (1974), e Nisonoff e outro, *Arch. Biochem. Biophys.*, 89: 230-244 (1960). Ligação anticorpo-antígeno pode ser ensaiada empregando-se qualquer método adequado conhecido na técnica, tal como, por exemplo, rádio-imunoensaio (RIA), ELISA, *Western blot*, imunoprecipitação, e ensaios de inibição competitivos (veja, por exemplo, Janeway e outro, *supra*, e Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 2002/0.197.266 A1).

Além disso, o anticorpo pode ser um anticorpo quimérico ou um

fragmento de ligação de antígeno do mesmo. Por "quimérico" entende-se que o anticorpo compreende pelo menos duas imunoglobulinas, ou fragmentos destas, obtidas ou derivadas de pelo menos duas espécies diferentes (por exemplo, duas imunoglobulinas diferentes, tais como uma região constante de imunoglobulina humana combinada com uma região variável de imunoglobulina de murino). O anticorpo também pode ser um anticorpo de domínio (dAb) ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo, tal como, por exemplo, um anticorpo de *camelid* (veja, por exemplo, Desmyter e outro, *Nature Struct. Biol.*, 3: 752, (1996)), ou um anticorpo de tubarão, tal como, por exemplo, um novo receptor de antígeno (IgNAR) (veja, por exemplo, Greenberg e outro, *Nature*, 374: 168 (1995), e Stanfield e outro, *Science*, 305: 1770-1773 (2004)).

Qualquer anticorpo adequado pode ser usado no contexto da invenção. Por exemplo, o anticorpo monoclonal J5 é um anticorpo IgG2a de murino que é específico para Antígeno de Leucemia Linfoblástica Aguda Comum (CALLA) (Ritz e outro, *Nature*, 283: 583-585 (1980)), e pode ser usado para alvejar células que expressam CALLA (por exemplo, células de leucemia linfoblástica aguda). O anticorpo monoclonal MY9 é um anticorpo IgG1 de murino que se liga especificamente ao antígeno CD33 (Griffin e outro, *Leukemia Res.*, 8: 521 (1984)), e pode ser usado para alvejar células que expressam CD33 (por exemplo, células de leucemia mielógena aguda (AML)).

Similarmente, o anticorpo monoclonal anti-B4 (também referido como B4) é um anticorpo IgG1 de murino que se liga ao antígeno CD19 em células B (Nadler e outro, *J. Immunol.*, 131: 244-250 (1983)), e pode ser usado para alvejar células B ou células doentes que expressam CD19 (por exemplo, células de linfoma de não Hodgkin e células de leucemia linfoblástica crônica). N901 é um anticorpo monoclonal de murino que se liga ao antígeno CD56 (molécula de adesão de célula neural) encontrado em células de origem neuroendócrina, incluindo tumor de pulmão de célula pequena, que pode ser usado no imunoconjugado para alvejar fármacos para as células de origem neuroendócrina. Os anticorpos J5, MY9, e B4 preferivelmente são

recapeados ou humanizados antes de seu uso como parte do imunocombinado. Recapeamento ou humanização de anticorpos é descrito em, por exemplo, Roguska e outro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 969-73 (1994).

- Além disso, o anticorpo monoclonal C242 liga-se ao antígeno
- 5 CanAg (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nº 5.552.293), e pode ser usado para alvejar o imunocombinado para tumores que expressam CanAg, tais como cânceres colorretal, pancreático, de pulmão de célula não pequena, e gástrico. HuC242 é uma forma humanizada do anticorpo monoclonal C242 (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nº 5.552.293).
- 10 O hibridoma do qual HuC242 é produzido é depositado com Número de identificação ECACC 90012601. HuC242 pode ser preparado empregando-se metodologia de enxerto de CDR (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nºs 5.585.089, 5.693.761, e 5.693.762) ou tecnologia de recapeamento (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nº 5.639.641).
- 15 HuC242 pode ser usado para alvejar o imunocombinado para células de tumor que expressam o antígeno CanAg, tal como, por exemplo, células de câncer colorretal, pancreático, de pulmão de célula não pequena, e gástrico.

- Para alvejar células de câncer de ovário e câncer de próstata, um anticorpo anti-MUC1 pode ser usado como o agente de ligação à célula
- 20 no imunocombinado. Anticorpos anti-MUC1 incluem, por exemplo, anti-HMFG-2 (veja, por exemplo, Taylor-Papadimitriou e outro, *Int. J. Cancer*, 28: 17-21 (1981)), hCTM01 (veja, por exemplo, van Hof e outro, *Cancer Res.*, 56: 5179-5185 (1996)), e DS6. Células de câncer de próstata também podem ser alvejadas com o imunocombinado empregando-se um antígeno de
- 25 membrana específico antipróstata (PSMA) como o agente de ligação à célula, tal como J591 (veja, por exemplo, Liu e outro, *Cancer Res.*, 57: 3629-3634 (1997)). Além disso, células de câncer que expressam o antígeno Her2, tais como cânceres de mama, próstata, e ovário, podem ser alvejadas empregando-se o anticorpo trastuzumab. Anticorpos anti-IGF-IR que se li-
- 30 gam ao receptor de fator de crescimento similar à insulina também podem ser usados no imunocombinado.

Anticorpos particularmente preferidos são anticorpos monoclo-

nais humanizados, exemplos dos quais incluem huN901, huMy9-6, huB4, huC242, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, e rituximab (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nºs 5.639.641 e 5.665.357; Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 2005-0118183 A1, Pedido de Patente Internacional WO 02/16,401, Pedersen e outro, *supra*, Roguska e outro, *supra*, Liu e outro, *supra*, Nadler e outro, *supra*, Colomer e outro, *Cancer Invest.*, 19: 49-56 (2001), Heider e outro, *Eur. J. Cancer*, 31A: 2385-2391 (1995), Welt e outro, *J. Clin. Oncol.*, 12: 1193-1203 (1994), e Maloney e outro, *Blood*, 90: 2188-2195 (1997)). Mais preferivelmente, o anticorpo é o anticorpo monoclonal humanizado huN901 ou o anticorpo monoclonal humanizado huMy9-6. Outros anticorpos monoclonais humanizados são conhecidos na técnica e podem ser usados com relação à invenção.

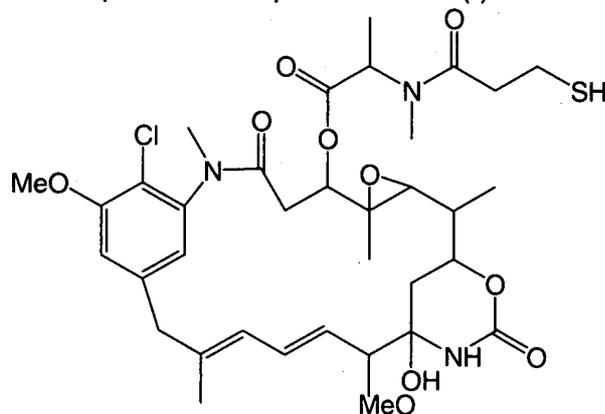
O imunoconjugado pode compreender qualquer fármaco adequado, tipicamente um agente citotóxico. Um "agente citotóxico", como empregado aqui, refere-se a qualquer composto que resulta na morte de uma célula, induz morte celular, ou diminui a viabilidade celular. Agentes citotóxicos adequados incluem, por exemplo, maitansinóides e análogos de maitansinóide, taxóides, CC-1065 e análogos de CC-1065, e dolastatina e análogos de dolastatina. Em uma modalidade preferida da invenção, o agente citotóxico é um maitansinóide, incluindo maitansinol e análogos de maitansinol. Maitansinóides são compostos que inibem a formação de microtúbulo e são altamente tóxicos às células de mamífero. Exemplos de análogos de maitansinol adequados incluem aqueles tendo um anel aromático modificado e aqueles tendo modificações em outras posições. Tais maitansinóides são descritos em, por exemplo, Patente dos Estados Unidos 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, e 6.333.410.

Exemplos de análogos de maitansinol tendo um anel aromático modificado incluem: (1) C-19-decloro (Patente dos Estados Unidos nº 4.256.746) (preparado por redução de LAH de ansamitocina P2), (2) C-20-hidróxi (ou C-20-demetil) +/-C-19-decloro (Patente dos Estados Unidos nºs

4.361.650 e 4.307.016) (preparado por desmetilação empregando-se *Streptomyces* ou *Actinomyces* ou descloração empregando-se LAH), e (3) C-20-demetóxi, C-20-acilóxi (-OCOR), +/-decloro (Patente dos Estados Unidos nº 4.294.757) (preparado por acilação empregando-se cloretos de acila).

- 5 Exemplos de análogos de maitansinol tendo modificações de posições diferentes de um anel aromático incluem: (1) C-9-SH (Patente dos Estados Unidos nº 4.424.219) (preparado pela reação de maitansinol com H₂S ou P₂S₅), (2) C-14-alcoximetila (demetóxi/CH₂OR) (Patente dos Estados Unidos nº 4.331.598), (3) C-14-hidroximetila ou aciloximetila (CH₂OH ou CH₂OAc) (Patente dos Estados Unidos nº 4.450.254) (preparado de *Nocardia*), (4) C-15-hidróxi/acilóxi (Patente dos Estados Unidos nº 4.364.866) (preparado pela conversão de maitansinol por *Streptomyces*), (5) C-15-metóxi (Patente dos Estados Unidos nºs 4.313.946 e 4.315.929) (isolado de *Trewia nudiflora*), (6) C-18-N-demetila (Patente dos Estados Unidos nºs 15 4.362.663 e 4.322.348) (preparado pela desmetilação de maitansinol por *Streptomyces*), e (7) 4,5-deóxi (Patente dos Estados Unidos nº 4.371.533) (preparado pela redução de tricloreto de titânio/LAH de maitansinol).

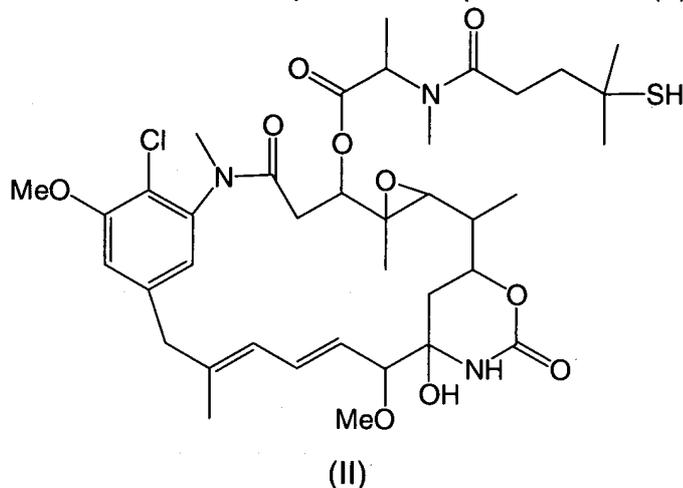
Em uma modalidade preferida da invenção, o imunoconjugado utiliza o maitansinóide DM1 contendo tiol, também conhecido como N²'-deacetil-N²'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como o agente citotóxico. 20 A estrutura de DM1 é representada pela fórmula (I):



(I)

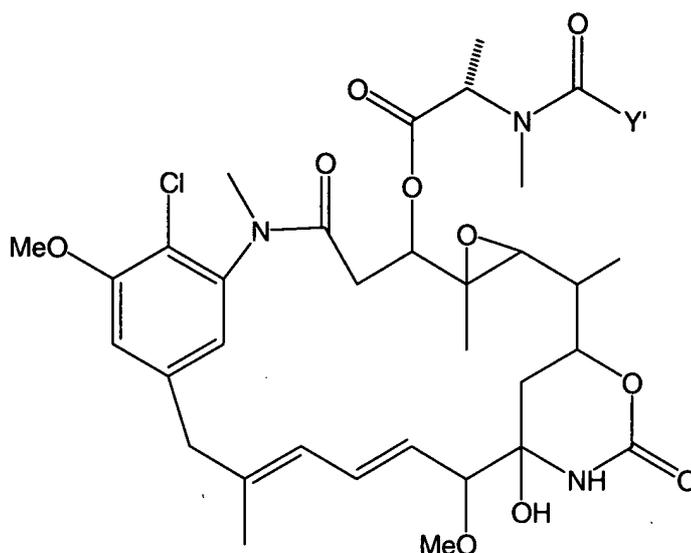
Em outra modalidade preferida da invenção, o imunoconjugado utiliza o maitansinóide DM4 contendo tiol, também conhecido como N²'-deacetil-N²'-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, como o agente

citotóxico. A estrutura de DM4 é representada pela fórmula (II):



Outras maitansinas podem ser usadas no contexto da invenção, incluindo, por exemplo, maitansinóides contendo tiol e dissulfeto transportando uma substituição de mono ou dialquila no átomo de carbono transportando o átomo de enxofre. Particularmente preferido é um maitansinóide tendo na posição C₃, a funcionalidade de C₁₄ hidroximetila, C₁₅ hidróxi, ou C₂₀ desmetila, uma cadeia lateral de aminoácido acilada com um grupo acila transportando um grupo sulfidríla impedida, no qual o átomo de carbono do grupo acila transportando a funcionalidade de tiol tem um ou dois substituintes, os referidos substituintes sendo CH₃, C₂H₅, alquenila ou alquila linear ou ramificada tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquenila ou alquila cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída, ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico, e também no qual um dos substituintes pode ser H, e no qual o grupo acila tem um comprimento de cadeia linear de pelo menos três átomos de carbono entre a funcionalidade de carbonila e o átomo de enxofre.

Maitansinas adicionais para uso no contexto da invenção incluem compostos representados pela fórmula (III):



em que Y' representa $(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u-$
 $(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_n-CR_1R_2SZ$,

em que R_1 e R_2 são cada qual independentemente alquenila ou
 5 alquila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, preferivelmente CH_3 ou
 C_2H_5 , alquenila ou alquila cíclica ou ramificada tendo de 3 a 10 átomos de
 carbono, fenila, fenila substituída ou radical heterocíclico ou aromático hete-
 rocíclico, e em que R_2 também pode ser H,

em que A, B, D são cicloalquila ou cicloalquenila tendo 3-10 á-
 10 tomos de carbono, arila substituída ou simples, ou radical heterocíclico, ou
 aromático heterocíclico,

em que $R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11},$ e R_{12} são cada qual
 independentemente H, alquenila ou alquila linear tendo de 1 a 10 átomos de
 carbono, preferivelmente CH_3 ou C_2H_5 , alquenila ou alquila cíclica ou ramifi-
 15 cada tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída ou radical
 heterocíclico, ou aromático heterocíclico,

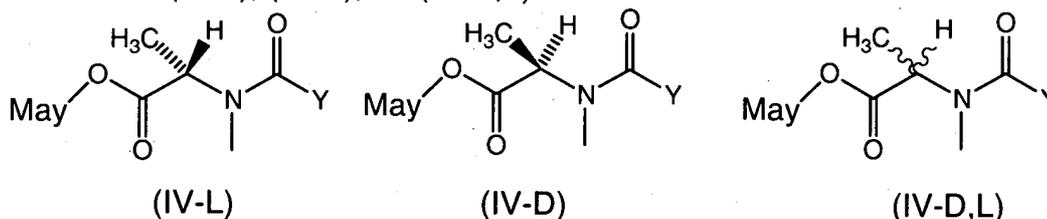
em que l, m, n, o, p, q, r, s, t e u são cada qual independente-
 mente

zero ou um número inteiro de 1 a 5, contanto que pelo menos
 dois de l, m, n, o, p, q, r, s, u, e t não sejam zero ao mesmo tempo, e

em que Z é H, SR ou COR, em que R é alquenila ou alquila line-
 20 ar tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquenila ou alquila cíclica ou ramifi-
 cada tendo de 3 a 10 átomos de carbono, arila substituída ou simples ou
 radical heterocíclico, ou aromático heterocíclico.

Modalidades preferidas de fórmula (III) incluem compostos de fórmula (III) em que (a) R_1 é metila, R_2 é H e Z é H, (b) R_1 e R_2 são metila e Z é H, (c) R_1 é metila, R_2 é H, e Z é $-SCH_3$, e (d) R_1 e R_2 são metila, e Z é $-SCH_3$.

5 Tais maitansinas adicionais incluem compostos representados pela fórmula (IV-L), (IV-D), ou (IV-D,L):



em que Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

em que R_1 e R_2 são cada qual independentemente H, alquila linear, ou alquênica tendo de 1 a 10 átomos de carbono, preferivelmente CH_3 ou C_2H_5 ,
 10 alquênica ou alquila cíclica ou ramificada tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída, ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico,

em que R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , e R_8 são cada qual independentemente H, alquênica ou alquila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, preferivelmente CH_3 ou C_2H_5 , alquênica ou alquila cíclica ou ramificada tendo de 3 a
 15 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída, ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico,

em que l, m, e n são cada qual independentemente um número inteiro de 1 a 5, e além disso n pode ser zero,

em que Z é H, SR, ou COR em que R é metila, alquênica ou alquila linear ou ramificada tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquênica ou alquila cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, ou arila substituída ou simples ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico, e
 20

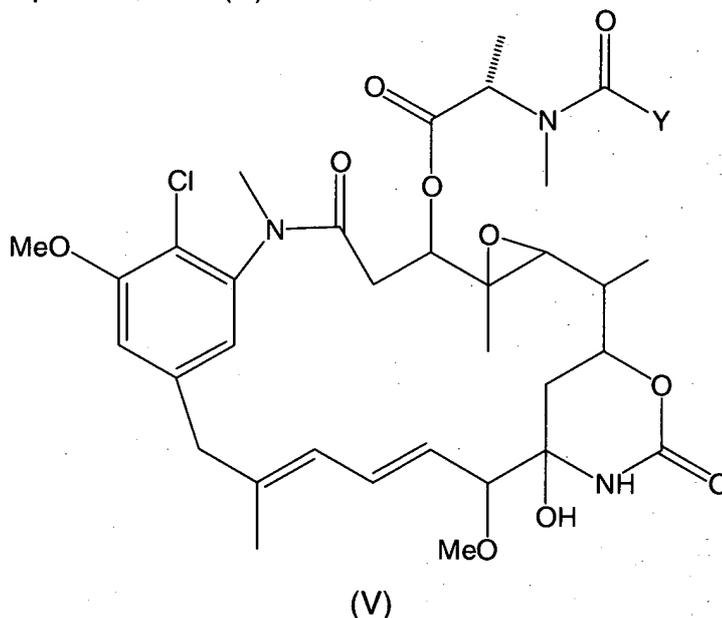
em que May representa um maitansinóide que transporta a cadeia lateral em C-3, C-14 hidroximetila, C-15 hidróxi, ou C-20 desmetila.

25 Modalidades preferidas de fórmulas (IV-L), (IV-D) e (IV-D,L) incluem compostos de fórmulas (IV-L), (IV-D) e (IV-D,L) em que (a) R_1 é H, R_2 é metila, R_5 , R_6 , R_7 , e R_8 são cada qual H, l e m são cada qual 1, n é 0, e Z é H, (b) R_1 e R_2 são metila, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 são cada qual H, l e m são 1, n é

0, e Z é H, (c) R₁ é H, R₂ é metila, R₅, R₆, R₇, e R₈ são cada qual H, l e m são cada qual 1, n é 0, e Z é -SCH₃, ou (d) R₁ e R₂ são metila, R₅, R₆, R₇, R₈ são cada qual H, l e m são 1, n é 0, e Z é -SCH₃.

5 Preferivelmente o agente citotóxico é representado pela fórmula (IV-L).

Maitansinas preferidas adicionais também incluem compostos representados pela fórmula (V):



em que Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

em que R₁ e R₂ são cada qual independentemente H, alquila
 10 linear, ou alquenila tendo de 1 a 10 átomos de carbono, preferivelmente CH₃
 ou C₂H₅, alquenila ou alquila cíclica ou ramificada tendo de 3 a 10 átomos de
 carbono, fenila, fenila substituída ou radical heterocíclico ou aromático hete-
 rocíclico, em que R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, e R₈ são cada qual independentemente
 H, alquenila ou alquila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, preferivel-
 15 mente CH₃ ou C₂H₅, alquenila ou alquila cíclica ou ramificada tendo de 3 a
 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída, ou radical heterocíclico ou
 aromático heterocíclico,

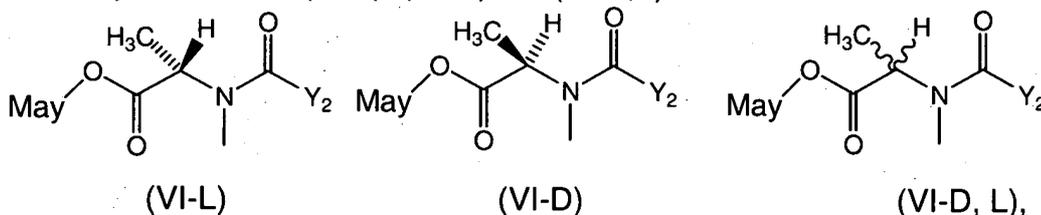
em que l, m, e n são cada qual independentemente um número
 inteiro de 1 a 5, e além disso n pode ser zero, e

20 em que Z é H, SR ou -COR, em que R é metila, alquenila ou al-
 quila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquenila ou alquila cíclica

ou ramificada tendo de 3 a 10 átomos de carbono, ou arila substituída ou simples ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico.

- Modalidades preferidas de fórmula (V) incluem compostos de fórmula (V) em que (a) R_1 é H, R_2 é metila, R_5 , R_6 , R_7 , e R_8 são cada qual H; l e m são cada qual 1; n é 0; e Z é H, (b) R_1 e R_2 são metila; R_5 , R_6 , R_7 , R_8 são cada qual H, l e m são 1; n é 0; e Z é H, (c) R_1 é H, R_2 é metila, R_5 , R_6 , R_7 , e R_8 são cada qual H, l e m são cada qual 1, n é 0, e Z é $-\text{SCH}_3$, ou (d) R_1 e R_2 são metila, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 são cada qual H, l e m são 1, n é 0, e Z é $-\text{SCH}_3$.

- 10 Ainda outras maitansinas preferidas incluem compostos representados pela fórmula (VI-L), (VI-D), ou (VI-D,L):



em que Y_2 representa $(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_5\text{R}_6)_m(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}_2$,

- em que R_1 e R_2 são cada qual independentemente alquenila ou alquila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, preferivelmente CH_3 ou C_2H_5 , alquenila ou alquila cíclica ou ramificada tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico, e em que R_2 também pode ser H,

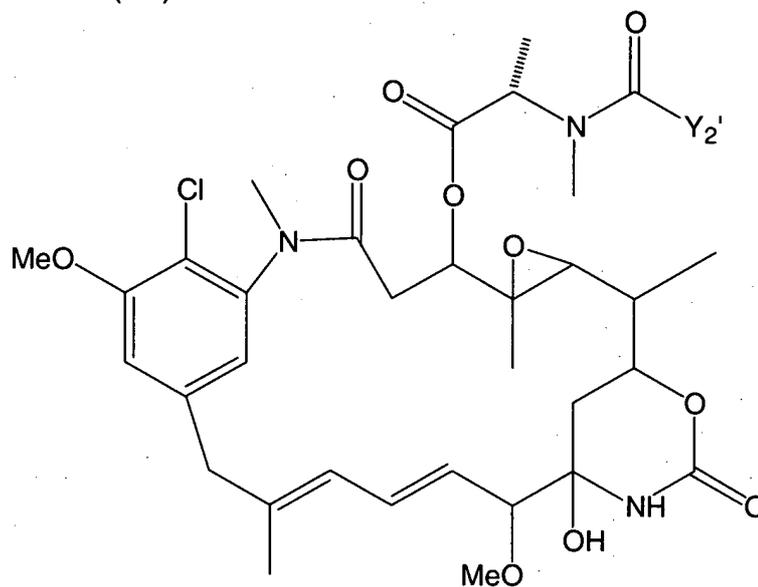
- em que R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , e R_8 são cada qual independentemente H, alquenila ou alquila cíclica linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, preferivelmente CH_3 ou C_2H_5 , alquenila ou alquila cíclica ou ramificada tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico,

em que l , m , e n são cada qual independentemente um número inteiro de 1 a 5, e além disso n pode ser zero,

- 25 em que Z_2 é SR ou COR, em que R é alquenila ou alquila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquenila ou alquila cíclica ou ramificada tendo de 3 a 10 átomos de carbono, ou arila substituída ou simples ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico, e

em que May é um maitansinóide.

Maitansinas preferidas adicionais incluem compostos representados pela fórmula (VII):



(VII),

em que Y_2' representa $(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_o(CR_5R_6)_mD_u-$
 5 $(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

em que R_1 e R_2 são cada qual independentemente H, alquenila ou alquila linear ou ramificada tendo de 1 a 10 átomos de carbono, preferi-
 10 velmente CH_3 ou C_2H_5 , alquenila ou alquila cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico, em que A, B, e D cada qual independentemente é cicloalquila ou cicloalquenila tendo 3 a 10 átomos de carbono, arila substituída ou sim-
 15 ples, ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico,

em que $R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11},$ e R_{12} são cada qual independentemente H, alquenila ou alquila linear tendo de 1 a 10 átomos de
 20 carbono, preferivelmente CH_3 ou C_2H_5 , alquenila ou alquila cíclica ou ramifi- cada tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico,

em que l, m, n, o, p, q, r, s, t, e u são cada qual independente-
 mente zero ou um número inteiro de 1 a 5, contanto que pelo menos dois de
 20 l, m, n, o, p, q, r, s, t, e u não sejam zero ao mesmo tempo, e

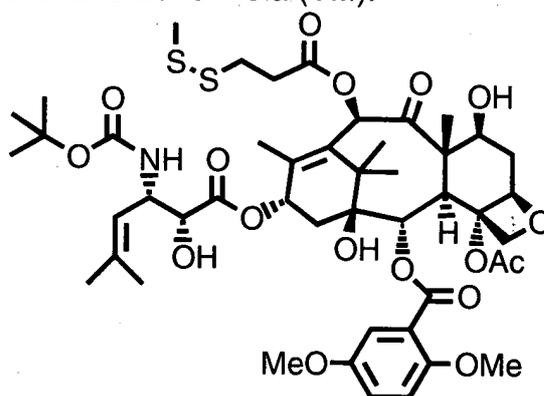
em que Z_2 é SR ou -COR, em que R é alquenila ou alquila linear

tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquênica ou alquila cíclica ou ramificada tendo de 3 a 10 átomos de carbono, ou arila substituída ou simples ou radical heterocíclico ou aromático heterocíclico.

5 Modalidades preferidas de fórmula (VII) incluem compostos de fórmula (VII), em que R_1 é metila e R_2 é H.

Além dos maitansinóides, o agente citotóxico usado no imunoconjugado pode ser um taxano ou derivado do mesmo. Taxanos são uma família de compostos que inclui paclitaxel (Taxol®), um produto natural citotóxico, e docetaxel (Taxotere®), um derivado semi-sintético, que são ambos
10 amplamente usados no tratamento de câncer. Taxanos são venenos de fuso mitótico que inibem a despolimerização de tubulina, resultando em morte celular. Ao mesmo tempo que docetaxel e paclitaxel são agentes úteis no tratamento de câncer, sua atividade antitumor é limitada por causa de sua toxicidade não específica com relação às células normais. Além disso, compostos tipo paclitaxel e docetaxel por si próprios não são suficientemente
15 potentes para serem usados em imunoconjugados.

Um taxano preferido para uso na preparação de um imunoconjugado citotóxico é o taxano de fórmula (VIII):



(VIII)

Métodos para sintetizar taxanos que podem ser usados no contexto da invenção, juntamente com métodos para conjugar taxanos aos agentes de ligação à célula tais como anticorpos, são descritos em detalhes na Patente dos Estados Unidos nºs 5.416.064, 5.475.092, 6.340.701, 6.372.738, 6.436.931, 6.596.757, 6.706.708, e 6.716.821, e na Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 2004/0.024.049 A1.
20

O agente citotóxico também pode ser CC-1065 ou um derivado do mesmo. CC-1065 é um potente antibiótico anti-tumor isolado do caldo de cultura de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 é cerca de 1000 vezes mais potente *in vitro* do que fármacos anticâncer comumente usados, tais como doxorrubicina, metotrexato, e vincristina (Bhuyan e outro, *Cancer Res.*, 42: 3532-3537 (1982)). CC-1065 e seus análogos são descritos na Patente dos Estados Unidos nºs 5.585.499, 5.846.545, 6.340.701, e 6.372.738. A potência citotóxica de CC-1065 foi correlacionada com sua atividade de alquilação e sua atividade de intercalação de DNA ou ligação de DNA. Estas duas atividades residem em partes separadas da molécula. Neste respeito, a atividade de alquilação está contida na subunidade de ciclopropapirroloindol (CPI) e a atividade de ligação de DNA reside nas duas subunidades de pirroloindol de CC-1065.

Diversos análogos de CC-1065 são conhecidos na técnica e também podem ser usados como o agente citotóxico no imunoconjugado (veja, por exemplo, Warpehoski e outro, *J. Med. Chem.*, 31: 590-603 (1988)). Uma série de análogos de CC-1065 foi desenvolvida na qual a porção de CPI é substituída por uma porção de ciclopropabenzindol (CBI) (Boger e outro, *J. Org. Chem.*, 55: 5823-5833 (1990), e Boger e outro, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1: 115-120 (1991)). Estes análogos de CC-1065 mantêm a elevada potência *in vitro* do fármaco de origem, sem causar toxicidade retardada em camundongos. Similar a CC-1065, estes compostos são agentes de alquilação que covalentemente ligam-se à menor ranhura de DNA para causar morte celular.

A eficácia terapêutica de análogos de CC-1065 pode ser grandemente melhorada alterando-se a distribuição *in vivo* através da liberação alvejada para um sítio de tumor, resultando em toxicidade inferior aos tecidos não marcados, e desse modo, toxicidade sistêmica inferior. Para esta finalidade, conjugados de análogos e derivados de CC-1065 com agentes de ligação à célula que especificamente alvejam células de tumor foram gerados (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nºs 5.475.092, 5.585.499, e 5.846.545). Estes conjugados tipicamente exibem citotoxicida-

de específica ao alvo elevada *in vitro*, e atividade antitumor em modelos de xenoenxerto de tumor humano em camundongos (veja, por exemplo, Chari e outro, *Cancer Res.*, 55: 4079-4084 (1995)).

5 Métodos para sintetizar análogos de CC-1065 são descritos em detalhes na Patente dos Estados Unidos nºs 5.475.092, 5.585.499, 5.846.545, 6.534.660, 6.586.618, e 6.756.397 e Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 2003/0.195.365 A1.

10 Fármacos tais como metotrexato, daunorrubicina, doxorrubicina, vincristina, vinblastina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, caliqueamicina, tubulisina e análogos de tubulisina, duocarmicina e análogos de duocarmicina, dolastatina e análogos de dolastatina também podem ser usados no contexto da invenção. Compostos de doxarrubicina e daunorrubicina (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nº 6,630,579) podem também ser usados como o fármaco.

15 Os imunocombinados podem ser preparados por métodos *in vitro*. A fim de ligar um fármaco ou pró-fármaco ao anticorpo, um grupo de ligação é usado. Grupos de ligação adequados são bem conhecidos na técnica e incluem grupos dissulfeto, grupos lábeis de ácido, grupos fotolábeis, grupos lábeis de peptidase, e grupos lábeis de esterase. Grupos de ligação
20 preferidos são grupos dissulfeto. Por exemplo, imunocombinados podem ser construídos empregando-se uma reação de permuta de dissulfeto entre o anticorpo e o fármaco ou pró-fármaco. As moléculas de fármaco também podem ser ligadas a um anticorpo através de uma molécula veículo intermediária tal como albumina de soro.

25 O anticorpo pode ser modificado por reação com um reagente de reticulação bifuncional, desse modo resultando na ligação covalente de uma molécula ligadora ao anticorpo. Como empregado aqui, um "reagente de reticulação bifuncional" é qualquer porção química que covalentemente liga um agente de ligação à célula a um fármaco, tais como os fármacos
30 descritos aqui. Em uma modalidade preferida da invenção, uma parcela da porção de ligação é fornecida pelo fármaco. Neste respeito, o fármaco compreende uma porção de ligação que é parte de uma molécula ligadora maior

que é usada para unir o anticorpo ao fármaco. Por exemplo, para formar o maitansinóide DM1, a cadeia lateral no grupo C-3 hidroxila de maitansina é modificado para ter um grupo sulfidril livre (SH). Esta forma tiolada de maitansina pode reagir com um anticorpo modificado para formar um imunocombinado. Portanto, o ligante final é agrupado de dois componentes, um dos quais é fornecido pelo reagente de reticulação, enquanto o outro é fornecido pela cadeia lateral de DM1.

Qualquer reagente de reticulação bifuncional adequado pode ser usado com relação à invenção, contanto que o reagente ligante provenha a retenção do produto terapêutico, por exemplo, citotoxicidade, e características de marcação do fármaco e do anticorpo, respectivamente. Preferivelmente, a molécula ligadora une o fármaco ao anticorpo através de ligações químicas (como descrito acima), de modo que o fármaco e o anticorpo sejam quimicamente acoplados (por exemplo, covalentemente ligados) um ao outro. Preferivelmente, o reagente de ligação é um ligante clivável. Mais preferivelmente, o ligante é clivado sob condições suaves, isto é, condições dentro de uma célula sob as quais a atividade do fármaco não é afetada. Exemplos de ligantes cliváveis adequados incluem ligantes de dissulfeto, ligantes lábeis de ácido, ligantes fotolábeis, ligantes lábeis de peptidase, e ligantes lábeis de esterase. Ligantes contendo dissulfeto são ligantes cliváveis através de permuta de dissulfeto, que podem ocorrer sob condições fisiológicas. Ligantes lábeis de ácido são ligantes cliváveis em pH ácido. Por exemplo, certos compartimentos intracelulares, tais como endossomos e lisossomos, têm um pH ácido (pH 4-5), e fornecem condições adequadas para clivar ligantes lábeis de ácido. Ligantes fotolábeis são úteis na superfície corporal e em muitas cavidades do corpo que são acessíveis à luz. Além disso, luz infravermelha pode penetrar no tecido. Ligantes lábeis de peptidase podem ser usados para clivar certos peptídeos dentro ou fora das células (veja por exemplo, Trouet e outro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 626-629 (1982), e Umemoto e outro, *Int. J. Cancer*, 43: 677-684 (1989)).

Preferivelmente, o fármaco é ligado a um anticorpo através de uma ligação de dissulfeto. A molécula ligadora compreende um grupo quími-

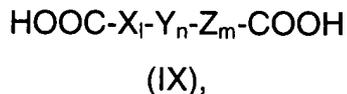
co reativo que pode reagir com o anticorpo. Grupos químicos reativos preferidos para reação com o anticorpo são ésteres de N-succinimidila e ésteres de N-sulfossuccinimidila. Adicionalmente a molécula ligadora compreende um grupo químico reativo, preferivelmente um grupo ditiopiridila, que pode
5 reagir com o fármaco para formar uma ligação de dissulfeto. Moléculas ligadoras particularmente preferidas incluem, por exemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidila (SPDP) (veja, por exemplo, Carlson e outro, *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)), 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidila (SPDB) (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nº
10 4.563.304), e 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidila (SPP) (veja, por exemplo, número de Registro CAS 341498-08-6).

Ao mesmo tempo que ligantes cliváveis preferivelmente são usados no método inventivo, um ligante não clivável também pode ser usado para gerar o imunocombinado descrito acima. Um ligante não clivável é qual-
15 quer porção química que é capaz de ligar um fármaco, tal como um maitansinóide, um taxano, ou um análogo de CC-1065, a um agente de ligação à célula, tal como um anticorpo, de uma maneira covalente, estável. Desse modo, ligantes não cliváveis são substancialmente resistentes à clivagem induzida por ácido, clivagem induzida por luz, clivagem induzida por peptidase,
20 se, clivagem induzida por esterase, e clivagem de ligação de dissulfeto, em condições sob as quais o fármaco ou o anticorpo permanece ativo.

Reagentes de reticulação adequados que formam ligantes não cliváveis entre um fármaco e um agente de ligação à célula são bem conhecidos na técnica. Exemplos de ligantes não cliváveis incluem ligantes tendo
25 uma porção de éster de N-succinimidila ou éster de N-sulfossuccinimidila para reação com o agente de ligação à célula, bem como uma porção com base em maleimido ou haloacetila para reação com o fármaco. Reagentes de reticulação compreendendo uma porção com base em maleimido incluem 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-succinimidila (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-cicloexano-1-carbóxi-(6-amidocaproato),
30 que é um análogo de "cadeia longa" de SMCC (LC-SMCC), éster de N-succinimidila de ácido κ -maleimidoundecanóico (KMUA), éster de N-

succinimidila de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster de N-hidroxissuccinimida de ácido ϵ -maleimidocapróico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida (MBS), éster de N-(α -maleimidoacetóxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidila (SMPB), e N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI). Reagentes de reticulação compreendendo uma porção com base em haloacetila incluem N-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), iodoacetato de N-succinimidila (SIA), bromoacetato de N-succinimidila (SBA), e 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidila (SBAP).

Outros reagentes de reticulação que não têm um átomo de enxofre que forma ligantes não cliváveis podem também ser usados no método inventivo. Tais ligantes podem ser derivados de porções com base em ácido dicarboxílico. Porções com base em ácido dicarboxílico adequadas incluem, porém não são limitadas a, ácidos α,ω -dicarboxílicos da fórmula geral (IX):



em que X é um grupo alquila, alquenila, ou alquinila linear ou ramificado tendo 2 a 20 átomos de carbono, Y é um grupo cicloalquila ou cicloalquenila transportando 3 a 10 átomos de carbono, Z é um grupo aromático substituído ou não substituído transportando 6 a 10 átomos de carbono, ou um grupo heterocíclico substituído ou não substituído em que o heteroátomo é selecionado de N, O ou S, e em que l, m, e n são cada qual 0 ou 1, contanto que l, m, e n sejam todos não zero ao mesmo tempo.

Muitos dos ligantes não cliváveis descritos aqui são descritos em detalhes na Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 2005-0169933 A1.

Alternativamente, como descrito na Patente dos Estados Unidos nº 6.441.163 B1, o fármaco pode ser primeiro modificado para introduzir um éster reativo adequado para reagir com um anticorpo. Reação dos mesmos maitansinóides contendo uma porção ligadora ativada com um anticorpo fornece outro método de produção de um conjugado anticorpo-maitansinóide

clivável ou não clivável.

Processos para a fabricação de tais composições farmacêuticas envolvem troca de tampão do produto farmacêutico de carga em tampão de formulação apropriado por cromatografia ou diafiltração e em seguida adição de excipientes apropriados em quantidade desejada, ou como solução ou como sólido. Ajuste final da concentração de proteína e/ou pH pode também ser realizado para obter a composição desejada.

Os imunocombinados da invenção são administrados ao paciente na forma de uma formulação farmacêutica descrita neste pedido e um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável portanto. Como empregado, "farmacêuticamente aceitável" refere-se àqueles agentes que são úteis no tratamento ou diagnóstico de mamíferos, preferivelmente ser humano. O modo preferido de administração é parenteralmente, particularmente pela via intravenosa, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, ou intralinfática. Veja, por exemplo *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a ed., 1980, Mack Publishing Company, editado por Osol e outros. Tais composições podem incluir proteínas, tais como proteínas de soro, por exemplo, albumina de soro humano, tampões ou substâncias de tamponamento tais como fosfatos, outros sais, ou eletrólitos, e similares. Diluentes adequados podem incluir, por exemplo, água estéril, salina isotônica, dextrose aquosa diluída, um álcool poliidrico ou misturas de tais álcoois, por exemplo, glicerina, propileno glicol, polietileno glicol e similares. As formulações podem conter conservantes tais como álcool de fenetila, metil e propil parabenos, e similares. Se desejado, a formulação pode incluir 0,05 a cerca de 0,20 percentual por peso de um antioxidante.

A administração pode ser por meio de qualquer via conhecida ser eficaz pelo médico de experiência ordinária. Administração parenteral é preferida. Vias parenterais preferidas para administração das formulações da presente invenção incluem intravenosa, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intra-arterial. Vias intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, e subcutânea de administração dos compostos usados na presente invenção são vias parenterais mais preferidas de administração. Vias intravenosa, intrape-

ritoneal, e subcutânea de administração das formulações da presente invenção são ainda mais altamente preferidas.

Administração por meio de certas vias parenterais pode envolver introdução das formulações da presente invenção no corpo de um paciente através de uma agulha ou um catéter. Opcionalmente, tal administração pode ser propelida por uma seringa estéril ou algum outro dispositivo mecânico tal como um sistema de infusão contínua. Uma formulação fornecida pela presente invenção pode ser administrada empregando-se uma seringa, injetor, bomba, ou qualquer outro dispositivo ou por gravidade reconhecido na técnica para administração parenteral. A formulação pode ser administrada parenteralmente, em formas de dosagem líquidas estéreis. Esta formulação pode ser administrada intravenosamente como uma infusão em bolus ou rápida, que pode, além de seu efeito terapêutico, diagnóstico ou medicinal desejado, causar a liberação de imunocjugado.

Os imunocjugados da invenção são eficazes durante uma ampla faixa de dosagem dependendo de fatores tais como o estado da doença a ser tratada ou o efeito biológico a ser modificado, a maneira da qual o imunocjugado é administrado, a idade, peso e condição do paciente bem como outros fatores a ser determinados pelo médico que está realizando o tratamento. Desse modo, a quantidade administrada a qualquer determinado paciente pode ser determinada em uma base individual.

A quantidade de uma formulação da presente invenção que é administrada para tratar um paciente pode depender de vários fatores, entre os quais são inclusos, sem limitação, o sexo, peso e idade do paciente, a causa subjacente da condição ou doença a ser tratada, a via de administração e biodisponibilidade, a persistência do imunocjugado administrado no corpo, a formulação, e a potência do imunocjugado. Onde a administração é intermitente, a quantidade por administração deve também levar em consideração o intervalo entre as doses, e a biodisponibilidade do imunocjugado da formulação. A administração da formulação da presente invenção pode ser contínua. Inclui-se na experiência ordinária do médico titular a dose e taxa de infusão ou frequência de administração da formulação da presente

invenção para obter o resultado clínico desejado.

5 A dosagem administrada, evidentemente, variará dependendo dos fatores conhecidos tais como as características farmacodinâmicas do agente particular, e seu modo e via de administração; idade, saúde, e peso do recipiente; natureza e extensão dos sintomas, tipo de tratamento simultâneo, frequência de tratamento, e o efeito desejado. Usualmente uma dosagem diária de composto terapeuticamente significativa pode ser cerca de 0,1 a 100 miligramas por quilograma de peso corporal.

10 Formas de dosagem adequadas para administração interna contêm de cerca de 1 miligrama a cerca de 500 miligramas de composto terapeuticamente significativa por unidade. Nestas composições farmacêuticas o composto terapeuticamente significativa ordinariamente estará presente em uma quantidade de cerca de 0,05-2% por peso em uma formulação líquida e 2-50% na formulação liofilizada antes da reconstituição baseada no peso total da composição.

15 A presente invenção também provê um pó liofilizado da formulação descrita acima. Preferivelmente, a formulação liofilizada compreende um ou mais componentes adicionais, tais como um agente de carga e/ou lioprotetor. O pó liofilizado pode ser reconstituído com água para criar uma solução reconstituída. A presente formulação pode ser liofilizada e reconstituída como descrito no Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 2004/0:241.174 A1, cuja descrição é por meio do mesmo incorporada por referência, e que descreve formulações liofilizadas compreendendo imunocombinados.

20 Antes da reconstituição da composição liofilizada, as quantidades relativas de cada componente compreendendo a composição liofilizada inventiva podem ser descritas em termos de mg de excipiente (por exemplo, tampão, tensoativo, agente de carga, crioprotetor) por mg de conjugado.

30 Ao mesmo tempo que qualquer agente de tamponamento adequado descrito aqui pode ser empregado com relação à composição liofilizada inventiva, a composição liofilizada preferivelmente compreende um tampão de succinato de sódio. O agente de tamponamento pode estar presente na composição liofilizada inventiva em qualquer quantidade adequada. Em

particular, a composição liofilizada desejavelmente compreende cerca de 0,1 mg a cerca de 2 mg do agente de tamponamento por mg do conjugado (por exemplo, cerca de 0,1 mg a cerca de 0,5 mg de agente de tamponamento por mg do conjugado, cerca de 0,5 mg a cerca de 1 mg de agente de tamponamento por mg do conjugado, ou cerca de 1 mg a cerca de 2 mg de agente de tamponamento por mg do conjugado). Mais preferivelmente, a composição liofilizada compreende cerca de 0,3 mg de tampão de succinato de sódio por mg do conjugado.

A composição liofilizada desejavelmente compreende cerca de 0,005 mg a cerca de 0,1 mg de polissorbato por mg do conjugado, e preferivelmente cerca de 0,005 mg a cerca de 0,01 mg de polissorbato por mg do conjugado, 0,01 mg a cerca de 0,05 mg de polissorbato por mg do conjugado, ou cerca de 0,05 mg de polissorbato a cerca de 0,1 mg de polissorbato por mg do conjugado. Quando o polissorbato for polissorbato 20, a composição liofilizada preferivelmente compreenderá cerca de 0,02 mg de polissorbato 20 por mg do conjugado.

A fim de prevenir a degradação dos ingredientes ativos da composição durante congelamento e secagem, a composição liofilizada inventiva também compreende um crioprotetor, preferivelmente um crioprotetor amorfo. O termo "crioprotetor", como empregado aqui, refere-se a um excipiente que protege moléculas instáveis durante o congelamento. Crioprotetores adequados para uso na composição liofilizada são conhecidos por aqueles versados na técnica, e incluem, por exemplo, glicerol, sulfóxido de dimetila (DMSO), polietileno glicol (PEG), dextrano, glicose, trealose, e sacarose. Mais preferivelmente, o crioprotetor é sacarose. O crioprotetor pode estar presente na composição liofilizada inventiva em qualquer quantidade adequada. A composição liofilizada desejavelmente compreende cerca de 0,5 mg a cerca de 5 mg, por exemplo, cerca de 0,5 mg a cerca de 2 mg do crioprotetor por mg do conjugado, cerca de 0,8 mg de crioprotetor por mg do conjugado, cerca de 2 mg de crioprotetor por mg do conjugado, ou cerca de 4 mg de crioprotetor por mg do conjugado. Quando o crioprotetor for sacarose, a composição liofilizada preferivelmente compreenderá cerca de 0,5 mg

a cerca de 2 mg (por exemplo, cerca de 1 mg) de sacarose por mg do conjugado.

A composição liofilizada pode também conter um agente de carga, preferivelmente um agente de carga cristalizável. Agentes de carga tipicamente são empregados na técnica para fornecer estrutura e peso à "massa" produzida como um resultado de liofilização. Qualquer agente de carga adequado conhecido na técnica pode ser empregado com relação à composição liofilizada inventiva. Agentes de carga adequados incluem, por exemplo, manitol, dextrano, e glicina. O agente de carga empregado na composição inventiva mais preferivelmente é glicina. A composição liofilizada pode conter qualquer quantidade adequada do agente de carga, porém preferivelmente a composição liofilizada compreende cerca de 2 mg a cerca de 20 mg do agente de carga por mg do conjugado, e preferivelmente cerca de 2 mg a cerca de 10 mg de agente de carga por mg do conjugado, cerca de 5 mg a cerca de 10 mg de agente de carga por mg do conjugado, cerca de 10 mg a cerca de 15 mg de agente de carga por mg do conjugado, ou cerca de 15 mg a cerca de 20 mg de agente de carga por mg do conjugado. Quando o agente de carga for glicina, a composição liofilizada preferivelmente compreenderá cerca de 3,8 mg de glicina por mg do conjugado.

Desse modo, de acordo com a invenção, os conteúdos de uma composição liofilizada que deve ser reconstituída para conter 5 mg/mL de conjugado (por exemplo, preferivelmente um conjugado compreendendo huN901 quimicamente acoplado a DM1) preferivelmente compreendem (i) cerca de 0,3 mg de tampão de succinato de sódio por mg do conjugado, (ii) cerca de 0,02 mg de polissorbato 20 por mg do conjugado, (iii) cerca de 1 mg de sacarose por mg do conjugado, e (iv) cerca de 3,8 mg de glicina por mg do conjugado. Assim que reconstituída com água, uma tal composição liofilizada preferivelmente tem um pH de cerca de 5,5. Além disso, quando a composição liofilizada for reconstituída com água, as descrições das concentrações relativas dos excipientes mencionados acima com relação à formulação líquida são aplicáveis à composição liofilizada supracitada.

Métodos de liofilização são bem conhecidos na técnica e são

descritos em, por exemplo, Wang, W., *Int. J. Pharm.*, 203, 1-60 (2000). Por exemplo, a composição liofilizada inventiva pode ser produzida empregando-se um ciclo de liofilização compreendendo as seguintes etapas: (1) pré-resfriamento em uma temperatura de prateleira de 4°C e pressão de câmara ambiente durante 2,5 horas, (2) congelamento em uma temperatura de prateleira de -50°C e pressão de câmara ambiente durante 14 horas, (3) recristalização de glicina em uma temperatura de prateleira de -20°C e pressão de câmara ambiente durante 6 horas, (4) recongelamento em uma temperatura de prateleira de -50°C e pressão de câmara ambiente durante 16 horas, (5) secagem primária em uma temperatura de prateleira de -13°C e 13,33 Pa (100 mTorr) de pressão durante 24 horas, (6) secagem secundária em uma temperatura de prateleira de 24°C e 13,33 Pa (100 mTorr) de pressão durante 10 horas, e (7) fase de interrupção em uma temperatura de prateleira de 24°C e pressão de câmara ambiente. A composição liofilizada, entretanto, não é limitada às composições produzidas pelo método descrito acima. De fato, qualquer método de liofilização adequado pode ser empregado para produzir a composição liofilizada, e será evidente para aqueles versados na técnica que os parâmetros de liofilização escolhidos (por exemplo, tempos de secagem) variarão dependendo de uma variedade de fatores, incluindo o volume da solução a ser liofilizada.

Em outra modalidade, a presente invenção é direcionada a um estojo para preparação de uma formulação aquosa, cujo kit contém tanto um primeiro recipiente contendo um pó liofilizado quanto um segundo recipiente contendo uma formulação aquosa compreendendo um estabilizante de reconstituição. A concentração do pó liofilizado na solução, o volume de solução que é carregado em cada recipiente, e a capacidade dos recipientes são todos parâmetros interrelacionados que podem ser adequadamente modificados, dependendo da concentração desejada de princípio ativo na unidade de dosagem final. Desse modo, estes parâmetros podem variar dentro de amplas faixas.

Todas as patentes, publicações, e outras referências citadas aqui são expressamente incorporadas por referência em suas totalidades.

A presente invenção é também descrita pelos seguintes exemplos, que são ilustrativos do processo e não devem ser construídos como limitantes da invenção. Os parâmetros do processo fornecidos abaixo podem ser adotados e adaptados pela pessoa experiente para satisfazer a necessidade particular.

EXEMPLO 1

Este exemplo mostra o efeito dos seguintes excipientes de formulação sobre a aparência visual de amostras de conjugado MAb-DM1 formuladas.

Amostras de huN901-SPP-DM1 foram estabelecidas em 1,0 mg/mL em 10 mM de tampão de fosfato pH 6,5 com 140 mM de NaCl com cada dos excipientes listados abaixo. Os excipientes foram adicionados diretamente à amostra de huN901-SPP-DM1 em uma base peso/peso % (peso do excipiente / peso da solução). Imediatamente após a adição do excipiente, as formulações foram filtradas, e testes de contagem de partícula e aparência foram realizados. As amostras foram em seguida armazenadas a 4°C durante o tempo do estudo, e foram testadas novamente em pontos de tempo de 2 semanas e 1 mês. Quanto à aparência, as amostras foram testadas examinando-se pelo menos 1,0 mL de solução em comparação com uma base branca quanto à claridade e em comparação com uma base preta sob luz branca quanto à presença ou ausência de partículas visíveis. Os resultados são relatados como presença ou ausência de partículas visíveis. Partículas subvisíveis com o tamanho acima de 5 μ m foram também medidas com uma registradora de partícula HIAC calibrada para medir o tamanho da partícula entre 2 e 100 μ m.

Aparência:

Excipiente	Inicial	2 Semanas	1 Mês
5% de sacarose	Clara	Clara	Clara
10% de sacarose	Clara	Clara	Clara
0,1% de tween20	Clara	Clara	Clara
0,8% de tween20	Clara	Partículas	Clara
1% de ciclodextrina	Clara	Clara	Clara
1% de dextrose	Clara	Clara	Partículas
5% de glicerol	Clara	Clara	Partículas
2% de PEG6000	Clara	Clara	Partículas
5% de manitol	Clara	Partículas	Partículas
Controle de filtrado*	Clara	Clara	Partículas

* filtrado concisamente antes do ponto de tempo inicial

Contagem de partícula (contas > 5 μ m por mL):

Excipiente	Contas de partícula acumulativas		
	Inicial	2 Semanas	1 Mês
5% de sacarose	94	120	84
10% de sacarose	68	14	58
0,1% de tween20	40	76	76
0,8% de tween20	86	120	120
1% de ciclodextrina	8	4	10
1% de dextrose	388	608	502
5% de glicerol	4	32	42
2% de PEG6000	12	6	72
5% de manitol	46	144	70
Controle de filtrado	222	284	720

5 Efeitos positivos de sacarose, TWEEN-20®, beta-ciclodextrina, dextrose, glicerol, manitol e polietileno glicol (PEG) foram observados.

EXEMPLO 2

Este exemplo mostra o efeito de aminoácidos sobre a estabilidade de huN901-SPP-DM1 com respeito à agregação de conjugado.

10 Amostras de huN901-SPP-DM1 foram estabelecidas em 5,0 mg/mL nos seguintes tampões e armazenadas a 2-8 e 25°C durante 12 meses. O conteúdo de agregado de conjugado foi testado com um ensaio cro-

matográfico em pontos de tempo de 1, 3, 6 e 12 meses.

(1) 10 mM de fosfato de sódio, 140 mM de NaCl, pH 6,5.

(2) 10 mM de citrato de sódio, 135 mM de NaCl, 0,01 % de polissorbato 20, pH 5,5.

5 (3) 10 mM de citrato de sódio, 130 mM de histidina, 0,01 % de polissorbato 20, pH 5,5.

(4) 10 mM de citrato de sódio, 110 mM de glicina, 80 mM de NaCl, 0,01 % de polissorbato 20, pH 5,5.

Formulação	T ₀	2-8°C				25°C			
		1 mês	3 meses	6 meses	12 meses	1 mês	3 meses	6 meses	12 meses
Composição 1	5,3	6,7	8,1	8,6	8,9	8,7	10,2	10,4	11,8
Composição 2	4,5	5,0	5,4	5,6	5,5	5,8	6,6	7,2	8,2
Composição 3	4,1	4,1	4,2	4,1	3,8	4,5	4,7	5,0	6,1
Composição 4	4,2	4,5	4,8	4,9	4,9	5,2	5,8	6,2	7,3

10 Exemplo 1 mostra que histidina melhora a formulação com referência à prevenção de formação de agregado de conjugado. Glicina também tem benefícios.

EXEMPLO 3

Este exemplo mostra o efeito de histidina sobre a estabilidade do conjugado huMy9-6-SPDB-DM4 em termos de agregado de conjugado.

15 O conjugado huMy9-6-SPDB-DM4 foi formulado em 5,0 mg/mL em:

(1) 10 mM de citrato de sódio, 135 mM de NaCl, pH 5,5

(2) 150 mM de histidina/cloreto de histidina, pH 5,5

20 As amostras foram incubadas a 2-8°C e 25°C durante 6 meses, após o que elas foram testadas quanto ao agregado de conjugado por um ensaio cromatográfico.

Formulação	T ₀	2-8°C, 6 meses	25°C, 6 meses
Composição 1	3,5	4,0	8,2
Composição 2	3,2	3,2	7,1

Os dados mostram os efeitos benéficos de histidina sobre a prevenção de formação de agregado.

EXEMPLO 4

5 Este exemplo mostra o efeito de agente de tamponamento, açúcar e aminoácido sobre a estabilidade de huC242-SPDB-DM4 com respeito ao agregado de conjugado.

Amostras de huC242-SPDB-DM4 em 5,0 mg/mL em:

(1) 10 mM de citrato de sódio, 135mM de NaCl, pH 5,5

10 (2) 10 mM de citrato de sódio, 5% de sacarose, 130 mM de glicina, 0,1% de polissorbat 80, pH 5,5

(3) 10 mM de histidina/cloreto de histidina, 5% de sacarose, 130 mM de glicina, pH 5,5

Teste para conteúdos de agregado e monômero de conjugado foram realizados em T₀, e após 3 meses de armazenagem em 2-8°C e 25°C.

Formulação	Agregado (%)		
	T ₀	2-8°C, 3 meses	25°C, 3 meses
Composição 1	4,0	4,3	9,1
Composição 2	3,2	3,7	5,9
Composição 3	2,4	2,3	3,8

15 Os dados mostram que sacarose e glicina, juntos na combinação acima, melhoram a formulação com referência à proteção contra agregação de conjugado. A maior melhora é observada quando a combinação de sacarose e glicina é usada com histidina.

EXEMPLO 5

20 Este exemplo mostra o efeito de várias formulações contendo sacarose com e sem glicina sobre o conteúdo de agregado do conjugado huN901-SPP-DM1.

25 Amostras de huN901-SPP-DM1 em concentração de 5,0 mg/mL em cada das seguintes formulações líquidas foram testadas quanto aos conteúdos de monômero e agregado.

(1) 10 mM de citrato de sódio, 135 mM de NaCl, 0,01 % de polissorbat 20, pH 5,5

(2) 10 mM de citrato de sódio, 60 mM de NaCl, 5 % de sacarose, pH 5,5

(3) 10 mM de citrato de sódio, 60 mM de NaCl, 0,01 % de polissorbato 20, 5 % de sacarose, pH 5,5

5 (4) 10 mM de fosfato de sódio, 140 mM de NaCl, pH 6,5

(5) 10 mM de succinato de sódio, 0,25 M de glicina, 0,01 % de polissorbato 20, 0,5 % de sacarose, pH 5,5

As amostras armazenadas a 25°C foram testadas quanto aos conteúdos de agregado em pontos de tempo de 3, 6 e 12 meses.

Formulação	Agregado (%)		
	3 meses	6 meses	12 meses
Composição 1	6,7	7,3	8,2
Composição 2	5,2	5,7	6,2
Composição 3	5,6	5,4	6,5
Composição 4	10,0	10,4	11,8
Composição 5	4,4	4,7	4,4

10 Em todos os casos as formulações contendo sacarose têm conteúdo de agregado inferior àquelas sem sacarose. A formulação contendo glicina (composição 5) teve a melhor estabilidade neste exemplo.

EXEMPLO 6

15 Este exemplo mostra o efeito de polissorbato 80 sobre a formação de partícula induzida por agitação. Esta condição de estresse (agitação) é suposta imitar os estresses encontrados durante expedição e manuseio do conjugado líquido, quando oposta aos estresses encontrados durante armazenagem estática (que são tratados no Exemplo 1).

20 Amostras de huC242-SPDB-DM4 foram estabelecidas em 1 mg/mL nos seguintes tampões e colocadas em frascos de vidro USP Tipo 1 (5mL em um frascos de 10mL) que foram selados com Flurotec® Stoppers. Os frascos foram agitados durante 48 horas em 100 rpm em temperatura ambiente, empregando-se um Agitador Orbital Lab-Line.

25 (1) 10 mM de citrato de sódio, 135 mM de cloreto de sódio, pH 5,5

(2) 10 mM de histidina, 5% de sacarose, 130 mM de glicina, pH

5,5

(3) 10 mM de histidina, 5% de sacarose, 130 mM de glicina, 0,1% de polissorbato 80, pH 5,5

(4) 10 mM de histidina, 1% de sacarose, 250 mM de glicina, pH

5 5,5

(5) 10 mM de histidina, 1% de sacarose, 250 mM de glicina, 0,1% de polissorbato 80, pH 5,5

(6) 10 mM de histidina, 280 mM de glicina, pH 5,5

(7) 10 mM de histidina, 280 mM de glicina, 0,1% de polissorbato

10 80, pH 5,5

(8) 10 mM de histidina, 10% de sacarose, pH 5,5

(9) 10 mM de histidina, 10% de sacarose, 0,1% de polissorbato 80, pH 5,5

15 Após agitação durante 48 horas, todos os frascos foram visualmente inspecionados. Aqueles que continham polissorbato 80 (Composições 3, 5, 7 e 9) permaneceram claros, ao passo que todos aqueles que não continham polissorbato 80 (1, 2, 4, 6 e 8) ficaram turvos. Estes dados demonstram o efeito benéfico de polissorbato 80 na redução de partículas devido à agitação, tal como pode ser encontrado durante expedição e manuseio do

20 conjugado líquido.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação de imunocombinado líquida, caracterizada pelo fato de que compreende:

5 (a) um imunocombinado, em que o imunocombinado é um anticorpo compreendendo um ou mais pró-fármacos citotóxicos ligados covalentemente; e

(b) um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em sacarose, polissorbato 20, polissorbato 80, ciclodextrina, dextrose, glicerol, polietileno glicol, manitol, e um aminoácido,

10 em que a formulação não compreende cloreto de sódio; e

em que a formulação é uma solução aquosa tamponada tendo um pH de 4,5 a 7,6.

2. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em:

- 15 (i) 0,1 - 12% de sacarose,
(ii) 0,005 - 1,0% de polissorbato 20,
(iii) 0,5 - 2% de beta-ciclodextrina,
(iv) 2 - 8% de glicerol,
20 (v) 1 - 5% de PEG6000,
(vi) 2 - 8% de manitol,
(vii) 0,005 - 1,0% de polissorbato 80,
(viii) 5 - 20 mM de histidina, e
(ix) 100 - 300 mM de glicina.

25 3. Formulação de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em:

- (i) 5 - 10% de sacarose,
(ii) 0,005 - 0,2 % de polissorbato 20,
30 (iii) 0,5 - 1% de beta - ciclodextrina,
(iv) 2 - 5% de glicerol,
(v) 2 - 3% de PEG6000,

- (vi) 3 - 5% de manitol,
- (vii) 0,005 – 0,2 % de polissorbato 80,
- (viii) 10 - 15 mM de histidina, e
- (ix) 130 - 250 mM de glicina.

- 5 4. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a solução aquosa tamponada contém um ou mais de histidina, succinato, citrato, fosfato, e acetato.
5. Formulação de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o pH é de 5,0 a 7,0.
- 10 6. Formulação de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o pH é de 5,0 a 6,0.
7. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o imunocombinado compreende um anticorpo humanizado selecionado do grupo consistindo em huMy9 - 6, huC242, huN901, DS6,
- 15 trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, e rituximab.
8. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o imunocombinado compreende um fármaco citotóxico selecionado do grupo consistindo em um maitansinóide, um taxano, e um CC - 1065.
- 20 9. Formulação de imunocombinado líquida, caracterizada pelo fato de que compreende:
- (a) um imunocombinado, em que o imunocombinado é um anticorpo compreendendo um ou mais pró-fármacos citotóxicos ligados covalentemente; e
- 25 (b) um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em histidina, sacarose e glicina,
- em que a formulação não compreende cloreto de sódio; e
- em que a formulação é uma solução aquosa tamponada tendo um pH de 4,5 a 7,6.
- 30 10. Formulação de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a formulação compreende um ou mais excipientes selecionados de 5 - 200 mM de histidina, 100 - 200 mM de glicina, e 2 - 8% de sa-

carose.

11. Formulação de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o excipiente é 5 - 100 mM de histidina ou 100 - 150 mM de glicina.

5 12. Formulação de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a formulação contém 2 - 8% de sacarose e 100 - 150 mM de glicina.

10 13. Formulação de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que a formulação contém 10 mM de histidina, 5% de sacarose e 130 mM de glicina.

14. Formulação de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a solução aquosa tamponada contém um ou mais de histidina, succinato, citrato, fosfato, e acetato.

15 15. Formulação de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o pH é de 5,0 a 7,0.

16. Formulação de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o pH é de 5,0 a 6,0.

17. Formulação de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que também compreende polissorbato 20 e/ou polissorbato 80.

20 18. Formulação de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o imunoc conjugado compreende um anticorpo humanizado selecionado do grupo consistindo em huMy9 - 6, huC242, huN901, DS6, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, e rituximab.

25 19. Formulação de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o imunoc conjugado compreende um fármaco citotóxico selecionado do grupo consistindo em um maitansinóide, um taxano, e um CC - 1065.

20. Formulação de imunoc conjugado, caracterizada pelo fato de que consiste essencialmente em:

30 (a) imunoc conjugado huN901 - DM1 em uma concentração de 0,5 - 10 mg/ml;

(b) 5 - 15 mM de histidina e/ou 5 - 15 mM de succinato;

(c) 0,1 - 10 % de sacarose e/ou 100 - 300 mM de glicina;

(d) 0,005 - 0,2% de polissorbato 80 e/ou 0,005 - 0,2% de polissorbato 20,

5 em que a formulação é uma solução tamponada aquosa tendo um pH de 5 – 6, e em que DM1 não é N2'-deacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, e em que a formulação não contém cloreto de sódio.

21. Formulação de imunoc conjugado, caracterizada pelo fato de que consiste essencialmente em:

10 (a) imunoc conjugado huC242 - DM4 em uma concentração de 0,5 - 10 mg/ml;

(b) 5 - 15 mM de histidina;

(c) 0,1 - 10 % de sacarose e/ou 100 - 300 mM de glicina;

(d) 0,005 - 0,2% de polissorbato 80 e/ou 0,005 - 0,2% de polissorbato 20;

15 em que a formulação é uma solução tamponada aquosa tendo um pH de 5 – 6, e em que DM4 não é N2'-deacetil-N2'-(4-metil-4-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, e em que a formulação não contém cloreto de sódio.

RESUMO

Patente de Invenção: **"FORMULAÇÕES DE IMUNOCONJUGADO LÍQUIDAS"**.

A presente invenção fornece uma formulação de imunoconjugado que é substancialmente livre de partículas, a formulação de imunoconjugado compreendendo: um imunoconjugado e um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em: sacarose, polissorbato 20, polissorbato 80, ciclodextrina, dextrose, glicerol, polietileno glicol, manitol, cloreto de sódio, e um aminoácido, em que a formulação é uma solução aquosa tampoadada tendo um pH de 4,5 a 7,6. A presente invenção também fornece uma formulação de imunoconjugado que é substancialmente livre de agregados, a formulação de imunoconjugado compreendendo: um imunoconjugado e um ou mais excipientes selecionados do grupo consistindo em histidina, sacarose, glicina e cloreto de sódio, em que a formulação é uma solução aquosa tamponada tendo um pH de 4,5 a 7,6. A presente invenção também fornece uma formulação de imunoconjugado que é substancialmente livre tanto de partículas quanto de agregados.