



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 616**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07765694 .0**

96 Fecha de presentación : **28.06.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2040749**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpo monoclonal antidiotípico anti-ca125 y aluminio.**

30 Prioridad: **29.06.2006 IT FI06A0163**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.08.2011

73 Titular/es: **MENARINI INTERNATIONAL
OPERATIONS LUXEMBOURG S.A.
1, avenue de la Gare
1611 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es: **Flemming, Jens;
Gröger, Karsten;
Schmitz, Reinhard y
Manzini, Stefano**

74 Agente: **Ruo Null, Alessandro**

ES 2 363 616 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpo monoclonal antiidiotípico anti-ca125 y aluminio

Campo de la invención

5 [0001] La invención se refiere al campo de las composiciones farmacéuticas que se van a usar como vacunas para aplicación parenteral.

Estado de la técnica

10 [0002] Como se sabe, con el fin de amplificar la inmunogenicidad de las vacunas profilácticas o terapéuticas, en general, se considera el uso de adyuvantes, tales como un compuesto de aluminio (Fiejka y col., Rocznik Hig 1993, 73-80) en la preparación de formas de dosificación farmacéutica como soluciones o suspensiones para administración parenteral. La diana de estas formulaciones debería ser inducir un efecto inmunogénico máximo y duradero. No obstante, hasta ahora se ha usado una cantidad limitada de adyuvantes de aluminio en vacunas registradas y comercializadas y, de hecho, en la Farmacopea Europea se ha establecido un límite de 1,25 mg/dosis.

[0003] Asimismo, la FDA, en el Título 21 del CFR 610.15, indica que la cantidad de aluminio en la dosis individual recomendada de un producto biológico no debe superar:

- 15 (1) 0,85 miligramos si se determina mediante ensayo; o
- (2) 1,14 miligramos si se determina mediante cálculo en base a la cantidad de compuesto de aluminio añadida; o
- (3) 1,25 miligramos determinados mediante ensayo, con la condición de que los datos demuestren que la cantidad de aluminio usada es segura y necesaria para producir el efecto previsto.

20 [0004] La inmunogenicidad de los anticuerpos adsorbidos sobre adyuvantes de aluminio parece depender del grado de adsorción (Capelle y col., Vaccine 2005, 1686-1694), pero no está claro cuál es la mejor proporción que se debe usar para conseguir una respuesta inmunogénica máxima manteniendo un perfil de seguridad. Por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda una adsorción sobre adyuvantes de aluminio a niveles de toxoides superiores al 80% para los toxoides del tétanos y de la difteria (Gupta y col., Vaccine 1995, 1263-1276; Serie de Informes Técnicos de la OMS N° 595, 1996, pág. 6). En contraste con ello, los datos demuestran que una adsorción de los componentes del tétanos sobre hidróxido de aluminio de niveles superiores al 80% no potenciaba la respuesta inmunitaria en adultos sanos (Paoletti y col., Infect Immun 2001, 6696-6701). El contenido más adecuado de un compuesto de aluminio para maximizar la inmunogenicidad (sin riesgo de efectos secundarios tóxicos inaceptables) de una vacuna que contiene anticuerpo monoclonal todavía es una cuestión técnica abierta.

25

30 [0005] Otro problema técnico es la estabilidad de las vacunas, que varía considerablemente. Pueden variar según su resistencia al almacenamiento a temperaturas elevadas, mostrando las vacunas con los toxoides de difteria y del tétanos y de la hepatitis B la mayor estabilidad térmica, las vacunas liofilizadas contra el sarampión, la fiebre amarilla y la BCG ocupando la posición central y siendo la vacuna oral contra la poliomielitis la más frágil (Galazka y col., Thermostability of vaccines, World Health Organisation, 1998). Las vacunas reconstituidas contra el sarampión, la fiebre amarilla y la tuberculosis (BCG) son vacunas inestables; deben usarse lo antes posible tras su reconstitución y conservarse en un baño de hielo durante la sesión de inmunización. Aunque las vacunas contra el tétanos y la difteria (p. ej., adsorbidas sobre sales de aluminio) como vacunas monovalentes o componentes de vacunas combinadas son estables durante semanas a 35-37°C, cada exposición a la temperatura ambiente da como resultado cierta degradación de la vacuna (Galazka y col., *vide supra*, pág. 48). Por tanto, también para estos tipos de vacunas "estables", se ha prescrito su almacenamiento en condiciones de frío (Rote Liste, Edition Cantor Verlag, 2005).

35

40 [0006] Un problema técnico no resuelto para este tipo de vacuna que contiene anticuerpos monoclonales es la baja estabilidad a temperaturas ambiente.

45 [0007] Debido a la naturaleza del principio activo de la proteína compleja, estos productos farmacológicos tienen que almacenarse en condiciones de frío (2-8°C) y requieren una cadena de frío constante. Esto produce costes de distribución más altos, altera el perfil de seguridad global y, posiblemente más importante, limita el uso mundial de fármacos altamente beneficiosos como una vacuna anticancerosa. Por tanto, el desarrollo de formulaciones de vacunas que garanticen una calidad constante del producto farmacológico incluso a temperaturas ambientales y superiores (25°C-37°C) mejoraría el perfil de seguridad y eficacia global de estos fármacos. Esto no sólo sería altamente beneficioso para los pacientes, sino que también facilitaría la manipulación global de estos valiosos fármacos.

50 [0008] Por otro lado, es bien conocida la importancia de la inmunoterapia en el tratamiento de los tumores en seres humanos y, en particular, del uso de anticuerpos monoclonales antiidiotípicos como vacunas terapéuticas contra tumores.

[0009] Dicha vacuna debería activar el sistema inmunitario en el huésped estimulando una respuesta humoral y celular contra el tumor.

5 **[0010]** El desarrollo y la definición de este tipo de formulación es particularmente importante para ACA125/MEN2234 (descrito en el documento EP700305), un anticuerpo monoclonal antiidiotípico muy prometedor destinado a usar como vacuna terapéutica contra el carcinoma de ovarios. El MEN2234 recibió el siguiente nombre de índice CA: inmunoglobulina G1, anti(OC125 de ratón) (cadena g del anticuerpo monoclonal de ratón ACA-125 clon 3D5), con disulfuro con la cadena k del anticuerpo monoclonal ACA-125 clon 3D5, dímero. El correspondiente número de registro CAS es 792921-10-9. El INN propuesto es Abagovomab.

[0011] La secuencia de aminoácidos de MEN 2234 se muestra más adelante en el presente documento.

10 **[0012]** El MEN2234 es un anticuerpo monoclonal murino generado contra el anticuerpo monoclonal murino OC125 que reconoce el antígeno asociado con tumores (AAT) CA125. MEN 2234 imita de forma eficaz la estructura tridimensional del AAT CA125 y, de este modo, induce en el huésped la producción de anticuerpos antiidiotípicos (Ab3) dirigidos contra las células tumorales que expresan el antígeno CA125. MEN 2234 también puede provocar en el huésped una respuesta inmunitaria celular dirigida específicamente contra las células tumorales CA125.

15 **[0013]** Aproximadamente el 80% de los pacientes con cáncer de ovarios en estado avanzado presentan una expresión elevada de CA125. Aunque el CA125 está sobreexpresado en el cáncer de ovarios, el organismo humano no puede producir por sí solo una respuesta inmunitaria eficaz contra estas células cancerosas. En su lugar, el tratamiento con una vacuna terapéutica que contiene MEN2234 debería ser capaz de revivir el sistema inmunitario del huésped para atacar y destruir las células diseminadas de cáncer de ovarios.

[0014] En el documento EP700305 se describieron los anticuerpos monoclonales antiidiotípicos anti-CA125, pero no se describe ninguna formulación farmacéutica específica adecuada para el tratamiento de enfermedades.

20 **[0015]** En Hybridoma, 1995, 14 (2), 164-174, se caracterizó el anticuerpo ACA-125, pero no se desarrolló ninguna formulación.

25 **[0016]** En Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1580-1587 se realizó la vacunación de pacientes con ACA125; no se divulgó indicación alguna sobre la concentración de aluminio en la formulación, pero un experto en la técnica, basándose en la técnica anterior, podría imaginar fácilmente una concentración relativamente baja de aluminio como adyuvante (inferior a 1,25 mg por dosis individual).

[0017] En Hybridoma, 2005, 133-140, se describe un sistema de liberación para la liberación endógena continua de ACA125hFc (una forma quimérica del ACA 125) para mejorar su inmunogenicidad como vacuna contra el cáncer de ovarios, pero se generó un depósito in vitro basado en la tecnología de bioencapsulación.

30 **[0018]** Otra publicación resume los resultados de estudios preclínicos y clínicos sobre vacunas para el cáncer de ovarios, incluido el MEN2234, pero no se mencionan datos concretos sobre la formulación ni sobre la concentración usada de los adyuvantes (p. ej., no se cita un compuesto de aluminio): Clinical Cancer Research, 2004, 1580-1587; Clinical Cancer Research, 2003, 3234-3240; Clinical Cancer Research, 2001, 1154-1162; Clinical Cancer Research, 2001, 1112-1115).

Descripción detallada de la invención

35 **[0019]** La invención reivindica una formulación farmacéutica para aplicación parenteral (preferentemente subcutánea o intramuscular) que contiene el anticuerpo monoclonal antiidiotípico MEN2234 adsorbido sobre un compuesto de aluminio seleccionado entre hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, y suspendido en un sistema acuoso tamponado.

40 **[0020]** El uso de concentraciones elevadas (muy por encima de las que normalmente se consideran y recomiendan) de un compuesto de aluminio como adyuvante proporciona una vacuna con ventajas clínicas y farmacéuticas inesperadas, tales como:

- I. garantía de una extraordinaria inmunogenicidad específica alta para las respuestas tanto humoral como celular
- II. garantía de una inducción y mantenimiento duraderos de una respuesta inmunitaria
- III. garantía de administración segura del fármaco;
- 45 IV. simplificación del procedimiento de fabricación y liberación del producto farmacológico final;
- V. aumento de la consistencia en los procedimientos de fabricación
- VI. mejora de la estabilidad del producto farmacológico también a intervalos de temperatura relevantes.

50 **[0021]** Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención contienen el anticuerpo antiidiotípico MEN2234 en una cantidad de 0,1 mg/ml a 4 mg/ml, preferentemente de 0,2 mg/ml a 2,5 mg/ml, incluso más preferentemente a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml (de 1,9 a 2,1 mg/ml). El anticuerpo MEN2234 se adsorbe sobre un compuesto de aluminio (preferentemente a una concentración de aproximadamente 3,5 mg/ml de

aluminio) y se suspende en una solución salina isotónica y tamponada. Las presentes composiciones no necesitan ningún otro ingrediente además del anticuerpo adsorbido sobre el compuesto de aluminio y las sales de los tampones, lo que tiene como resultado una solución muy sencilla que carece de cualquier problema de seguridad adicional que podría derivar del uso de otros agentes tales como estabilizantes, antioxidantes, otros adyuvantes etc.

5 [0022] Tampones preferidos son los obtenidos con sales fosfato o citrato.

[0023] La composición final contiene 1 ml del producto que se ha de administrar por vía parenteral, preferentemente mediante inyecciones subcutáneas o intramusculares.

10 [0024] Una de las principales características de la presente invención es que se requiere una concentración relativamente alta de un compuesto de aluminio, seleccionado entre fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio, para garantizar una adsorción casi completa de MEN2234 sobre el adsorbente; siendo el hidróxido de aluminio muy preferido (ref. Tabla 1).

15 [0025] La concentración preferida de aluminio Al⁺⁺⁺ en las composiciones está en el intervalo de 2,4-5,2 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 3,5 mg/ml (en el intervalo de 3,1-3,8 mg/ml), que corresponde a un contenido de hidróxido de aluminio en el intervalo de 0,7-1,5% peso/peso, preferentemente de aproximadamente 1% de peso/peso (en el intervalo de 0,9-1,1%).

Tabla 1: Dependencia de la adsorción de MEN2234 (proteína no adsorbida) de la concentración de aluminio (hidróxido de aluminio)

Concentración		Proteína no adsorbida [%]
Al ⁺⁺⁺ [mg/ml]	Al(OH) ₃ [%]	
0	0	100
0,9	0,25	78
1,2	0,36	59
1,7	0,5	30
2,6	0,75	<1,0
3,5	1,0	<0,1
6,9	2,0	<0,1

20 [0026] El contenido de 1% de hidróxido de aluminio corresponde a aproximadamente 3,5 mg de aluminio Al⁺⁺⁺ por ml, por tanto, muy por encima del contenido que se usa actualmente en las vacunas registradas y comercializadas y del recomendado generalmente por las autoridades.

25 [0027] Las presentes formulaciones pudieron prepararse de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica. Un procedimiento general que se puede usar es el siguiente. La fabricación del producto final se realizará mezclando la solución de anticuerpo y el adyuvante (un gel de compuesto de aluminio) en condiciones definidas. El producto farmacológico tiene que cumplir los requisitos de esterilidad de acuerdo con la monografía de la Farmacopea Europea "Preparaciones parenterales". En consecuencia, de acuerdo con los requisitos reguladores, el procedimiento de fabricación se llevará a cabo estrictamente en condiciones asépticas. Todos los ingredientes usados son de calidad estéril o se filtran a través de un filtro de 0,22 micrómetros en forma de una solución durante la fabricación.

30 [0028] Las formulaciones de acuerdo con la presente solicitud muestran un grupo consistente de ventajas.

I. Garantía de una extraordinaria inmunogenicidad específica alta para las respuestas tanto humoral como celular

35 [0029] Los inventores han demostrado que el tratamiento mensual (cuatro administraciones s.c. semanales) de la composición objeto de la presente invención puede inducir una respuesta humoral específica (anticuerpos específicos dirigidos contra MEN2234) en una cantidad dependiente de la concentración del compuesto de aluminio. De hecho, se ha demostrado que la cantidad de respuesta humoral provocada por la formulación con 1% de hidróxido de aluminio (Ejemplo 1) es significativamente superior a la provocada por una suspensión que contiene 0,36% de hidróxido de aluminio (correspondiente al límite indicado en la Farmacopea Europea y las normas de la FDA) o por una solución de MEN2234 en solución salina tamponada:

Tabla 2: Títulos plasmáticos de anticuerpos contra MEN2234 medidos en plasma de conejo tras 4 administraciones s.c. semanales

Formulación	Título de anticuerpos (ng/ml)
Solución de MEN 2234	907 ± 259
Suspensión de MEN 2234 en Al(OH) ₃ al 0,36%	3658 ± 1473
Suspensión de MEN 2234 en Al(OH) ₃ al 1,0%	15627 ± 5007*
*P < 0,05 frente a las otras dos condiciones (Ensayo de comparación múltiple de Bonferroni)	

5 **[0030]** Además, se llevó a cabo una evaluación histológica en los puntos de inyección para medir el reclutamiento de células inflamatorias y células presentadoras de antígeno necesarias para el establecimiento de una respuesta inmunitaria celular específica. Asimismo, para este parámetro, la respuesta a la formulación con 1% de hidróxido de aluminio (Ejemplo 1) fue considerablemente superior a la obtenida con una suspensión con un contenido menor de Al(OH)₃ (0,36%) o una solución de MEN2234 sin Al(OH)₃.

Tabla 3: Detección semicuantitativa de células inflamatorias en los puntos de inyección de conejos tratados semanalmente con las vacunas

Formulación	Densidad de células inflamatorias
Solución de MEN 2234	+/-
Suspensión de MEN 2234 en Al(OH) ₃ al 0,36%	++
Suspensión de MEN 2234 en Al(OH) ₃ al 1,0%	+++

II. Garantía de una inducción y mantenimiento duraderos de una respuesta inmunitaria

15 **[0031]** En conejos, los inventores han demostrado que tras la inmunización (4 inyecciones semanales) con la composición objeto del Ejemplo 1 se mantiene la respuesta inmunitaria durante más tiempo y que se pueden medir en plasma anticuerpos específicos incluso después de varias semanas. Por otro lado, cuando la inmunización se realiza con una suspensión de MEN2234 con una cantidad menor de Al(OH)₃ (0,36%) o con MEN2234 en solución sin adyuvante, la presencia de anticuerpos se puede detectar durante un periodo de tiempo más corto:

III. Garantía de administración segura del fármaco

20 **[0032]** La suspensión de MEN2234 objeto de la presente invención se ha administrado en conejos en forma de inyecciones s.c. a la dosis de 2 mg/ml durante hasta 26 semanas. El esquema de administración fue semanal durante el primer mes y, después, bisemanal durante el periodo restante. Se evaluó la tolerancia local y la seguridad sistémica. Incluso después de 15 tratamientos no se registraron efectos tóxicos en términos de: peso corporal, signos clínicos, consumo de alimentos, hematología, bioquímica clínica, histopatología de todos los órganos. En el punto de las inyecciones sólo se observó la respuesta inflamatoria e inmunológica como consecuencia de la acción farmacológica del fármaco.

25 **[0033]** Además, la presente invención, al permitir una cantidad reducida de anticuerpo murino libre, también disminuirá su absorción y su máximo en la circulación sistémica, lo que reduce el riesgo de reacción(es) anafiláctica(s).

IV. Simplificación del procedimiento de fabricación y liberación del producto farmacológico final

30 **[0034]** Aproximadamente un % de hidróxido de aluminio garantiza la unión completa de MEN2234 (<1% de anticuerpo no adsorbido). Esto tiene como resultado una adsorción y procedimiento de fabricación muy sólidos evitando la necesidad de realizar ensayos de liberación in vivo (respuesta inmunogénica en animales experimentales) como suele ser necesario para muchas vacunas que contienen aluminio, como la del tétanos y la difteria. La adsorción completa garantiza una presentación óptima del anticuerpo (Ab₂) al sistema inmunitario del huésped.

35 **[0035]** Investigaciones detalladas del mecanismo de adsorción de MEN1234-hidróxido de aluminio revelaron que se consigue una distribución estequiométrica casi ideal para ambas sustancias en una solución tamponada con fosfato. Esto garantiza, como se ha mencionado anteriormente, un procedimiento de fabricación simple y sólido debido a las propiedades de autoensamblaje de la invención. Ya después de 15 segundos de un mezclado moderado, el anticuerpo se ha adsorbido casi por completo sobre el hidróxido de aluminio (Tabla 4).

Tabla 4: Dependencia de la adsorción de MEN2234 del tiempo de mezclado (concentración de hidróxido de aluminio 1%)

Tiempo de mezclado [min:s]	Proteína no adsorbida [%]
0	100
0:10	0,20
0:30	0,20
1:100	0,15
5:00	0,20
15:00	0,03
240:00	0,10

5 Como se ve en la Tabla 1, con una concentración del adyuvante inferior al 0,75% no se pudo alcanzar la adsorción completa; concentraciones superiores al 1% (p. ej., 2%) no mostraron ninguna mejora.

10 [0036] La adsorción muy rápida y completa de MEN2234 sobre el compuesto de aluminio a concentraciones de adsorbente superiores a las recomendadas permite simplificar considerablemente la fabricación de la composición en forma de un fármaco. En un plazo de segundos, la formulación final se obtiene simplemente mezclando el anticuerpo monoclonal con el adyuvante. Esta etapa de mezclado se puede realizar de forma rutinaria usando equipos convencionales para procesamiento aséptico en centros farmacéuticos. Las características de autoensamblaje del sistema descrito conducen a perspectivas completamente nuevas en la fabricación y estabilización de la presente formulación, así como para anticuerpos monoclonales adsorbidos o vacunas en general. La adsorción completa de MEN2234 sobre el adyuvante de aluminio en segundos también pudo permitir la preparación de la suspensión final inmediatamente antes de la inyección s.c. o i.m. sólo mezclando las cantidades requeridas de sustancia farmacológica y de adyuvante de aluminio en el lugar de la aplicación final en los pacientes, por ejemplo en el hospital.

15 [0037] Por tanto, un aspecto concreto de la presente invención está representado por una forma en la que el principio activo de la vacuna (el anticuerpo MEN2234) y el adyuvante (el compuesto de aluminio, preferentemente hidróxido de aluminio) se conservan por separado y listos para mezclar justo antes de la inyección en el paciente. El momento preferido para esta etapa de mezclado debería ser entre 10 segundos y 10 minutos antes de la administración al paciente.

20 [0038] Para esta forma concreta, la composición se proporcionará con el anticuerpo y la solución del adyuvante por separado pero cargados en sistemas de envases farmacéuticos convencionales como viales, ampollas, jeringuillas precargadas o sistemas de dos cámaras adecuados para mezclar y/o reconstituir. El anticuerpo monoclonal no sólo se puede usar en forma de una solución en último término tamponada, sino también en forma de, por ejemplo, un polvo. La posibilidad de usar la sustancia farmacológica en forma sólida permite aplicar todas las técnicas destinadas a mejorar la estabilidad de los anticuerpos monoclonales o vacunas (liofilización, secado por pulverización, etc.). Esto representa un progreso significativo en la manipulación y una mejora de la estabilidad para todas las vacunas adsorbidas en general y, en particular, para aquéllas que contienen anticuerpos monoclonales tales como MEN2234. Se pueden evitar las principales desventajas de las vacunas adsorbidas como la necesidad de una cadena de frío permanente durante el envío y almacenamiento, y se puede aumentar el periodo de almacenamiento del producto farmacológico.

30 [0039] Como se ha mencionado, la actividad inmunogénica in vivo de las composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos monoclonales depende de un modo variable del grado de adsorción del anticuerpo sobre los adsorbentes usados (Capelle y col., Vaccine 2005, 1686 - 1694). Por tanto, un estado de la técnica es determinar la actividad inmunogénica biológica de las vacunas (adsorbidas) "in vivo" en animales antes de la liberación del producto farmacológico. La adsorción reproducible de MEN2234 sobre el adyuvante de aluminio simplifica significativamente el procedimiento de liberación. Debido a la fiabilidad de la adsorción, los ensayos de liberación solo podían recurrir a las pruebas in vitro para determinar la potencia de la composición. El procedimiento habitual para determinar también la actividad biológica "in vivo" en animales es, para la composición de la presente invención, redundante.

V. Mejora de la consistencia en la fabricación del producto farmacológico

40 [0040] La reproducibilidad en la adsorción de MEN2234 usando concentraciones mayores a las recomendadas de, por ejemplo, hidróxido de aluminio, mejora significativamente la consistencia de la fabricación de productos farmacológicos. Como se ha demostrado en la Tabla 5, si la concentración de hidróxido de aluminio en las formulaciones está en el intervalo de 0,7 a 2% en p/v, la adsorción de MEN2234 es completa (<1% de anticuerpo libre) para todos los lotes fabricados.

Tabla 5: Variabilidad de la adsorción de MEN 2234 (anticuerpo no adsorbido) sobre hidróxido de aluminio durante la fabricación

Concentración de hidróxido de aluminio [%]	Anticuerpo no adsorbido [%]	
	Ciclo I	Ciclo II
0	100	100
0,25	78	36
0,36	59	11
0,5	30	6
0,75	<1,0	<1,0
1,0	<0,1	<0,1
2,0	<0,1	<0,1

5 **[0041]** La adsorción completa y reproducible previene otras complicaciones temidas durante el procesamiento, tales como la formación de aglomerados de anticuerpos. Los anticuerpos en solución son susceptibles de formar agregados. La agregación de anticuerpos en solución puede estar inducida por un exceso de fuerzas de cizalladura en la fase líquida, por ejemplo durante la agitación. Estos agregados no se pueden volver a disolver, lo que produce una reducción significativa de la actividad biológica de la vacuna. No obstante, debido al proceso de adsorción completo y rápido, este fenómeno se puede evitar completamente para las composiciones objeto de la presente invención.

VI. Mejora de la estabilidad del producto farmacológico también a intervalos de temperatura relevantes

15 **[0042]** Sorprendentemente, la composición del ejemplo 1 es, con mucho, más estable (incluso a temperaturas de 25°C y 37°C) en comparación con la solución taponada de MEN2234. Este sencillo aunque eficaz medio (el incremento de la concentración de hidróxido de aluminio hasta 2 ó 3 veces la dosis recomendada) asegura una unión casi completa y, en consecuencia, también la estabilidad. En la Tabla 6 se presentan datos de estabilidad relevantes para MEN2234 en solución y formulado de acuerdo con el ejemplo 1.

Tabla 6: Datos de estabilidad para MEN2234 en solución y adsorbido sobre hidróxido de aluminio

Producto de ensayo	Condición de almacenamiento [°C]	Producto [%] después de tiempo de almacenamiento (meses)		
		0	1	2
Solución de MEN2234, lote K2CL73-95	25	100,0	90,2	88,6
	37	100,0	88,9	89,1
MEN2234 adsorbido sobre hidróxido de aluminio al 1%, lote 287-2p42	25	100,0	102,1	98,7
	37	100,0	98,7	100,4

En consecuencia, la invención garantiza la estabilidad y actividad requeridas para el anticuerpo a temperaturas corporales relevantes (36-37°C) tras la administración en seres humanos.

20 **Ejemplos**

[0043] Ejemplos no limitantes de la invención incluyen los siguientes:

Ejemplo 1: suspensión para inyección

[0044]

Ingrediente	mg/ml
MEN2234	2,00
Al(OH) ₃ *	10,00
KCl	0,20
KH ₂ PO ₄	0,20
NaCl	8,00
Na ₂ HPO ₄ X 7 H ₂ O	2,16
Agua para inyectables	hasta 1,00 ml
*usado para fabricar hidróxido de aluminio hidratado para adsorción. La composición se preparó de acuerdo con procedimientos convencionales como se ha descrito anteriormente, simplemente mezclando MEN2234 con una suspensión de hidróxido de aluminio, hidrato, en una solución tamponada con las sales relevantes.	

Ejemplo 2: suspensión para inyección

[0045]

Ingrediente	mg/ml
MEN2234	2,00
Al(OH) ₃ *	7,50
KCl	0,20
KH ₂ PO ₄	0,20
NaCl	8,00
Na ₂ HPO ₄ X 7 H ₂ O	2,16
Agua para inyectables	hasta 1,00 ml
*usado para fabricar hidróxido de aluminio hidratado para adsorción preparado como para el ejemplo 1	

5

Ejemplo 3: suspensión para inyección

[0046]

Ingrediente	mg/ml
MEN2234	2,00
AlPO ₄	10,00
KH ₂ PO ₄	0,20
NaCl	9,00
Na ₂ HPO ₄ X 7 H ₂ O	1,20
Agua para inyectables	hasta 1,00 ml

Preparada como para el ejemplo 1

Ejemplo 4: Determinación de la secuencia de aminoácidos de MEN2234 (abagovomab).

[0047]

SEC ID Nº1

5 Secuencia de la cadena pesada

```

QVQXQQSGAE XARPGASVKX SCKASGYTFT NYWMQWVKQR PGQGDWDXGA XYPGDGNTRY 60
TQKFKGKATX TADKSSSTAY MQXSSXASED SAVYYCARGE GNYAWFAYWG QGTXTVTSAA 120
KTTPPSVYPX APGSAAQTNS MVTXGCXVKG YFPEPVTITW NSGSXSSGVH TFPVAVXQSDX 180
YTXSSSVTVP SSTWPSETVT CNVAHPASST KVDKXVPRD CGCKPCXCTV PEVSSVFXFP 240
PKPKDVXTXT XTPKVTCVVV DXSKDDPEVQ FSWFVDDVEV HTAQTQPREE QFNSTFRSVS 300
EXPXMHQDWX NGKEFKCRVN SAAFPAPXEK TXSKTKGRPK APQVYTXPPP KEQMAKDKVS 360
XTCMXTDFFP EDXTVEWQWN GQPAENYKNT QPXMDDTGSY FVYSKXNVQK SNWEAGNIFT 400
CSVXHEGXHN HHTEKSXSHS PGK
    
```

SEC ID Nº 2

Secuencia de la cadena ligera

```

DIQMTQSPAS LSAŠVGETVT XTCRASENXY SYXAWHQQKQ GKSPQXXVYN AKTXAGGVSS 60
RFSGSGSGTH FSXKXKXQP EDFGXYYCQH HYGXFPTFGG GTKXEXKRAD AAPTVSXFPP 120
SSEQXTSGGA SVVCFXNNFY PKDXNVKWKX DGSERQNGVX NSWTDQDSKD STYMSSTXT 180
XTKDEYERHN SYTCEATHKT STSPXVKSFN RNEC
    
```

10 **[0048]** Una primera parte de la determinación de la secuencia de aminoácidos en abagovomab se realizó usando técnicas de secuenciación automática de acuerdo con el procedimiento de degradación de Edman, en un secuenciador de proteínas en el que abagovomab se unió de forma covalente a la membrana de secuenciación (primeros 15 aminoácidos de la cadena ligera).

15 **[0049]** Dado que la secuenciación automática de Edman no pudo producir ningún dato de secuencia de la cadena pesada, lo que sugiere la existencia de una modificación del grupo en el extremo N de la cadena pesada a ácido piroglutámico, para una secuenciación más extendida se usaron las bien conocidas técnicas de secuenciación mediante CL/EM/EM utilizando espectrometría de masas (p. ej., Proc. Natl Acad Sci USA, 1986 Sep Sep, 83(17), 6233-6237).

20 **[0050]** Brevemente, las diferentes muestras de anticuerpos se fragmentaron con distintas enzimas proteolíticas antes del análisis mediante CL/EM/EM y se obtuvieron varias series de fragmentos de secuencias superpuestos. Encontrando el esquema de superposición de estos fragmentos fue posible determinar la secuencia total de la cadena ligera del anticuerpo (las secuencias de aminoácidos completas de la cadena pesada y de la cadena ligera se muestran en la SEC ID Nº 1 y la SEC ID Nº 2).

25 **[0051]** Como comprobación final de la fiabilidad de los resultados experimentales, las secuencias indicadas también se verificaron mediante análisis de similitud de secuencia con el paquete de software BLAST frente a una base de datos de proteínas no redundantes optimizada para análisis proteico (MSDB, descarga de marzo de 2007 del sitio ftp del Instituto Europeo de Bioinformática).

[0052] Dado que en la espectrometría de masas es imposible distinguir entre isoleucina y leucina, en la figura 1 esta indecisión se representa con una "X".

LISTADO DE SECUENCIAS

30 **[0053]**

<110> Menarini International operations Luxembourg SA

<120> Composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpo monoclonal antiidiotípico anti-CA125 y aluminio

<130> 7626 PTWO

<150> FI2006A000163

35 <151> 2006-06-29

<160> 2

<170> Patentin versión 3.3

- <210> 1
- <211> 443
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
- <223> Anticuerpo monoclonal
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (4) .. (4)
- 10 <223> X es Leu o Ile
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (11) .. (11)
- <223> X es Leu o Ile
- 15 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (20).. (20)
- <223> X es Leu o Ile
- <220>
- 20 <221> MISC_FEATURE
- <222> (45).. (45)
- <223> X es Leu o Ile
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 25 <222> (48).. (48)
- <223> X es Leu o Ile
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (51).. (51)
- 30 <223> X es Leu o Ile
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (70).. (70)
- <223> X es Leu o Ile
- 35 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (83).. (83)

<223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (86).. (86)
 5 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (114) .. (114)
 <223> X es Leu o lle
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (130) .. (130)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (144) .. (144)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (147) .. (147)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (165) .. (165)
 25 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (176) .. (176)
 <223> X es Leu o lle
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (180) .. (180)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (183) .. (183)
 <223> X es Leu o lle

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (216) .. (216)
 <223> X es Leu o lle
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (227) .. (227)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (238) .. (238)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (247) .. (247)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (249) .. (249)
 20 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (251) .. (251)
 <223> X es Leu o lle
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (262) .. (262)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (302) .. (302)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (304) .. (304)
 <223> X es Leu o lle
 <220>

- <221> MISC_FEATURE
 - <222> (310) .. (310)
 - <223> X es Leu o lle
 - <220>
- 5

 - <221> MISC_FEATURE
 - <222> (328) .. (328)
 - <223> X es Leu o lle
 - <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 10

 - <222> (332) .. (332)
 - <223> X es Leu o lle
 - <220>
- <221> MISC_FEATURE
 - <222> (347) .. (347)
- 15

 - <223> X es Leu o lle
 - <220>
- <221> MISC_FEATURE
 - <222> (361) .. (361)
 - <223> X es Leu o lle
- 20

 - <220>
- <221> MISC_FEATURE
 - <222> (365) .. (365)
 - <223> X es Leu o lle
 - <220>
- 25

 - <221> MISC_FEATURE
 - <222> (373) .. (373)
 - <223> X es Leu o lle
 - <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 30

 - <222> (393) .. (393)
 - <223> X es Leu o lle
 - <220>
- <221> MISC_FEATURE
 - <222> (406) .. (406)
- 35

 - <223> X es Leu o lle
 - <220>
- <221> MISC_FEATURE

<222> (424) .. (424)

<223> X es Leu o lle

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (428) .. (428)

<223> X es Leu o lle

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (437) .. (437)

10 <223> X es Leu o lle

<400> 1

ES 2 363 616 T3

Gln Val Gln Xaa Gln Gln Ser Gly Ala Glu Xaa Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Xaa Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Xaa Asp Trp Xaa
 35 40 45

Gly Ala Xaa Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Xaa Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Xaa Ser Ser Xaa Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Glu Gly Asn Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Xaa Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
 115 120 125

Pro Xaa Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Xaa
 130 135 140

Gly Cys Xaa Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Xaa Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Xaa
 165 170 175

Gln Ser Asp Xaa Tyr Thr Xaa Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Xaa Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys
 210 215 220

Pro Cys Xaa Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Xaa Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Val Xaa Thr Xaa Thr Xaa Thr Pro Lys Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Xaa Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser
 260 265 270

Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Xaa Pro Xaa
 290 295 300

Met His Gln Asp Trp Xaa Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn
 305 310 315 320

Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Xaa Glu Lys Thr Xaa Ser Lys Thr Lys
 325 330 335

Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Xaa Pro Pro Pro Lys Glu
 340 345 350

Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Xaa Thr Cys Met Xaa Thr Asp Phe
 355 360 365

Phe Pro Glu Asp Xaa Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala
 370 375 380

Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Xaa Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr
 385 390 395 400

Phe Val Tyr Ser Lys Xaa Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly
 405 410 415

Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Xaa His Glu Gly Xaa His Asn His His
 420 425 430

Thr Glu Lys Ser Xaa Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 2

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo monoclonal

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (21).. (21)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29).. (29)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (33).. (33)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (46).. (47)
 15 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221>MISC_FEATURE
 <222> (54).. (54)
 <223> X es Leu o lle
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73).. (73)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (75).. (75)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (78).. (78)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (85).. (85)
 35 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (94).. (94)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (104) .. (104)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106) .. (106)
 10 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (117) .. (117)
 <223> X es Leu o lle
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (125) .. (125)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (136) .. (136)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (144) .. (144)
 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (150) .. (150)
 30 <223> X es Leu o lle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (160) .. (160)
 <223> X es Leu o lle
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (179) .. (179)

<223> X es Leu o lle

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (181) .. (181)

5 <223> X es Leu o lle

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (205) .. (205)

<223> X es Leu o lle

10 <400> 2

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Glu	Thr	Val	Thr	Xaa	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Xaa	Tyr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Xaa	Ala	Trp	His	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Xaa	Xaa	Val
		35					40					45			
Tyr	Asn	Ala	Lys	Thr	Xaa	Ala	Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	His	Phe	Ser	Xaa	Lys	Xaa	Lys	Ser	Xaa	Gln	Pro
	65				70					75					80
Glu	Asp	Phe	Gly	Xaa	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Tyr	Gly	Xaa	Phe	Pro
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Xaa	Glu	Xaa	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala
			100					105					110		
Pro	Thr	Val	Ser	Xaa	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Xaa	Thr	Ser	Gly
		115					120					125			
Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Xaa	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Xaa
	130					135					140				
Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Xaa	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val	Xaa
					150					155					160

ES 2 363 616 T3

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Xaa Thr Xaa Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Xaa Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para administración parenteral como vacuna, que comprende un anticuerpo monoclonal y como adyuvante un derivado de aluminio a una concentración comprendida entre 2,4 y 5,2 mg/ml de ion de aluminio, en la que
- 5 - dicho anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal antiidiotípico anti-CA-125 MEN2234 que comprende la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2, y está presente en una cantidad de 0,1-4 mg/ml y adsorbido sobre el derivado de aluminio; y
- dicho compuesto de aluminio se escoge entre hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, y se suspende en un sistema acuoso tamponado;
- 10 **que se caracteriza por que** dicha composición farmacéutica contiene 1 ml del producto que se va a administrar.
2. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el derivado de aluminio está en una concentración comprendida entre 3,1–3,8 mg/ml de ion de aluminio.
3. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el compuesto de aluminio es hidróxido de aluminio.
- 15 4. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el MEN2234 está presente en una cantidad de 0,2-2,5 mg/ml.
5. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el MEN2234 está presente en una cantidad de 1,9-2,1 mg/ml.
- 20 6. Composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en la que el MEN2234 se adsorbe sobre el compuesto de aluminio y se suspende en una solución salina tamponada e isotónica.
7. Composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, en forma de una suspensión líquida adecuada para administración parenteral.
8. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, adecuada para administración subcutánea o intramuscular.
- 25 9. Composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, seleccionada entre las siguientes:
- a) MEN2234 2,00 mg/ml, Al(OH)₃ 10,00 mg/ml, KCl 0,20 mg/ml, KH₂PO₄ 0,20 mg/ml, NaCl 8,00 mg/ml, Na₂HPO₄ .7 H₂O 2,16 mg/ml, agua para inyectables hasta 1,00 ml
- b) MEN2234 2,00 mg/ml, Al(OH)₃ 7,50 mg/ml, KCl 0,20 mg/ml, KH₂PO₄ 0,20 mg/ml, NaCl 8,00 mg/ml, Na₂BPO₄ .7 H₂O 2,16 mg/ml, agua para inyectables hasta 1,00 ml
- 30 c) MEN2234 2,00 mg/ml, AIPO₄ 10,00 mg/ml, KH₂PO₄ 0,20 mg/ml, NaCl 9,00 mg/ml, Na₂HPO₄ 7 H₂O 1,20 mg/ml, agua para inyectables hasta 1,00 ml
10. Composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-9 para uso como vacuna antitumoral para el tratamiento o la prevención de tumores.
- 35 11. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 como vacuna antitumoral para el tratamiento de tumores en los ovarios.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tomado especial cuidado en la compilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

5 -EP 700305 [0010]

Documentos de patentes no citados en la descripción

-Flejka et al. Rocznik Panstw Zakl Hig, 1993, 73-80 [0002]

-Capelle et al. Vaccine, 2005, 1686-1694 [0004] [0039]

-Gupta et al. Vaccine, 1995, 1263-1276 [0004]

10 -WHO Technical Report Series No. 595, 1996, 6 [0004]

-Paoletti et al. Infect Immun, 2001, 6696-6701 [0004]

-Galazka et al. Thermostability of vaccines. World Health Organisation, 1998 [0005]

-Rote Liste. Edition Cantor Verlag, 2005 [0005]

-Hybridoma, 1995, vol. 14 (2) 164-174 [0015]

15 -Clinical Cancer Research, 2004, vol. 10, 1580-1587 [0016]

-Hybridoma, 2005, 133-140 [0017]

-Clinical Cancer Research, 2004, 1580-1587 [0018]

-Clinical Cancer Research, 2003, 3234-3240 [0018]

-Clinical Cancer Research, 2001, 1154-1162 [0018]

20 -Clinical Cancer Research, 2001, 1112.1115 [0018]

-Proc. Natl Acad Sci USA, September 1986, vol. 83 (17) 6233-6237 [0049]