

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 134**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027868**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14143765**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14722450 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2968588**

54 Título: **Formulaciones de conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361790490 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.10.2019

73 Titular/es:

**ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO. KG (50.0%)
Max-Planck-Ring 2a
65205 Wiesbaden, DE y
ABBVIE INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TSCHOEPE, MARKUS;
KALETA, KATHARINA y
KUMAR, VINEET**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 727 134 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

Formulaciones de conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR

Introducción

5 El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (también conocido como HER-1 o Erb-B1, y denominado en la presente memoria "EGFR") es un receptor transmembranario de 170 kDa codificado por el protooncogén c-erbB y exhibe actividad de tirosina cinasa intrínseca (Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)). La entrada en la base de datos SwissProt P00533 proporciona la secuencia del EGFR. El EGFR regula numerosos procesos celulares a través de vías de transducción de señal mediadas por

10 tirosina cinasa que incluyen, pero no se limitan a, activación de vías de transducción de señal que controlan la proliferación celular, diferenciación, supervivencia, apoptosis, angiogénesis, mitogénesis y metástasis celular (Atalay et al., Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Tsao and Herbst, Signal 4:4-9 (2003); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)).

15 Se ha divulgado la sobreexpresión de EGFR en numerosas afecciones malignas humanas que incluyen cánceres de vejiga, cerebro, vías respiratorias y digestivas altas, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata y riñón. (Atalay et al., Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002) Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). En muchas de estas afecciones, la sobreexpresión de EGFR se correlaciona o está asociada con un mal pronóstico de los pacientes. (Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002) Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). El EGFR también se expresa en las células de tejidos normales, particularmente

20 en los tejidos epiteliales de la piel, hígado y tracto gastrointestinal, aunque generalmente en niveles más bajos que en las células malignas (Herbst y Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)).

Una proporción significativa de tumores que contienen amplificaciones del gen de EGFR (es decir, múltiples copias del gen de EGFR) también coexpresa una versión truncada del receptor (Wikstrand et al. (1998) J. Neurovirol. 4, 148-158) conocida como EGFR de2-7, ΔEGFR o Δ2-7 (los términos se usan de manera intercambiable en la presente memoria) (Olapade-Olaopa et al. (2000) Br. J. Cancer. 82, 186-94). La redistribución observada en el

25 EGFR de2-7 resulta en un ARNm maduro dentro del marco que carece de 801 nucleótidos que abarcan los exones 2-7 (Wong et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 2965-9; Yamazaki et al. (1990) Jpn. J. Cancer Res. 81, 773-9; Yamazaki et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 1816-20; Sugawa et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 8602-6). La proteína de EGFR correspondiente tiene una eliminación de 267 aminoácidos que comprenden los residuos 6-273 del dominio extracelular y un nuevo residuo glicina en la unión de la fusión (Sugawa et al., 1990). Esta

30 eliminación, junto con la inserción de un residuo glicina, produce un péptido de unión único en la interfaz de la eliminación (Sugawa et al., 1990).

Se ha divulgado que el EGFR de2-7 se encuentra en varios tipos de tumores incluidos glioma, de mama, pulmón, ovario y próstata (Wikstrand et al. (1997) Cancer Res. 57, 4130-40; Olapade-Olaopa et al. (2000) Br. J. Cancer. 82, 186-94; Wikstrand, et al. (1995) Cancer Res. 55, 3140-8; Garcia de Palazzo et al. (1993) Cancer Res. 53, 3217-20).

35 Aunque este receptor truncado no se une al ligando, posee baja actividad constitutiva e imparte una ventaja de crecimiento significativa a las células de glioma que se cultivan como xenoinjertos tumorales en ratones limpios (Nishikawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7727-31) y es capaz de transformar células NIH3T3 (Batra et al. (1995) Cell Growth Differ. 6, 1251-9) y células MCF-7. Los mecanismos celulares usados por el EGFR de2-7 en células de glioma no están completamente definidos, pero se ha divulgado que incluyen una disminución de la

40 apoptosis (Nagane et al. (1996) Cancer Res. 56, 5079-86) y una pequeña mejora de la proliferación (Nagane et al., 1996).

Dado que la expresión de este receptor truncado está restringida a células tumorales, representa una diana altamente específica para tratamiento con anticuerpos. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de anticuerpos anti-EGFR y formulaciones que puedan proporcionar un tratamiento eficaz a aquellos que lo necesitan.

45 Los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) representan una nueva clase de productos terapéuticos que comprenden un anticuerpo conjugado con un fármaco citotóxico a través de un enlazador químico. Actualmente se están evaluando varios ADC en ensayos clínicos, incluidos trastuzumab (Herceptina (anticuerpo anti-HER2) enlazado a DM1; Genentech / Roche) y glebatumumab vedotin (CDX-011; un anticuerpo anti-GPNMB enlazado a MMAE; Celldex Therapeutics). El concepto terapéutico de los ADC es usar un anticuerpo como un

50 vehículo para suministrar un fármaco citotóxico a una célula tumoral por medio de la unión a un antígeno superficial diana. Los ADC tienen estructuras más complejas y heterogéneas que los anticuerpos no conjugados. Por consiguiente, los ADC presentan un desafío para la formulación con fines terapéuticos.

La patente US 2005/232929 describe métodos para detectar, filtrar y cuantificar muestras biológicas después de la administración de conjugados de anticuerpo, anticuerpos y fragmentos y metabolitos de estos, mediante separación

55 por afinidad, cromatografía y espectrometría de masas.

Compendio de la invención

- La presente invención proporciona formulaciones que comprenden conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC) anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y dichas formulaciones para su uso en métodos para tratar trastornos que requieren tratamiento con un ADC anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR), tales como el cáncer. La presente invención y las realizaciones de esta se exponen en las reivindicaciones adjuntas.
- La invención proporciona una formulación que comprende un conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un azúcar, histidina y un tensioactivo, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5 - 7, y en donde el ADC anti-EGFR comprende un anticuerpo anti-EGFR conjugado con una auristatina, en donde el anticuerpo anti-EGFR comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones de dominio de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 20, 21 y 22.
- En una realización, la formulación está liofilizada.
- En una realización, la formulación comprende un tensioactivo que es un polisorbato, p. ej., polisorbato 80, o un poloxámero. En una realización, la formulación comprende 0,05-0,15 mg/ml de un polisorbato.
- En otra realización, la formulación comprende aproximadamente 60-80 mg/ml de un azúcar. En una realización, el azúcar se selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol, sacarosa y trehalosa.
- En una realización, la formulación de la invención comprende aproximadamente 5-25 mM de histidina.
- En una realización, la formulación está liofilizada y el azúcar es sacarosa. En otra realización de la invención, la formulación liofilizada no comprende ácido lactobiónico. En otra realización de la invención, la formulación liofilizada no comprende un ácido de azúcar.
- En una realización, la formulación de la invención es acuosa y comprende aproximadamente 1-40 mg/ml del ADC anti-EGFR.
- En una realización adicional, la formulación de la invención comprende 1-150 mg del ADC anti-EGFR. En una realización, la formulación de la invención comprende 90-110 mg del ADC anti-EGFR.
- En una realización, la formulación de la invención tiene un pH de aproximadamente 5 a 7. En una realización adicional, la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,5 a 6,5.
- En una realización, la auristatina es Monometilauristatina F (MMAF). En una realización, la formulación de la invención comprende el ADC anti-EGFR que comprende el anticuerpo anti-EGFR conjugado con Monometilauristatina F (MMAF). En otra realización, la MMAF se conjuga con el anticuerpo con un enlazador de maleimidocaproilo.
- La invención proporciona, además, una formulación liofilizada que comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que comprende el anticuerpo anti-EGFR conjugado con una auristatina, un azúcar, p. ej., sacarosa, un tensioactivo, p. ej., un polisorbato, tal como polisorbato 80 e histidina. En una realización, la formulación liofilizada comprende 1-20 mg de histidina, aproximadamente 320-410 mg de un azúcar, aproximadamente 0,1 a 0,9 mg de un tensioactivo, y aproximadamente 1-150 mg del ADC anti-EGFR.
- La invención también proporciona una formulación acuosa que comprende aproximadamente 1 - 100 mg/ml del conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que comprende el anticuerpo anti-EGFR conjugado con una auristatina, aproximadamente 1 - 10 mg/ml de histidina, aproximadamente 50 - 90 mg/ml de un azúcar, p. ej., sacarosa y aproximadamente 0,01 - 0,2 mg/ml de un tensioactivo, p. ej., polisorbato 80.
- En una realización, la formulación de la invención comprende el ADC anti-EGFR en donde el anticuerpo anti-EGFR está humanizado.
- En otra realización, la formulación de la invención comprende un ADC anti-EGFR en donde el anticuerpo anti-EGFR comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 18.
- En otra realización, la formulación de la invención comprende un ADC anti-EGFR en donde el anticuerpo anti-EGFR comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID

NO: 13, una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos según se expone en la SEQ ID NO: 14, una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18, y una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos según se expone en la SEQ ID NO: 19.

5 La formulación de la invención comprende un ADC anti-EGFR en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones de dominio de complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 20, 21 y 22.

10 En otra realización de la invención, el ADC anti-EGFR comprende CDR (es decir, CDR1, CDR2, CDR3 de cadena ligera) descritas en la región variable de cadena ligera expuesta en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, y CDR (es decir, CDR1, CDR2, CDR3 de cadena pesada) descritas en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

15 La invención proporciona, además, una formulación liofilizada que comprende sacarosa, polisorbato 80 e histidina, y en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones de dominio de complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 20, 21 y 22. En una realización, la formulación comprende 1-110 mg del ADC anti-EGFR.

20 En una realización, la formulación de la invención contiene una mezcla de ADC que comprende ADC anti-EGFR que tienen una DAR promedio de aproximadamente 3 o una mezcla de ADC que comprende ADC anti-EGFR que tienen una DAR de aproximadamente 2-4.

25 En una realización, la formulación de la invención comprende un ADC anti-EGFR que comprende un anticuerpo anti-EGFR conjugado con monometil auristatina F (MMAF), en donde dicho ADC 1-MMAF comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones de dominio de complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 20, 21 y 22, sacarosa, histidina y polisorbato 80, en donde la formulación comprende una mezcla de ADC que tiene una DAR promedio de aproximadamente 3 o una mezcla de ADC que tiene una DAR de aproximadamente 2-4. En una realización adicional, el anticuerpo anti-EGFR se enlaza a MMAF a través de un enlazador maleimidocaproilo. En una realización adicional, el anticuerpo anti-EGFR comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18.

35 En una realización, la formulación de la invención comprende un ADC anti-EGFR que comprende un anticuerpo anti-EGFR conjugado con monometil auristatina E (MMAE), en donde dicho ADC 1-MMAE comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones de dominio de complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 20, 21 y 22, sacarosa, histidina y polisorbato 80, en donde la formulación comprende una mezcla de ADC que tiene una DAR promedio de aproximadamente 3 o una mezcla de ADC que tiene una DAR de aproximadamente 2-4. En una realización adicional de la invención, la formulación está liofilizada. En una realización adicional, el anticuerpo anti-EGFR comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18.

45 En una realización, la formulación de la invención es una formulación farmacéutica.

La invención también presenta un método para preparar una formulación, en donde el método comprende liofilizar una formulación acuosa que tiene un pH que varía de aproximadamente 5 a 7 y que comprende 1-20 mg de histidina, aproximadamente 320-410 mg del azúcar, aproximadamente 0,1 a 0,9 mg del tensioactivo y aproximadamente 1-150 mg del ADC anti-EGFR.

50 En aún un aspecto adicional, la presente invención proporciona las formulaciones de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno que requiere tratamiento con el ADC anti-EGFR. En una realización, el trastorno que requiere tratamiento con el ADC anti-EGFR es cáncer, p. ej., glioblastoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas, cáncer de mama, tumores de células escamosas, cáncer anal, cáncer de piel y cáncer vulvar.

En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar tumores sólidos que probablemente sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el cáncer de pulmón no microcítico escamoso (NSCLC, por sus siglas en inglés).

- 5 En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un cáncer seleccionado del grupo que consiste en tumores escamosos (incluidos tumores escamosos de pulmón, de vías respiratorias y digestivas altas, de cuello uterino, etc.), glioblastoma, glioma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas, cáncer de mama, tumores de células escamosas, cáncer anal, cáncer de piel y cáncer vulvar.

En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar el glioblastoma multiforme.

- 10 En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un tumor sólido que tiene sobreexpresión de EGFR. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar a un sujeto que tiene un tumor sólido avanzado que probablemente sobreexpresa EGFR.

En una realización, las formulaciones de la invención se administran por vía intravenosa.

La invención también proporciona kits que comprenden las formulaciones descritas en la presente memoria.

- 15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que muestra la estructura de la MMAE acoplada a un anticuerpo de interés (mAb) mediante un enlazador (enlazadores GN + Auristatina: vcMMAE).

La Figura 2 es un diagrama que muestra la estructura de la MMAF acoplada a un anticuerpo de interés (mAb) mediante un enlazador (enlazadores + Auristatina: mcMMAF).

- 20 La Figura 3 (A y B) representa gráficamente el inicio de temperatura de despliegue según se determina mediante fluorescencia dinámica de barrido (A) y calorimetría diferencial de barrido (B). ♦ anticuerpo 1; ■ Conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) 1- MMAF; ▲ ADC 1- MMAE.

- 25 La Figura 4 (A y B) representa gráficamente la presencia de elementos no estructurados en el anticuerpo 1, ADC 1- MMAF y ADC 1 - MMAE usando Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) (A) y dicroísmo circular de ultravioleta cercano (CD, por sus siglas en inglés) (B). ♦ anticuerpo 1; ■ ADC 1- MMAF; ▲ ADC 1- MMAE.

La Figura 5 representa gráficamente la propensión a la aglomeración de ADC 1- MMAE en concentraciones bajas, en comparación con ADC 1- MMAF y el anticuerpo 1.

- 30 La Figura 6 representa gráficamente la propensión a la aglomeración de ADC 1- MMAE en concentraciones altas, en comparación con ADC 1- MMAF y el anticuerpo 1.

La Figura 7 muestra un esquema del ensayo de estabilidad en suero y describe la estabilidad en suero *in vitro* de varias moléculas, incluido el anticuerpo 1, el ADC 1- MMAF y ADC 1-MMAE.

- 35 La Figura 8 (A y B) representa gráficamente la estabilidad en congelamiento/descongelamiento, indicada por el porcentaje de monómero presente, según se determina mediante SEC entre formulaciones de anticuerpo 1, ADC 1- MMAF y ADC 1-MMAE en 15 mM de tampón de histidina a pH 5,75 (A) y 1 mg/ml pH 7,0 10 mM de citrato y 10 mM de tampón de fosfato.

La Figura 9 (A y B) es un gráfico que cuantifica la formación de partículas subvisibles durante el congelamiento-descongelamiento, según se determina mediante generación de imágenes por microflujo (MFI, por sus siglas en inglés).

- 40 Descripción detallada

I. Definiciones

Para que la presente invención se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Además, cabe señalar que cada vez que se menciona un valor o intervalo de valores de un parámetro, se pretende que los valores e intervalos intermedios de los valores mencionados también se consideren parte de la presente invención.

- 45 Los términos "conjugado de fármaco y anticuerpo anti-factor de crecimiento epidérmico" o "conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR" y "ADC anti-EGFR", usados de manera intercambiable en la presente memoria, se refieren a un conjugado de fármaco y anticuerpo que comprende un anticuerpo que se une específicamente a EGFR, por el cual el anticuerpo se conjuga con un fármaco, *p. ej.*, un agente citotóxico tal como auristatina (*p. ej.*, monometil

- auristatina F). En una realización, el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR es el ADC 1-MMAF, que es el anticuerpo 1 conjugado con MMAF a través de una ligadura de maleimidocaproilo (mc). Las secuencias de aminoácidos correspondientes a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 1 se proporcionan en las SEQ ID NO: 13 a 22. A menos que se especifique de cualquier otra manera, el término "ADC1-MMAF", según se usa en la presente memoria, incluye ADC1-MMAF purificado (también denominado en la presente ADC1-MMAFp).
- 5 El término "auristatina", según se usa en la presente memoria, se refiere a una familia de agentes antimetabólicos. Los derivados de auristatina también se incluyen dentro de la definición del término "auristatina". Los ejemplos de auristatinas incluyen, pero no se limitan a, auristatina E (AE), monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF) y análogos sintéticos de dolastatina.
- 10 El término "anticuerpo anti-EGFR" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a EGFR. Un anticuerpo "que se une a" un antígeno de interés, es decir, EGFR, es uno capaz de unirse a dicho antígeno con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil para dirigirse a una célula que expresa el antígeno.
- El término "mezcla de ADC", según se usa en la presente memoria, se refiere a una composición que contiene una distribución de DAR heterogénea de los ADC. En una realización, una mezcla de ADC contiene ADC anti-EGFR que tienen una distribución de DAR de 1 a 8, p. ej., 2, 4, 6 y 8 (es decir, especies cargadas de fármaco de 2, 4, 6 y 8). En otra realización, una mezcla de ADC contiene ADC anti-EGFR que tienen DAR menores que 4, p. ej., una DAR de 2-4. Cabe señalar que pueden surgir productos de degradación de manera que también se pueden incluir DAR de 1, 3, 5 y 7 en la mezcla. Además, los ADC dentro de la mezcla también pueden tener DAR mayores que 8. La mezcla de ADC resulta de la reducción de disulfuro intercatenaria y posterior conjugación.
- 15 El término "ADC1-MMAFp", según se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de ADC1-MMAF que se encuentra dentro de una mezcla de ADC que se ha purificado de manera que la DAR del ADC esté dentro del intervalo deseado, p. ej., (una DAR de 2-4) o el ADC se incluye en una mezcla de ADC que tiene un promedio deseado (p. ej., una DAR promedio de 3).
- El término "formulación" según se usa en la presente memoria se refiere a una formulación acuosa o una formulación liofilizada. En una realización, la formulación de la invención está liofilizada. En una realización, la formulación de la invención es acuosa. En una realización, la formulación de la invención no incluye un quelante. En una realización, la formulación liofilizada de la invención no incluye un quelante.
- 25 El término "formulación acuosa" se refiere a una disolución en la que el disolvente es agua. En una realización, el término "formulación acuosa" se refiere a una formulación líquida en la que el disolvente es agua en donde la formulación no se liofilizó anteriormente (es decir, no resulta de la reconstitución de una formulación liofilizada). En otra realización, el término "formulación acuosa" se refiere a una formulación líquida en la que el disolvente es agua en donde la formulación se liofilizó anteriormente (es decir, una formulación reconstituida).
- El término "liofilizada" según se usa en la presente memoria en relación con la formulación según la invención denota una formulación que se seca al congelar la formulación y posteriormente sublimar el hielo del contenido congelado mediante cualquier método de liofilización conocido en la técnica, por ejemplo, dispositivos de liofilización disponibles comercialmente.
- 35 Una formulación "reconstituida" es una que se ha preparado al disolver una formulación liofilizada que contiene una proteína, p. ej., un ADC, en un diluyente de manera que la proteína se disperse en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para la administración (p. ej. administración intravenosa) a un sujeto para tratarlo con la proteína de interés (p. ej., conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR).
- 40 Un "diluyente" de interés en la presente memoria es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para su administración a un humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de la liofilización. Los diluyentes ilustrativos incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), una disolución tamponada para pH (p. ej. disolución salina tamponada por fosfato), disolución salina estéril, disolución de Ringer o disolución de dextrosa. En una realización alternativa, los diluyentes pueden incluir disoluciones acuosas de sales y/o tampones.
- 45 El término "tampón" se refiere a un compuesto que resiste a cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base cuando están en disolución. En una realización, un tampón que se usa en la presente invención tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen acetato (p. ej., acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, metionina, imidazol, histidina, glicina, arginina, citrato, fosfato, citrato y fosfato, Tris y otros tampones ácidos orgánicos. En una realización, el tampón que se usa en la formulación comprende tampón de histidina, succinato o citrato o fosfato. En una realización de la invención, la formulación comprende aproximadamente 1 - 10 mg/ml de un tampón que comprende histidina. En otra realización de la invención, la formulación comprende 1-20 mg de un tampón que comprende histidina.
- 55

El término "azúcar" según se usa en la presente memoria pretende denotar un monosacárido o un oligosacárido. Un monosacárido es un carbohidrato monomérico que no es hidrolizable mediante ácidos, incluidos azúcares simples y sus derivados, *p. ej.*, aminoazúcares. Los ejemplos de monosacáridos incluyen, pero no se limitan a, glucosa, fructosa, galactosa, manosa, sorbosa, ribosa, desoxirribosa, ácido neuramínico. Un oligosacárido es un carbohidrato que consiste en más de una unidad de sacárido monomérico conectada a través de una unión(es) glucosídica ramificada o en una cadena. Las unidades de sacárido monoméricas dentro de un oligosacárido pueden ser idénticas o diferentes. Dependiendo de la cantidad de unidades de sacárido monoméricas, el oligosacárido es un di, tri, tetra, penta y demás sacárido. Los ejemplos de oligosacáridos incluyen, pero no se limitan a, maltosa, sacarosa, lactosa, melezitosa, trehalosa, sorbosa y rafinosa. A diferencia de los polisacáridos, los monosacáridos y oligosacáridos son solubles en agua. Los ejemplos de azúcares incluyen, pero no se limitan a, un azúcar reductor, un azúcar no reductor, un alcohol de azúcar y un ácido de azúcar. Un "azúcar reductor" es un azúcar que contiene un grupo aldehído o cetona libre y puede reducir iones metálicos o hacer reacción covalentemente con lisina y otros grupos amino en proteínas. Un "azúcar no reductor" es un azúcar que carece de un grupo aldehído o cetónico libre y no se oxida mediante agentes oxidantes leves tales como las disoluciones de Fehling o Benedict. Los ejemplos de azúcares reductores son fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melezitosa y rafinosa. Manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol son ejemplos de alcoholes de azúcar. En una realización de la invención, el azúcar es manitol, sorbitol, sacarosa o trehalosa. En otra realización de la invención, la formulación comprende aproximadamente 50-90 mg/ml de un azúcar, *p. ej.*, sacarosa. En otra realización adicional de la invención, la formulación comprende aproximadamente 60-80 mg/ml de un azúcar, *p. ej.*, sacarosa. En otra realización adicional de la invención, la formulación comprende aproximadamente 70 mg/ml de un azúcar, *p. ej.*, sacarosa. En otra realización adicional de la invención, la formulación liofilizada comprende aproximadamente 320-410 mg de un azúcar.

El término "tensioactivo" generalmente se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfipáticas; a saber, están compuestas por grupos de tendencias de solubilidad opuestas, típicamente una cadena de hidrocarburo soluble en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los tensioactivos se pueden clasificar, dependiendo de la carga del resto activo en la superficie, en tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los tensioactivos frecuentemente se usan como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. Los ejemplos de tensioactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, lauril sulfato sódico, polisorbatos tales como monooleato, monolaurato, monopalmitato, monoestearato de polioxietileno sorbitán u otro éster de polioxietileno sorbitán (*p. ej.*, los TWEENS disponibles comercialmente, tales como TWEEN 20 y TWEEN 80 (ICI Speciality Chemicals)), dioctilsulfosuccinato sódico (DOSS, por sus siglas en inglés), lecitina, alcohol estearílico, alcohol cetoestearílico, colesterol, aceite de ricino de polioxietileno, glicéridos de ácido graso de polioxietileno, poloxámeros (*p. ej.*, Pluronic F68™ y F108™, que son copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno); derivados de aceite de ricino de polioxietileno o mezclas de estos.

El término "polisorbato" según se usa en la presente memoria se refiere a ésteres de oleato de sorbitol y sus anhídridos, típicamente copolimerizados con óxido de etileno. En una realización, el polisorbato tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 1200 Da (peso molecular aproximado del polisorbato 20) a aproximadamente 1350 Da (peso molecular aproximado del polisorbato 80). En una realización, una formulación comprende polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 o polisorbato 80. En una realización, la formulación comprende aproximadamente 0,1 a 0,9 mg de un polisorbato. En otra realización, la formulación comprende aproximadamente 0,01 - 0,2 mg/ml de un polisorbato. En otra realización, la formulación comprende 0,05-0,15 mg/ml de un polisorbato.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a preparaciones que están en tal forma que permite que la actividad biológica del (de los) ingrediente(s) activo(s) sea eficaz y, por lo tanto, se pueda administrar a un sujeto para un uso terapéutico.

Una formulación "estable" es una en la que el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR conserva esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica después del almacenamiento. En la técnica hay disponibles diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad proteica y se describen, *p. ej.*, en Peptide and Protein Drug Delivery, págs. 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90. En una realización, la estabilidad del conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR se determina según el porcentaje de proteína monomérica en la disolución, con un porcentaje bajo de proteína degradada (*p. ej.*, fragmentada) y/o aglomerada. Por ejemplo, una formulación que comprende un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR estable puede incluir al menos 95 % de conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR monomérico. Alternativamente, una formulación puede incluir no más que 5 % de conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR aglomerado y/o degradado.

Un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR "conserva su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no muestra sustancialmente signos de aglomeración, precipitación y/o desnaturalización después del examen visual del color y/o la claridad, o según se mide mediante dispersión de luz UV o mediante cromatografía de

exclusión por tamaño. En una realización, una formulación acuosa estable es una formulación que tiene menos de aproximadamente 5 % de aglomeración del conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR en la formulación.

5 Un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR "conserva su estabilidad química" en una formulación farmacéutica si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR todavía conserva su actividad biológica según se define más adelante. La estabilidad química se puede evaluar al detectar y cuantificar las formas químicamente alteradas del conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR. La alteración química puede implicar modificaciones de tamaño (p. ej., recorte) que se pueden evaluar usando cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o desorción/ionización láser asistida por matriz / espectrometría de masas por tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS, por sus siglas en inglés), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen alteración de carga (p. ej., que se produce como resultado de la desamidación), que se puede evaluar mediante, p. ej., cromatografía de intercambio iónico.

10 Un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR "conserva su actividad biológica" en una formulación farmacéutica si la proteína en la formulación farmacéutica es biológicamente activa para su fin previsto. Por ejemplo, la actividad biológica de un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR se conserva si la actividad biológica del conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR en la formulación farmacéutica está dentro de aproximadamente 30 %, aproximadamente 20 %, o aproximadamente 10 % (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica exhibida en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica (p. ej., según se determina en un ensayo de unión a antígeno). En una realización, la actividad biológica es citotoxicidad de células de carcinoma epidermoide.

15 El término "anticuerpo" se refiere ampliamente a una molécula de inmunoglobulina (Ig), que comprende generalmente cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento, mutante, variante o derivado funcional de esta, que conserva las características de unión a diana esenciales de una molécula de Ig.

20 En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende uno dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones de determinación de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amínico hasta el extremo carboxílico en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) y clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

25 El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), según se usa en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., hIL-13). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Dichas realizaciones de anticuerpo pueden tener formatos biespecíficos, doble específicos o multiespecíficos; específicamente, se unen a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmentos Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo simple de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546, Winter et al., publicación PCT WO 90/05144 A1), que comprende un dominio variable simple; y (vi) una región de determinación de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se puede unir usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite que se conviertan en una cadena proteica simple en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véase p. ej., Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que el término «porción de unión a antígeno» de un anticuerpo abarque los anticuerpos de cadena simple. Se abarcan también otras formas de anticuerpos de cadena simple, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos, bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una cadena polipeptídica simple, pero que usan un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, por lo cual los dominios están obligados a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (véase, p. ej., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Dichas porciones de unión anticuerpo se conocen en la técnica (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York: 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Un "anticuerpo aislado", según se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a EGFR está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de EGFR). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a EGFR, sin embargo, puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de EGFR de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (p. ej., un ratón), pero en los que al menos una porción de la secuencia de VH y/o VL se ha alterado para que sea más "similar a la humano", es decir, más similar a las secuencias variables de línea germinal humana. En una realización particular, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo o variante, derivado o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de interés, y comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano, y comprende CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Según se usa en la presente memoria, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, preferiblemente, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. En una realización, uno tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con una CDR, en el que se introducen secuencias de CDR humanas en secuencias de VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias de CDR no humanas correspondientes.

Según se usa en la presente memoria, el término "CDR" se refiere a la región de determinación de la complementariedad dentro de secuencias variables de anticuerpo. Existen tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR" según se usa en la presente memoria se refiere a un grupo de tres CDR presentes en una región variable simple capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de manera diferente según sistemas diferentes. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoca aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporcionar límites de residuo precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)) hallaron que ciertas subporciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de estructura peptídica casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Estas subporciones se designaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde la "L" y la "H" designan las regiones de cadena ligera y cadenas pesadas, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDR de Kabat. Se han descrito otros límites que definen CDR que se superponen con las CDR de Kabat por Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Además, otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente ninguno de los sistemas mencionados anteriormente, pero sin embargo se superpondrán con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse en virtud de la predicción o hallazgos experimentales de que residuos o grupos de residuos específicos o incluso CDR enteras no impactan significativamente la unión al antígeno. Los métodos usados en la presente memoria pueden usar CDR definidas según cualquiera de estos sistemas, aunque las realizaciones preferidas usan las CDR definidas por Kabat o Chothia.

El término "trastorno" se refiere a cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con las formulaciones de la invención, p. ej., un trastorno que requiere tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR en la formulación. Se incluyen trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluidas las afecciones patológicas que predisponen al sujeto al trastorno en cuestión.

El término "cáncer" se refiere o describe la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más específicos de dichos cánceres incluyen glioblastoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas, cáncer de mama, tumores de células escamosas, cáncer anal, cáncer de piel y cáncer vulvar. En un caso, la formulación se administra a un paciente que tiene un tumor(es) que contiene amplificaciones del gen de EGFR, por las cuales el tumor expresa la versión trucada de EGFR de2-7. En un caso, la formulación que comprende ADC1-MMAF se puede administrar a un sujeto para el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas (incluido, pero sin limitarse a, cáncer hipofaríngeo, cáncer orofaríngeo, cáncer esofágico, cáncer laríngeo y cáncer de cavidad oral), cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de mama, un tumor sólido, p. ej., un tumor sólido que probablemente sobreexpresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o glioblastoma multiforme.

El término "administrar" según se usa en la presente memoria se refiere al suministro de una sustancia (p. ej., un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR) para lograr un objetivo terapéutico (p. ej., el tratamiento de un trastorno asociado con EGFR). Los modos de administración pueden ser parenteral, entérico y tópico. La

administración parenteral es normalmente mediante inyección e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intracostal.

- 5 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de un ADC, según se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad eficaz para la prevención o el tratamiento o el alivio de un síntoma de un trastorno para el tratamiento en el cual el ADC es eficaz.

El término "tratamiento" se refiere al tratamiento terapéutico y a las medidas profilácticas o preventivas. Los pacientes que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno.

En las siguientes subsecciones se describen diversos aspectos de la invención en mayor detalle.

II. Formulaciones de conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR de la invención

La presente invención presenta formulaciones que comprenden el anticuerpo anti-EGFR, en donde dicho anticuerpo para EGFR se conjuga con uno o más fármacos, *p. ej.*, una auristatina (*p. ej.*, MMAF). La presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que una formulación que comprende un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR (ADC), (en donde el anticuerpo anti-EGFR o una porción de unión a antígeno de este, se conjuga con una o más moléculas de auristatina, tal como MMAF), es capaz de mantener la actividad biológica del ADC después de la reconstitución y mantener una relación entre fármaco y anticuerpo después de la reconstitución, después del almacenamiento de la formulación durante hasta 6 meses a 5 °C y 25 °C.

- 20 Las formulaciones descritas en la presente memoria pueden ser liofilizadas o acuosas. A menos que se indique de cualquier otra manera, el término "formulación" indica liofilizada y acuosa.

Ciertas formulaciones comprenden preferiblemente el conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un azúcar, un tampón y un polisorbato, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5 - 7. En ciertas realizaciones, la formulación comprende, además, el ADC anti-EGFR que comprende el anticuerpo anti-EGFR, tal como el anticuerpo 1, que está conjugado con una o más moléculas de una auristatina, tal como MMAF.

En una realización, la invención proporciona una formulación liofilizada que comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR, un azúcar, *p. ej.*, sacarosa, un tensioactivo, *p. ej.*, un polisorbato (tal como polisorbato 80) e histidina, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5 - 7, y en donde el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR comprende el anticuerpo anti-EGFR conjugado con Monometilauristatina F (MMAF).

En una realización, la invención proporciona una formulación liofilizada que comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR, sacarosa, un tensioactivo y un tampón, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5 - 7, y en donde el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR comprende el anticuerpo anti-EGFR, *p. ej.*, el anticuerpo 1, conjugado a través de un enlazador de maleimidocaproilo con Monometilauristatina F (MMAF) (mc-MMAF).

En una realización, la invención proporciona una formulación liofilizada que comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR, sacarosa, un polisorbato e histidina, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5 - 7, y en donde el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR comprende el anticuerpo anti-EGFR, *p. ej.*, el anticuerpo 1, conjugado a través de un enlazador de maleimidocaproilo con Monometilauristatina F (MMAF) (mc-MMAF).

Las formulaciones descritas en la presente memoria preferiblemente tienen un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0. En una realización, el pH de la formulación varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0; alternativamente, el pH puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5; alternativamente, el pH de la formulación puede variar de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. También se pretende que los intervalos intermedios de los valores de pH mencionados anteriormente, *p. ej.*, aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,4, sean parte de la invención. Se pretende que también se incluyan los intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superiores / inferiores, *p. ej.*, un intervalo de pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,2.

Las formulaciones de la invención comprenden preferiblemente el ADC anti-EGFR, un azúcar, un tensioactivo e histidina.

En una realización, la formulación comprende 1-20 mg/ml de un tampón de histidina (*p. ej.*, aproximadamente 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 1 a aproximadamente 10; aproximadamente 1 a aproximadamente 5; o aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mg/ml) con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0; un

pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5; o un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, e intervalos intermedios.

5 En una realización, la formulación comprende aproximadamente 5-25 mM de histidina (*p. ej.*, aproximadamente 2 a aproximadamente 25 mM; aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mM; aproximadamente 10 a aproximadamente 25 mM; o aproximadamente 20 a aproximadamente 25 mM), e intervalos intermedios.

10 En una realización, la formulación comprende 1-20 mg/ml de un tampón de succinato (*p. ej.*, aproximadamente 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 1 a aproximadamente 10; aproximadamente 5 a aproximadamente 20; o aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/ml) con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0; un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5; o un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, e intervalos intermedios. En una realización, la formulación comprende aproximadamente 1-10 mg/ml de un tampón de succinato con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0; un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5; o un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, e intervalos intermedios.

15 En una realización, la formulación comprende 1-20 mg/ml de un tampón de citrato (*p. ej.*, aproximadamente 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 1 a aproximadamente 10; aproximadamente 5 a aproximadamente 20; o aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/ml) con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0; un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5; o un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, e intervalos intermedios. En una realización, el tampón usado en la formulación comprende aproximadamente 1-10 mg/ml de un tampón de citrato con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0; un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5; o un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, e intervalos intermedios.

20 En una realización, la formulación comprende 1-20 mg/ml de un tampón de fosfato (*p. ej.*, aproximadamente 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 1 a aproximadamente 10; aproximadamente 5 a aproximadamente 20; o aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/ml) con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0; un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5; o un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, e intervalos intermedios. En una realización, el tampón usado en la formulación comprende aproximadamente 1-10 mg/ml de un tampón de fosfato con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0; un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5; o un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, e intervalos intermedios.

25 En una realización, la formulación comprende 1-20 mg/ml de un tampón de citrato / fosfato (*p. ej.*, aproximadamente 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 1 a aproximadamente 10; aproximadamente 5 a aproximadamente 20; o aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/ml) con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0; un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5; o un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. En una realización, el tampón usado en la formulación comprende aproximadamente 1-10 mg/ml de un tampón de citrato / fosfato con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0; un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5; o un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, e intervalos intermedios.

30 Además del tampón, se incluye un azúcar en la formulación. Los ejemplos de azúcares que se pueden usar en la formulación incluyen, pero no se limitan a, manitol, sorbitol, sacarosa y trehalosa. En una realización, el azúcar usado en la formulación es sacarosa.

35 En una realización, la formulación comprende un azúcar en una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 85 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 65 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 60 a aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 60 a aproximadamente 85 mg/ml, aproximadamente 60 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 60 a aproximadamente 70 mg/ml, o aproximadamente 60 a aproximadamente 75 mg/ml, e intervalos intermedios, *p. ej.*, aproximadamente 55 a aproximadamente 85 mg/ml de azúcar, e intervalos intermedios.

40 En una realización, la formulación comprende sacarosa en una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 85 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 65 mg/ml, aproximadamente 50 a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 60 a aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 60 a aproximadamente 85 mg/ml, aproximadamente 60 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 60 a aproximadamente 70 mg/ml, o aproximadamente 60 a aproximadamente 75 mg/ml, e intervalos intermedios, *p. ej.*, aproximadamente 55 a aproximadamente 85 mg/ml de sacarosa, e intervalos intermedios.

Un tensioactivo también se agrega a la formulación, *p. ej.*, para estabilidad agregada. Los tensioactivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, detergentes no iónicos tales como polisorbato (*p. ej.*, polisorbatos 20, 80) o poloxámeros (*p. ej.*, poloxámero 188).

5 En una realización, la formulación comprende un polisorbato, *p. ej.*, polisorbato 80, en una concentración de aproximadamente 0,05-0,20 mg/ml (*p. ej.*, aproximadamente 0,05-0,19, 0,05-0,18, 0,05-0,17, 0,05-0,16, 0,05-0,15, 0,05-0,14, 0,05-0,13, 0,05-0,12, 0,05-0,11 o 0,05-0,10 mg/ml, e intervalos intermedios). En una realización, la formulación acuosa comprende 0,05-0,15 mg/ml del polisorbato, *p. ej.*, polisorbato 80.

10 En una realización, la formulación comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR en una concentración de aproximadamente 1-150 mg/ml (*p. ej.*, aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 125, 130, 135, 140, 145 o 150 mg/ml, y valores intermedios, del conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR).

15 En una realización, la formulación comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR en una cantidad de aproximadamente 1-150 mg, aproximadamente 10-150 mg, aproximadamente 20-150 mg, aproximadamente 30-150 mg, aproximadamente 40-150 mg, aproximadamente 50-150 mg, aproximadamente 60-150 mg, aproximadamente 70-150 mg, aproximadamente 80-150 mg, aproximadamente 90-150 mg, aproximadamente 100-150 mg, aproximadamente 10-140 mg, aproximadamente 20-140 mg, aproximadamente 30-140 mg, aproximadamente 40-140 mg, aproximadamente 50-140 mg, aproximadamente 60-140 mg, aproximadamente 70-140 mg, aproximadamente 80-140 mg, aproximadamente 90-140 mg, aproximadamente 100-140 mg, aproximadamente 10-130 mg, aproximadamente 20-130 mg, aproximadamente 30-130 mg, aproximadamente 40-130 mg, aproximadamente 50-130 mg, aproximadamente 60-130 mg, aproximadamente 70-130 mg, aproximadamente 80-130 mg, aproximadamente 90-130 mg, aproximadamente 100-130 mg, aproximadamente 10-120 mg, aproximadamente 20-120 mg, aproximadamente 30-120 mg, aproximadamente 40-120 mg, aproximadamente 50-120 mg, aproximadamente 60-120 mg, aproximadamente 70-120 mg, aproximadamente 80-120 mg, aproximadamente 90-120 mg, aproximadamente 100-120 mg, aproximadamente 10-110 mg, aproximadamente 20-110 mg, aproximadamente 30-110 mg, aproximadamente 40-110 mg, aproximadamente 50-110 mg, aproximadamente 60-110 mg, aproximadamente 70-110 mg, aproximadamente 80-110 mg, aproximadamente 90-110 mg, y aproximadamente 100-110 mg, e intervalos intermedios.

20 En una realización, la formulación comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR en una concentración de 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml, 26 mg/ml, 27 mg/ml, 28 mg/ml, 29 mg/ml, 30 mg/ml, 31 mg/ml, 32 mg/ml, 33 mg/ml, 34 mg/ml, 35 mg/ml, 36 mg/ml, 37 mg/ml, 38 mg/ml, 39 mg/ml, 40 mg/ml, 41 mg/ml, 42 mg/ml, 43 mg/ml, 44 mg/ml, 45 mg/ml, 46 mg/ml, 47 mg/ml, 48 mg/ml, 49 mg/ml, 50 mg/ml, 51 mg/ml, 52 mg/ml, 53 mg/ml, 54 mg/ml, 55 mg/ml, 56 mg/ml, 57 mg/ml, 58 mg/ml, 59 mg/ml, 60 mg/ml, 61 mg/ml, 62 mg/ml, 63 mg/ml, 64 mg/ml, 65 mg/ml, 66 mg/ml, 67 mg/ml, 68 mg/ml, 69 mg/ml, 70 mg/ml, 71 mg/ml, 72 mg/ml, 73 mg/ml, 74 mg/ml, 75 mg/ml, 76 mg/ml, 77 mg/ml, 78 mg/ml, 79 mg/ml, 80 mg/ml, 81 mg/ml, 82 mg/ml, 83 mg/ml, 84 mg/ml, 85 mg/ml, 86 mg/ml, 87 mg/ml, 88 mg/ml, 89 mg/ml, 90 mg/ml, 91 mg/ml, 92 mg/ml, 93 mg/ml, 94 mg/ml, 95 mg/ml, 96 mg/ml, 97 mg/ml, 98 mg/ml, 99 mg/ml, 100 mg/ml, 101 mg/ml, 102 mg/ml, 103 mg/ml, 104 mg/ml, 105 mg/ml, 106 mg/ml, 107 mg/ml, 108 mg/ml, 109 mg/ml, 110 mg/ml, 111 mg/ml, 112 mg/ml, 113 mg/ml, 114 mg/ml, 115 mg/ml, 116 mg/ml, 117 mg/ml, 118 mg/ml, 119 mg/ml, 120 mg/ml, 121 mg/ml, 122 mg/ml, 123 mg/ml, 124 mg/ml, 125 mg/ml, 126 mg/ml, 127 mg/ml, 128 mg/ml, 129 mg/ml, 130 mg/ml, 131 mg/ml, 132 mg/ml, 133 mg/ml, 134 mg/ml, 135 mg/ml, 136 mg/ml, 137 mg/ml, 138 mg/ml, 139 mg/ml, 140 mg/ml, 141 mg/ml, 142 mg/ml, 143 mg/ml, 144 mg/ml, 145 mg/ml, 146 mg/ml, 147 mg/ml, 148 mg/ml, 149 mg/ml o 150 mg/ml del anticuerpo. También se incluyen en la invención los intervalos que incluyen cualesquiera de las cifras mencionadas anteriormente, *p. ej.*, 10-150 mg/ml, 10-100 mg/ml, 20-90 mg/ml, 10-70 mg/ml, 10-40 mg/ml y 1-70 mg/ml.

45 En un aspecto, la invención presenta una formulación acuosa que se reconstituye a partir de una formulación liofilizada que comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR, en donde la formulación acuosa reconstituida comprende aproximadamente 1 - 100 mg/ml del ADC anti-EGFR, aproximadamente 1 - 10 mg/ml de histidina, aproximadamente 50 - 90 mg/ml de un azúcar, (*p. ej.*, sacarosa) y aproximadamente 0,01 - 0,2 mg/ml de un polisorbato (*p. ej.*, polisorbato 80) y tiene un pH de aproximadamente 5 - 7, y en donde dicho conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR comprende al anticuerpo anti-EGFR (*p. ej.*, el anticuerpo 1) conjugado con una auristatina (*p. ej.*, MMAF).

50 Una formulación liofilizada se produce inicialmente como una formulación preliofilizada, que es la formulación antes del proceso de liofilización. La cantidad de conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR presente en la formulación preliofilizada se determina tomando en cuenta los volúmenes de dosis deseados, el(los) modo(s) de administración, etc.

55 En un aspecto, la invención presenta una formulación liofilizada que comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR, un azúcar, (*p. ej.*, sacarosa), un tensioactivo (*p. ej.*, polisorbato 80) e histidina, en donde la

formulación tiene un pH de aproximadamente 5,0 a 7,0, y en donde el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR comprende el anticuerpo anti-EGFR (p. ej., el anticuerpo 1) conjugado con una auristatina (p. ej., MMAF).

En una realización de la invención, la formulación liofilizada comprende el ADC anti-EGFR, p. ej., ADC1-MMAF, sacarosa, un polisorbato, p. ej., polisorbato 80, e histidina, y no incluye, o está sustancialmente libre de, manitol y/o serina. En una realización de la invención, la formulación liofilizada comprende el ADC anti-EGFR, p. ej., ADC1-MMAF, sacarosa, un polisorbato, p. ej., polisorbato 80, e histidina, y no incluye o está sustancialmente libre de un catión divalente. En otra realización de la invención, la formulación liofilizada no incluye ácido lactobiónico. En otra realización de la invención, la formulación liofilizada no incluye un ácido de azúcar.

En ciertos aspectos ilustrativos, la invención presenta una formulación liofilizada que tiene un pH que varía de aproximadamente 5,0 a 7,0, y que comprende 1-20 mg de histidina, aproximadamente 320-410 mg de un azúcar (p. ej., sacarosa) aproximadamente 0,1 a 0,9 mg de un tensioactivo (p. ej., polisorbato 80) y aproximadamente 50-150 mg del conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR, en donde el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR comprende el anticuerpo anti-EGFR (p. ej., el anticuerpo 1) conjugado con una auristatina (p. ej., MMAF).

En una realización, la formulación liofilizada comprende aproximadamente 320-410 mg, aproximadamente 330-400 mg, aproximadamente 340 a 390 mg, aproximadamente 350 a 380 mg, o aproximadamente 360 a 370 mg de un azúcar (p. ej., sacarosa), e intervalos (p. ej., 355 mg a 375 mg) intermedios.

En una realización, la formulación liofilizada comprende aproximadamente 0,1-0,9 mg de un tensioactivo (p. ej., aproximadamente 0,1-0,8, 0,1-0,7, 0,01-0,6, 0,01-0,55, 0,2-0,6, 0,3-0,6, 0,4-0,6, e intervalos intermedios).

En una realización, la formulación liofilizada comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR en una cantidad de aproximadamente 1-150 mg, aproximadamente 10-150 mg, aproximadamente 20-150 mg, aproximadamente 30-150 mg, aproximadamente 40-150 mg, aproximadamente 50-150 mg, aproximadamente 60-150 mg, aproximadamente 70-150 mg, aproximadamente 80-150 mg, aproximadamente 90-150 mg, aproximadamente 100-150 mg, aproximadamente 10-140 mg, aproximadamente 20-140 mg, aproximadamente 30-140 mg, aproximadamente 40-140 mg, aproximadamente 50-140 mg, aproximadamente 60-140 mg, aproximadamente 70-140 mg, aproximadamente 80-140 mg, aproximadamente 90-140 mg, aproximadamente 100-140 mg, aproximadamente 10-130 mg, aproximadamente 20-130 mg, aproximadamente 30-130 mg, aproximadamente 40-130 mg, aproximadamente 50-130 mg, aproximadamente 60-130 mg, aproximadamente 70-130 mg, aproximadamente 80-130 mg, aproximadamente 90-130 mg, aproximadamente 100-130 mg, aproximadamente 10-120 mg, aproximadamente 20-120 mg, aproximadamente 30-120 mg, aproximadamente 40-120 mg, aproximadamente 50-120 mg, aproximadamente 60-120 mg, aproximadamente 70-120 mg, aproximadamente 80-120 mg, aproximadamente 90-120 mg, aproximadamente 100-120 mg, aproximadamente 10-110 mg, aproximadamente 20-110 mg, aproximadamente 30-110 mg, aproximadamente 40-110 mg, aproximadamente 50-110 mg, aproximadamente 60-110 mg, aproximadamente 70-110 mg, aproximadamente 80-110 mg, aproximadamente 90-110 mg, y aproximadamente 100-110 mg, e intervalos intermedios.

En una realización, la formulación liofilizada comprende 1-20 mg/ml de histidina, o alternativamente, 2-18 mg, 3-17 mg, 4-16 mg, 5-15 mg, 6-14 mg o 7-13 mg, e intervalos intermedios.

La liofilización se puede llevar a cabo según métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, existen muchos liofilizadores diferentes disponibles para este fin tales como los liofilizadores HULL50 (Hull, EE. UU.) o GT20 (Leybold-Heraeus, Alemania). La liofilización se logra al congelar la formulación y posteriormente sublimar el hielo del contenido congelado a una temperatura adecuada para el secado primario. En esta condición, la temperatura del producto está por debajo del punto eutéctico o la temperatura de colapso de la formulación. Típicamente, la temperatura del liofilizador para el secado primario variará de aproximadamente -30 a 25 °C. (siempre que el producto permanezca congelado durante el secado primario) a una presión adecuada, que varía típicamente de aproximadamente 50 a 250 mTorr. La formulación, tamaño y tipo de contenedor que aloja la muestra (p. ej., un vial de vidrio) y el volumen de líquido dictarán principalmente el tiempo necesario para el secado que puede variar de algunas horas a varios días (p. ej., 40-60 h). Opcionalmente, también se puede llevar a cabo una etapa de secado secundaria dependiendo del nivel de humedad residual deseado en el producto. La temperatura a la que se lleva a cabo el secado secundario varía de aproximadamente 0-40 °C, dependiendo principalmente del tipo y tamaño del contenedor y el tipo de proteína empleada. Por ejemplo, la temperatura del liofilizador a lo largo de toda la fase de extracción de agua de la liofilización puede ser de aproximadamente 15-30 °C (p. ej., aproximadamente 20 °C). El tiempo y presión requeridos para el secado secundario serán los que produzcan una torta liofilizada adecuada, dependiendo, p. ej., de la temperatura y otros parámetros. El tiempo de secado secundario lo dicta el nivel de humedad residual deseado en el producto y típicamente lleva al menos aproximadamente 5 horas (p. ej., 10-15 horas). La presión puede ser la misma que la empleada durante la etapa de secado primaria. Las condiciones de liofilización se pueden variar dependiendo de la formulación y tamaño del vial.

Antes de la administración al paciente, la formulación liofilizada se reconstituye con un diluyente farmacéuticamente aceptable de manera que la concentración del conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR en la formulación

reconstituida sea, por ejemplo, con la necesaria para el tratamiento, p. ej., al menos aproximadamente 1-150 mg/ml. La reconstitución se lleva a cabo generalmente a una temperatura de aproximadamente 25 °C para asegurar la hidratación completa, aunque se pueden emplear otras temperaturas, según se desee. El tiempo necesario para la reconstitución dependerá, p. ej., del tipo de diluyente, cantidad de excipiente(s) y proteína. Los diluyentes ilustrativos incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWF1), una disolución tamponada para pH (p. ej. disolución salina tamponada por fosfato), disolución salina estéril (p. ej., disolución salina al 0,9 %), disolución de Ringer o disolución de dextrosa. En una realización, los liofilizados se deben disolver en agua estéril para inyección y diluirse en disolución salina normal estéril. El diluyente opcionalmente contiene un conservante. Los conservantes ilustrativos se han descrito anteriormente, donde los conservantes preferidos son alcoholes aromáticos tales como alcohol bencílico o fenólico. La cantidad de conservante empleado se determina al someter a ensayo diferentes concentraciones de conservante para determinar la compatibilidad con la proteína y someter a prueba la eficacia del conservante. Por ejemplo, si el conservante es un alcohol aromático (tal como alcohol bencílico), puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,1-2,0 %, de aproximadamente 0,5-1,5 %, o aproximadamente 1,0-1,2 %.

15 III. Conjugados de fármaco y anticuerpo anti-EGFR para su uso en las formulaciones de la invención

Las formulaciones y métodos descritos en la presente memoria abarcan el uso de conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC) que comprenden anticuerpos anti-EGFR o porciones de unión a antígeno estos, que se unen específicamente a EGFR. Los conjugados de fármaco y anticuerpo anti-EGFR usados en las formulaciones de la descripción están conjugados con un agente terapéutico, por el cual el agente terapéutico ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre las células que expresan EGFR.

En particular, la presente invención se refiere a formulaciones que comprenden un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR que comprende un anticuerpo que reconoce un epítipo de EGFR que se encuentra en células oncógenas, hiperproliferativas o anormales, en donde el epítipo no es detectable en células normales o naturales. Preferiblemente, el anticuerpo no se une a ni reconoce células normales o naturales que contienen el epítipo de EGFR normal o natural en ausencia de sobreexpresión y en presencia de la modificación postraducción del EGFR normal.

Los anticuerpos anti-EGFR adecuados para su uso de acuerdo con las presentes formulaciones y métodos son típicamente monoclonales y pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos quiméricos (p. ej., que tienen una región constante humana y una región variable de ratón), humanizados o humanos; anticuerpos de cadena simple; o similares. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el anticuerpo anti-EGFR usado en el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR de la invención puede ser el anticuerpo anti-EGFR 1 o 2, o un. Las secuencias y características de los anticuerpos 1 y 2 se describen más adelante (véanse también WO 2011/041319 y US20110076232 (véase, p. ej., la secuencia de anticuerpo de la Figura 55)). Los anticuerpos 1 y 2 se dirigen cada uno a la forma sobreexpresada del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) presente en 50 % de todos los cánceres de origen epitelial.

En una realización específica de la presente invención, el anticuerpo anti-EGFR usado en el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR reconoce el EGFR natural amplificado y el EGFR de2-7. El anticuerpo anti-EGFR (o ADC anti-EGFR) demuestra especificidad útil, en que reconoce EGFR de2-7 y EGFR amplificado, pero no reconocer EGFR normal, natural ni el péptido de unión único que es característico de EGFR de2-7. Los ejemplos de anticuerpos que tienen estas características de unión son el anticuerpo 1, el anticuerpo 2 y el anticuerpo 3. Las secuencias para el anticuerpo 1 y el anticuerpo 2 se proporcionan a continuación.

El anticuerpo 2 es un anticuerpo anti-EGFR murino monoclonal. La cadena VH del anticuerpo 2 comprende la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos, con el péptido señal (SEQ ID NO: 2) según se muestra a continuación (el péptido señal está subrayado en la SEQ ID NO: 2).

SEQ ID NO: 1

ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTACAGCCTTTCCTGGTGTCTGTCTGA
 TGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCC
 CTCACCTGCACTGTCCTGGCTACTCAATCACCAGTGATTTTGCCTGGAAGTGGG
 TCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGGATGGGCTACATAAGTTATAGTG
 GTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACAC
 ATCCAAGAACCAATTCTTCCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTATTGAGGACACAGCC
 ACATATTACTGTGTAACGGCGGGACGCGGGTTTCCTTATTGGGGCCAAGGGACTC
 TGGTCACTGTCTCTGCA

SEQ ID NO: 2

MRVLILLWLFTAFPGVLSDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQ
 FPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVT
 AGRGFPYWGQGLVTVSA

5 La cadena VL del anticuerpo 2 comprende la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) según se muestra a continuación (el péptido señal está subrayado en la SEQ ID NO: 4).

SEQ ID NO: 3

ATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTTGCATTCTTGTGTGCTTTGGTTTCCAGGTGCAAG
 ATGTGACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCTGTATCTCTGGGAGAC
 ACAGTCAGCATCACTTGCCATTCAAGTCAGGACATTAACAGTAATATAGGGTGGT
 TGCAGCAGAGACCAGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAACT
 TGGACGATGAAGTTCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTC
 TCTACCATCAGCAGCCTGGAATCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAG
 TATGCTCAGTTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGT

SEQ ID NO: 4

MVSTAQFLAFLLLWFPGARCDILMTQSPSSMSVSLGDTVSIHSSQDINSNIGWLQQ
 RPKGSFKGLIYHGTLNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSESEDFADYYCVQYAQFPW

10 TFGGGTKLEIKR

Las regiones de determinación de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 (SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente) de la secuencia de cadena VH SEQ ID NO: 2, sin el péptido señal (SEQ ID NO: 11) se indican con subrayado a continuación. Los residuos clave de la secuencia de cadena VH (SEQ ID NO: 11) son 24, 37, 48, 67 y 78.

15 SEQ ID NO: 11

DVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTR
CDR1 CDR2
YNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRFPYWGQGLVTVSA
CDR3

Las regiones de determinación de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 (SEQ ID NOS: 8, 9 y 10, respectivamente) de la secuencia de cadena VL SEQ ID NO: 4, sin el péptido señal (SEQ ID NO: 12) se indican con subrayado a continuación. Los residuos clave de la secuencia de cadena VH (SEQ ID NO: 12) son 36, 46, 57 y 71.

20 SEQ ID NO: 12

DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDDEVPSR

CDR1

CDR2

FSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR

CDR3

El anticuerpo 3 es un anticuerpo quimérico que comprende los dominios variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 2, y regiones constantes humanas.

- 5 En una realización de la invención, el anticuerpo anti-EGFR usado en las formulaciones y métodos de la invención es el anticuerpo 1. Según se describió anteriormente, el anticuerpo 1 es un anticuerpo anti-EGFR humanizado que incluye las CDR del anticuerpo 2. Las regiones variables (VH) y constantes (CH) de cadena pesada del anticuerpo 1 se muestran a continuación como las SEQ ID NOS: 13 y 14, respectivamente. La región VH CDR1, CDR2 y CDR3 (SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, respectivamente) se indican con subrayado.

10 SEQ ID NO: 13

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYISSSDFAWNWIRQPPGKLEWMGYISYSGNTR

CDR1

CDR2

YQPSLKSRITISRDTSKNQHFLKLSNSVTAADTATYCVTAGRGFYWGQGITLVTVSS

CDR3

SEQ ID NO: 14

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 15 Las regiones variables (VL) y constantes (CL) de cadena ligera del anticuerpo 1 se muestran a continuación como las SEQ ID NOS: 18 y 19, respectivamente. La región VL CDR1, CDR2 y CDR3 (SEQ ID NOS: 20, 21 y 22, respectivamente) se indican con subrayado.

SEQ ID NO: 18

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITTCHSSQDINSNIGWLQKQPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPS

CDR1

CDR2

RFSGSGSGTIDYLTISSLQPEDFATYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR

CDR3

SEQ ID NO: 19

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE

20 QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 25 En una realización, la invención presenta una formulación liofilizada que comprende un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR, sacarosa, polisorbato 80 e histidina, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5 - 7, y en donde el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR comprende un anticuerpo anti-EGFR, o porción de unión a antígeno de este, conjugado con monometilauristatina F (MMAF), y en donde dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones de dominio de complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 20, 21 y 22.

En una realización, la invención proporciona una formulación liofilizada que tiene un pH de aproximadamente 5-7 y que comprende un ADC anti-EGFR que comprende un anticuerpo, o porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, y una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos según se expone en la SEQ ID NO: 14, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18, y una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos según se expone en la SEQ ID NO: 19, histidina, un azúcar, *p. ej.*, sacarosa, y un polisorbato, *p. ej.*, polisorbato 80.

En una realización, la invención proporciona una formulación que comprende un ADC que comprende un anticuerpo anti-EGFR (conjugado con una auristatina, *p. ej.*, MMAF) que tiene una región variable de cadena ligera que comprenden CDR según se describen en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, y una región variable de cadena pesada que comprende CDR según se describen en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13.

Los anticuerpos anti-EGFR que se pueden usar para producir conjugados de fármaco y anticuerpo anti-EGFR se pueden generar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas que incluyen, *p. ej.*, el uso de hibridoma, tecnologías recombinantes y de visualización en fagos o una combinación de estas. Las técnicas con hibridoma se describen generalmente en, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a ed., 1988); y Hammerling, et al., *In Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, págs. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Los ejemplos de métodos de visualización en fagos que se pueden usar para producir anticuerpos anti-CD70 incluyen, *p. ej.*, los descritos en Brinkman et al., 1995, *J Immunol Methods* 182:41-50; Ames et al., 1995, *J Immunol Methods* 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, *Eur J Immunol* 24:952-958; Persic et al., 1997, *Gene* 187:9-18; Burton et al., 1994, *Advances in Immunology* 57:191-280; la publicación PCT WO 92/01047; las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes estadounidenses núms. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Las técnicas para generar fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos también se conocen generalmente en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ se pueden producir mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de cadena pesada. También se pueden emplear técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando, *p. ej.*, métodos descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, *BioTechniques*, 12(6):864-869; y Sawai et al., 1995, *AJRI* 34:26-34; y Better et al., 1988, *Science* 240:1041-1043.

Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv de cadena simple y anticuerpos incluyen las descritas en las patentes estadounidenses núms. 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., 1991, *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shu et al., 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7995-7999; y Skerra et al., 1988, *Science* 240:1038-1040.

Se pueden producir anticuerpos mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la expresión a partir de células hospedantes, en donde se transfecta(n) un vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesada y ligera en una célula hospedante mediante técnicas estándares. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedante procarionota o eucariota, *p. ej.*, electroporación, precipitación por fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano y similares.

Las células hospedantes de mamíferos que expresan los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen de ovario de hámster chino (células CHO, por sus siglas en inglés) (incluidas las células dhfr-CHO, descritas en Urlaub and Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, *p. ej.*, según se describe en Kaufman and Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621) y células DG44 o DUXB11 (Urlaub et al. (1986) *Som. Cell Molec. Genet.* 12:555; Haynes et al. (1983) *Nuc. Acid. Res.* 11:687-706; Lau et al. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:1469-1475), células de mieloma NS0, línea de riñón de mono (*p. ej.*, CV1 y COS, tal como una célula COS 7), células SP2, células de riñón embrionario humano (HEK, por sus siglas en inglés), tal como una célula HEK-293, fibroblasto de hámster chino (*p. ej.*, R1610), carcinoma de cuello de útero humano (*p. ej.*, HELA), fibroblasto murino (*p. ej.*, BALBc/3T3), mieloma murino (P3x63-Ag3.653; NS0; SP2/O), línea de riñón de hámster (*p. ej.*, HAK), célula L murina (*p. ej.*, L-929), linfocito humano (*p. ej.*, RAJI), riñón humano (*p. ej.*, 293 y 293T). Las líneas celulares hospedantes están típicamente disponibles comercialmente (*p. ej.*, de BD Biosciences, Lexington, Ky.; Promega, Madison, Wis.; Life Technologies, Gaithersburg, Md.) o de la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, Va.).

Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican el anticuerpo en células hospedantes de mamíferos, los anticuerpos se producen al cultivar las células hospedantes durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de los anticuerpos en las células hospedantes o la secreción de los anticuerpos en el

medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedantes. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteína estándares.

En un sistema ilustrativo para la expresión recombinante de anticuerpos, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada del anticuerpo y la cadena ligera del anticuerpo en células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato cálcico. Dentro del vector de expresión recombinante, los ADNc de cadena pesada y ligera del anticuerpo se enlazan funcionalmente a elementos reguladores potenciador de CMV/promotor de AdMLP para promover niveles altos de transcripción de los ADNc. El vector de expresión recombinante también porta ADNc que codifica DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección por metotrexato/amplificación. Las células hospedantes transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular estándares para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedantes, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedantes y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Además, la descripción proporciona un método para sintetizar un anticuerpo al cultivar una célula hospedante de la descripción en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetice el anticuerpo. El método puede comprender, además, aislar el anticuerpo del medio de cultivo.

El conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR usado en la descripción comprende un anticuerpo anti-EGFR, o porción de unión a antígeno de este, conjugado con un agente citotóxico o inmunosupresor, de manera que el ADC resultante ejerza un efecto citotóxico o citostático sobre una célula cancerosa que expresa EGFR. Por lo tanto, el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre células cancerosas que expresan EGFR. En un caso, el ADC anti-EGFR se internaliza y acumula dentro de una célula que expresa EGFR, donde el ADC ejerce un efecto terapéutico (p. ej., un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor).

Los ejemplos de restos adecuados para la conjugación con anticuerpos incluyen agentes quimioterapéuticos, enzimas que convierten profármacos, isótopos o compuestos radioactivos, o toxinas. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo anti-EGFR se conjuga con una auristatina, p. ej., MMAF o MMAE. Se puede usar cualquier agente que ejerce un efecto terapéutico sobre células cancerosas o células inmunitarias activadas como el agente terapéutico para la conjugación con un anticuerpo anti-EGFR o derivado de este. (Véase, p. ej. WO 2004/010957, "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease" (supra) y la solicitud provisional de los EE. UU. n.º 60/400.403 (supra)). Típicamente, el agente terapéutico es un agente citotóxico. En algunos casos, un conjugado de fármaco anti-EGFR comprende más de un agente terapéutico por conjugado, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 agentes terapéuticos por conjugado.

En una realización preferida, el anticuerpo anti-EGFR se conjuga con una auristatina (una o más). Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y/o la división nuclear y celular y tienen actividad anticancerosa y/o antifúngica.

Un anticuerpo anti-EGFR de la invención se puede conjugar con al menos una auristatina. Las auristatinas representan un grupo de análogos de dolastatina que generalmente se ha demostrado que poseen actividad anticancerosa al interferir con la dinámica de los microtúbulos y la hidrólisis de GTP, por lo cual inhiben la división celular. Por ejemplo, la Auristatina E (descrita en la patente estadounidense n.º 5.635.483) es un análogo sintético del producto natural marino dolastatina 10, un compuesto que inhibe la polimerización de tubulina al unirse al mismo sitio en la tubulina que el fármaco anticanceroso vincristina (G. R. Pettit, Prog. Chem. Org. Nat. Prod, 70: 1-79 (1997)). La dolastatina 10, la auristatina PE y la auristatina E son péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, tres de los cuales son exclusivos de la clase de compuestos dolastatina. Las realizaciones ilustrativas de la subclase auristatina de inhibidores mitóticos incluyen, pero no se limitan a, monometil auristatina D (MMAD o derivado de auristatina D), monometil auristatina E (MMAE o derivado de auristatina E), monometil auristatina F (MMAF o derivado de auristatina F), auristatina F fenilendiamina (AFP), auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP) y éster de 5-ácido benzoilvalérico-AE (AEVB). La síntesis y estructura de los derivados de auristatina se describen en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense núms. 2003-0083263, 2005-0238649 y 2005-0009751; la publicación de patente internacional n.º WO 04/010957, publicación de patentes internacional n.º WO 02/088172 y las patentes estadounidenses núms. 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

En una realización, el anticuerpo anti-EGFR, tal como el anticuerpo 1, se conjuga con al menos una MMAF (monometil auristatina F) mediante un enlazador tal como, pero sin limitarse a, maleimidocaproilo (mc-MMAF). La estructura de MMAF se proporciona en la Figura 2. Un ADC de anticuerpo anti-EGFR puede tener una relación entre fármaco y anticuerpo (DAR, por sus siglas en inglés) de 2, 4, 6 u 8. En particular, el DAR de un ADC puede variar de 0 a 8, aunque también son posibles cargas más altas, p. ej., 10. La monometil auristatina F (MMAF) inhibe la división celular al bloquear la polimerización de la tubulina. Tiene un residuo fenilalanina en el extremo C cargado que atenúa la actividad citotóxica en comparación con su MMAE contraparte no cargado. Debido a su toxicidad, no se puede usar como un fármaco por sí misma, pero se puede enlazar a un anticuerpo monoclonal (mAb) que la dirige a las células cancerosas. En una realización, el enlazador al anticuerpo anti-EGFR es estable en fluido extracelular,

pero se escinde mediante catepsina una vez que el conjugado ha ingresado a la célula tumoral donde activa, por lo tanto, el mecanismo antimetabólico.

En una realización, el anticuerpo anti-EGFR de la invención se conjuga con al menos una MMAE (mono-metil auristatina E). La estructura de MMAE se proporciona en la Figura 1, así como un ADC ilustrativo que comprenden MMAE. La monometil auristatina E (MMAE, vedotina) inhibe la división celular al bloquear la polimerización de la tubulina. Debido a su súper toxicidad, tampoco se puede usar como un fármaco por sí misma. En desarrollos de tratamiento para el cáncer recientes se enlaza a un anticuerpo monoclonal (mAb) que reconoce la expresión de un marcador específico en células cancerosas y dirige la MMAE a las células cancerosas. En una realización, el enlazador que enlaza MMAE al anticuerpo anti-EGFR es estable en fluido extracelular (es decir, el medio o entorno que es externo a las células), pero se escinde mediante catepsina una vez que el ADC se ha unido al antígeno de célula cancerosa específico y ha ingresado a la célula cancerosa donde libera, por lo tanto, la MMAE tóxica y activa el potente mecanismo antimetabólico.

En una realización, el anticuerpo anti-EGFR se conjuga con una auristatina que es MMAF. En una realización, el ADC anti-EGFR es el ADC 1-MMAF. El ADC 1-MMAF comprende el anticuerpo 1 (descrito anteriormente y en la SEQ ID NO: 13 a 22) enlazado covalentemente a una o más moléculas de monometil auristatina F (MMAF) (véase la Figura 2 para la estructura). Para generar ADC 1-MMAF, las uniones disulfuro intercatenarias del anticuerpo 1 se reducen a grupos sulfhidrilo. A continuación, la MMAF se acopla al anticuerpo a través de estos grupos sulfhidrilo. El ADC 1-MMAF se genera usando un enlazador no escindible, es decir, una ligadura de maleimidocaproilo (mc) no escindible, como se muestra en la Figura 2.

En una realización particular, las formulaciones de la invención comprenden ADC anti-EGFR que se etiquetan con una etiqueta detectable o funcional. Las etiquetas detectables incluyen, pero no se limitan a, radioetiquetas tales como los isótopos ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}S , ^{34}S , ^{35}S , ^{36}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{99}Tc y ^{186}Re , que se pueden acoplar a los anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la técnica de generación de imágenes de anticuerpos. Las etiquetas también incluyen etiquetas fluorescentes y etiquetas usadas convencionalmente en la técnica para la generación de imágenes por MRI-CT. También incluyen etiquetas enzimáticas tales como peroxidasa de rábano picante. Las etiquetas incluyen, además, restos químicos tales como biotina que se puede detectar a través de unión a un resto detectable cognado específico, p. ej., avidina etiquetada.

Las etiquetas funcionales también pueden incluir sustancias que se diseñan para dirigirse al sitio de un tumor para provocar la destrucción del tejido tumoral. Dichas etiquetas funcionales incluyen fármacos citotóxicos tales como 5-fluorouracilo o ricino y enzimas tales como carboxipeptidasa o nitrorreductasa bacterianas, que son capaces de convertir profármacos en fármacos activos en el sitio de un tumor.

Como lo entenderán los expertos en la técnica, los agentes indicados anteriormente, así como otros agentes adecuados, pueden conjugarse o acoplarse al anticuerpo anti-EGFR, p. ej., el anticuerpo 1, de cualquier manera adecuada para producir un ADC anti-EGFR útil en la presente invención. Por ejemplo y sin limitación, en diversas realizaciones de la presente invención el anticuerpo anti-EGFR y agente(s) pueden acoplarse covalentemente y/o pueden conjugarse usando compuestos enlazadores, separadores y/o extensores, que en diversas realizaciones de la presente invención son escindibles o no escindibles, y resultan en que la célula diana internaliza el(los) agente(s) terapéutico(s).

En una realización, el anticuerpo 1 se conjuga con MMAF usando una ligadura de maleimidocaproilo no escindible (anticuerpo 1-mc-MMAF).

Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos con proteínas, y en particular con anticuerpos, son conocidas. (Véase, p. ej., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2a ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera et al. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); y Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58. Véase también, p. ej., la publicación PCT WO 89/12624.)

En una realización, el ADC comprende una región enlazadora entre el agente citotóxico y el anticuerpo. Por ejemplo, dichos compuestos enlazadores, separadores y/o extensores incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: separadores de ácido benzoico amino (véanse, por ejemplo y sin limitación, las patentes estadounidenses núms. 7.091.186 y 7.553.816,); maleimidocaproilo; p-aminobencilcarbamoilo (PAB); enlazadores escindibles por enzima lisosómicos (véase, por ejemplo y sin limitación, la patente estadounidense n.º 6.214.345,); maleimidocaproil-polietileno 20 glicol (MC(PEG)6-OH); N-metil-valina citrulina; N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (véase, por ejemplo y sin limitación, Yoshitake et al. (1979) Eur. J. Biochem., 101, 395-399,); N-

succinimidil 4-(2-piridilditio) butanoato (SPDB) (véase, por ejemplo y sin limitación, la patente estadounidense n.º 4.563.304.); N-Succinimidil 4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP); valina-citrulina; y otros compuestos enlazadores, separadores y/o extensores (véanse, por ejemplo y sin limitación, las patentes estadounidenses núms. 7.090.843, 7.223.837 y 7.659.241, y las publicaciones de patente estadounidense núms. 2004/0018194, 2004/0121940, 2006/0116422, 2007/0258987, 2008/0213289, 2008/0241128, 2008/0311136, 2008/0317747 y 2009/0010945). En términos generales, las técnicas para acoplar y/o conjugar los agentes indicados anteriormente, así como otros agentes, con miembros de unión específicos de la presente invención se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo y sin limitación, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Existen varias reacciones diferentes disponibles para el acoplamiento covalente de fármacos a anticuerpos. Con frecuencia se logra mediante la reacción de los residuos aminoacídicos de la molécula de anticuerpo, incluidos los grupos amina de lisina, los grupos de ácido carboxílico libres de ácido glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrido de cisteína y los diversos restos de los aminoácidos aromáticos. Uno de los métodos no específicos más usados comúnmente para el acoplamiento covalente es la reacción con carbodiimida para enlazar un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a grupos amino (o carboxi) del anticuerpo. Además, se han usado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para enlazar el grupo amino de un compuesto a grupos amino de la molécula de anticuerpo. También está disponible para el acoplamiento de fármacos a anticuerpos la reacción de base de Schiff. Este método implica la oxidación de periodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxilo para formar así un aldehído que a continuación se hace reaccionar con la molécula de anticuerpo. El acoplamiento se produce a través de la formación de una base de Schiff con grupos amino de la molécula de anticuerpo. También se pueden usar isotiocianatos como agentes de acoplamiento para acoplar covalentemente fármacos a anticuerpos. Los expertos en la técnica conocen otras técnicas y están dentro del alcance de la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de dichas técnicas se describen en, *p. ej.*, las patentes estadounidenses núms. 5.665.358; 5.643.573; y 5.556.623.

En ciertas realizaciones, un intermediario, que es el precursor del enlazador, se hace reaccionar con el fármaco en condiciones adecuadas. En ciertas realizaciones, se usan grupos reactivos en el fármaco y/o el intermediario. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermediario, o el fármaco derivado, posteriormente se hace reaccionar con el anticuerpo anti-EGFR en condiciones adecuadas.

Otros ejemplos de métodos de conjugación se describen en la patente estadounidense n.º 7.837.980 (Seattle Genetics), Carter y Senter (2008) *Cancer J*, 14(3):154, así como las solicitudes estadounidenses publicadas núms. 2004-0157782 A1 y 2005-0238649 y la publicación PCT n.º WO 05/081711.

En ciertas realizaciones, los ADC anti-EGFR se pueden purificar con el fin de obtener ADC que tienen una relación entre fármaco y anticuerpo deseada (DAR). En una realización de la invención, la formulación contiene la mezcla de ADC anti-EGFR que comprende ADC anti-EGFR que tienen una relación entre fármaco y anticuerpo (DAR) promedio deseada, *p. ej.*, una DAR promedio de aproximadamente 3. En una realización de la invención, la formulación comprende una mezcla de ADC que comprende ADC anti-EGFR que tienen un intervalo de DAR deseado, *p. ej.*, una DAR de aproximadamente 2-4.

En una realización, la formulación contiene una mezcla de ADC donde 70 % de los ADC presentes tiene una especie cargada con fármaco de 4 o menos, y en donde el ADC comprende el anticuerpo anti-EGFR y una auristatina. Alternativamente, el 75 % de los ADC presentes tiene una especie cargada con fármaco de 4 o menos; el 80 % de los ADC presentes tiene una especie cargada con fármaco de 4 o menos; el 85 % de los ADC presentes tiene una especie cargada con fármaco de 4 o menos; el 90 % de los ADC presentes tiene una especie cargada con fármaco de 4 o menos; o el 95 % de los ADC presentes tiene una especie cargada con fármaco de 4 o menos.

En una realización de la invención, la formulación comprende un ADC anti-EGFR que comprende un anticuerpo anti-EGFR conjugado con monometil auristatina F (MMAF), en donde dicho ADC 1-MMAF comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones de dominio de complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 20, 21 y 22, sacarosa, histidina y polisorbato 80, en donde la formulación comprende una mezcla de ADC que tiene una DAR promedio de aproximadamente 3 o una mezcla de ADC que tiene una DAR de aproximadamente 2-4. En una realización adicional de la invención, la formulación está liofilizada. En una realización adicional, el anticuerpo anti-EGFR se enlaza a MMAF a través de un enlazador maleimidocaproilo. En una realización adicional, el

anticuerpo anti-EGFR comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18.

5 En una realización, la formulación comprende un ADC anti-EGFR que comprende un anticuerpo anti-EGFR conjugado con monometil auristatina E (MMAE), en donde dicho ADC 1-MMAE comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones de dominio de complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 20, 21 y 22, sacarosa, histidina y polisorbato 80, en donde la formulación comprende una mezcla de ADC que tiene una DAR promedio de aproximadamente 3 o una mezcla de ADC que tiene una DAR de aproximadamente 2-4. En una realización adicional de la invención, la formulación está liofilizada. En una realización adicional, el anticuerpo anti-EGFR comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18.

15 La purificación de los ADC se puede lograr de tal modo que se recojan los ADC que tienen ciertas DAR. Por ejemplo, se puede usar la resina HIC para separar ADC con carga alta de fármaco de los ADC que tienen relaciones entre fármaco y anticuerpo óptimas (DAR), *p. ej.*, una DAR de 4 o menos. En una realización, se agrega una resina hidrófoba a una mezcla de ADC de manera que los ADC indeseados, es decir, ADC con cargas de fármaco más altas, se unan a la resina y se pueden retirar selectivamente de la mezcla. En ciertas realizaciones, la separación de los ADC se puede lograr al poner en contacto una mezcla de ADC (*p. ej.*, una mezcla que comprende una especie cargada con fármaco de ADC de 4 o menos y una especie cargada con fármaco de ADC de 6 o más) con una resina hidrófoba, en donde la cantidad de resina es suficiente para permitir la unión de la especie cargada con fármaco que se retira de la mezcla de ADC. La resina y la mezcla de ADC se mezclan entre sí, de manera que la especie de ADC que se va a retirar (*p. ej.*, una especie cargada con fármaco de 6 o más) se una a la resina y se puede separar de las otras especies de ADC en la mezcla de ADC. La cantidad de resina usada en el método se basa en la relación en peso entre la especie que se va a retirar y la resina, donde la cantidad de resina usada no permite una unión significativa de la especie cargada con fármaco que se desea. Por lo tanto, se pueden usar métodos para reducir la DAR promedio 5,5 a menos de 4. Además, se pueden usar métodos de purificación para aislar ADC que tienen un intervalo deseado de especies cargadas con fármaco, *p. ej.*, una especie cargada con fármaco de 4 o menos; una especie cargada con fármaco de 3 o menos; una especie cargada con fármaco de 2 o menos; una especie cargada con fármaco de 1 o menos.

Cierta(s) especie(s) de molécula(s) se une(n) a una superficie en función de interacciones hidrófobas entre la especie y una resina hidrófoba. En un caso, la descripción se refiere a un proceso de purificación que depende de la intermezcla de una resina hidrófoba y una mezcla de ADC, en donde la cantidad de resina agregada a la mezcla determina qué especie (*p. ej.*, ADC con una DAR de 6 o más) se unirá. Following producción y purificación of an anticuerpo from an expresión sistema (*p. ej.*, a mamífero expresión sistema), the anticuerpo is reduced y coupled to a fármaco through a conjugación reacción. La mezcla de ADC resultante frecuentemente contiene ADC que tienen un intervalo de DAR, *p. ej.*, 1 a 8. En un caso, la mezcla de ADC comprende una especie cargada con fármaco de 4 o menos y una especie cargada con fármaco de 6 o más. Según los métodos de la descripción, la mezcla de ADC se puede purificar usando un proceso, tal como, pero que no se limita a, un proceso en lotes, de manera que los ADC que tienen una especie cargada con fármaco de 4 o menos se seleccionen y separen de ADC que tienen una carga de fármaco más alta (*p. ej.*, ADC que tienen una especie cargada con fármaco de 6 o más). En particular, los métodos de purificación descritos en la presente memoria se pueden usar para aislar ADC que tienen cualquier intervalo deseado de DAR, *p. ej.*, una DAR de 4 o menos, una DAR de 3 o menos, una DAR de 2 o menos.

45 Por lo tanto, en un caso, una mezcla de ADC que comprende una especie cargada con fármaco de 4 o menos y una especie cargada con fármaco de 6 o más se puede poner en contacto con una resina hidrófoba para formar una mezcla de resina mezcla, en donde la cantidad de resina hidrófoba que se pone en contacto con la mezcla de ADC es suficiente para permitir la unión de la especie cargada con fármaco de 6 o más a la resina, pero no permite la unión significativa de la especie cargada con fármaco de 4 o menos; y retirar la resina hidrófoba de la mezcla de ADC, de manera que se obtenga la composición que comprende ADC, en donde la composición comprende menos de 15 % de especie cargada con fármaco de 6 o más, y en donde el ADC comprende un anticuerpo conjugado con una auristatina. En un caso aparte, el método puede incluir poner en contacto una mezcla de ADC que comprende una especie cargada con fármaco de 4 o menos y una especie cargada con fármaco de 6 o más con una resina hidrófoba para formar una mezcla de resina mezcla, en donde la cantidad de resina hidrófoba que se pone en contacto con la mezcla de ADC es suficiente para permitir la unión de la especie cargada con fármaco de 6 o más a la resina, pero no permite la unión significativa de la especie cargada con fármaco de 4 o menos; y retirar la resina hidrófoba de la mezcla de ADC, de manera que se obtenga la composición que comprende ADC, en donde la composición comprende menos de 15 % de especie cargada con fármaco de 6 o más, y en donde el ADC comprende un anticuerpo conjugado con una auristatina, en donde el peso de la resina hidrófoba es 3 a 12 veces mayor que el peso de la especie cargada con fármaco de 6 o más en la mezcla de ADC.

El método de separación de ADC se puede llevar a cabo usando un método de purificación en lotes. El proceso de purificación en lotes generalmente incluye agregar la mezcla de ADC a la resina hidrófoba en un recipiente, mezclar y posteriormente separar la resina del sobrenadante. Por ejemplo, en el contexto de la purificación en lotes, se puede preparar una resina hidrófoba en o equilibrada con el tampón de equilibrio deseado. Por lo tanto, se puede obtener una suspensión de la resina hidrófoba. La mezcla de ADC a continuación se puede poner en contacto con la suspensión para adsorber las especies específicas de ADC que se van a separar por medio de la resina hidrófoba. Después, la disolución que comprende los ADC deseados que no se unen al material de resina hidrófoba se pueden separar de la suspensión, p. ej., mediante filtración o al dejar que la suspensión se deposite y retirar el sobrenadante. La suspensión resultante se puede someter a una o más etapas de lavado. Para eluir los ADC unidos, se puede reducir la concentración de sal. En un caso, el proceso usado en la descripción incluye no más de 50 g de resina hidrófoba.

Por lo tanto, se puede usar un método en lotes para poner en contacto una mezcla de ADC que comprende una especie cargada con fármaco de 4 o menos y una especie cargada con fármaco de 6 o más con una resina hidrófoba para formar una mezcla de resina mezcla, en donde la cantidad de resina hidrófoba que se pone en contacto con la mezcla de ADC es suficiente para permitir la unión de la especie cargada con fármaco de 6 o más a la resina, pero no permite la unión significativa de la especie cargada con fármaco de 4 o menos; y retirar la resina hidrófoba de la mezcla de ADC, de manera que se obtenga la composición que comprende ADC, en donde la composición comprende menos de 15 % de especie cargada con fármaco de 6 o más, y en donde el ADC comprende un anticuerpo conjugado con una auristatina. En un caso aparte, el método en lotes se usa para poner en contacto una mezcla de ADC que comprende una especie cargada con fármaco de 4 o menos y una especie cargada con fármaco de 6 o más con una resina hidrófoba para formar una mezcla de resina mezcla, en donde la cantidad de resina hidrófoba que se pone en contacto con la mezcla de ADC es suficiente para permitir la unión de la especie cargada con fármaco de 6 o más a la resina, pero no permite la unión significativa de la especie cargada con fármaco de 4 o menos; y retirar la resina hidrófoba de la mezcla de ADC, de manera que se obtenga la composición que comprende ADC, en donde la composición comprende menos de 15 % de especie cargada con fármaco de 6 o más, y en donde el ADC comprende un anticuerpo conjugado con una auristatina, en donde el peso de la resina hidrófoba es 3 a 12 veces mayor que el peso de la especie cargada con fármaco de 6 o más en la mezcla de ADC.

Alternativamente, la purificación se puede llevar a cabo usando un proceso de circulación, por el cual la resina se carga en un contenedor y la mezcla de ADC se pasa por el lecho de resina hidrófoba hasta que se hayan retirado las especies específicas de ADC que se van a separar. El sobrenadante (que contiene la especie de ADC deseada) a continuación se bombea desde el contenedor y el lecho de resina se puede someter a etapas de lavado.

También se puede usar un proceso de circulación para poner en contacto una mezcla de ADC que comprende una especie cargada con fármaco de 4 o menos y una especie cargada con fármaco de 6 o más con una resina hidrófoba para formar una mezcla de resina mezcla, en donde la cantidad de resina hidrófoba que se pone en contacto con la mezcla de ADC es suficiente para permitir la unión de la especie cargada con fármaco de 6 o más a la resina, pero no permite la unión significativa de la especie cargada con fármaco de 4 o menos; y retirar la resina hidrófoba de la mezcla de ADC, de manera que se obtenga la composición que comprende ADC, en donde la composición comprende menos de 15 % de especie cargada con fármaco de 6 o más, y en donde el ADC comprende un anticuerpo conjugado con una auristatina. En un caso aparte, se usa un proceso de circulación para poner en contacto una mezcla de ADC que comprende una especie cargada con fármaco de 4 o menos y una especie cargada con fármaco de 6 o más con una resina hidrófoba para formar una mezcla de resina mezcla, en donde la cantidad de resina hidrófoba que se pone en contacto con la mezcla de ADC es suficiente para permitir la unión de la especie cargada con fármaco de 6 o más a la resina, pero no permite la unión significativa de la especie cargada con fármaco de 4 o menos; y retirar la resina hidrófoba de la mezcla de ADC, de manera que se obtenga la composición que comprende ADC, en donde la composición comprende menos de 15 % de especie cargada con fármaco de 6 o más, y en donde el ADC comprende un anticuerpo conjugado con una auristatina, en donde el peso de la resina hidrófoba es 3 a 12 veces mayor que el peso de la especie cargada con fármaco de 6 o más en la mezcla de ADC.

Alternativamente, se puede llevar a cabo la purificación usando un proceso de flujo continuo por el cual se carga la resina en un contenedor, p. ej., una columna, y se pasa la mezcla de ADC por la resina cargada de manera que la especie de ADC deseada no se una sustancialmente a la resina y fluya a través de la resina, y la especie de ADC indeseada se una a la resina. Se puede llevar a cabo un proceso de flujo continuo en un modo de pasada simple (donde las especies de ADC de interés se obtienen como resultado de una única pasada a través de la resina del contenedor) o en un modo de múltiples pasadas (donde las especies de ADC de interés se obtienen como resultado de múltiples pasadas a través de la resina del contenedor). El proceso de flujo continuo se lleva a cabo de manera que el peso de la resina seleccionada se une a la población de ADC indeseados, y los ADC deseados (p. ej., DAR 2-4) fluyen por la resina y se recogen en el flujo continuo después de una o múltiples pasadas.

En un caso de la descripción, se puede usar un proceso de flujo continuo para poner en contacto una mezcla de ADC que comprende una especie cargada con fármaco de 4 o menos y una especie cargada con fármaco de 6 o

más con una resina hidrófoba, en donde la cantidad de resina hidrófoba que se pone en contacto con la mezcla de ADC es suficiente para permitir la unión de la especie cargada con fármaco de 6 o más a la resina, pero no permite la unión significativa de la especie cargada con fármaco de 4 o menos, donde la especie cargada con fármaco de 4 o menos pasa a través de la resina y posteriormente se recoge después de una o múltiples pasadas, de manera que se obtiene la composición que comprende los ADC deseados (p. ej., DAR 2-4), en donde la composición comprende menos de 15 % de especie cargada con fármaco de 6 o más, y en donde el ADC comprende un anticuerpo conjugado con una auristatina. En un caso aparte, se usa un proceso de flujo continuo para poner en contacto una mezcla de ADC que comprende una especie cargada con fármaco de 4 o menos y una especie cargada con fármaco de 6 o más con una resina hidrófoba para formar una mezcla de resina mezcla, en donde la cantidad de resina hidrófoba que se pone en contacto con la mezcla de ADC es suficiente para permitir la unión de la especie cargada con fármaco de 6 o más a la resina, pero no permite la unión significativa de la especie cargada con fármaco de 4 o menos, donde la especie cargada con fármaco de 4 o menos pasa a través de la resina y posteriormente se recoge, de manera que se obtiene la composición que comprende los ADC, en donde la composición comprende menos de 15 % de especie cargada con fármaco de 6 o más, y en donde el ADC comprende un anticuerpo conjugado con una auristatina, en donde la cantidad de resina hidrófoba es 3 a 12 veces mayor que el peso de la especie cargada con fármaco de 6 o más en la mezcla de ADC.

Los métodos de purificación se pueden basar en el uso de una resina hidrófoba para separar las especies de ADC con carga de fármaco alta frente a baja. La resina hidrófoba comprende grupos hidrófobos que interactúan con las propiedades hidrófobas de los ADC. Los grupos hidrófobos en el ADC interactúan con grupos hidrófobos dentro de la resina hidrófoba. Cuanto más hidrófoba es una proteína, con mayor intensidad interactuará con la resina hidrófoba.

La resina hidrófoba normalmente comprende una matriz base (p. ej., agarosa reticulada o material de copolímero sintético) a la cual se acoplan los ligandos hidrófobos (p. ej., grupos alquilo o arilo grupos). Existen muchas resinas hidrófobas disponibles comercialmente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, columnas de Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow con sustitución baja o alta (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Phenyl Sepharose™ High Performance (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Octyl Sepharose™ High Performance (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Fractogel™ EMD Propyl o Fractogel™ EMD Phenyl (E. Merck, Alemania); soportes Macro-Prep™ Methyl o Macro-Prep™ t-Butyl (Bio-Rad, California); WP HI-Propyl (C₃)™ (J. T. Baker, New Jersey); y Toyopearl™ éter, hexilo, fenilo o butilo (TosoHaas, PA). En una realización, la resina hidrófoba es una resina hidrófoba de butilo. En otro caso, la resina hidrófoba es una resina hidrófoba de fenilo. En otro caso, la resina hidrófoba es una resina hidrófoba de hexilo, una resina hidrófoba de octilo o una resina hidrófoba de decilo. En un caso, la resina hidrófoba es un polímero metacrílico que tiene ligandos n-butilo (p. ej., TOYOPEARL® Butyl-600M).

Se describen métodos adicionales para purificar ADC con DAR alta y baja separados en la solicitud provisional de los EE. UU. n.º 61/792.834 y la solicitud de los EE. UU. n.º 14/210.602, presentada el 14 de marzo de 2014.

IV. Usos de la formulación

De acuerdo con los presentes métodos, una formulación que comprende un ADC anti-EGFR se administra a un sujeto que tiene (o en riesgo de tener) un trastorno que requiere tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR o un ADC anti-EGFR. La formulación que comprende el ADC anti-EGFR se puede administrar sola o en una combinación con otras composiciones en la prevención o tratamiento del trastorno que requiere tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR.

Según se usa en la presente memoria, el término "un trastorno en el que la actividad de EGFR es nociva" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que se ha demostrado o se sospecha que la presencia de EGFR en un sujeto que padece el trastorno es responsable de la patofisiología del trastorno o es un factor que contribuye a empeorar el trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el que la actividad de EGFR es nociva es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la actividad de EGFR alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Dichos trastornos se pueden evidenciar, por ejemplo, por un aumento en la actividad EGFR o un aumento en la cantidad de EGFR presente en una muestra biológica de un sujeto que padece el trastorno (p. ej., un aumento en la concentración de EGFR en una muestra de tejido, en suero, plasma, fluido sinovial, etc. del sujeto), que se puede detectar, por ejemplo, al usar un anticuerpo anti-EGFR.

Las formulaciones de la invención se pueden usar para tratar el cáncer. Los ejemplos de cáncer que se puede tratar incluyen, pero no se limitan a, glioblastoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas, cáncer de mama, tumores de células escamosas, cáncer anal, cáncer de piel y cáncer vulvar.

En un caso, la formulación que comprende un ADC1-MMAF se puede administrar a un sujeto para el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas (incluido, pero sin limitarse a, cáncer hipofaríngeo, cáncer orofaríngeo, cáncer esofágico, cáncer laríngeo y cáncer de cavidad oral), cáncer pancreático y cáncer

gástrico. En un caso de la descripción, una formulación que comprende un ADC1-MMAF se administra a un sujeto para tratar un tumor sólido que probablemente sobreexpresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cáncer de pulmón no microcítico escamoso (NSCLC) o glioblastoma multiforme. Los ejemplos adicionales de dichos cánceres que se pueden tratar con las composiciones de la invención incluyen tumores escamosos (incluidos tumores escamosos de pulmón, de vías respiratorias y digestivas altas, de cuello uterino, etc.), glioblastoma, glioma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas, cáncer de mama, tumores de células escamosas, cáncer anal, cáncer de piel y cáncer vulvar.

La especificidad única de los ADC anti-EGFR proporciona usos diagnósticos y terapéuticos para identificar, caracterizar, convertir en diana y tratar, reducir o eliminar varios tipos de células oncógenas y tipos de tumores, por ejemplo, pero sin limitarse a, glioblastoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas, cáncer de mama, tumores de células escamosas, cáncer anal, cáncer de piel y cáncer vulvar, sin los problemas asociados con la captación del tejido normal que se pueden observar con anticuerpos para EGFR conocidos anteriormente. Por lo tanto, las células que sobreexpresan EGFR (*p. ej.*, mediante amplificación o expresión de un mutante o variante de EGFR), y en realizaciones específicas, aquellas que demuestran modificación postraduccion aberrante se pueden reconocer, aislar, caracterizar, convertir en diana y tratar o eliminar usando ADC anti-EGFR.

En un caso de la descripción, se proporciona un método para tratar a un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC anti-EGFR en cualquiera de las formulaciones descritas en la presente memoria, en donde el sujeto tiene un trastorno que requiere tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR en la formulación (*p. ej.*, un tumor, una afección cancerosa, una afección precancerosa y cualquier afección relacionada con o que resulta del crecimiento celular hiperproliferativo), tal como, pero que no se limita a, un tumor sólido que probablemente sobreexpresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o glioblastoma multiforme.

Los métodos para detectar la expresión de EGFR en un tumor se conocen en la técnica, *p. ej.*, el kit EGFR pharmDx™ (Dako). En cambio, un "tumor negativo para EGFR" se define como un tumor que tiene ausencia de tinción en membrana de EGFR con respecto al fondo en una muestra de tumor, según se determina mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Las formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR, por lo tanto, se pueden usar específicamente para categorizar la naturaleza de los tumores o células oncógenas con EGFR, mediante tinción o reconocimiento de cualquier otra manera de los tumores o células en donde está presente la sobreexpresión de EGFR, particularmente amplificación y/o mutación de EGFR, particularmente EGFR de2-7. Además, se ha demostrado que los ADC anti-EGFR demuestran actividad antitumoral significativa *in vivo* contra tumores que contienen EGFR amplificado y contra xenoinjertos positivos para EGFR de2-7.

Por lo tanto, en un caso adicional de la descripción, se proporciona un método para el tratamiento de un tumor, una afección cancerosa, una afección precancerosa y cualquier afección relacionada con o que resulta del crecimiento celular hiperproliferativo que comprende la administración de un ADC anti-EGFR en una formulación descrita en la presente memoria.

Se conocen diversos sistemas de suministro y se pueden usar para administrar formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los ADC se pueden administrar, por ejemplo, mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de la mucosa epitelial o mucocutánea (*p. ej.*, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal mucosa, y similares) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos tales como agentes quimioterapéuticos. La administración puede ser sistémica o local. En un caso, la formulación de la descripción se suministra a un sujeto por vía intravenosa. En otro caso, la formulación de la descripción se suministra a un sujeto por vía subcutánea. En un caso, el sujeto se administra la formulación (autoadministración).

La cantidad de ADC que es eficaz en el tratamiento o prevención de un trastorno que requiere tratamiento con el ADC anti-EGFR en la formulación, *p. ej.*, un cáncer, se puede determinar mediante técnicas clínicas estándares. Además, se pueden emplear, opcionalmente, ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa también dependerá de la vía de administración, y el estadio del trastorno inmunológico o cáncer que expresa EGFR, y se puede decidir según la opinión del médico y las circunstancias de cada paciente. En un caso, una cantidad terapéuticamente eficaz del ADC anti-EGFR en la formulación se administra a un sujeto que lo necesita. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de un ADC anti-EGFR, según se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad eficaz para la prevención o el tratamiento o el alivio de un síntoma de un trastorno para el tratamiento en el cual el ADC es eficaz. Un ejemplo de una cantidad terapéuticamente eficaz del ADC anti-EGFR en la formulación es una cantidad suficiente para inhibir la actividad nociva de EGFR o tratar un trastorno en el que la actividad de EGFR es nociva.

Se puede administrar una dosis de un ADC anti-EGFR, por ejemplo, diariamente, una vez por semana (semanalmente), dos veces por semana, tres veces por semana, cuatro veces por semana, cinco veces por semana, cada dos semanas, cada tres semanas, mensualmente o cada cuatro semanas o de cualquier otra manera según sea necesario.

- 5 En ciertos casos, el ADC anti-EGFR se puede coadministrar a un sujeto con uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar el cáncer. El término "coadministrar" significa la administración de dos o más agentes farmacéuticos o tratamientos diferentes (p. ej., tratamiento por radiación) que se administran a un sujeto mediante combinación en la misma composición farmacéutica o composiciones farmacéuticas separadas. Por lo tanto, la
10 coadministración implica la administración al mismo tiempo de una única composición farmacéutica que comprende dos o más agentes farmacéuticos o la administración de dos o más composiciones diferentes al mismo sujeto al mismo tiempo o en momentos diferentes.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, donde los ejemplos de agentes incluyen, tales como radicación, agentes alquilantes, inhibidores de angiogénesis, anticuerpos, antimetabolitos, antimitóticos, antiproliferativos, antivíricos, inhibidores de aurora cinasa, inhibidores de promotores de apoptosis (por ejemplo, Bcl-xL, Bcl-w y Bfl-1), activadores de la vía del receptor de muerte, inhibidores de Bcr-Abl cinasa, anticuerpos BiTE (acopladores a linfocito T biespecíficos), conjugados de fármaco y anticuerpo, modificadores de respuesta biológica, inhibidores de cinasa dependientes de ciclina, inhibidores del ciclo celular, inhibidores de ciclooxigenasa-2, DVD (anticuerpos de dominio variable doble), inhibidores del receptor homólogo de oncogén vírico de la leucemia
15 (ErbB2), inhibidores de factor de crecimiento, inhibidores de proteína de choque térmico (HSP)-90, inhibidores de histona desacetilasa (HDAC), terapias hormonales, tratamientos inmunológicos, inhibidores de inhibidores de proteínas de apoptosis (IAP), antibióticos intercalantes, inhibidores de cinasa, inhibidores de cinesina, inhibidores de Jak2, inhibidores de diana en mamíferos de rapamicina, microARN, inhibidores de cinasa regulados por señal extracelular activada por mitógeno, proteínas de unión multivalentes, fármacos antiinflamatorios no esteroideos
20 (AINE), inhibidores de poli ADP (adenosina difosfato)-ribosa polimerasa (PARP), agentes quimioterapéuticos de platino, inhibidores de cinasa similar a polo (Plk), inhibidores de fosfoinosítido-3 cinasa (bromodominio), inhibidores de proteosoma, análogos de purina, análogos de pirimidina, inhibidores de receptor tirosina cinasa, alcaloides vegetales etinoides/deltoides, ácidos ribonucleicos inhibidores pequeños (ARNip), inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de ubiquitina ligasa y similares, y en combinación con uno o más de estos agentes.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos anticuerpos BiTE, que son anticuerpos biespecíficos que dirigen el ataque de los linfocitos T a células cancerosas al unirse simultáneamente a las dos células. A continuación, el linfocito T ataca a la célula cancerosa diana. Los ejemplos de anticuerpos BiTE incluyen adecatumumab (Micromet MT201), blinatumomab (Micromet MT103) y similares. Sin limitarnos a la teoría,
30 uno de los mecanismos por el cual los linfocitos T desencadenan la apoptosis de la célula cancerosa diana es mediante excitosis de componentes granulares citolíticos, que incluyen perforina y granzima B. En este sentido, se ha demostrado que Bcl-2 atenúa la inducción de la apoptosis por perforina y granzima B. Estos datos sugieren que la inhibición de Bcl-2 podría potenciar los efectos citotóxicos desencadenados por los linfocitos T cuando se dirigen a células cancerosas (V.R. Sutton, D.L. Vaux and J.A. Trapani, J. of Immunology 1997, 158 (12), 5783).

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluido ARNip. Los ARNip son moléculas que tienen bases de ARN endógenas o nucleótidos químicamente modificados. Las modificaciones no suprimen la actividad celular, sino que imparten mayor estabilidad y/o mayor potencia celular. Los ejemplos de modificaciones químicas incluyen grupos fosforotioato, 2'-desoxinucleótido, ribonucleótidos que contienen 2'-OCH₃, 2'-F-ribonucleótidos, 2'-metoxietil ribonucleótidos, combinaciones de estos y similares. El ARNip puede tener longitudes
40 (p. ej., 10-200 bps) y estructuras (p. ej., horquillas, cadenas simples/dobles, abombamientos, mellas/espacios, desfaces) variables y se procesan en células para proporcionar un silenciamiento génico activo. Un ARNip bicatenario (ARNbc) puede tener la misma cantidad de nucleótidos en cada cadena (extremos romos) o extremos asimétricos (prolongaciones). La prolongación de 1-2 nucleótidos puede estar en la cadena codificante y/o la no codificante, así como puede estar presente en los extremos hacia 5' y/o hacia 3' de una cadena dada.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos DVD y otras proteínas de unión multivalentes. Las proteínas de unión multivalentes son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno. Las proteínas de unión multivalentes se genomanipulan para tener los tres o más sitios de unión a antígeno y generalmente no son anticuerpos de origen natural. El término "proteína de unión multiespecífica" significa una proteína de unión capaz de unirse a dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Las proteínas de unión de dominio variable doble (DVD) son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno. Dichas DVD pueden ser monoespecíficas (es decir, capaces de unirse a un antígeno) o multiespecíficas (es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos). Las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena ligera se denominan Ig
55

60

DVD. Cada mitad de una Ig DVD comprende un polipéptido DVD de cadena pesada, un polipéptido DVD de cadena ligera y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de 6 CDR implicadas en la unión a antígeno por sitio de unión a antígeno. Las DVD multiespecíficas incluyen proteínas de unión DVD que se unen a DLL4 y VEGF, o C-met y EGFR o ErbB3 y EGFR.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos agentes alquilantes. Los agentes alquilantes incluyen altretamina, AMD-473, AP-5280, apacicuona, bendamustina, brostalicina, busulfán, carbocuoona, carmustina (BCNU), clorambucilo, CLORETAZINE® (laromustina, VNP 40101M), ciclofosfamida, decarbazina, estramustina, fotemustina, glufosfamida, ifosfamida, KW-2170, lomustina (CCNU), mafosfamida, melfalán, mitobronitol, mitolactol, nimustina, N-óxido de mostaza nitrogenada, ranimustina, temozolomida, tiotepa, TREANDA® (bendamustina), treosulfán, rofosfamida y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de angiogénesis. Los inhibidores de angiogénesis incluyen inhibidores del receptor tirosina cinasa (Tie-2) específicos endoteliales, inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), inhibidores del factor de crecimiento de insulina 2 (IGFR-2), inhibidores de metaloproteínasa de matriz 2 (MMP-2), inhibidores de metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9), inhibidores del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), análogos de tromboespondina, inhibidores del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular de tirosina cinasa (VEGFR) y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos antimetabolitos. Los antimetabolitos incluyen ALIMTA® (pemetrexed disódico, LY231514, MTA), 5-azacitidina, XELODA® (capecitabina), carmofur, LEUSTAT® (cladribina), clofarabina, citarabina, citarabine ocfosfato, citosina arabinósido, decitabina, deferoxamina, doxifluridina, eflornitina, EICAR (5-etinil-1-β-D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida), enocitabina, etnilcitidina, fludarabina, 5-fluorouracilo solo o en combinación con leucovorina, GEMZAR® (gemcitabina), hidroxiurea, ALKERAN®(melfalán), mercaptopurina, 6-mercaptopurina ribósido, metotrexato, ácido micofenólico, nelarabina, nolatrexed, ocfosfato, pelitrexol, pentostatina, raltitrexed, Ribavirina, triapina, trimetrexato, S-1, tiazofurina, tegafur, TS-1, vidarabina, UFT y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos antiviricos. Los antiviricos incluyen ritonavir, hidroxicloquina y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de aurora cinasa. Los inhibidores de aurora cinasa incluyen ABT-348, AZD-1152, MLN-8054, VX-680, inhibidores específicos para Aurora A cinasa, inhibidores específicos para Aurora B cinasa e inhibidores de pan-Aurora cinasa y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de proteína Bcl-2. Los inhibidores de proteína Bcl-2 incluyen AT-101 ((-)-gossipol), GENASENSE® (G3139 u oblimersén (oligonucleótido no codificante dirigido a Bcl-2)), IPI-194, IPI-565, N-(4-(4-((4'-cloro(1,1'-bifenil)-2-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-nitrobenzenosulfonamida) (ABT-737), N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5,5-dimetil-1-ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonyl)benzenosulfonamida) (ABT-263), GX-070 (obatoclast), ABT-199 y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de Bcr-Abl cinasa, tales como DASATINIB® (BMS-354825), GLEEVEC® (imatinib) y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de CDK. Los inhibidores de CDK incluyen AZD-5438, BMI-1040, BMS-032, BMS-387, CVT-2584, flavopiridol, GPC-286199, MCS-5A, PD0332991, PH-690509, seliciclib (CYC-202, R-roscovitina), ZK-304709 y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de COX-2. Los inhibidores de COX-2 incluyen ABT-963, ARCOXIA® (etoricoxib), BEXTRA® (valdecoxib), BMS347070, CELEBREX® (celecoxib), COX-189 (lumiracoxib), CT-3, DERAMAXX® (deracoxib), JTE-522, 4-metil-2-(3,4-dimetilfenil)-1-(4-

sulfamoilfenil-1H-pirrol), MK-663 (etoricoxib), NS-398, parecoxib, RS-57067, SC-58125, SD-8381, SVT-2016, S-2474, T-614, VIOXX® (rofecoxib) y similares.

5 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos otros inhibidores de EGFR. Los inhibidores de EGFR incluyen anticuerpos para EGFR, ABX-EGF, inmunoliposomas anti-EGFR, vacuna de EGF, EMD-7200, ERBITUX® (cetuximab), HR3, anticuerpos IgA, IRESSA® (gefitinib), TARCEVA® (erlotinib u OSI-774), TP-38, proteína de fusión de EGFR, TYKERB® (lapatinib) y similares.

10 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de HER2. Los inhibidores del receptor ErbB2 incluyen CP-724-714, CI-1033 (canertinib), HERCEPTIN® (trastuzumab), TYKERB® (lapatinib), OMNITARG® (2C4, pertuzumab), TAK-165, GW-572016 (ionafarnib), GW-282974, EKB-569, PI-166, dHER2 (vacuna HER2), APC-8024 (vacuna HER-2), anticuerpos biespecífico anti-HER/2neu, B7.her2IgG3, anticuerpos biespecíficos trifuncionales AS HER2, mAB AR-209, mAB 2B-1 y similares.

15 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de histona desacetilasa, tales como depsipéptido, LAQ-824, MS-275, trapoxina, ácido suberoilánilido hidroxámico (SAHA), TSA, ácido valproico y similares.

20 Los inhibidores de HSP-90 incluyen 17-AAG-nab, 17-AAG, CNF-101, CNF-1010, CNF-2024, 17-DMAG, geldanamicina, IPI-504, KOS-953, MYCOGRAB® (anticuerpo recombinante humano para HSP-90), NCS-683664, PU24FCI, PU-3, radicolol, SNX-2112, STA-9090 VER49009 y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de inhibidores de proteínas de apoptosis, tales como HGS1029, GDC-0145, GDC-0152, LCL-161, LBW-242 y similares.

25 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos otros ADC, tales como los ADC anti-CD22-MC-MMAF, anti-CD22-MC-MMAE, anti-CD22-MCC-DM1, CR-011-vcMMAE, PSMA-ADC, MEDI-547, SGN-19Am SGN-35, SGN-75 y similares.

30 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos activadores de la vía del receptor de muerte, tales como TRAIL, anticuerpos u otros agentes que se dirigen a TRAIL o receptores de muerte (*p. ej.*, DR4 y DR5) tales como Apomab, conatumumab, ETR2-ST01, GDC0145, (*lexatumumab*), HGS-1029, LBY-135, PRO-1762 y trastuzumab.

35 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de cinesina, tales como inhibidores de Eg5 tales como AZD4877, ARRY-520; inhibidores de CENPE tales como GSK923295A y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de JAK-2, tales como CEP-701 (lesaurtinib), XL019 e INCB018424 y similares.

40 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de MEK, tales como ARRY-142886, ARRY-438162 PD-325901, PD-98059 y similares.

45 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de mTOR, tales como AP-23573, CCI-779, everolimus, RAD-001, rapamicina, temsirolimus, inhibidores de TORC1/TORC2 competitivos con ATP, incluidos PI-103, PP242, PP30, Torin 1 y similares.

50 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como AMIGESIC® (salsalato), DOLOBID® (diflunisal), MOTRIN® (ibuprofeno), ORUDIS® (cetoprofeno), RELAFEN® (nabumetona), FELDENE® (piroxicam), ibuprofeno en crema, ALEVE® (naproxeno) y NAPROSYN® (naproxeno), VOLTAREN® (diclofenac), INDOCIN® (indometacina), CLINORIL® (sulindac), TOLECTIN® (tolmetin), LODINE® (etodolac), TORADOL® (cetorolac), DAYPRO® (oxaprozina) y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de PDGFR, tales como C-451, CP-673, CP-868596 y similares.

5 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos agentes quimioterapéuticos de platino, tales como cisplatino, ELOXATIN® (oxaliplatino) eptaplatino, lobaplatino, nedaplatino, PARAPLATIN® (carboplatino), satraplatino, picoplatino y similares.

10 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de cinasa similares a polo, p. ej., BI-2536 y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de fosfoinosítido-3 cinasa (PI3K), tales como wortmanina, LY294002, XL-147, CAL-120, ONC-21, AEZS-127, ETP-45658, PX-866, GDC-0941, BGT226, BEZ235, XL765 y similares.

15 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos análogos de tromboespondina, tales como ABT-510 (mimético de tromboespondina), ABT-567, ABT-898 (péptido mimético de tromboespondina-1), TSP-1 y similares.

20 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de VEGFR, tales como AVASTIN® (bevacizumab), ABT-869, AEE-788, ANGIOZYME™ (una ribozima que inhibe la angiogénesis (Ribozyme Pharmaceuticals (Boulder, CO.) y Chiron, (Emeryville, CA)), axitinib (AG-13736), AZD-2171, CP-547,632, IM-862, MACUGEN (pegaptamib), NEXAVAR® (sorafenib, BAY43-9006), pazopanib (GW-786034), vatalanib (PTK-787, ZK-222584), SUTENT® (sunitinib, SU-11248), trampa de VEGF ZACTIMA™ (vandetanib, ZD-6474), GA101, ofatumumab, ABT-806 (mAb-806), anticuerpos específicos para ErbB3, anticuerpos específicos para BSG2, anticuerpos específicos para DLL4 y anticuerpos específicos para C-met y similares. Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos antibióticos, tales como antibióticos intercalantes aclarrubicina, actinomicina D, amrubicina, anamicina, adriamicina, BLENOXANE® (bleomicina), daunorrubicina, CAELYX® o MYOCET® (doxorubicina liposómica), elsamitrucina, epirubicina, glarbuicina, ZAVEDOS® (idarrubicina), mitomicina C, nemorrubicina, neocarzinostatina, peplomicina, pirarrubicina, rebeccamicina, estimalamer, estreptozocina, VALSTAR® (valrubicina), zinostatina y similares.

35 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de topoisomerasa, tales como aclarrubicina, 9-aminocamptotecina, amonafida, amsacrina, becatecarina, belotecan, BN-80915, CAMPTOSAR® (clorhidrato de irinotecán), camptotecina, CARDIOXANE® (dexrazoxina), diflomotecán, edotecarina, ELLENCE® o PHARMORUBICIN® (epirubicina), etopósido, exatecán, 10-hidroxicamptotecina, gimitecán, lurtotecán, mitoxantrona, oratecina, pirarubicina, pixantrona, rubitecán, sobuzoxano, SN-38, taflupósido, topotecán y similares.

40 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos anticuerpos terapéuticos, tales como AVASTIN® (bevacizumab), anticuerpos específicos para CD40, chTNT-1/B, denosumab, ERBITUX® (cetuximab), HUMAX-CD4® (zanolimumab), anticuerpos específicos para IGF1R, lintuzumab, PANOREX® (edrecolomab), RENCAREX® (WX G250), RITUXAN® (rituximab), ticilimumab, trastuzimab, anticuerpos para CD20 tipos I y II y similares.

45 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidas terapias hormonales, tales como ARIMIDEX® (anastrozol), AROMASIN® (exemestano), arzoxifeno, CASODEX® (bicalutamida), CETROTIDE® (cetorelix), degarelix, deslorelina, DESOPAN® (trilostano), dexametasona, DROGENIL® (flutamida), EVISTA® (raloxifeno), AFEMA™ (fadrozol), FARESTON® (toremifeno), FASLODEX® (fulvestrant), FEMARA® (letrozol), formestano, glucocorticoides, HECTOROL® (doxercalciferol), RENAGEL® (sevelamer carbonato), lasofoxifeno, acetato de leuprolido, MEGACE® (megesterol), MIFEPREX® (mifepristona), NILANDRON™ (nilutamida), NOLVADEX® (citrate de tamoxifeno), PLENAXIS™ (abarelix), prednisona, PROPECIA® (finasterida), rilostano, SUPREFACT® (buserelina), TRELSTAR® (hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH)), VANTAS® (implante de Histrelina), VETORYL® (trilostano o modrastano), ZOLADEX® (fosrelina, goserelina) y similares.

55

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos deltoides y retinoides, tales como seocalcitol (EB1089, CB1093), lexacalcitol (KH1060), fenretinida, PANRETIN® (aliretinoína), ATRAGEN® (tretinoína liposómica), TARGRETIN® (bexaroteno), LGD-1550 y similares.

- 5 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de PARP, tales como veliparib, olaparib, KU-59436, AZD-2281, AG-014699, BSI-201, BGP-15, INO-1001, ONO-2231 y similares.

- 10 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos alcaloides vegetales, tales como, pero sin limitarse a, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de proteasoma, tales como VELCADE® (bortezomib), MG132, NPI-0052, PR-171 y similares.

- 15 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos tratamientos inmunológicos. Los ejemplos de tratamiento inmunológicos incluyen interferones y otros agentes potenciadores de la inmunidad. Los interferones incluyen interferón alfa, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta, interferón gamma-la, ACTIMMUNE® (interferón gamma-lb) o interferón gamma-nl, combinaciones de estos y similares. Otros agentes incluyen ALFAFERONE®, (IFN- α), BAM-002 (glutación oxidado), BEROMUN® (tasonermina), BEXXAR® (tositumomab), CAMPATH® (alemtuzumab), CTLA4 (antígeno de linfocito citotóxico 4), decarbazina, denileucina, epratuzumab, GRANOCYTE® (lenograstim), lentinan, leucocito alfa interferón, imiquimod, MDX-010 (anti-CTLA-4), vacuna para melanoma, mitumomab, molgramostim, MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin), NEUPOGEN® (filgrastim), OncoVAC-CL, OVAREX® (oregovomab), pentumomab (Y-muHMFG1), PROVENGE® (sipuleucel-T), sargaramostim, sizofilan, teceleucina, THERACYS® (Bacillus Calmette-Guerin), ubenimex, VIRULIZIN® (agente inmunoterapéutico, Lorus Pharmaceuticals), Z-100 (sustancia específica de Maruyama (SSM)), WF-10 (Tetraclorodecaóxido (TCDO)), PROLEUKIN® (aldesleucina), ZADAXIN® (timalfasin), ZENAPAX® (daclizumab), ZEVALIN® (90Y-Ibritumomab tiuxetan) y similares.

- 30 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos modificadores de la respuesta biológica, tales como agentes que modifican los mecanismos de defensa de organismos vivos o respuestas biológicas, tales como la supervivencia, crecimiento o diferenciación de células de tejido para dirigirlos para que tengan actividad antitumoral e incluyen krestin, lentinan, sizofiran, picibanil PF-3512676 (CpG-8954), ubenimex y similares.

- 35 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos análogos de pirimidina, tales como citarabina (ara C o Arabinósido C), citosina arabinósido, doxifluridina, FLUDARA® (fludarabina), 5-FU (5-fluorouracilo), floxuridina, GEMZAR® (gemcitabina), TOMUDEX® (ratitrexed), TROXATYL™ (triacetiluridina troxacitabina) y similares.

- 40 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos análogos de purina, tales como LANVIS® (tioguanina) y PURI-NETHOL® (mercaptopurina).

- 45 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos agentes antimetabólicos tales como batabulina, epotilona D (KOS-862), N-(2-((4-hidroxifenil)amino)piridin-3-il)-4-metoxibencenosulfonamida, ixabepilona (BMS 247550), paclitaxel, TAXOTERE® (docetaxel), PNU100940 (109881), patupilona, XRP-9881 (larotaxel), vinflunina, ZK-EPO (epotilona sintética) y similares.

Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos inhibidores de ubiquitina ligasa, tales como inhibidores de MDM2, tales como nutlinas; inhibidores de NEDD8 tales como MLN4924 y similares.

- 50 Los compuestos de la presente invención también se pueden usar como radiosensibilizadores que potencian la eficacia de la radioterapia. Los ejemplos de radioterapia incluyen radioterapia de haz externo, teleterapia, braquiterapia y radioterapia de fuente sellada, no sellada y similares.

- 55 Los ADC anti-EGFR (o formulaciones que comprenden ADC anti-EGFR) se pueden coadministrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes para tratar un cáncer, incluidos agentes quimioterapéuticos tales como ABRAXANE™ (ABI-007), ABT-100 (inhibidor de farnesil transferasa), ADVEXIN® (vacuna Ad5CMV-p53),

ALTOCOR® o MEVACOR® (lovastatina), AMPLIGEN® (poli I:poli C12U, un ARN sintético), APTOSYN® (exisulind), AREDIA® (ácido pamidrónico), arglabina, L-asparaginasa, atamestano (1-metil-3,17-diona-androsta-1,4-dieno), AVAGE® (tazaroteno), AVE-8062 (derivado de combrestatina) BEC2 (mitumomab), caquectina o caquexina (factor de necrosis tumoral), canvacina (vacuna), CEAVAC® (vacuna contra el cáncer), CELEUK® (celmoleucina), CEPLENE® (diclorhidrato de histamina), CERVARIX® (vacuna contra el virus del papiloma humano), CHOP® (C: CYTOXAN® (ciclofosfamida); H: ADRIAMYCIN® (hidroxidoxorrubicina); O: Vincristina (ONCOVIN®); P: prednisona), CYPAT™ (acetato de ciproterona), combrestatina A4P, DAB(389)EGF (dominios catalíticos y de translocación de toxina diftérica fusionados a través de un enlazador His-Ala al factor de crecimiento epidérmico humano) o TransMID-107R™ (toxinas diftéricas), dacarbazina, dactinomicina, ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (DMXAA), eniluracil, EVIZON™ (lactato de escualamina), DIMERICINE® (loción de liposoma T4N5), discodermólido, DX-8951f (mesilato de exatecán), enzastaurina, EPO906 (epitilona B), GARDASIL® (vacuna recombinante contra el virus del papiloma humano cuadrivalente (Tipos 6, 11, 16, 18)), GASTRIMMUNE®, GENASENSE®, GMK (vacuna de conjugado gangliósido), GVAX® (vacuna contra el cáncer de próstata), halofuginona, histerelina, hidroxycarbamida, ácido ibandrónico, IGN-101, IL-13-PE38, IL-13-PE38QQR (cintredequina besudotox), exotoxina de IL-13-pseudomonas, interferón-a, interferón-y, JUNOVAN™ o MEPACT™ (mifamurtida), Ionafarnib, 5,10-metilenotetrahidrofolato, miltefosina (hexadecilfosfocolina), NEOVASTAT®(AE-941), NEUTREXIN® (glucuronato de trimetrexato), NIPENT® (pentostatina), ONCONASE® (una enzima ribonucleasa), ONCOPHAGE® (tratamiento con vacuna contra melanoma), ONCOVAX® (vacuna IL-2), ORATHECIN™ (rubitecán), OSIDEM® (fármaco celular basado en anticuerpo), OVAREX® MAb (anticuerpo monoclonal murino), paclitaxel, PANDIMEX™ (aglicona saponines de ginseng que comprenden 20(S)protopanaxadiol (aPPD) y 20(S)protopanaxatriol (aPPT)), panitumumab, PANVAC®-VF (vacuna contra el cáncer en investigación), pegaspargasa, PEG Interferón A, fenoxodiol, procarbazona, rebimastat, REMOVAB® (catumaxomab), REVLIMID® (lenalidomida), RSR13 (efaproxiral), SOMATULINE® LA (lanreótido), SORIATANE® (acitretina), estaurosporina (Streptomyces staurospores), talabostat (PT100), TARGRETIN® (bexaroteno), TAXOPREXIN® (DHA-paclitaxel), TELCYTA® (canfosfamida, TLK286), temilifeno, TEMODAR® (temozolomida), tesmilifeno, talidomida, THERATOPE® (STn-KLH), timitaq (diclorhidrato de 2-amino-3,4-dihidro-6-metil-4-oxo-5-(4-piridilto)quinazolina), TNFERADE™ (adenovector: Portador de ADN que contiene el gen para el factor de necrosis tumoral- α), TRACLEER® o ZAVESCA® (bosentán), tretinoína (Retin-A), tetrandrina, TRISENOX® (tríóxido de arsénico), VIRULIZIN®, ucraina (derivado de alcaloides de la planta celidonia mayor), vitaxina (anticuerpo anti-alfavbeta3), XCYTRIN® (motexafin gadolinio), XINLAY™ (atrasentán), XYOTAX™ (paclitaxel poliglumex), YONDELIS® (trabectedina), ZD-6126, ZINECARD® (dexrazoxano), ZOMETA® (ácido zolendróico), zorrubicina y similares.

En un caso, la formulación que comprende el ADC anti-EGFR se administra por vía intravenosa a un sujeto que tiene glioblastoma en combinación con radiación y/o TEMODAR® (temozolomida).

Además, en una realización, la formulación se puede proporcionar como un kit farmacéutico que comprende (a) un contenedor que contiene el ADC anti- GFR en forma liofilizada y (b) un segundo contenedor que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable (p. ej., agua estéril) para inyección. El diluyente farmacéuticamente aceptable se puede usar para la reconstitución o dilución de un ADC liofilizado. Opcionalmente, asociado con tal(es) contenedor(es) puede haber un aviso en la forma indicada por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación de la agencia para la fabricación, uso o venta para administración a humanos.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos que no se pretende que limiten en alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Prueba de estabilidad de los conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC)

El siguiente ejemplo describe pruebas usadas para someter a ensayo la estabilidad de ciertos ADC (en forma líquida) en comparación con anticuerpos no conjugados. Los anticuerpos conjugados con MMAF (véase la Figura 2) (denominado más adelante "ADC 1- MMAF" que es un conjugado de anticuerpo anti-EGFR 1 humanizado-MMAF) o MMAE (véase la Figura 1) (denominado más adelante "ADC 1- MMAE" que es un conjugado de anticuerpo anti-EGFR 1 humanizado-MMAE) se sometieron a prueba y compararon con el anticuerpo anti-EGFR 1 humanizado solo. Entre las propiedades examinadas se incluyeron el inicio de temperatura de despliegue mediante el uso de fluorescencia dinámica de barrido y DSC, análisis de estructura secundaria y terciaria mediante FTIR y CD de UV cercano, respectivamente, estabilidad acelerada a concentraciones bajas y altas, estabilidad en suero, estabilidad en congelamiento/descongelamiento a concentraciones bajas y altas y solubilidad. Las formulaciones descritas en este ejemplo fueron formulaciones líquidas.

Análisis de inicio de despliegue mediante el uso de fluorescencia dinámica de barrido (DSF) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se usaron dos técnicas diferentes, fluorescencia dinámica de barrido (DSF) y calorimetría diferencial de barrido (DSC), para determinar el inicio del despliegue y la estabilidad conformacional del anticuerpo 1, ADC 1- MMAF y ADC 1- MMAE durante la desnaturalización térmica. Como se muestra en la Figura 3A, el cambio en la intensidad de la fluorescencia estaba relacionada con los niveles y temperaturas de despliegue de la proteína. Los resultados de las mediciones de termoestabilidad se compararon con los datos adquiridos usando DSC (Figura 3B). El despliegue de la proteína a una temperatura mayor que 55 °C se usó como medida de estabilidad. Como se muestra en la Figura 3A y B, el inicio del despliegue se produjo a una temperatura más baja en ADC 1- MMAE (46 °C) en comparación con ADC 1- MMAF (55 °C), y se alcanzó la más alta con el anticuerpo 1 (61 °C), lo que indica que el anticuerpo 1 fue el más estable de las tres moléculas. Por lo tanto, los ADC exhibieron una disminución de la estabilidad termodinámica, según se reflejó en las temperaturas de despliegue más bajas para ADC 1- MMAF y ADC-1 MMAE con respecto al anticuerpo 1 solo.

Análisis de estructura secundaria y terciaria del anticuerpo 1, ADC 1- MMAF y ADC 1-MMAE

Se determinaron las estabildades del anticuerpo 1, ADC 1- MMAF y ADC 1 - MMAE usando espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y dicroísmo circular (CD) de ultravioleta cercano. Se ha demostrado que los espectros de CD entre 260 y aproximadamente 180 nm se pueden analizar para los diferentes tipos estructurales secundarios: hélice alfa, hoja beta paralela y antiparalela, giro y otra. Los cambios en la estructura secundaria del anticuerpo 1, el ADC 1- MMAF y ADC 1-MMAE en tampón de citrato / fosfato solo a pH 5/6/7 se monitorizaron mediante FTIR (Figura 4A) y CD (Figura 4B). Según se muestra en las Figuras 4A y 4B, las características físicas de ADC 1- MMAE y ADC 1- MMAF se alteraron ligeramente en elementos no estructurados en comparación con el anticuerpo 1. También hubo elementos no estructurados ligeramente alterados ADC 1- MMAE y ADC 1- MMAF en comparación con el anticuerpo 1 solo, según se evidencia por los datos de FTIR en la Figura 4A. Sin embargo, en general, cada una de las tres moléculas exhibió la presencia de >40 % de banda de hoja β a 1638 cm^{-1} . Los resultados de CD exhibieron un perfil diferente para ADC 1- MMAE en comparación con ADC 1- MMAF y el anticuerpo 1 (Figura 4B). Sin embargo, generalmente, cada una de las moléculas tenía un perfil en forma de S con elipticidad negativa a 280 nm.

Estudios de estabilidad acelerados del anticuerpo 1, ADC 1- MMAF y ADC 1-MMAE

Los estudios de estabilidad acelerados pueden ayudar a proporcionar información sobre el efecto de la exposición a corto plazo a condiciones que de cualquier otra manera típicamente se producen a largo plazo. Se formularon el anticuerpo 1, ADC 1- MMAF y ADC 1- MMAE a concentraciones bajas (1 mg/ml) en 10 mM de tampón citrato/ fosfato, pH 6, y concentraciones más altas (60 mg/ml) en 15 mM de histidina, pH 5,75. La estabilidad se definió como menos de 5 % de pérdida de monómero a 40 °C después de 7 días como máximo a pH estable

Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 5 y la Figura 6. La Figura 5 muestra la aglomeración (como % de aglomerados; determinado mediante análisis SEC) en un punto de tiempo inicial (T_0), y después de almacenamiento a 40 °C durante 7 días. La Figura 5 muestra que a una concentración de 1 mg/ml, hubo una propensión aumentada a la aglomeración de ADC 1- MMAE en concentraciones bajas, en comparación con ADC 1- MMAF y el anticuerpo 1. La Figura 6 muestra la aglomeración (como % de aglomerados) en un punto de tiempo inicial (T_0), y después de almacenamiento a 40 C durante 7 días. La Figura 6 muestra que a una concentración de 60 mg/ml, hubo una propensión significativamente aumentada a la aglomeración de ADC 1- MMAE en concentraciones altas, en comparación con ADC 1- MMAF y el anticuerpo 1. Además, no hubo impacto de agentes estabilizantes conocidos como hidroxipropil beta ciclodextrina (etiquetada como "HPBCD" en la Figura 6) sobre la aglomeración.

Estabilidad en plasma del anticuerpo 1, ADC 1- MMAF y ADC 1-MMAE

La estabilidad en plasma tiene un papel importante en el hallazgo y desarrollo de fármacos, dado que los compuestos inestables tienden a tener un aclaramiento rápido y semivida corta, lo cual resulta en un rendimiento malo in vivo. Se evaluó la estabilidad en suero *in vitro* del anticuerpo 1, ADC 1- MMAF y ADC 1-MMAE en un ensayo de estabilidad en suero. Brevemente, los anticuerpos se etiquetaron con Aexa Flur® (Life Technologies). El anticuerpo 1 y ADC-1-MMAF y ADC-1-MMAE etiquetados a continuación se incubaron en suero filtrado. Se recogieron muestras en los días 0, 1, 3, 5, 7 y se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se calculó la pendiente del porcentaje de aglomerados de alto peso molecular (HMW, por sus siglas en inglés) entre los días 0-7. La estabilidad se definió como menos de 1 % de especies de HMW por día. Por lo tanto, cuanto más baja es la pendiente, menor es la aglomeración presente. Más específicamente, el gráfico en la Figura 7 muestra que la pendiente de ADC 1-MMAF (0,5 %) fue más baja que la del anticuerpo 1 (1,10 %) y ADC 1-MMAE (2,30), lo cual indica menor aglomeración y mejor estabilidad en plasma. La Figura 7 también describe las pendientes del porcentaje de aglomerados de HMW para una gama de moléculas distintas, p. ej., anticuerpos e Ig DVD, con fines de comparación.

Estabilidad en congelamiento/descongelamiento a concentraciones bajas y altas del anticuerpo 1, ADC 1- MMAF y ADC 1-MMAE

La aglomeración de anticuerpos se puede inducir mediante congelamiento-descongelamiento y temperatura elevada, factores de estrés típicos durante el desarrollo, producción y almacenamiento. El anticuerpo 1, ADC 1-MMAF y ADC 1-MMAE se sometieron a 0, 1 o 2 ciclos de congelamiento-descongelamiento y se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas (SEC). Se formularon concentraciones altas de anticuerpo 1 (210 mg/ml), ADC 1- MMAF (135 mg/ml) y ADC 1-MMAE (145 mg/ml) en 15 mM de tampón con histidina a un pH de 5,75. Los resultados que muestran el % de monómero (determinado mediante SEC) se describen en la Figura 8A, y sugieren que no hubo cambios en la aglomeración (definida como aumento <2 % de especies con HMW después de 2 ciclos de C/D) entre las tres moléculas. En los experimentos que se muestran en la Figura 8B, el anticuerpo 1, ADC 1-MMAF y ADC 1- MMAE a las mismas concentraciones se formularon a una concentración de 1 mg/ml en tampón con 10 mM de citrato y 10 mM de fosfato a un pH 7,0. Como se muestra en las Figuras 8A y 8B, no hubo cambio significativo en la estabilidad en congelamiento/descongelamiento después uno o dos ciclos de congelamiento/descongelamiento entre el anticuerpo 1, ADC 1-MMAF y ADC 1-MMAE a concentraciones bajas o altas.

También se sometió a prueba la formación de partícula para las tres moléculas a una concentración de 1 mg/ml en tampón de citrato / fosfato solo a pH 6, durante el congelamiento/descongelamiento (0, 1 o 2 ciclos de congelamiento-descongelamiento). Se determinó que las partículas subvisibles ($\geq 10 \mu\text{m}$ y $\geq 25 \mu\text{m}$, respectivamente) estaban por debajo de los límites de la farmacopea ($\geq 10 \mu\text{m}$ y menor o igual que 600/ MI ($\geq 25 \mu\text{m}$), respectivamente (Figura 9A). También se usó generación de imágenes por microflujo (MFI) para detectar y cuantificar las partículas subvisibles (menos de 10 micrones) (Figura 9B). Las Figuras 9A y 9B describen un aumento global en las partículas subvisibles para el anticuerpo 1, ADC 1-MMAF y ADC 1-MMAE con el tiempo.

Solubilidad del anticuerpo 1 frente al ADC 1 con MMAF o MMAE

Se examinó la solubilidad del anticuerpo 1, ADC 1-MMAF y ADC 1-MMAE en una formulación que contenía un sistema tampón con 10 mM de citrato y 10 mM de fosfato a pH 6 a 5 grados C. La solubilidad se definió como una disolución que no presenta precipitado cuando se fórmula a al menos una concentración de 50 mg/ml. Se determinó que la solubilidad de cada uno del anticuerpo 1, ADC 1- MMAF y ADC 1-MMAE fue la siguiente: anticuerpo 1 >210 mg/mL; ADC 1-MMAF : >135 mg/mL (Fuente 1); ADC 1-MMAF : >92 mg/mL A (Fuente 2); ADC 1-MMAE: >145 mg/mL (Fuente 1); y ADC 1-MMAE: >116 mg/mL (Fuente 2). Cabe señalar que la solubilidad puede haber excedido las concentraciones mencionadas anteriormente, dado que el material limitado impidió una concentración adicional.

Conclusión

En general, ADC 1-MMAF y ADC 1-MMAE exhibieron estabilidad más baja que el anticuerpo 1 no conjugado, según se describe, por ejemplo, en los estudios acelerados y el ensayo de despliegue descritos en la presente memoria.

Ejemplo 2: Formulación liofilizada estable de ADC 1-MMAF

El ADC 1-MMAF es un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR que comprende el anticuerpo 1 covalentemente enlazado a MMAF. El ADC 1-MMAF se formuló como un polvo liofilizado para inyección tras la reconstitución y se envasó en viales de vidrio. El polvo liofilizado se reconstituyó con 5 mL de agua estéril para inyección (SWFI, por sus siglas en inglés) y proporcionó una disolución de 20 mg/mL de ADC 1-MMAF para inyección. La formulación de producto de fármaco se preparó para un solo uso y no contenía conservante. La composición de ADC 1-MMAF por vial (polvo liofilizado) y por mL (disolución reconstituida) se describe en la Tabla 1, a continuación. El producto de fármaco reconstituido se diluyó con disolución salina al 0,9 % (inyección de cloruro de sodio, USP) para la administración de la dosis por infusión.

Tabla 1. Composición de polvo de ADC 1-MMAF para disolución para inyección, 20 mg/mL

Nombre de ingredientes	Función	Cantidad (mg) por vial	Cantidad reconstituida (mg/mL)
ADC 1-MMAF	Sustancia de fármaco	105	20
Histidina	Agente tampón	12	2,3
Sacarosa	Agente de volumen	368	70
Polisorbato 80	Tensioactivo	0,53	0,10
Ácido clorhídrico ^a	ajuste de pH	q.s.	q.s.
Agua para inyección/Agua para inyecciones	Vehículo	No aplicable ^b	Para un peso total de 1032 mg

a. Usado como disolución al 10 %
b. No está presente después de la liofilización

La formulación descrita en la Tabla 1 es representativa de una formulación liofilizada para un ADC anti-EGFR donde el conjugado es un derivado de auristatina, tal como MMAF. La formulación comprende un tampón, un azúcar, un tensioactivo y un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR.

- 5 Los ejemplos 3-5 describen estudios de estabilidad para evaluar la formulación de ADC 1-MMAF liofilizada descrita en el Ejemplo 2. Los ejemplos 6-8 describen estudios de estabilidad para evaluar la formulación de ADC 1-MMAF liofilizada purificada descrita en el Ejemplo 2. Para los estudios de estabilidad, se almacenó ADC 1-MMAF (o ADC1-MMAFp) como un liofilizado en viales de vidrio incoloros de 20 ml, cerrados con un tapón de goma gris y una tapa de plástico gris. El ADC 1-MMAF (o ADC1-MMAFp) se almacenó en las siguientes tres condiciones separadas: 5 °C; 25 °C (60 % de humedad relativa); 40 °C (75 % de humedad relativa) para la prueba de estabilidad.
- 10 Ejemplo 3: Estabilidad de ADC 1-MMAF en una formulación liofilizada a 5 °C
- Se llevaron a cabo los siguientes experimentos después de la reconstitución con SWFI en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento del liofilizado durante hasta dieciocho meses a 5 °C.
- El aspecto del liofilizado y la disolución reconstituida no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C
- 15 Se evaluó visualmente el aspecto del liofilizado y de la disolución reconstituida para confirmar que el liofilizado estaba prácticamente libre de materia particulada extraña visible y libre de humedad en el material de envasado. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante hasta doce meses, el aspecto del liofilizado cumplió con los criterios anteriores. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante hasta doce meses, la disolución reconstituida fue una disolución incolora a ligeramente amarilla y estaba prácticamente libre de materia particulada visible.
- 20 El color de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C
- Se evaluó el color de la disolución reconstituida (visual) usando una escala de Azul/Amarillo (escala BY, por sus siglas en inglés), donde las muestras se evaluaron con respecto a una disolución de referencia y se informaron los valores. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante hasta doce meses, todas las disoluciones reconstituidas tuvieron una medición en la escala BY menor o igual que 7. Por lo tanto, el almacenamiento no afectó el color de la disolución.
- 25 La transparencia y opalescencia de la disolución no se ven afectadas por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C
- Se midieron la transparencia y opalescencia de la disolución reconstituida mediante un nefelómetro estándar usando el principio de difracción de luz y siguiendo los métodos de la Ph. Eur. o USP respectivos (según se hizo también para los Ejemplos 4 a 8). En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante hasta doce meses, el aspecto de la disolución reconstituida no fue más opalescente que el de la suspensión de referencia IV (según, la Farmacopea europea, ph. Eur) (<= RSII).
- 30 El contenido de proteína de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C
- Se determinó el contenido de proteína de la disolución reconstituida. La concentración de proteína del ADC se determinó espectrofotométricamente usando una longitud de onda de 280 nm y el coeficiente de extinción de ADC1-MMAF (1,43) (como también se hizo para los Ejemplos 4 a 8). En el punto de tiempo inicial, el contenido de proteína de la disolución reconstituida fue de 18,8 mg/ml. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el contenido de proteína de la disolución reconstituida fue de 20,2 mg/ml.
- 35 La actividad biológica de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C
- Se usó un ensayo de citotoxicidad usando una línea celular de carcinoma epidermoide humano para evaluar la actividad biológica (%) de la disolución reconstituida en comparación con un testigo de ADC1-MMAF que se había confirmado anteriormente que tenía actividad citotóxica (el testigo tenía 100 % de actividad). En el punto de tiempo inicial, la actividad biológica relativa fue de 109 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante un mes, la actividad biológica relativa fue de 105 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, la actividad biológica relativa fue de 97 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante seis meses, la actividad biológica relativa fue de 108 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante nueve meses, la actividad biológica relativa fue de 105 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante 12 meses, la actividad biológica relativa fue de 99 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante 18 meses, la actividad biológica relativa fue de 112 %.
- 40
- 45
- 50 El tamaño de las moléculas y/o complejos moleculares no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C

- Se llevó a cabo cromatografía de exclusión por tamaño de la disolución reconstituida usando cromatografía líquida de alto rendimiento-de exclusión por tamaño (SE-HPLC, por sus siglas en inglés). La SE-HPLC determinó la pureza de ADC1-MMAF usando HPLC de exclusión por tamaño. Las macromoléculas se separan isocráticamente durante la filtración por gel de HPLC según el tamaño molecular decreciente. La pureza se determinó al comparar el área del pico principal de ADC1-MMAF con el área total del cromatograma de la muestra, excluyendo los picos relacionados con el tampón. El método es capaz de resolver aglomerados de peso molecular alto y especies de anticuerpo truncadas del pico principal de ADC1-MMAF. Este método también se usó en los Ejemplos 4 a 8.
- El pico principal (%) se midió junto con las especies de alto peso molecular (%) y las especies de bajo peso molecular (%). En el punto de tiempo inicial, el pico principal fue de 98,9 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,9 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %.
- Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante un mes, el pico principal fue de 98,8 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,9 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %.
- Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el pico principal fue de 98,8 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 1,0 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %.
- Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante seis meses, el pico principal fue de 99,0 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,9 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. \ Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante nueve meses, el pico principal fue de 98,9 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,9 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,3 %.
- Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante 12 meses, el pico principal fue de 98,8 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,8 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,4 %.
- Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante 18 meses, el pico principal fue de 98,8 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,9 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,3 %.
- Por lo tanto, todos los puntos de tiempo exhibieron poco a nulo cambio en el % de pico principal y las especies de peso molecular alto y bajo entre las mediciones en el punto de tiempo inicial, uno, tres, seis, nueve, doce y dieciocho meses.
- El pico cromatográfico de la disolución no cambia por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C
- Se llevó a cabo cromatografía de intercambio catiónico (CEX, por sus siglas en inglés) en la disolución reconstituida usando cromatografía líquida de alto rendimiento (CEX-HPLC, por sus siglas e inglés). En la cromatografía de intercambio catiónico, las moléculas con carga positiva se atraen a un soporte sólido con carga negativa. El ensayo de cromatografía de intercambio catiónico (CEX-HPLC) es un método de separación basado en la carga que se usó para monitorizar la estabilidad de ADC1-MMAF en las muestras de prueba a través de comparación con un patrón de referencia (ADC1-MMAF que se había caracterizado anteriormente). El método es capaz de resolver el pico principal de especies ácidas y básicas.
- En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante hasta dieciocho meses, el aspecto de la disolución reconstituida se caracterizó por un patrón de pico cromatográfico predominante de la muestra que se ajustó al del testigo que fue el ADC1-MMAF que se había caracterizado anteriormente. Por lo tanto, el pico cromatográfico permaneció relativamente incambiado durante dieciocho meses a 5 °C.
- La pureza de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C
- Se llevó a cabo electroforesis en gel capilar (CE-SDS-R) con la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante hasta 18 meses para determinar la pureza de la disolución. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de pureza fue de 97,4 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante un mes, el porcentaje de pureza fue de 97,6 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el porcentaje de pureza fue de 96,9 %.
- Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante seis meses, el porcentaje de pureza fue de 97,1 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante nueve meses, el porcentaje de pureza fue de 96,7 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante doce meses, el porcentaje de pureza fue de 97,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante dieciocho meses, el porcentaje de pureza fue de 97,3 %. Por lo tanto, la pureza de la disolución reconstituida no cambió significativamente entre el punto de tiempo inicial y hasta dieciocho meses después de la reconstitución.
- La relación entre el fármaco y el anticuerpo de la disolución no cambia después del almacenamiento a largo plazo a 5 °C

Se llevó a cabo cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés) en la disolución reconstituida para determinar la relación entre fármaco y anticuerpo (DAR) durante un período de tiempo de dieciocho meses. La HIC se usa para separar las proteínas en base a la hidrofobicidad relativa. El método de HIC es una medida de la hidrofobicidad de ADC1-MMAF. Los componentes unidos se retiran por elución del ligando para aumentar la hidrofobicidad mediante el uso de un gradiente para disminuir la concentración de sal de la fase móvil. Para ADC1-MMAF, el primer pico eluido de la columna fue el anticuerpo no conjugado. Los picos restantes representaron un número creciente de moléculas enlazadoras a fármaco por anticuerpo. Por lo tanto, se determinó el número de enlazadores a fármaco por anticuerpo mediante el tiempo de retención del pico y el área del pico relativa. Este método también se usó en los Ejemplos 4 a 8. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante hasta dieciocho meses, se midió la relación entre fármaco y anticuerpo (DAR) en 4,1-4,2 para todas las disoluciones reconstituidas.

El porcentaje de anticuerpo no conjugado en la disolución no cambió después del almacenamiento a largo plazo a 5 °C

La disolución reconstituida también se analizó para determinar el porcentaje de anticuerpo no conjugado para ADC1-MMAF usando el método HIC descrito anteriormente para determinar la DAR (y que también se usó para los Ejemplos 4 a 8). En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no fue mayor que 4,1. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante un mes, el porcentaje no fue mayor que 4,1. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el porcentaje no fue mayor que 4,1. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante seis meses, el porcentaje no fue mayor que 3,9. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante nueve meses, el porcentaje no fue mayor que 4,0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante doce meses, el porcentaje no fue mayor que 4,0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante dieciocho meses, el porcentaje no fue mayor que 4,0. Por lo tanto, el porcentaje fue similar en todos los puntos de tiempo.

El porcentaje de enlazador a fármaco aplacado en la disolución no cambió por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C

Se llevó a cabo cromatografía de fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) en la disolución reconstituida para determinar el porcentaje de enlazador a fármaco aplacado. La RP-HPLC es la separación de moléculas en base su interacción con una matriz hidrófoba que se base en gran medida en su polaridad. Este método determina la cantidad de enlazador a fármaco aplacado y las impurezas totales en la disolución. Se retiró el ADC1-MMAF de la muestra mediante precipitación con metanol y posteriormente centrifugación. El análisis del sobrenadante para el enlazador a fármaco aplacado y las impurezas totales se llevó a cabo mediante RP-HPLC usando una columna C-18 con detección UV a 214 nm. Este método también se usó en los Ejemplos 4 a 8.

En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no fue mayor que 0,007. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante un mes, el porcentaje no fue mayor que 0,005. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el porcentaje no fue mayor que 0,006. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante seis meses, el porcentaje no fue mayor que 0,005. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante nueve meses, el porcentaje no fue mayor que 0,005. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante doce meses, el porcentaje no fue mayor que 0,007. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante dieciocho meses, el porcentaje no fue mayor que 0,005. Por lo tanto, el porcentaje fue similar en todos los puntos de tiempo para el porcentaje de enlazador a fármaco aplacado.

Las impurezas totales en la disolución no cambiaron después del almacenamiento a largo plazo a 5 °C

La disolución reconstituida también se analizó para determinar el porcentaje de impurezas totales usando RP-HPLC, mediante el uso del método descrito anteriormente con respecto al porcentaje del enlazador aplacado (y que también se usó para los Ejemplos 4 a 8). En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no fue mayor que 0,007. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante un mes, el porcentaje no fue mayor que 0,005. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el porcentaje no fue mayor que 0,006. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante seis meses, el porcentaje no fue mayor que 0,005. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante nueve meses, el porcentaje no fue mayor que 0,005. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante doce meses, el porcentaje no fue mayor que 0,007. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante dieciocho meses, el porcentaje no fue mayor que 0,005. Por lo tanto, el porcentaje fue similar en todos los puntos de tiempo para las impurezas totales.

La contaminación por particulado de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C

La contaminación por particulado se evaluó al determinar las partículas subvisibles. Se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 10 µm por contenedor, con no más de 6000 (norma

- de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) y la Farmacopea europea). En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 33. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante un mes, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 22. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 25. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante seis meses, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 73. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante doce meses, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 20. Por lo tanto, todos los puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm.
- 10 También se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 25 µm por contenedor, con NMT de 600 (norma de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) y la Farmacopea europea). En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante un mes, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 2. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 2. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante seis meses, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 10. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante doce meses, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 3. Por lo tanto, todos los puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm.
- 15
- 20 El contenido de agua de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C
- El contenido de agua se evaluó mediante titulación de Karl-Fischer. La titulación de Karl Fischer usa titulación coulombimétrica o volumétrica para determinar cantidades traza de agua en una muestra, indicadas como un porcentaje. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 2,0 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,7 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante seis meses, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,7 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante doce meses, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,8 %. Por lo tanto, en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante uno, tres, seis y doce meses, el contenido de agua de la disolución reconstituida fue insignificante.
- 25
- 30 El pH de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C
- Se determinó el pH de la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante uno, tres, seis y doce meses. En el punto de tiempo inicial, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 6,0. Después del almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9. Después del almacenamiento a 5 °C durante seis meses, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9. Después del almacenamiento a 5 °C durante doce meses, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9.
- 35
- La osmolalidad de la disolución no fue afectada por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C
- Se determinó la osmolalidad de la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante un mes al medir el valor medio de miliosmoles de soluto por kilogramo de disolvente (mOsmol/kg). En el punto de tiempo inicial, la osmolalidad fue de 235 mOsmol/kg. Después de un mes, la osmolalidad fue de 251 mOsmol/kg.
- 40
- Ejemplo 4: Estabilidad de ADC 1-MMAF en una formulación liofilizada a 25 °C
- Se llevaron a cabo las siguientes pruebas después de la reconstitución con SWFI en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento del liofilizado durante uno, tres y seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa):
- 45
- El aspecto del liofilizado y la disolución reconstituida no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 25 °C
- Se evaluó visualmente el aspecto del liofilizado y de la disolución reconstituida para confirmar que el liofilizado estaba prácticamente libre de materia particulada extraña visible y libre de humedad en el material de envasado. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el aspecto del liofilizado cumplió con los criterios anteriores. Después de la reconstitución, la disolución reconstituida fue una disolución incolora a ligeramente amarilla, prácticamente libre de materia particulada visible. Por lo tanto, en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el aspecto de la disolución reconstituida fue que la disolución era incolora a ligeramente amarilla, prácticamente libre de materia particulada visible.
- 50
- 55

El color de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 25 °C

5 Se evaluó el color de la disolución (visual) usando una escala de Azul/Amarillo (BY), donde las muestras se evaluaron con respecto a una disolución de referencia y se informaron los valores. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), todas las disoluciones reconstituidas tuvieron una medición en la escala BY menor o igual que 7. Por lo tanto, el almacenamiento no afectó el color de la disolución.

La transparencia y opalescencia de la disolución no se ven afectadas por el almacenamiento a largo plazo a 25 °C

10 Se evaluaron la transparencia y opalescencia de la disolución reconstituida. Los criterios de aceptación de la disolución reconstituida se cumplieron si la disolución reconstituida no fue más opalescente que la suspensión de referencia IV (según, la Farmacopea europea, ph. Eur.). En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el aspecto de la disolución reconstituida no fue más opalescente que el de la suspensión de referencia IV (según la Farmacopea europea, ph. Eur.) (\leq RSII).

La actividad biológica de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a largo plazo a 25 °C

15 Se usó un ensayo de citotoxicidad usando una línea celular de carcinoma epidermoide humano para evaluar la actividad biológica (%) de la disolución reconstituida en comparación con un testigo de ADC1-MMAF que se había confirmado anteriormente que tenía actividad citotóxica (el testigo tenía 100 % de actividad). En el punto de tiempo inicial, la actividad biológica relativa fue de 109 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C (60 % de humedad relativa) durante un mes, la actividad biológica relativa fue de 113 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C/60 % de humedad relativa durante tres meses, la actividad biológica relativa fue de 103 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C/60 % de humedad relativa durante seis meses, la actividad biológica relativa fue de 109 %.

20

El tamaño de las moléculas y/o complejos moleculares no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 25 °C

25 Se llevó a cabo cromatografía de exclusión por tamaño mediante cromatografía líquida de alto rendimiento-de exclusión por tamaño (SE-HPLC). El pico principal (%) se midió junto con las especies de alto peso molecular (%) y las especies de bajo peso molecular (%). En el punto de tiempo inicial, el pico principal fue de 98,9 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,9 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C (60 % de humedad relativa) durante un mes, el pico principal fue de 98,8 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 1,0 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C (60 % de humedad relativa) durante tres meses, el pico principal fue de 98,8 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 1,0 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C (60 % de humedad relativa) durante seis meses, el pico principal fue de 98,9 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,9 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Por lo tanto, hubo poco a nulo cambio en el % de pico principal y las especies de peso molecular alto y bajo entre las mediciones en el punto de tiempo inicial, uno, tres y seis meses.

30

35

El pico cromatográfico de la disolución no cambia por el almacenamiento a largo plazo a 25 °C

40 Se llevó a cabo cromatografía de intercambio catiónico (CEX) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (CEX-HPLC). En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C/60 % de humedad relativa durante un mes, tres meses y seis meses, el aspecto de la disolución reconstituida se caracterizó por un patrón de pico cromatográfico predominante de la muestra que se ajustó al del patrón de referencia.

La pureza de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a largo plazo a 25 °C

45 Se llevó a cabo electroforesis en gel capilar (CE-SDS-R) en la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa). En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de pureza fue de 97,4 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes, el porcentaje de pureza fue de 97,4 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses, el porcentaje de pureza fue de 96,9 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses, el porcentaje de pureza fue de 97,1 %. Por lo tanto, la pureza de la disolución reconstituida no cambió significativamente entre el punto de tiempo inicial y durante y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa).

50

La relación entre el fármaco y el anticuerpo de la disolución no cambia después del almacenamiento a largo plazo a 25 °C

Se llevó a cabo cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en la disolución reconstituida. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), se midió la DAR en 4,2 para todas las disoluciones reconstituidas.

El porcentaje de anticuerpo no conjugado en la disolución no cambió después del almacenamiento a largo plazo

- 5 La disolución reconstituida se analizó para determinar el porcentaje de anticuerpo no conjugado. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no fue mayor que 4,1. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 4,1. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 4,1. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 3,9.

El porcentaje de enlazador a fármaco aplacado en la disolución no cambió por el almacenamiento a largo plazo a 25 °C

- 15 Se llevó a cabo cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) en la disolución reconstituida para determinar el porcentaje de enlazador aplacado. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no fue mayor que 0,007. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,005. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,006. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,005. Por lo tanto, el porcentaje fue similar en todos los puntos de tiempo para el porcentaje de enlazador a fármaco aplacado.

- 20 Las impurezas totales en la disolución no cambiaron después del almacenamiento a largo plazo a 25 °C

- La disolución reconstituida se analizó para determinar el porcentaje de impurezas totales. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no fue mayor que 0,007. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,005. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,006. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,005. Por lo tanto, el porcentaje fue similar en todos los puntos de tiempo para las impurezas totales.

La contaminación por particulado de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a largo plazo a 25 °C

- 30 La contaminación por particulado se evaluó al determinar las partículas subvisibles. Se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 10 µm por contenedor, con no más de 6000 (norma de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) y la Farmacopea europea). En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 33. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C (60 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 18. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 25. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 50. Por lo tanto, todos los puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm. También se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 25 µm por contenedor, con no más de 600. En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C (60 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 2. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 2. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 2. Por lo tanto, todos los puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm.

El contenido de agua de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 25 °C

- 50 El contenido de agua se evaluó mediante titulación de Karl-Fischer. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 2,0 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue indetectable. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,8 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,9 %. Por lo tanto, en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al

almacenamiento durante uno, tres y seis meses, el contenido de agua de la disolución reconstituida fue insignificante.

El pH de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 25 °C

5 Se determinó el pH de la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres y seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa). En el punto de tiempo inicial, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 6,0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 25 °C (60 % de humedad relativa), el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9.

10 Ejemplo 5: Estabilidad de la formulación liofilizada de ADC 1-MMAF a 40 °C

Se llevaron a cabo las siguientes pruebas después de la reconstitución de la formulación de ADC1-MMAF liofilizada descrita en el Ejemplo 2, con SWFI en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento del liofilizado durante uno, tres y seis meses a 40 °C/(75 % de humedad relativa):

El aspecto del liofilizado y la disolución reconstituida no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 40 °C

15 Se evaluó visualmente el aspecto del liofilizado y de la disolución reconstituida para confirmar que el liofilizado estaba prácticamente libre de materia particulada extraña visible y libre de humedad en el material de envasado. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el aspecto del liofilizado cumplió con los criterios anteriores. Después de la reconstitución, la disolución reconstituida fue una disolución incolora a ligeramente amarilla, prácticamente libre de materia particulada visible.

20 En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el aspecto de la disolución reconstituida fue incoloro a ligeramente amarillo, prácticamente libre de materia particulada visible.

El color de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 40 °C

25 Se evaluó el color de la disolución (visual) usando una escala BY, donde las muestras se evaluaron con respecto a una disolución de referencia y se informaron los valores. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), todas las disoluciones reconstituidas tuvieron una medición en la escala BY menor o igual que 7. Por lo tanto, el almacenamiento no afectó el color de la disolución.

La transparencia y opalescencia de la disolución no se ven afectadas por el almacenamiento a largo plazo a 40 °C

30 Se evaluaron la transparencia y opalescencia de la disolución reconstituida. Los criterios de aceptación de la disolución reconstituida se cumplieron si la disolución reconstituida no fue más opalescente que la suspensión de referencia IV (según, la Farmacopea europea, ph. Eur. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el aspecto de la disolución reconstituida no fue más opalescente que el de la suspensión de referencia IV (según la Farmacopea europea, ph. Eur.) (<= RSII).

35

La actividad biológica de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a largo plazo a 40 °C

40 Se usó un ensayo de citotoxicidad usando una línea celular de carcinoma epidermoide humano para evaluar la actividad biológica (%) de la disolución reconstituida en comparación con un testigo de ADC1-MMAF que se había confirmado anteriormente que tenía actividad citotóxica (el testigo tenía 100 % de actividad). En el punto de tiempo inicial, la actividad biológica fue de 109 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C (75 % de humedad relativa) durante un mes, la actividad biológica relativa fue de 117 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C (75 % de humedad relativa) durante tres meses, la actividad biológica relativa fue de 113 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C (75 % de humedad relativa) durante seis meses, la actividad biológica relativa fue de 110 %. Por lo tanto, el porcentaje de actividad biológica en todos los puntos de tiempo tuvo actividad biológica por encima de 100 %.

45

El tamaño de las moléculas y/o complejos moleculares no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 40 °C

50 Se llevó a cabo cromatografía de exclusión por tamaño mediante cromatografía líquida de alto rendimiento-de exclusión por tamaño (SE-HPLC). El pico principal (%) se midió junto con las especies de alto peso molecular (%) y las especies de bajo peso molecular (%). En el punto de tiempo inicial, el pico principal fue de 98,9 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,9 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C (75 % de humedad relativa) durante un mes, el pico principal fue

- de 98,8 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 1,0 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C (75 % de humedad relativa) durante tres meses, el pico principal fue de 98,7 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 1,1 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C (75 % de humedad relativa) durante seis meses, el pico principal fue de 98,8 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 1,0 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Por lo tanto, hubo poco a nulo cambio en el % de pico principal y las especies de peso molecular alto y bajo entre las mediciones en el punto de tiempo inicial, uno, tres y seis meses.
- 5 El pico cromatográfico de la disolución no cambia por el almacenamiento a largo plazo a 40 °C
- 10 Se llevó a cabo cromatografía de intercambio catiónico (CEX) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (CEX-HPLC). En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C (75 % de humedad relativa) durante un mes, tres meses y seis meses, el aspecto de la disolución reconstituida se caracterizó por un patrón de pico cromatográfico predominante de la muestra que se ajusta al del patrón de referencia.
- 15 La pureza de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a largo plazo
- 20 Se llevó a cabo electroforesis en gel capilar (CE-SDS-R) en la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa) y se usó para determinar el porcentaje de pureza de la disolución. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de pureza fue de 97,4 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes, el porcentaje de pureza fue de 97,5 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses, el porcentaje de pureza fue de 96,9 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses, el porcentaje de pureza fue de 97,2 %. Por lo tanto, la pureza de la disolución reconstituida no cambió significativamente entre el punto de tiempo inicial y durante y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa).
- 25 La relación entre el fármaco y el anticuerpo de la disolución no cambia después del almacenamiento a largo plazo a 40 °C
- Se llevó a cabo cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en la disolución reconstituida. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), se midió la DAR en 4,2 para todas las disoluciones reconstituidas.
- 30 El porcentaje de anticuerpo no conjugado en la disolución no cambió después del almacenamiento a largo plazo a 40 °C
- 35 En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no fue mayor que 4,1. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 4,1. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 4,1. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 3,9. Por lo tanto, el porcentaje fue similar en todos los puntos de tiempo.
- El porcentaje de enlazador a fármaco aplacado en la disolución no cambió por el almacenamiento a largo plazo a 40 °C
- 40 Se llevó a cabo cromatografía de fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) en la disolución reconstituida para determinar el porcentaje de enlazador a fármaco aplacado. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no fue mayor que 0,007. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,005. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,006. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,005. Por lo tanto, el porcentaje fue similar en todos los puntos de tiempo para el porcentaje de enlazador a fármaco aplacado.
- 45 Las impurezas totales en la disolución no cambiaron después del almacenamiento a largo plazo a 40 °C
- 50 La disolución reconstituida se analizó para determinar el porcentaje de impurezas totales mediante el uso de RP-HPLC. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no fue mayor que 0,007. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,005. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,006. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses

a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje no fue mayor que 0,005. Por lo tanto, el porcentaje fue similar en todos los puntos de tiempo para las impurezas totales.

La contaminación por particulado de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a largo plazo a 40 °C

5 La contaminación por particulado se evaluó al determinar las partículas subvisibles. Se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 10 µm por contenedor, con no más de 6000 (norma de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) y la Farmacopea europea). En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 33. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C (75 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 5. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 12. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 32. Por lo tanto, todos los puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm. También se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 25 µm por contenedor, con no más de 600. En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C (75 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 2. Por lo tanto, todos los puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm.

El contenido de agua de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 40 °C

25 El contenido de agua se evaluó mediante titulación de Karl-Fischer. La titulación de Karl Fischer usa titulación coulombimétrica o volumétrica para determinar cantidades traza de agua en una muestra, indicadas como un porcentaje. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 2,0 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue indetectable. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,9 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 1,0 %. Por lo tanto, en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses, el contenido de agua de la disolución reconstituida fue insignificante.

El pH de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 40 °C

35 Se determinó el pH de la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa). En el punto de tiempo inicial, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 6,0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 40 °C (75 % de humedad relativa), el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9.

40 La purificación de ADC 1-MMAF se llevó a cabo según el método de purificación en lotes descrito en la presente memoria y divulgado en la solicitud provisional de los EE. UU. n.º 61/792834 y la solicitud de los EE. UU. n.º 14/210.602, presentada el 14 de marzo de 2014. La DAR promedio para las mezclas de ADC que comprenden ADC1-MMAFp descritas en el Ejemplos 6 a 8 fue aproximadamente 3,0.

45 Se llevaron a cabo experimentos de estabilidad descritos en los Ejemplos 6 a 8 después de la reconstitución con SWFI en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento del liofilizado que comprendía ADC1-MMAFp durante tres meses a 5 °C y durante uno y tres meses a 25 °C (60 % de humedad relativa) y 40 °C/(75 % de humedad relativa).

Ejemplo 6: Estabilidad de ADC 1-MMAF purificado (ADC1-MMAFp) en una formulación liofilizada a 5 °C

50 Se llevaron a cabo las siguientes pruebas después de la reconstitución de la formulación de ADC1-MMAFp liofilizada descrita en el Ejemplo 2, con SWFI en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución de la formulación posterior al almacenamiento del liofilizado durante hasta tres meses a 5 °C.

El aspecto del liofilizado y la disolución reconstituida no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C

Se evaluó visualmente el aspecto del liofilizado y de la disolución reconstituida para confirmar que el liofilizado estaba prácticamente libre de materia particulada extraña visible y libre de humedad en el material de envasado. En

el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el aspecto del liofilizado cumplió con los criterios anteriores. Después de la reconstitución, la disolución reconstituida fue una disolución incolora a ligeramente amarilla y prácticamente libre de materia particulada visible.

El color de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C

5 Se evaluó el color de la disolución reconstituida (visual) usando una escala de Azul/Amarillo (escala BY, por sus siglas en inglés), donde las muestras se evaluaron con respecto a una disolución de referencia y se informaron los valores. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, todas las disoluciones reconstituidas tuvieron una medición en la escala BY menor o igual que 7. Por lo tanto, el almacenamiento de la formulación de ADC1-MMAFp no afectó el color de la disolución.

10 La transparencia y opalescencia de la disolución no se ven afectadas por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C

Se evaluaron la transparencia y opalescencia de la disolución reconstituida. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el aspecto de la disolución reconstituida no fue más opalescente que el de la suspensión de referencia IV (según, la Farmacopea europea, ph. Eur) (<= RSII).

15 La actividad biológica de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C

Se usó un ensayo de citotoxicidad usando una línea celular de carcinoma epidermoide humano para evaluar la actividad biológica (%) de la disolución reconstituida en comparación con un testigo de ADC1-MMAF que se había confirmado anteriormente que tenía actividad citotóxica (el testigo tenía 100 % de actividad). En el punto de tiempo inicial, la actividad biológica relativa fue de 102 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C en una forma liofilizada durante tres meses, la actividad biológica relativa fue de 98 %.

20 El tamaño de las moléculas y/o complejos moleculares no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C

El tamaño de las moléculas y/o complejos moleculares no se ve afectado por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C

25 Se llevó a cabo cromatografía de exclusión por tamaño de la disolución reconstituida usando cromatografía líquida de alto rendimiento-de exclusión por tamaño (SE-HPLC, por sus siglas en inglés). El pico principal (%) se midió junto con las especies de alto peso molecular (%) y las especies de bajo peso molecular (%). En el punto de tiempo inicial, el pico principal fue de 99,5 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,2 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C en una forma liofilizada durante tres meses, el pico principal fue de 99,6 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,2 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 % tanto inicialmente y después de la reconstitución posterior a tres meses de almacenamiento en forma liofilizada.

30 Por lo tanto, todos los puntos de tiempo exhibieron poco a nulo cambio en el % de pico principal y las especies de peso molecular alto y bajo entre las mediciones en el punto de tiempo inicial y a los tres meses.

El pico cromatográfico de la disolución no cambia por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C

35 Se llevó a cabo cromatografía de intercambio catiónico (CEX, por sus siglas en inglés) en la disolución reconstituida usando cromatografía líquida de alto rendimiento (CEX-HPLC, por sus siglas en inglés). En la cromatografía de intercambio catiónico, las moléculas con carga positiva se atraen a un soporte sólido con carga negativa. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C en forma liofilizada durante tres meses, el aspecto de la disolución reconstituida se caracterizó por un patrón de pico cromatográfico predominante de la muestra que se ajustó al del testigo que fue el ADC1-MMAF que se había caracterizado anteriormente. Por lo tanto, el pico cromatográfico permaneció relativamente incambiado durante tres meses a 5 °C.

40 La pureza de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a largo plazo a 5 °C

Se llevó a cabo electroforesis en gel capilar (CE-SDS-R) con la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses para determinar la pureza de la disolución. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de pureza fue de 97,4 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C en forma liofilizada durante tres meses, el porcentaje de pureza fue de 97,6 %.

45 Por lo tanto, la pureza de la disolución reconstituida no cambió significativamente entre el punto de tiempo inicial y los tres meses de almacenamiento.

La relación entre el fármaco y el anticuerpo (DAR) de ADC1-MMAF permaneció sin cambios después del almacenamiento a 5 °C

50 Se llevó a cabo cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en la disolución reconstituida para determinar la relación entre fármaco y anticuerpo (DAR) durante un período de almacenamiento de tres meses. La HIC se usa para separar las proteínas en base a la hidrofobicidad relativa. En el punto de tiempo inicial y después de la

reconstitución posterior al almacenamiento en forma liofilizada a 5 °C durante tres meses, se midió la relación entre fármaco y anticuerpo (DAR) promedio para ADC1-MMAF en 3,0 y 2,9, respectivamente.

El porcentaje de anticuerpo 1 no conjugado en la disolución no cambió después del almacenamiento a 5 °C

5 La disolución reconstituida también se analizó para determinar el porcentaje de anticuerpo no conjugado para ADC1-MMAF. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no fue mayor que 7,6. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C en forma liofilizada durante tres meses, el porcentaje no fue mayor que 7,6. Por lo tanto, el porcentaje de anticuerpo 1 no conjugado permaneció igual durante el periodo de tres meses.

El porcentaje de enlazador a fármaco aplacado en la disolución no cambió por el almacenamiento a 5 °C

10 Se llevó a cabo cromatografía de fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) en la disolución reconstituida para determinar el porcentaje de enlazador a fármaco aplacado. No se detectó el porcentaje de enlazador a fármaco aplacado inicialmente y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses en forma liofilizada (el límite de detección práctico fue de 0,001 %).

Las impurezas totales en la disolución no cambiaron después del almacenamiento a 5 °C

15 La disolución reconstituida también se analizó para determinar el porcentaje de impurezas totales mediante el uso de RP-HPLC. El porcentaje de impurezas totales no fue detectable inicialmente y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses en forma liofilizada (el límite de detección práctico fue de 0,001 %; el límite de determinación cuantitativa práctico fue de 0,003 %).

La contaminación por particulado de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a 5 °C

20 La contaminación por particulado se evaluó al determinar las partículas subvisibles mediante el uso de dos criterios de aceptación diferentes.

25 Se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 10 µm por contenedor, con no más de 6000 (norma de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) y la Farmacopea europea). En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 13. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses en forma liofilizada, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 20. Por lo tanto, ambos puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm.

30 También se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 25 µm por contenedor, con NMT de 600 (norma de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) y la Farmacopea europea). En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 0. Por lo tanto, ambos puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm.

El contenido de agua de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a 5 °C

35 El contenido de agua se evaluó mediante titulación de Karl-Fischer. La titulación de Karl Fischer usa titulación coulombimétrica o volumétrica para determinar cantidades traza de agua en una muestra, indicadas como un porcentaje. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,8 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses en forma liofilizada, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,8 %. Por lo tanto, en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el contenido de agua de la disolución reconstituida fue insignificante.

El pH de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a 5 °C

45 Se determinó el pH de la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 5 °C durante tres meses. En el punto de tiempo inicial, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9. Después del almacenamiento a 5 °C durante tres meses, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9. Por lo tanto, el almacenamiento de la composición de ADC1-MMAFp durante tres meses a 5 °C no afectó el pH.

Ejemplo 7: Estabilidad de ADC 1-MMAFp en una formulación liofilizada a 25 °C

50 Se llevaron a cabo los siguientes experimentos después de la reconstitución de la formulación de ADC1-MMAFp liofilizada (véase el Ejemplo 2), con SWFI en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento del liofilizado durante uno y tres meses a 25 °C (60 % de humedad relativa).

El aspecto del liofilizado y la disolución reconstituida no se ve afectado por el almacenamiento a 25 °C

5 Se evaluó visualmente el aspecto del liofilizado y de la disolución reconstituida para confirmar que el liofilizado estaba prácticamente libre de materia particulada extraña visible y libre de humedad en el material de envasado. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 25 °C, el aspecto del liofilizado cumplió con los criterios anteriores. Después de la reconstitución, la disolución reconstituida fue una disolución incolora a ligeramente amarilla, prácticamente libre de materia particulada visible. Por lo tanto, en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 25 °C, el aspecto de la disolución reconstituida fue que la disolución era incolora a ligeramente amarilla y prácticamente libre de materia particulada visible.

10 El color de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a 25 °C

Se evaluó el color de la disolución (visual) usando una escala de Azul/Amarillo (BY), donde las muestras se evaluaron con respecto a una disolución de referencia y se informaron los valores. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 25 °C, todas las disoluciones reconstituidas tuvieron una medición en la escala BY menor o igual que 7. Por lo tanto, el almacenamiento no afectó el color de la disolución.

15

La transparencia y opalescencia de la disolución no se ven afectadas por el almacenamiento a 25 °C

Se evaluaron la transparencia y opalescencia de la disolución reconstituida. Los criterios de aceptación de la disolución reconstituida se cumplieron si la disolución reconstituida no fue más opalescente que la suspensión de referencia IV (según, la Farmacopea europea, ph. Eur.). En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 25 °C, el aspecto de la disolución reconstituida no fue más opalescente que el de la suspensión de referencia IV (según la Farmacopea europea, ph. Eur.) (<= RSII).

20

La actividad biológica de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a 25 °C

Se usó un ensayo de citotoxicidad usando una línea celular de carcinoma epidermoide humano para evaluar la actividad biológica (%) de la disolución reconstituida en comparación con un testigo de ADC1-MMAF que se había confirmado anteriormente que tenía actividad citotóxica (el testigo tenía 100 % de actividad). En el punto de tiempo inicial, la actividad biológica relativa fue de 102 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C durante un mes, la actividad biológica relativa fue de 101 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C durante tres meses, la actividad biológica relativa fue de 97 %.

25

El tamaño de las moléculas y/o complejos moleculares no se ve afectado por el almacenamiento a 25 °C

Se llevó a cabo cromatografía de exclusión por tamaño mediante cromatografía líquida de alto rendimiento-de exclusión por tamaño (SE-HPLC). El pico principal (%) se midió junto con las especies de alto peso molecular (%) y las especies de bajo peso molecular (%). En el punto de tiempo inicial, el pico principal fue de 99,5 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,2 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C durante un mes, el pico principal fue de 99,5 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,3 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C durante tres meses, el pico principal fue de 99,6 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,3 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Por lo tanto, hubo poco a nulo cambio en el % de pico principal y las especies de peso molecular alto y bajo entre las mediciones en el punto de tiempo inicial, uno y tres meses.

35

40 El pico cromatográfico de la disolución no cambia por el almacenamiento a 25 °C

Se llevó a cabo cromatografía de intercambio catiónico (CEX) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (CEX-HPLC). En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 25 °C durante un mes y tres meses, el aspecto de la disolución reconstituida se caracterizó por un patrón de pico cromatográfico predominante de la muestra que se ajustó al del patrón de referencia.

45 La pureza de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a 25 °C

Se llevó a cabo electroforesis en gel capilar (CE-SDS-R) en la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 25 °C. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de pureza fue de 97,4 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes, el porcentaje de pureza fue de 97,5 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses, el porcentaje de pureza fue de 97,6 %. Por lo tanto, la pureza de la disolución reconstituida no cambió significativamente entre el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 25 °C.

50

La relación entre el fármaco y el anticuerpo (DAR) de ADC1-MMAFp en la disolución permaneció sin cambios después del almacenamiento a 25 °C

5 Se llevó a cabo cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en la disolución reconstituida. En el punto de tiempo inicial, se midió una DAR de 3,0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C, se midió una DAR de 3,0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C, se midió una DAR de 2,9. Por lo tanto, la DAR de ADC1-MMAPp no cambió significativamente entre el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 25 °C.

El porcentaje de anticuerpo 1 no conjugado en la disolución no cambió después del almacenamiento a 25 °C

10 La disolución reconstituida se analizó para determinar el porcentaje de anticuerpo 1 no conjugado. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no fue mayor que 7,6. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C, el porcentaje no fue mayor que 7,6. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C, el porcentaje no fue mayor que 7,6.

El porcentaje de enlazador a fármaco aplacado en la disolución no cambió por el almacenamiento a 25 °C

15 Se llevó a cabo cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) en la disolución reconstituida para determinar el porcentaje de enlazador aplacado. En el punto de tiempo inicial, en el punto de tiempo de un mes y en el punto de tiempo de tres meses, el porcentaje de enlazador aplacado no fue detectable (el límite de detección práctico fue de 0,001 %; el límite de determinación cuantitativa práctico fue de 0,003 %).

Las impurezas totales en la disolución no cambiaron después del almacenamiento a 25 °C

20 La disolución reconstituida se analizó para determinar el porcentaje de impurezas totales. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no se detectó. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C, el porcentaje de impurezas fue menor que 0,003. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C, el porcentaje no se detectó (el límite de detección práctico fue de 0,001 %; el límite de determinación cuantitativa práctico fue de 0,003 %). Por lo tanto, el porcentaje fue similar en todos los puntos de tiempo para las impurezas totales.

25 La contaminación por particulado de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a 25 °C

La contaminación por particulado se evaluó al determinar las partículas subvisibles según dos criterios de aceptación.

30 Se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 10 µm por contenedor, con no más de 6000 (norma de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) y la Farmacopea europea). En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 13. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 12. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 17. Por lo tanto, todos los puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm. También se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 25 µm por contenedor, con no más de 600. En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 7. Por lo tanto, todos los puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm.

El contenido de agua de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a 25 °C

45 El contenido de agua se evaluó mediante titulación de Karl-Fischer. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,8 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 25 °C, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,8 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 25 °C, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,8 %. Por lo tanto, en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses, el contenido de agua de la disolución reconstituida fue insignificante.

El pH de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a 25 °C

50 Se determinó el pH de la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 25 °C. En el punto de tiempo inicial, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a

25 °C, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 25 °C, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9.

Ejemplo 8: Estabilidad de la formulación liofilizada de ADC 1-MMAFp a 40 °C

5 Se llevaron a cabo las siguientes pruebas después de la reconstitución de la formulación de ADC1-MMAFp liofilizada descrita en el Ejemplo 2, con SWFI en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento del liofilizado durante uno y tres meses a 40 °C/(75 % de humedad relativa).

El aspecto del liofilizado y la disolución reconstituida no se ve afectado por el almacenamiento a 40 °C

10 Se evaluó visualmente el aspecto del liofilizado y de la disolución reconstituida para confirmar que el liofilizado estaba prácticamente libre de materia particulada extraña visible y libre de humedad en el material de envasado. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 40 °C, el aspecto del liofilizado cumplió con los criterios anteriores. Después de la reconstitución, la disolución reconstituida fue una disolución incolora a ligeramente amarilla, prácticamente libre de materia particulada visible. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 40 °C, el aspecto de la disolución reconstituida fue que la disolución era incolora a ligeramente amarilla, prácticamente libre de materia particulada visible.

El color de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a 40 °C

20 Se evaluó el color de la disolución (visual) usando una escala BY, donde las muestras se evaluaron con respecto a una disolución de referencia y se informaron los valores. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 40 °C, todas las disoluciones reconstituidas tuvieron una medición en la escala BY menor o igual que 7. Por lo tanto, el almacenamiento no afectó el color de la disolución.

La transparencia y opalescencia de la disolución no se ven afectadas por el almacenamiento a 40 °C

25 Se evaluaron la transparencia y opalescencia de la disolución reconstituida. Los criterios de aceptación de la disolución reconstituida se cumplieron si la disolución reconstituida no fue más opalescente que la suspensión de referencia IV (según, la Farmacopea europea, ph. Eur. En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 40 °C, el aspecto de la disolución reconstituida no fue más opalescente que el de la suspensión de referencia IV (según la Farmacopea europea, ph. Eur.) (<= RSII).

La actividad biológica de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a 40 °C

30 Se usó un ensayo de citotoxicidad usando una línea celular de carcinoma epidermoide humano para evaluar la actividad biológica (%) de la disolución reconstituida en comparación con un testigo de ADC1-MMAF que se había confirmado anteriormente que tenía actividad citotóxica (el testigo tenía 100 % de actividad). En el punto de tiempo inicial, la actividad biológica fue de 102 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C durante un mes, la actividad biológica relativa fue de 101 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C durante tres meses, la actividad biológica relativa fue de 105 %. Por lo tanto, el porcentaje de actividad biológica en todos los puntos de tiempo tuvo actividad biológica por encima de 100 % en la formulación del Ejemplo 2.

El tamaño de las moléculas y complejos moleculares no se ve afectado por el almacenamiento a 40 °C

40 Se llevó a cabo cromatografía de exclusión por tamaño mediante cromatografía líquida de alto rendimiento-de exclusión por tamaño (SE-HPLC). El pico principal (%) se midió junto con las especies de alto peso molecular (%) y las especies de bajo peso molecular (%). En el punto de tiempo inicial, el pico principal fue de 99,5 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,2 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C durante un mes, el pico principal fue de 99,5 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,3 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C durante tres meses, el pico principal fue de 99,5 %. Las especies de alto peso molecular alcanzaron 0,3 % y las especies de bajo peso molecular alcanzaron 0,2 %. Por lo tanto, hubo poco a nulo cambio en el % de pico principal y las especies de peso molecular alto y bajo entre las mediciones en el punto de tiempo inicial, uno y tres meses.

El pico cromatográfico de la disolución no cambia por el almacenamiento a 40 °C

50 Se llevó a cabo cromatografía de intercambio catiónico (CEX) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (CEX-HPLC). En el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento a 40 °C durante un mes y tres meses, el aspecto de la disolución reconstituida se caracterizó por un patrón de pico cromatográfico predominante de la muestra que se ajusta al del patrón de referencia.

La pureza de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a 40 °C

5 Se llevó a cabo electroforesis en gel capilar (CE-SDS-R) en la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno, tres y seis meses a 40 °C y se usó para determinar el porcentaje de pureza de la disolución. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de pureza fue de 97,4 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes, el porcentaje de pureza fue de 97,5 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses, el porcentaje de pureza fue de 97,6 %. Por lo tanto, la pureza de la disolución reconstituida no cambió significativamente entre el punto de tiempo inicial y durante y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 40 °C.

10 La relación entre el fármaco y el anticuerpo (DAR) de ADC1-MMAFp no cambió después del almacenamiento a 40 °C

15 Se llevó a cabo cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en la disolución reconstituida. En el punto de tiempo inicial, se midió una DAR de 3,0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C, se midió una DAR de 3,0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C, se midió una DAR de 2,9. Por lo tanto, la DAR no cambió significativamente entre el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 40 °C.

El porcentaje de anticuerpo 1 no conjugado en la disolución no cambió después del almacenamiento a 40 °C

20 En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de anticuerpo 1 no conjugado no fue mayor que 7,6. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C, el porcentaje de anticuerpo 1 no conjugado no fue mayor que 7,6. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C, el porcentaje de anticuerpo 1 no conjugado no fue mayor que 7,6. Por lo tanto, el porcentaje fue similar en todos los puntos de tiempo.

El porcentaje de enlazador a fármaco aplacado en la disolución no cambió por el almacenamiento a 40 °C

25 Se llevó a cabo cromatografía de fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) en la disolución reconstituida para determinar el porcentaje de enlazador a fármaco aplacado. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no se detectó. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C, el porcentaje no se detectó. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C, el porcentaje no se detectó. Por lo tanto, el porcentaje de enlazador a fármaco aplacado no se detectó en todos los puntos de tiempo.

Las impurezas totales en la disolución no cambiaron después del almacenamiento a 40 °C

30 La disolución reconstituida se analizó para determinar el porcentaje de impurezas totales mediante el uso de RP-HPLC. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje no se detectó. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C, el porcentaje fue menor que 0,003. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C, el porcentaje no se detectó. Por lo tanto, el porcentaje fue similar en todos los puntos de tiempo para las impurezas totales.

35 La contaminación por particulado de la disolución no se ve afectada por el almacenamiento a 40 °C

La contaminación por particulado se evaluó al determinar las partículas subvisibles según dos criterios de aceptación.

40 Se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 10 µm por contenedor, con no más de 6000 (norma de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) y la Farmacopea europea). En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 13. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 5. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm fue 8. Por lo tanto, todos los puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 10 µm.

45 También se alcanzaron los criterios de aceptación al determinar la cantidad de partículas mayores que 25 µm por contenedor, con no más de 600. En el punto de tiempo inicial, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 0. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C, la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm fue 2. Por lo tanto, todos los puntos de tiempo alcanzaron los criterios de aceptación para la cantidad de partículas por contenedor mayores que 25 µm.

50 El contenido de agua de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a 40 °C

5 El contenido de agua se evaluó mediante titulación de Karl-Fischer. La titulación de Karl Fischer usa titulación coulombimétrica o volumétrica para determinar cantidades traza de agua en una muestra, indicadas como un porcentaje. En el punto de tiempo inicial, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,8 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante un mes a 40 °C, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,8 %. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C, el porcentaje de agua en la disolución reconstituida fue de 0,8 %. Por lo tanto, en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses, el contenido de agua de la disolución reconstituida fue insignificante.

El pH de la disolución no se ve afectado por el almacenamiento a 40 °C

10 Se determinó el pH de la disolución reconstituida en el punto de tiempo inicial y después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante uno y tres meses a 40 °C. En el punto de tiempo inicial, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante tres meses a 40 °C, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9. Después de la reconstitución posterior al almacenamiento durante seis meses a 40 °C, el valor de pH de la disolución reconstituida fue de 5,9.

15 Ejemplo 9: Fabricación a gran escala de la formulación de ADC 1-MMAF liofilizada

Para la preparación de la disolución a granel, se disolvió histidina en agua para inyección, se ajustó el pH con ácido clorhídrico al 10 % p/p, y se agregó agua para inyección hasta el final peso. Los excipientes tampón de la formulación (sacarosa y polisorbato 80) se pasaron y disolvieron en 15 mM de disolución de histidina. A continuación, la disolución resultante se examinó para determinar su aspecto.

20 El ADC 1-MMAF se descongeló a 30 °C en un baño de agua, se examinó su aspecto, se concentró y se pesó. Se agregaron 15 mM de tampón de histidina, polisorbato 80 y sacarosa a ADC 1-MMAF. Se examinó el aspecto de la disolución y se determinó su pH y densidad, posteriormente se esterilizó por filtración. A continuación, la disolución se liofilizó en condiciones controladas.

25 Las pruebas esenciales durante el proceso que se llevaron a cabo durante la fabricación del polvo de ADC 1-MMAF para disolución para inyección, 20 mg/mL se indican en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2. Pruebas de control durante el proceso y límites de aceptación

Operación	Prueba	Límite de aceptación
Primera filtración	Integridad del filtro	La prueba de flujo directo, tasa de difusión y punto de burbuja deben cumplir con la especificación del filtro
Esterilización por filtración	Carga bacteriana biológica antes de la segunda filtración	<10 UFC/100 mL
	Integridad del filtro	La prueba de flujo directo, tasa de difusión o punto de burbuja deben cumplir con la especificación del filtro

30 La cantidad de disolución de ADC 1-MMAF y tampón disolución usada para un lote típico de disolución de ADC 1-MMAF para liofilización se muestra en la Tabla 3, a continuación. En la Tabla 4 y la Tabla 5 se describen una lista de componentes y las cantidades usadas para fabricar el tampón de formulación.

Tabla 3. Fórmula de lote para la disolución de producto de fármaco a granel de ADC 1-MMAF

Concentración	20 mg/mL
Tamaño del lote	27 L ^a
Componente	Cantidad (kg) por lote
Sustancia de fármaco ADC 1-MMAF	15,57 ^{b, c, d}
Tampón de formulación ^e	12,29 ^d

a. Densidad de la disolución a granel: 1,032 g/mL

b. Equivalente a 0,540 kg de proteína a 35 g de proteína/L de concentrado de sustancia de fármaco; densidad de concentrado de sustancia de fármaco: 1,0089 g/mL

c. El concentrado de sustancia de fármaco contiene 15 mM de histidina

d. Las cantidades varían dependiendo de la concentración de proteína real del concentrado de sustancia de fármaco

e. La fórmula del lote para este material se presenta en la Tabla 4

ES 2 727 134 T3

Tabla 4. Fórmula del lote para la disolución de tampón de formulación

Tamaño del lote	11,58 L ^a
Componente^b	Cantidad (g) por lote
Sacarosa	1890 ^b
Polisorbato 80	2,7 ^c
15 mM de disolución de histidina ^d	ad 12290
Abreviatura: ad = hasta el peso total de a. Densidad de la disolución: 1,0616 g/mL b. La cantidad corresponde a una concentración final en la disolución de producto a granel de 70 g/L c. La cantidad corresponde a una concentración final en la disolución de producto a granel de 0,10 g/L d. La fórmula del lote para este material se presenta en la Tabla 6.	

Tabla 5. Fórmula de lote para 15 mM de disolución de histidina

Tamaño del lote	15 L ^a
Componente	Cantidad (g) por lote
Histidina	34,95
Ácido clorhídrico al 10 % (p/p) ^b	q.s.
Agua para inyección	ad 14999
Abreviatura: ad = hasta el peso total de a. Densidad de la disolución: 0,9993 g/mL b. Usado para el ajuste del pH	

Resumen de secuencias

SEQ ID NO: 1	Ácido nucleico	Secuencia de cadena pesada variable de anticuerpo 2 (Ab anti-EGFR murino)
SEQ ID NO: 2	Proteína	Secuencia de cadena pesada variable de anticuerpo 2 (Ab anti-EGFR murino)
SEQ ID NO: 3	Ácido nucleico	Secuencia de cadena ligera variable de anticuerpo 2 (Ab anti-EGFR murino)
SEQ ID NO: 4	Proteína	Secuencia de cadena ligera variable de anticuerpo 2 (Ab anti-EGFR murino).
SEQ ID NO: 5	Proteína	CDR1 de la secuencia de cadena pesada variable SEQ ID NO:2
SEQ ID NO: 6	Proteína	CDR2 de la secuencia de cadena pesada variable SEQ ID NO:2
SEQ ID NO: 7	Proteína	CDR3 de la secuencia de cadena pesada variable SEQ ID NO:2
SEQ ID NO: 8	Proteína	CDR1 de la secuencia de cadena ligera variable SEQ ID NO:2
SEQ ID NO: 9	Proteína	CDR2 de la secuencia de cadena ligera variable SEQ ID NO:2
SEQ ID NO: 10	Proteína	CDR3 de la secuencia de cadena ligera variable SEQ ID NO:2
SEQ ID NO: 11	Proteína	Secuencia de cadena pesada variable de anticuerpo 2 (Ab anti-EGFR murino) sin péptido señal
SEQ ID NO: 12	Proteína	Secuencia de cadena ligera variable de anticuerpo 2 (Ab anti-EGFR murino) sin péptido señal
SEQ ID NO: 13	Proteína	Secuencia de cadena pesada variable de anticuerpo 1 (Ab anti-EGFR humanizado)
SEQ ID NO: 14	Proteína	Secuencia de cadena pesada constante de anticuerpo 1 (Ab anti-EGFR humanizado)
SEQ ID NO: 15	Proteína	CDR1 de la secuencia de cadena pesada variable SEQ ID NO:13
SEQ ID NO: 16	Proteína	CDR2 de la secuencia de cadena pesada variable SEQ ID NO:13
SEQ ID NO: 17	Proteína	CDR3 de la secuencia de cadena pesada variable SEQ ID NO:13
SEQ ID NO: 18	Proteína	Secuencia de cadena ligera variable de anticuerpo 1 (Ab anti-EGFR humanizado)

ES 2 727 134 T3

SEQ ID NO: 19	Proteína	Secuencia de cadena ligera constante de anticuerpo 1 (Ab anti-EGFR humanizado)
SEQ ID NO: 20	Proteína	CDR1 de la secuencia de cadena ligera variable SEQ ID NO:18
SEQ ID NO: 21	Proteína	CDR2 de la secuencia de cadena ligera variable SEQ ID NO:18
SEQ ID NO: 22	Proteína	CDR3 de la secuencia de cadena ligera variable SEQ ID NO:18

Listado de secuencias

<110> ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO. KG y ABBVIE INC.

<120> FORMULACIONES DE CONJUGADO DE FÁRMACO Y ANTICUERPO ANTI-EGFR

5 <130> 117813-06020

<140> Nueva solicitud

< 141> en forma conjunta en la presente con

<150> 61/790.490

< 151> 2013-03-15

10 <160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 402

< 212> ADN

15 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 1

atgagagtgc tgattctttt gtggctgttc acagcctttc ctgggtgcct gtctgatgtg 60

cagcttcagg agtcgggacc tagcctggtg aaacettctc agtctctgtc cctcacctgc 120

actgtcactg gctactcaat caccagtgat ttgctctgga actggatccg gcagtttcca 180

ggaaacaagc tggagtggat gggctacata agttatagtg gtaacactag gtacaaccca 240

tctctcaaaa gtcgaatctc tatcactcga gacacatcca agaaccaatt cttcctgcag 300

ttgaattctg tgactattga ggacacagcc acatattact gtgtaacggc gggacgcggg 360

tttccttatt gggccaag gactctggtc actgtctctg ca 402

20 <210> 2

< 211> 134

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

25 < 223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 727 134 T3

<400> 2
 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Val
 1 5 10 15
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 35 40 45
 Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 130

5 <210> 3
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 3
 atgggtgtcca cagctcagtt ccttgcattc ttgttgcttt ggtttccagg tgcaagatgt 60
 gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc 120
 atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagagacca 180
 gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatga agttccatca 240
 aggttcagtg gcagtgatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 300
 gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatgctcagt ttccgtggac gttcgggtgga 360
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgt 384

15 <210> 4
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 727 134 T3

<400> 4
 Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
 20 25 30
 Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp
 35 40 45
 Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe
 50 55 60
 Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala
 100 105 110
 Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

5 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 5
 Ser Asp Phe Ala Trp Asn
 1 5

15 <210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

20 <400> 6
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 727 134 T3

<400> 7
 Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
 1 5

5
 <210> 8
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

10
 <400> 8
 His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly
 1 5 10

<210> 9
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

15
 <220>
 < 223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 9
 His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
 1 5

20
 <210> 10
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

25
 <400> 10
 Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5

30
 <210> 11
 < 211> 116
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 11
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

ES 2 727 134 T3

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala
115

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 12
Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

15

ES 2 727 134 T3

<220>

< 223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 13

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

5

<210> 14

< 211> 330

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 14

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

ES 2 727 134 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

ES 2 727 134 T3

275

280

285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

5 <210> 15
 < 211> 6
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 15
 Ser Asp Phe Ala Trp Asn
 1 5

10 <210> 16
 < 211> 16
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

15 <220>
 < 223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 16
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

20 <210> 17
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 17
 Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
 1 5

<210> 18
 < 211> 108
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

30 <220>
 < 223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 727 134 T3

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 19

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

5

10

<210> 20
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>
 < 223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 20
 His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly
 1 5 10

10

<210> 21
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

15

<400> 21
 His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
 1 5

20

<210> 22
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 22
 Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5

25

REIVINDICACIONES

1. Una formulación liofilizada que comprende un conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un azúcar, histidina y un tensioactivo, en donde dicho ADC anti-EGFR comprende un anticuerpo anti-EGFR conjugado con una auristatina, en donde el anticuerpo anti-EGFR comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones de dominio de complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 20, 21 y 22.
2. La formulación de la reivindicación 1, en donde la auristatina es monometilauristatina F (MMAF).
3. La formulación de la reivindicación 2, en donde la MMAF se conjuga con el anticuerpo con un enlazador de maleimidocaproilo.
4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el tensioactivo es un polisorbato.
5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la formulación comprende aproximadamente 1-120 mg del ADC anti-EGFR.
6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el azúcar se selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol, sacarosa y trehalosa.
7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el azúcar es sacarosa y el tensioactivo es un polisorbato.
8. La formulación de la reivindicación 4 o la reivindicación 7, en donde el polisorbato es polisorbato 80.
9. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha formulación se reconstituye y comprende aproximadamente 1 - 100 mg/ml del ADC anti-EGFR, aproximadamente 1 - 10 mg/mL de histidina, aproximadamente 50 -90 mg/ml del azúcar y aproximadamente 0,01 - 0,2 mg/ml del tensioactivo.
10. La formulación de la reivindicación 9, en donde el azúcar es sacarosa, opcionalmente, en donde el tensioactivo es polisorbato 80 y/o la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,5 a 6,5.
11. La formulación de la reivindicación 9 o reivindicación 10, que comprende 10-100 mg/ml del ADC anti-EGFR.
12. La formulación de la reivindicación 9 o reivindicación 10, que comprende 1-40 mg/ml del ADC anti-EGFR.
13. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18.
14. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la formulación comprende una mezcla de ADC que tiene una DAR promedio de aproximadamente 3 o una mezcla de ADC que tiene una DAR de aproximadamente 2-4.
15. Una formulación liofilizada que comprende un ADC anti-EGFR que comprende un anticuerpo anti-EGFR conjugado con monometil auristatina F (MMAF), en donde dicho ADC comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones de dominio de complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOS: 20, 21 y 22, sacarosa, histidina y polisorbato 80, en donde la formulación comprende una mezcla de ADC que tiene una DAR promedio de aproximadamente 3 o una mezcla de ADC que tiene una DAR de aproximadamente 2-4.
16. La formulación de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo anti-EGFR comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18.
17. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que es una formulación farmacéutica.
18. Un método para preparar la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 15, dicho método comprende liofilizar una formulación acuosa que tiene un pH que varía de aproximadamente 5 a 7 y que comprende

1-20 mg de histidina, aproximadamente 320-410 mg del azúcar, aproximadamente 0,1 a 0,9 mg del tensioactivo y aproximadamente 1-150 mg del ADC anti-EGFR.

19. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17 para su uso en un método para tratar un trastorno que requiere tratamiento con el ADC anti-EGFR.

5 20. La formulación para su uso según la reivindicación 19, en donde el trastorno que requiere tratamiento con el ADC anti-EGFR es cáncer.

10 21. La formulación para su uso según la reivindicación 20, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas, cáncer de mama, tumores de células escamosas, cáncer anal, cáncer de piel, cáncer vulvar, tumores escamosos y glioma.

22. La formulación para su uso según la reivindicación 21, en donde el tumor escamoso se selecciona del grupo que consiste en tumor de pulmón escamoso, un tumor de vías respiratorias y digestivas altas escamoso y un tumor de cuello de útero escamoso.

15 23. La formulación para su uso según la reivindicación 21, en donde el cáncer es glioblastoma o glioblastoma multiforme.

24. La formulación para su uso según la reivindicación 20, en donde el cáncer es un tumor sólido que tiene sobreexpresión de EGFR.

25. La formulación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19-24, en donde la formulación se administra por vía intravenosa.

20 26. Un kit que comprende la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17.

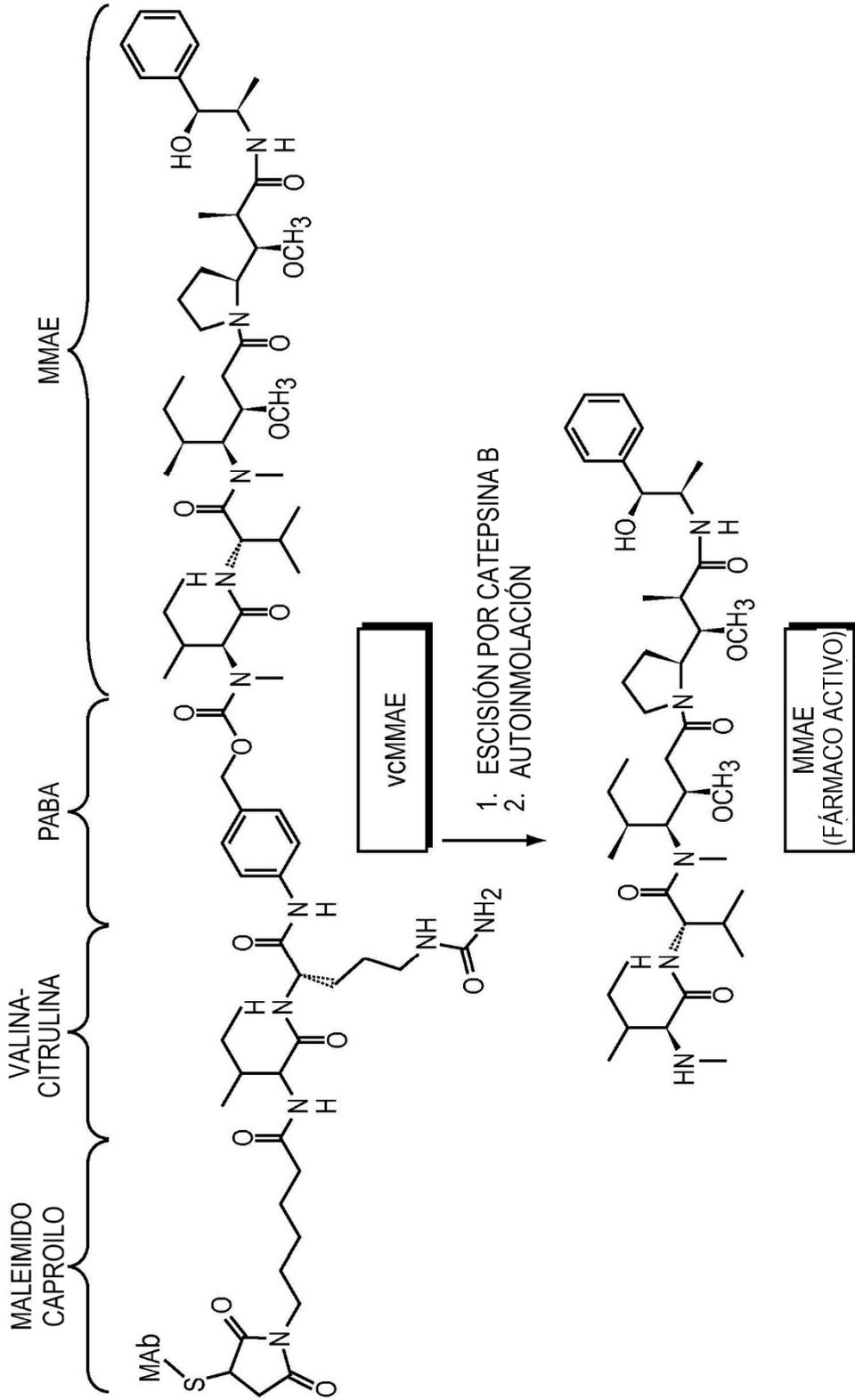


FIG. 1

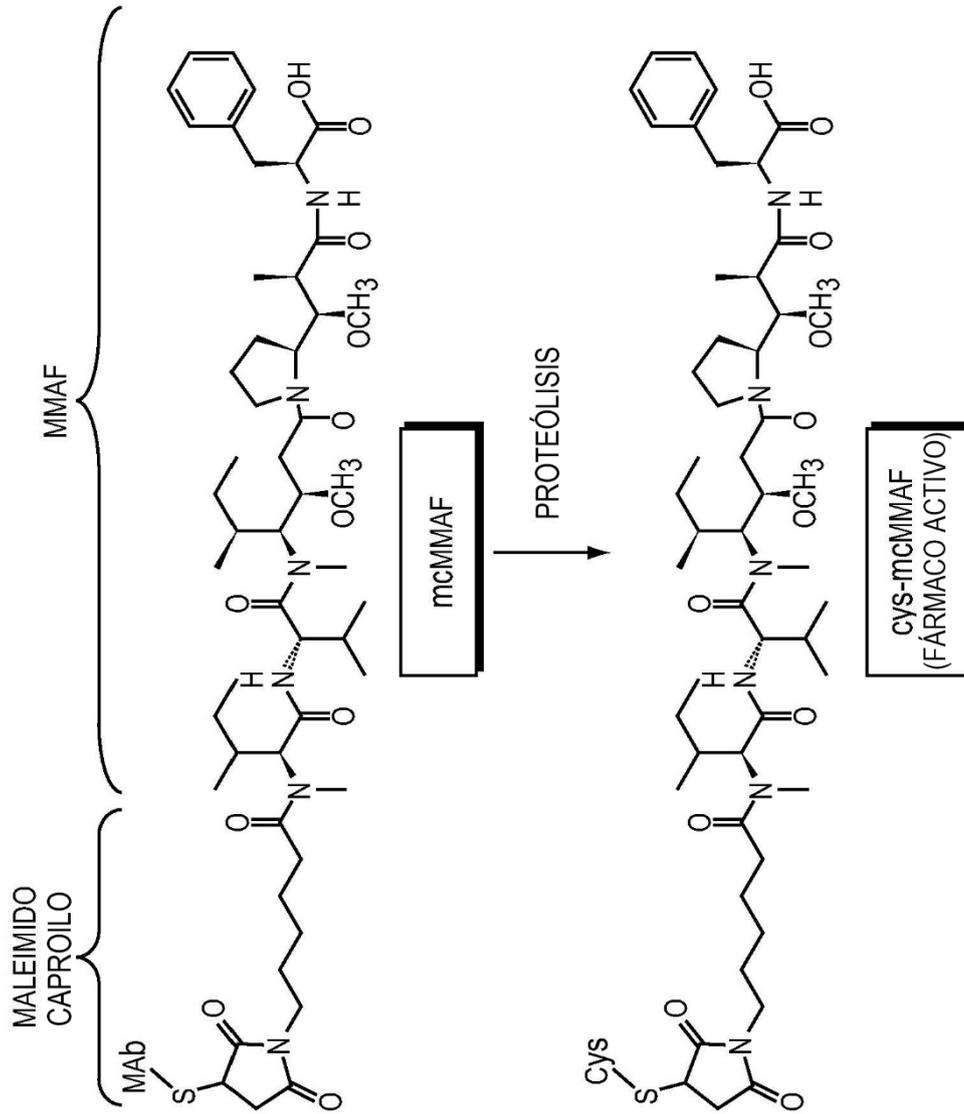


FIG. 2

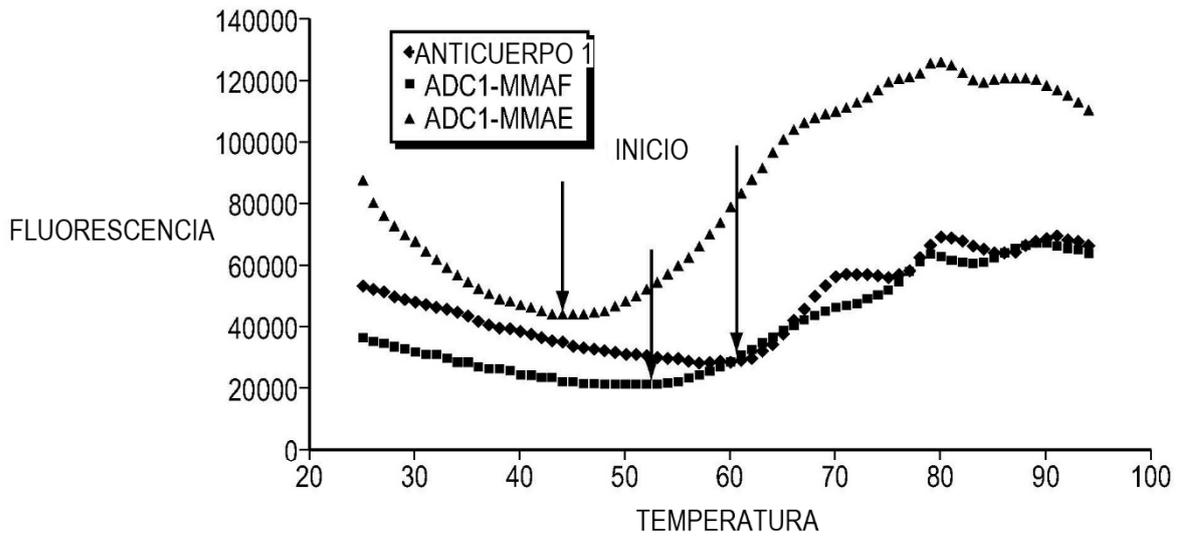


FIG. 3A

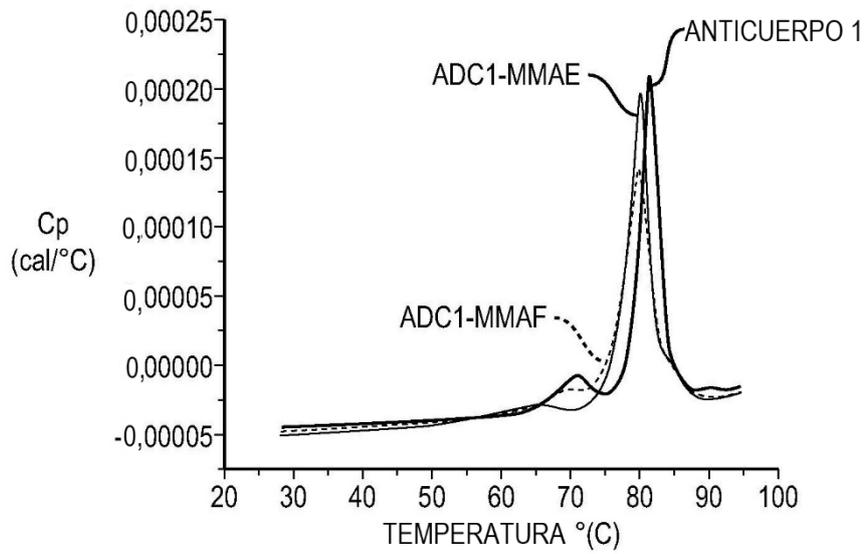
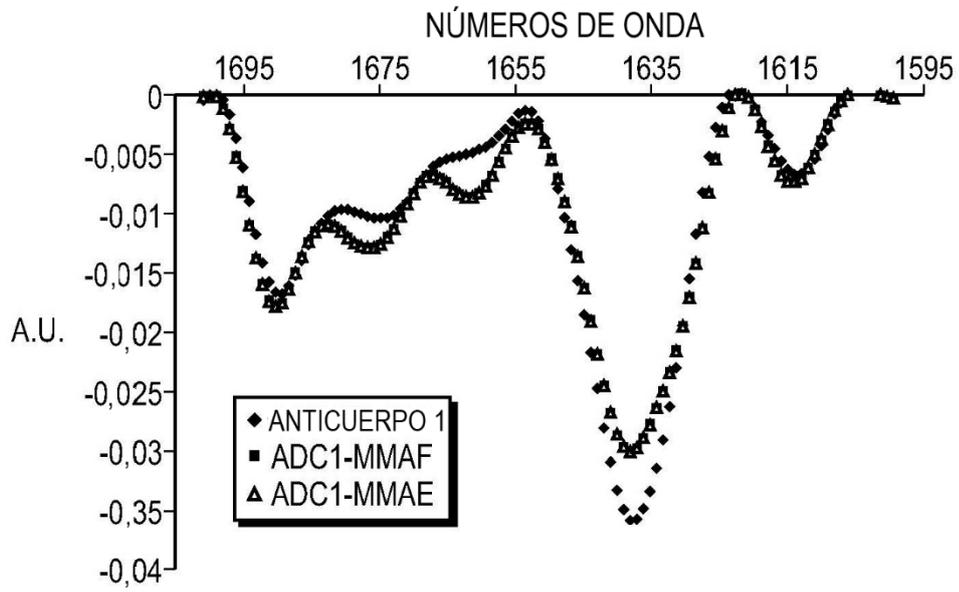
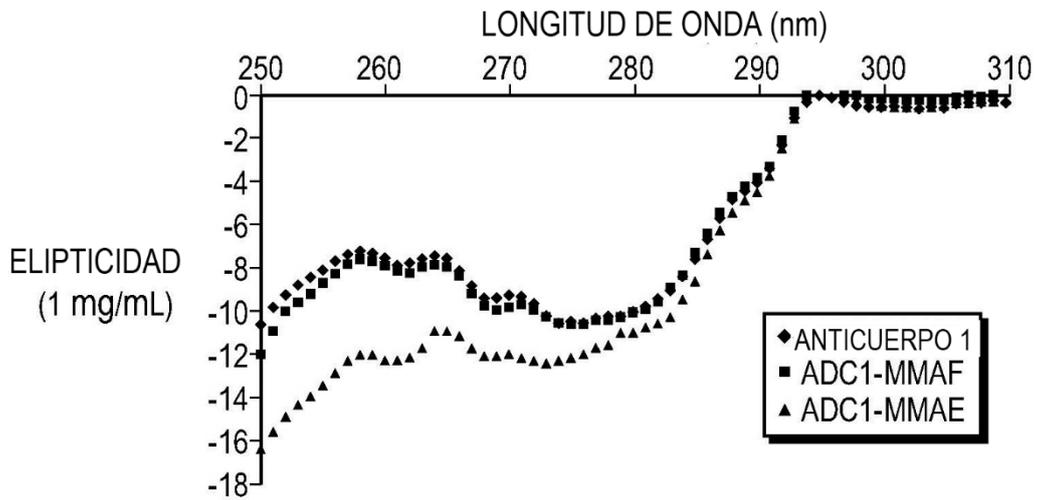


FIG. 3B



FTIR

FIG. 4A



CD DE UV CERCANO

FIG. 4B

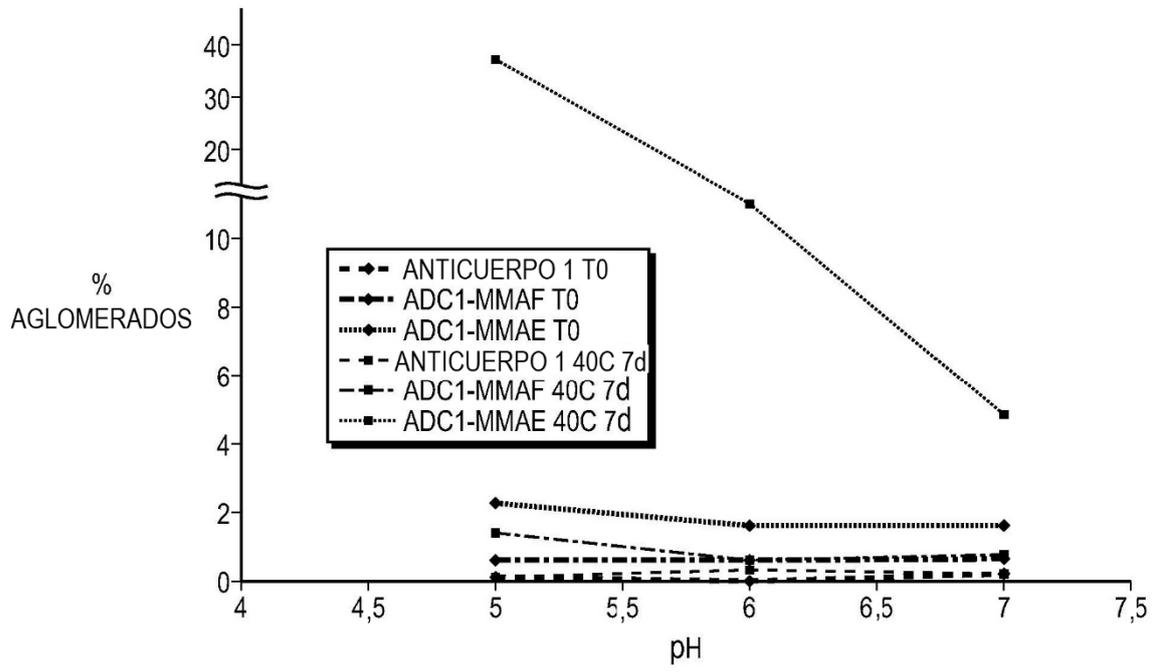


FIG. 5

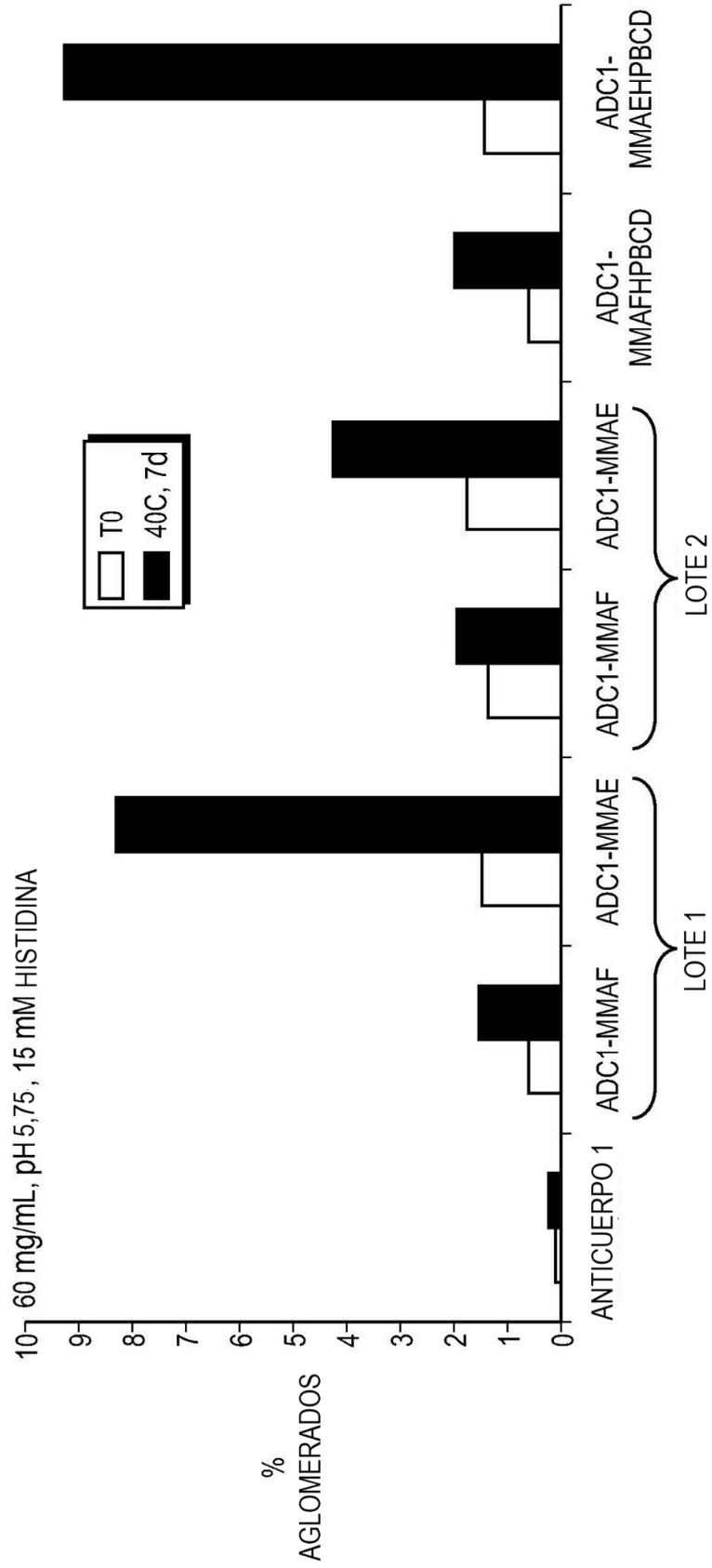


FIG. 6

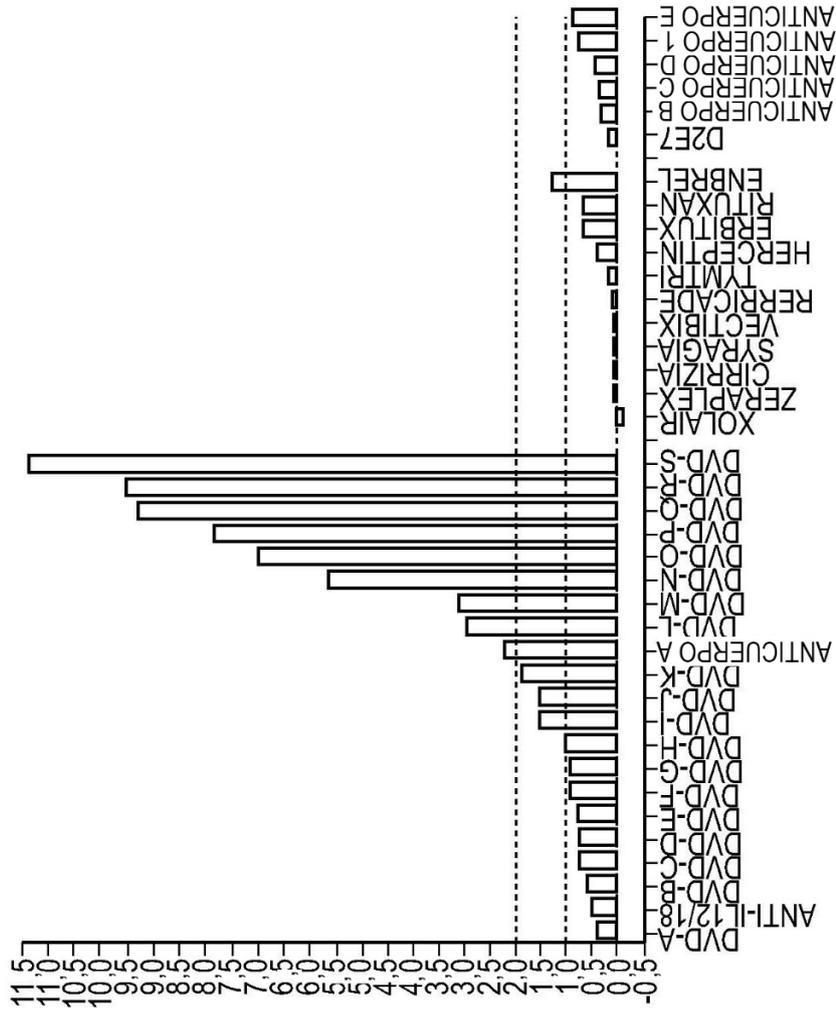


FIG. 7

ALTO PESO MOLECULAR (PENDIENTE)

↓

MUESTRA	PENDIENTE
ANTICUERPO 1	1,10
ADC1-MMAF	0,50
ADC1-MMAE	2,30
ANTICUERPO A	2,17

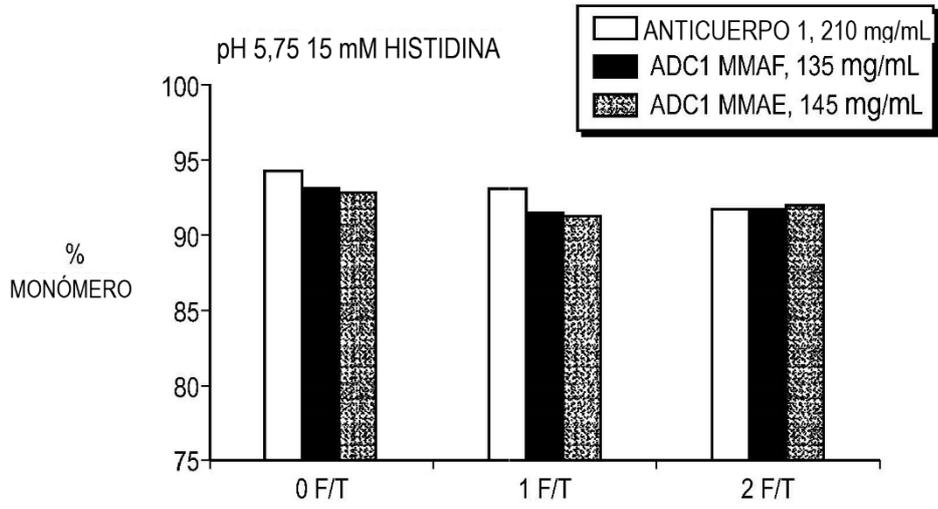


FIG. 8A

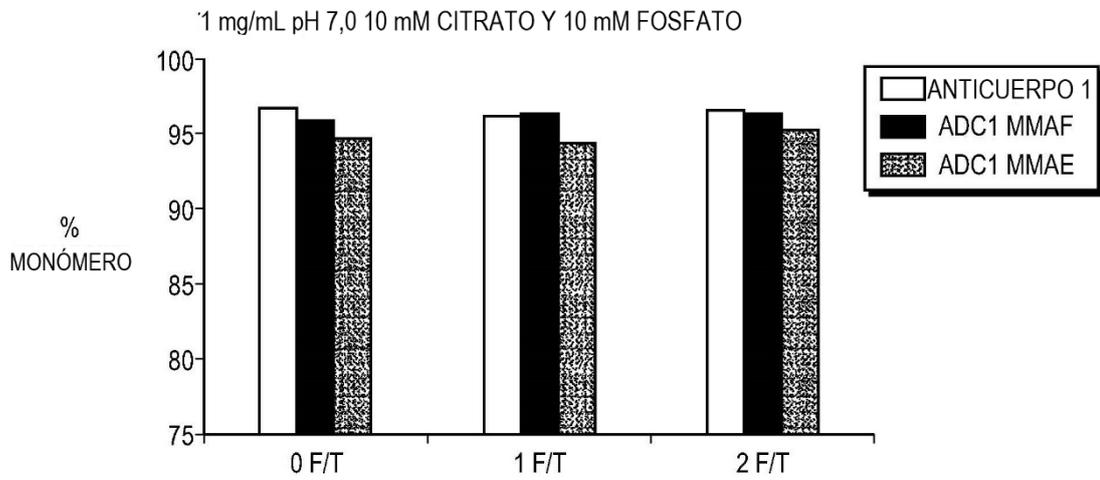


FIG. 8B

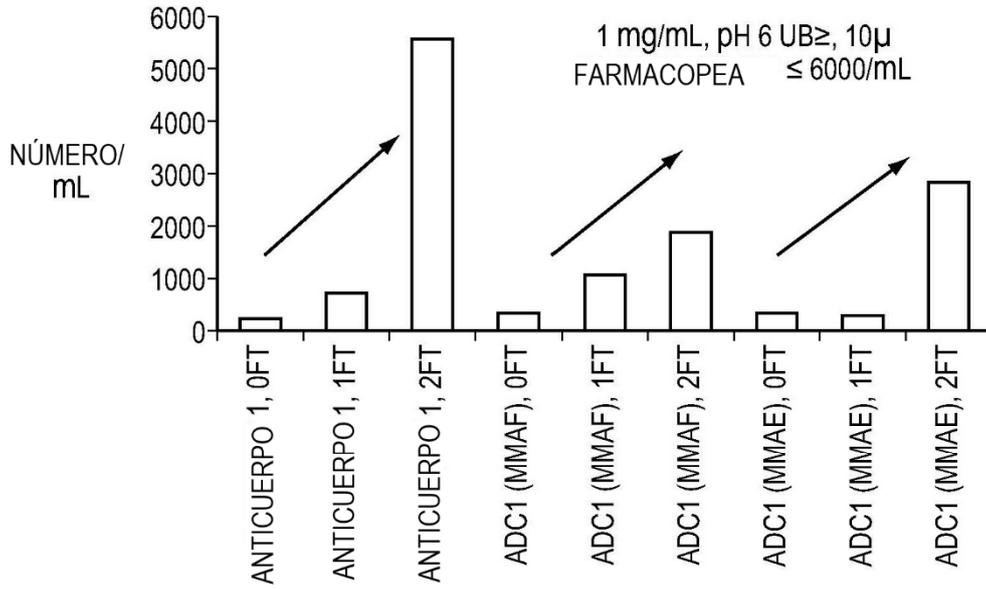


FIG. 9A

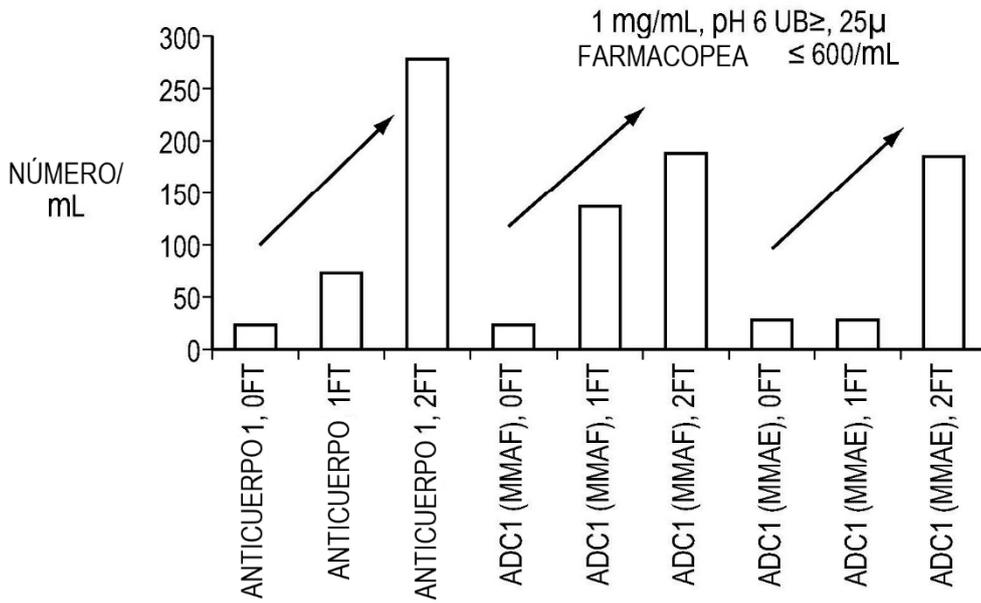


FIG. 9B