

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 332 402**

51 Int. Cl.:

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2001 PCT/US2001/42487**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2002 WO02030463**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2001 E 01981824 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **21.03.2018 EP 1324776**

54 Título: **Formulaciones de proteína concentradas de viscosidad reducida**

30 Prioridad:

12.10.2000 US 240107 P

24.05.2001 US 293834 P

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

14.05.2018

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (50.0%)

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US y

NOVARTIS AG (50.0%)

72 Inventor/es:

LIU, JUN y

SHIRE, STEVEN J.

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 332 402 T5

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de proteína concentradas de viscosidad reducida.

5 Antecedentes de la invenciónCampo de la invención

10 La presente invención pertenece a formulaciones de proteínas concentradas con una viscosidad reducida, que son particularmente adecuadas para la administración subcutánea. La invención también se refiere a un procedimiento de reducción de la viscosidad de las formulaciones de proteínas concentradas.

Descripción de la técnica relacionada

15 En los últimos diez años, los avances en la biotecnología han hecho posible la producción de una variedad de proteínas para aplicaciones farmacéuticas utilizando técnicas de ADN recombinante. Como las proteínas son más grandes y más complejas que los fármacos tradicionales orgánicos e inorgánicos (es decir, poseen múltiples grupos funcionales además de las estructuras tridimensionales complejas), la formulación de estas proteínas presenta problemas especiales. Uno de los problemas es el elevado valor de viscosidad de las formulaciones de proteínas, especialmente a alta concentración. El suministro de una concentración de proteínas es a menudo requerido para la administración subcutánea debido a las limitaciones de volumen ($\leq 1,5$ ml) y requerimientos de dosis (normalmente ≥ 50 mg, preferiblemente ≥ 100 mg). Por ejemplo, si una proteína debe administrarse a pacientes a 2 mg/kg sobre una base semanal, la dosis semanal promedio será de 130 mg considerando 65 kg como peso promedio de los pacientes. Como volúmenes de inyección mayores de 1, 5 mg no se toleran bien para la administración subcutánea, la concentración de proteínas para una administración subcutánea semanal será de aproximadamente 100 mg/ml (130 mg de proteínas en menos de 1,5 ml de volumen). Sin embargo, las formulaciones de proteínas muy concentradas presentan varios problemas. Un problema es la tendencia de las proteínas a formar partículas durante su procesamiento y/o almacenamiento, que hace difícil la manipulación durante el procesamiento adicional. En el caso de formulaciones líquidas reconstituidas, esto se soluciona normalmente añadiendo un surfactante adecuado (por ejemplo, un polisorbato) durante la liofilización o después de la liofilización mientras se reconstituye la formulación. Aunque los surfactantes han mostrado que reduce de manera significativa el grado de formación de partículas de las proteínas, no solucionan otro problema asociado con la manipulación y la administración de formulaciones de proteínas concentradas. Las proteínas tienden a formar soluciones viscosas en alta concentración debido a su naturaleza macromolecular y potencial para interacciones intermoleculares. Además, muchas proteínas a menudo se liofilizan en presencia de grandes cantidades de lioprotectores, tal como azúcar para mantener su estabilidad. El azúcar puede mejorar las interacciones intermoleculares y aumentar la viscosidad. Formulaciones muy viscosas son difíciles de fabricar, colocar en una jeringuilla e inyectar de manera subcutánea. La utilización de fuerzas en la manipulación de las formulaciones viscosas provoca una formación de espuma excesiva, y la acción resultante a modo detergente de la formación de espuma tiene el potencial de desnaturalizar y desactivar la proteína terapéuticamente activa. Además, la solución viscosa aumenta la presión trasera durante el proceso UF/DF y hace difícil la recuperación de la proteína. Esto puede provocar una pérdida considerable del producto de la proteína. No hay una solución satisfactoria de este problema de la técnica anterior. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un procedimiento de reducción de la viscosidad de una formulación que contiene una alta concentración de proteínas.

45 Formulaciones de proteínas liofilizadas isotónicas estables se describen en la publicación PCT WO 97/04801, publicada el 13 febrero de 1997. Las formulaciones liofilizadas descritas se pueden reconstituir para generar formulaciones líquidas con una alta concentración de proteínas sin una pérdida aparente de estabilidad. Sin embargo, los aspectos potenciales asociados con la alta viscosidad de las formulaciones reconstituidas no se contemplan.

50 Los solicitantes han descubierto que la preparación de una formulación proteínica liofilizada con 100 mM NaCl de diluyente puede producir una solución ligeramente hipertónica. Se ha creído previamente que las formulaciones farmacéuticas deben mantenerse en un pH fisiológico y ser isotónicas. Esta creencia se basó por lo menos en parte en la percepción que la administración de una formulación hipertónica podría provocar la deshidratación y por lo tanto podría dañar el tejido en el sitio de la inyección. Sin embargo, la creencia del requerimiento de isotonicidad absoluta de una formulación farmacéutica puede no estar bien fundada. Por ejemplo, Zietkiewicz *et al.*, *Grzyby Drozdopodobne* 23: 869-870 (1971) han mostrado que la isotonicidad absoluta de los fármacos no es necesaria. Se encontró que es suficiente evitar que las soluciones del fármaco superen los límites críticos de hipertonicidad. Por ejemplo, se observaron daños en los tejidos solamente cuando se administró una solución hipertónica de 1300 mOsmol/Kg (~ 650 mM NaCl) o mayor de manera subcutánea o intramuscular en animales experimentales. Como resultado, las formulaciones que son ligeramente hipertónicas, o fuera del rango del pH fisiológico no parecen presentar un riesgo de daños en el tejido en el sitio de administración.

La patente EP 0 661 060 describe preparaciones de inmunoglobulina concentrada que tienen una baja osmolaridad y una baja viscosidad.

La patente WO 97/04-801 describe formulaciones de anticuerpos liofilizados isotónicos estables.

Los solicitantes también han encontrado que las soluciones proteínicas que tienen un pH bajo (4,0-5,3) o elevado (6,5-12,0) también fueron efectivas en la reducción de la viscosidad de las formulaciones de proteínas de alta concentración.

La presente invención se dirige a proporcionar una formulación de inmunoglobulina de alta concentración con una viscosidad reducida, que es fácil de manipular y que es adecuada para la administración subcutánea. La presente invención también se dirige a proporcionar un procedimiento de reducción de la viscosidad de formulaciones de inmunoglobulina concentrada.

Características de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de disminución de la viscosidad de una composición de inmunoglobulina concentrada mediante: aumentar la resistencia iónica total de la formulación a través de la adición de sales o componentes de tampón tal como se define en las reivindicaciones sin comprometer de manera significativa la estabilidad o actividad biológica. En consecuencia, la invención se refiere a procedimientos y medios para reducir la viscosidad de formulaciones de inmunoglobulina concentrada, principalmente para asegurar una fácil manipulación antes y durante la administración a un paciente.

La presente invención se define en las reivindicaciones. En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación líquida estable que comprende una inmunoglobulina en una cantidad de por lo menos aproximadamente 80 mg/ml y una sal y/o un tampón en una cantidad de por lo menos 100 mM, y que tiene una viscosidad cinemática de aproximadamente 50 mm²/s o menos a 25°C, en el que la inmunoglobulina es el anticuerpo rhuMAb-E25, rhuMAb-E26 o rhuMAb-E27, y en el que dicha sal no es cloruro de sodio, tal como se establece en las reivindicaciones. Las sales y/o tampones son farmacéuticamente aceptables y se derivan de varios ácidos conocidos (inorgánicos y orgánicos) o base que forman metales y aminas. Alternativamente, las sales y/o tampones se pueden derivar de aminoácidos. En un aspecto específico, las sales eligen entre el grupo que consiste en cloruro de sodio, clorhidrato de arginina, tiocianato de sodio, tiocianato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, cloruro de calcio, cloruro de zinc y acetato de sodio. En otro aspecto, las sales o tampones son monovalentes. En otro aspecto, la formulación contiene los componentes de sal o tampón en una cantidad de aproximadamente 100-200 mM, y tiene una viscosidad de aproximadamente 2 a 30 mm²/s. Otra vez en particular, la formulación es hipertónica. En otro aspecto particular, la formulación también puede comprender un surfactante tal como polisorbato. La invención también contempla una formulación reconstituida que también comprende un lioprotector tal como el azúcar. En otro aspecto, el azúcar lioprotector puede ser, por ejemplo, sacarosa o trehalosa, y puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 60-300 mM. En otro aspecto específico, la concentración de proteínas en la formulación reconstituida es aproximadamente 2-40 veces mayor que la concentración de proteínas en la mezcla antes de la liofilización.

La invención proporciona una formulación que contiene altas concentraciones de rhuMAbE-25, rhuMAbE-26 y rhuMAbE-27, tal como se establece en las reivindicaciones. Estos anticuerpos se describen en el documento WO 99/01556.

Las formulaciones de la presente invención pueden ser formulaciones farmacéuticas, en particular, formulaciones para la administración subcutánea.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de reducción de la viscosidad cinemática de una formulación que contiene una inmunoglobulina en una cantidad de por lo menos 80 mg/ml, que comprende la adición de una sal y/o tampón en una cantidad de por lo menos 100 mM, en el que la inmunoglobulina es el anticuerpo rhuMAb-25, rhuMAbE-26 o rhuMAbE-27, y en el que dicha sal no es cloruro de sodio, tal como se establece en las reivindicaciones. En un aspecto específico, la viscosidad se reduce a 50 mm²/s o menos a 25°C. En un aspecto específico, la viscosidad se reduce a aproximadamente de 2 a 30 mm²/s. En otro aspecto específico, las sales o componentes de tampón se pueden añadir en una cantidad de por lo menos aproximadamente 100 mM, preferiblemente aproximadamente 100-200 mM, más preferiblemente aproximadamente 150 mM. Las sales y/o tampones son farmacéuticamente aceptables y se derivan de varios ácidos conocidos (inorgánicos y orgánicos) con metales o aminas de "formación de base". Alternativamente, las sales y/o tampones se pueden derivar de aminoácidos. En otro aspecto específico, las sales y/o tampones son monovalentes. En otro aspecto específico, las sales se seleccionan entre el grupo que consiste en clorhidrato de arginina, tiocianato de sodio, tiocianato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, cloruro de calcio, cloruro de zinc y acetato de sodio. En otro aspecto, la formulación contiene sal o componentes de tampón anteriores en una cantidad de aproximadamente 100-200 mM, y tiene una viscosidad de aproximadamente 2 a 30 mm²/s. En otro aspecto, la inmunoglobulina en la formulación tiene un peso molecular de por lo menos aproximadamente 15-20 kD. En otra realización

particular, la formulación puede comprender también un surfactante tal como polisorbato. La invención también contempla una formulación reconstituida que también comprende un lioprotector tal como el azúcar. En un aspecto particular, el azúcar lioprotector puede ser, por ejemplo, sacarosa o trehalosa, y puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 60-300 mM. En un aspecto específico, la formulación se puede reconstituir con un diluyente que comprende el tampón o la sal. En una realización preferida, la concentración de proteína en la formulación reconstituida es aproximadamente 2-40 veces mayor que la concentración de proteína en la mezcla anterior a la liofilización.

La presente invención proporciona un procedimiento para reducir la viscosidad de una formulación de inmunoglobulina, tal como se establece en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el procedimiento se utiliza para preparar una formulación reconstituible, especialmente las que se concentran en una concentración de inmunoglobulina mucho mayor (por ejemplo, 2-40 veces) después de la etapa de concentración (por ejemplo, liofilización) comparada con antes.

Estas formulaciones son particularmente útiles para administración subcutánea.

También se proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que encierra una formulación tal como se define en las reivindicaciones.

También se describe aquí un procedimiento para evitar la autoasociación de proteínas en formulaciones líquidas concentradas mediante (1) añadir una sal o un componente de tampón en una cantidad de por lo menos 50 mM aproximadamente; o (2) alterar el pH disminuyéndolo a (~4,0 a ~5,3) o elevándolo a (~6,5 a ~12,0). En un aspecto específico, la autoasociación que debe evitarse es la inducida o exacerbada mediante la presencia de azúcares (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) que se utilizan comúnmente como lioprotectores. En consecuencia, este procedimiento es particularmente útil para evitar la autoasociación de formulaciones liofilizadas reconstituidas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los efectos de la concentración de proteínas en la viscosidad de la formulación reconstituida que contiene el anticuerpo anti-IgE rhuMAb E25, 16 mM histidina, 266 mM sacarosa y 0,03% Polisorbato 20 a 25°C.

La figura 2 muestra los efectos de la concentración de NaCl sobre la viscosidad de la formulación reconstituida que contiene 125 mg/ml del anticuerpo IgE rhuMAb E25, 16 mM histidina, 266 mM sacarosa, 0,03% Polisorbato 20 y varias cantidades de NaCl a 25°C.

La figura 3 muestra los efectos de varias sales sobre la viscosidad de la formulación reconstituida que contiene 40 mg/ml del anticuerpo anti-IgE rhuMAb E25, 10 mM histidina, 250 mM sacarosa, 0,01% Polisorbato 20 y varias cantidades de sales a 25°C.

La figura 4 muestra los efectos de la concentración del tampón sobre la viscosidad de una formulación líquida que contiene 80 mg/ml del anticuerpo anti-IgE rhuMAb E25, 50 mM histidina, 150 mM trehalosa, 0,05% Polisorbato 20 y varias cantidades de componentes de histidina, acetato, o succinato a 25°C.

La figura 5 muestra los efectos de la concentración de NaCl sobre la viscosidad de una formulación reconstituida que contiene 21 mg/ml rhuMAb E26, 5 mM histidina, 275 mM sacarosa a 6°C.

La figura 6 muestra los efectos del pH sobre la viscosidad de las formulaciones líquidas que contienen 130 mg/ml rhuMAb E25, 2-17,5 mM de acetato o arginina con y sin 150 mM NaCl a 25°C.

La figura 7 muestra los efectos del pH sobre la viscosidad de las formulaciones liofilizadas reconstituidas que contienen 94 mg/ml rhuMAb E25, 250 mM trehalosa, 20 mM histidina, a 25°C.

Descripción detallada de la realización preferida

I. Definiciones

Mediante "proteína" se indica una secuencia de aminoácidos para la cual la longitud de la cadena es suficiente para producir los niveles mayores de estructura terciaria y/o cuaternaria. Así, las proteínas se distinguen de los "péptidos" que también son moléculas basadas en aminoácidos que no tienen esta estructura. Típicamente, una inmunoglobulina para su uso aquí tendrá un peso molecular de por lo menos aproximadamente 15-20 kD, preferiblemente por lo menos aproximadamente 20 kD.

Ejemplos de proteínas incluyen proteínas de mamífero, tales como, por ejemplo, hormona del crecimiento, incluyendo hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroide; hormona de estimulación tiroide; lipoproteínas; α -1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona de estimulación de folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor de tejido, y factor von Willebrands; factores anticoagulantes tales como Proteína C; factor natriurético atrial; surfactante de pulmón; un activador plasminogen, tal como uroquinasa o activador plasminogen de tipo tejido (t-PA, por ejemplo, Activase®, TNKase®, Retevase®); bombazina; trombina; tumor

necrosis factor- α y - β de necrosis tumoral; encefalinas; RANTES (regulada bajo la activación normalmente de células T expresadas y secretadas); proteína inflamatoria macrófaga inflamatoria (MIP-1- α); albúmina de suero tal como albúmina de suero humano; sustancia de inhibición mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; una integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado óseo (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidermal (EGF); factor de crecimiento de transformación (TGF) tal como TGF- α y TGF- β , incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; factor de crecimiento similar a la insulina -I y -II (IGF-I y IGF-II); des (1-3) -IGF-I (cerebro IGF-I); proteína de unión de factor de crecimiento a modo de insulina; proteínas CD tal como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; critropoietina (EPO); trombopoietina (TPO); factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón- α , - β y - γ , factores de estimulación de colonias (CSFs), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a IL-10; dismutasa superóxido; receptores de células T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración de descomposición (DAF); un antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la cubierta de SIDA; proteínas de transporte; receptores de guiado; adhesinas; proteínas regulatorias; inmuno adhesinas; anticuerpos; y fragmentos biológicamente activos o variantes de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente.

La inmunoglobulina que se formula preferiblemente es esencialmente pura y es deseable que sea esencialmente homogénea (es decir, libre de proteínas contaminantes). Proteína "esencialmente pura" significa una composición que comprende por lo menos aproximadamente un 90% en peso de la proteína, basado en el peso total de la composición, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% en peso. Proteína "esencialmente homogénea" significa una composición que comprende por lo menos un 99% en peso aproximadamente de proteína, basado en el peso total de la composición.

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpo con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, y moléculas de cadena simple, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y Fv).

La unidad de anticuerpo de 4 cadenas básica es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas junto con un polipéptido adicional llamado una cadena J, y contiene 10 sitios de unión del antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprenden entre 2 y 5 de las unidades básicas de 4 cadenas que pueden polimerizarse para formar conjuntos polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de IgGs, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L está enlazada con una cadena H mediante una unión de disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están enlazadas entre sí mediante una o más uniones de disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L tiene también puentes de disulfuro entrecadenas separadas regularmente. Cada cadena H tiene en el terminal N un dominio variable (V_H) seguido por tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el terminal N un dominio variable (V_L) seguido por un dominio constante en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejado de un V_H y V_L juntos forman un único sitio de unión del antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8a Edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basados en secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), se pueden asignar inmunoglobulinas a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y μ también se dividen en subclases sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y función C_H, por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren de manera extensiva en secuencia entre anticuerpos. El dominio V MEDIA en la unión del antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida de manera uniforme a través de toda la separación de los dominios variables. Por el contrario, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes llamados regiones de marco (FRs) de aproximadamente 15-30 residuos de aminoácidos separados mediante regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" o a veces "regiones de determinación de

complementariedad" (CDRs) que tienen cada una aproximadamente 9-12 residuos de aminoácidos de longitud. Los dominios variables que las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FRs, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectada mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, en algunos casos forman parte de, la estructura de la lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana mediante las FRs y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión del antígeno de los anticuerpos (ver Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero presentan varias funciones efectoras, tal como la participación de la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

El término "región hipervariable" (también conocido como "regiones de determinación de la complementariedad" o CDRs) cuando se utiliza aquí se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que están (normalmente tres o cuatro regiones cortas de variabilidad de secuencia extrema) en el dominio de la región V de una inmunoglobulina que forman sitios de unión del antígeno y son los principales determinantes de la especificidad del antígeno. Hay por lo menos dos procedimientos para identificar los residuos CDR: (1) una aproximación basada en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, MS 1991); y (2) una aproximación basada en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia, C. *et al.*, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Sin embargo, en la extensión que dos técnicas de identificación de residuos definen regiones de solapado, pero no regiones idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa aquí se refiere un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se produce naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) y típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se sintetizan mediante cultivos de hibridoma, sin contaminar por parte de otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población de anticuerpos socialmente homogénea, y no se construye para que requiera una producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se pueden utilizar según la presente invención se pueden hacer mediante el procedimiento de hibridoma descrito primero por parte de Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), pueden hacer mediante procedimientos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente US 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de las librerías de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales incluyen aquí específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de las cadenas son idénticas u homólogas con las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de estos anticuerpos, mientras presenten la actividad biológica deseada (patente US 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión y antígeno, así como un CL y por lo menos los dominios de cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión del antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F (ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (ver la patente US 5.641.870, ejemplo 2; Zapata *et al.*, Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de los anticuerpos produjo dos fragmentos de unión de antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento residual "Fc", una designación que refleja la capacidad de cristalizarse fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L entera a lo largo del dominio de región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente respecto a la unión del antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión con el antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento grande F (ab')₂ que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab enlazados con disulfuro que tienen una actividad de unión de antígeno diferente y que es todavía capaz de articular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab porque tienen unos pocos residuos adicionales en el terminal carboxi del dominio C_{H1}, incluyendo una o más cisteínas de

la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación aquí para Fab', del cual los residuos de cisteína de los dominios constantes soportan un grupo tiol libre. Los fragmentos anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre los mismos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos anticuerpo también son conocidos.

5

El fragmento Fc comprende las porciones de terminal carboxi de las dos cadenas H mantenidas juntas mediante disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante secuencias en la región Fc, la región que también se reconoce mediante los receptores Fc (FcR) encontrados en ciertos tipos de células.

10 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno completo y de unión. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de una cadena pesada y una cadena ligera en asociación tensa no covalente. A partir del plegado de estos dos dominios se emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno a partir de la cadena H y L) que contribuyen a los residuos de aminoácidos para la unión del antígeno y confieren especificidad de unión al antígeno con el anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDRs específicas para un antígeno) tienen la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

15

20 "Fv de cadena simple", también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L, conectados en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido sFv también comprende un enlace de polipéptido entre los dominios V_H y V_L, que permite que el sFv forme la estructura deseada por la unión del antígeno. Para una revisión del sFv, ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

20

25 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos anticuerpos preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (ver párrafo anterior) mediante enlaces cortos (aproximadamente 5- 10 residuos) entre los dominios V_H y V_L, de manera que se consigue la cadena intermedia pero no la cadena intermedia que perjudica los dominios V, resultando así en un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión del antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de los fragmentos sFv "cruzados" en los cuales los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos. Los diacuerpos se describen en mayor detalle en, por ejemplo, los documentos EP 404, 097; WO 93/11161; Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

25

30

Un anticuerpo que "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo sobre un polipéptido particular es aquel que se une a ese polipéptido o epítipo particular sobre un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

35

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murina) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión del antígeno) de secuencias casi humanas, que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo recipiente) en las cuales los residuos de una región hipervariable (también CDR) recipiente se reemplazan mediante residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región del marco (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan mediante correspondientes residuos humanos. Además, "anticuerpos humanizados" tal como se usa aquí pueden también comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo recipiente ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen para refinar y utilizar más el rendimiento del anticuerpo. El anticuerpo humanizado comprenderá también de manera óptima por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992).

40

45

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varía con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de las funciones efectoras del anticuerpo incluyen: unión C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión de receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptores de células B); y activación de células B.

55

60

"Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" o ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual Ig secretado se une sobre receptores Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, las células resinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) que permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula objetivo que soporta el antígeno y subsiguientemente mate la célula objetivo con citotoxinas. Los anticuerpos

- "arman" las células citotóxicas y son requeridas para matar la célula objetivo mediante este mecanismo. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan sólo Fc γ RIII, mientras que en los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión Fc sobre células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página en 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para determinar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo ACDD *in vitro*, tal como se describe en Patente U.S. No. 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede ser determinada *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes *et al.*, PNAS USA 95:652-656 (1998).
- 5
- 10 "Receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es el que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ I, Fc γ RII, y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y alternativamente formas empalmadas de estos receptores, los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activador") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren primariamente en los dominios citoplásmicos del mismo. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación basado en tiroxina inmunoreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo inhibidor basado en tiroxina inmunoreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Ver M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). Los FcRs son revisados en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo aquellos a ser identificados en el futuro, son abarcados aquí mediante el término "FcR". El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable para la transferencia de IgGs maternos al feto. Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994).
- 15
- 20
- "Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan por lo menos Fc γ RIII y realizan funciones de efector ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos, con células PBMCs y MNK siendo preferidas. Las células efectoras pueden ser aisladas a partir de una fuente nativa, por ejemplo, sangre.
- 25
- "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en presencia del complemento. La activación de la trayectoria se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno cognado. Para determinar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo, como se describió en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).
- 30
- 35 Una formulación "estable" es una en la cual la proteína esencialmente retiene su estabilidad física y química e integridad durante almacenamiento. Distintas técnicas analíticas para medir la estabilidad de la proteína están disponibles en la técnica y son revisadas en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Deliver y Rev.* 10: 29-90 (1993). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Para una investigación rápida, la formulación puede mantenerse a 40°C durante de 2 semanas a 1 mes, en cuyo momento se mide la estabilidad. Si la formulación debe almacenarse a 2-8°C, generalmente la formulación debe ser estable a 30°C o 40°C durante por lo menos 1 mes y/o estable a 2-8°C durante por lo menos 2 años. Si la formulación debe almacenarse a 30°C, generalmente la formulación debe ser estable durante por lo menos 2 años a 30°C y/o estable a 40°C durante por lo menos 6 meses. Por ejemplo, la extensión de la agregación a continuación de la liofilización y almacenamiento puede utilizarse como un indicador de estabilidad de proteína. Por lo tanto, una formulación "estable" puede ser una donde menos de aproximadamente el 10% y preferentemente menos de aproximadamente el 5% de la proteína están presentes como un agregado en la formulación. En otras realizaciones, se puede determinar cualquier incremento en la formación de agregados a continuación de la liofilización y almacenamiento de la formulación liofilizada. Por ejemplo, una formulación liofilizada "estable" puede ser una donde el incremento en el agregado en la formulación liofilizada es menos de aproximadamente 5% y preferentemente menos de aproximadamente 3%, cuando la formulación liofilizada es almacenada a 2-8°C durante por lo menos un año. En otras realizaciones, la estabilidad de la formulación de proteína puede medirse utilizando un ensayo de actividad biológica.
- 40
- 45
- 50
- 55 Una formulación "reconstituida" es una que se ha preparado disolviendo formulaciones de proteína liofilizada en un diluyente de tal forma que la proteína se dispersa en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para la administración (por ejemplo administración parenteral) a un paciente a ser tratado con la inmunoglobulina de interés y, en ciertas realizaciones de la invención, puede ser una que es adecuada para la administración subcutánea.
- 60 Una formulación "isotónica" es una que esencialmente posee la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tienen una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término

"hipotónica" describe una formulación con una presión osmótica inferior a la de la sangre humana. De forma correspondiente, el término "hipertónica" se utiliza para describir una formulación con una presión osmótica por encima de la sangre humana. La isotonicidad puede utilizarse usando un osmómetro de presión de vapor o de tipo de congelación por hielo, por ejemplo. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas con un resultado de la adición de sal y/o tampón.

Un "ácido farmacéuticamente aceptable" incluye ácidos inorgánicos y orgánicos que son no tóxicos en la concentración y forma en la cual son formulados. Por ejemplo, ácidos inorgánicos adecuados incluyen hidrocórico, perclórico, hidrobromico, hidroyódico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, etc. Ácidos orgánicos adecuados incluyen alquil de cadena lineal y de cadena ramificada, aromático, cíclico, cicloalifático, arilalifático, heterocíclico, saturado, insaturado, mono, di- y tri-carboxílico, incluyendo por ejemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, t-butil acético, antranílico, propanoico, 2-hidroxiopropanoico, 2-oxopropanoico, propandioico, ciclopentanopropiónico, ciclopentano propiónico, 3-fenilpropiónico, butanoico, butandioico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, 2-acetoxi-benzoico, ascórbico, cinámico, lauril sulfúrico, esteárico, muconico, mandélico, succínico, embonico, fumarico, málico, maleico, hidroximaleico, malonico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glicónico; gluconico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmoico, palmeico, tiocianico, metanosulfónico, etanesulfónico, 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, benzenosulfónico, 4-clorobenzenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, p-toluenosulfónico, camforsulfónico, 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, glucoheptónico, ácido 4,4'-metilenbis-3-(hidroxi-2-en-1-carboxílico), hidroxinaptoico.

"Bases farmacéuticamente aceptables" incluyen en bases inorgánicas y orgánicas que son no tóxicas en la concentración y forma en la cual son formuladas. Por ejemplo, bases adecuadas incluyen aquellas formadas a partir de base inorgánica que forma metales tales como el litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio, N-metilglucamina, morfolina, piperidina y bases orgánicas no tóxicas incluyendo, amina primaria, secundaria y terciaria, a minas sustituidas, a minas cíclicas y resinas básicas de intercambio de iones, [por ejemplo, $N(R')_4^+$ (donde R' es independientemente H o alquilo C_{1-4} , por ejemplo, amonio, Tris)], por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilenediamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Particularmente las bases orgánicas no tóxicas preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, dicitohexilamina, colina, y cafeína.

Ácidos y bases adicionales farmacéuticamente aceptables utilizables con la presente invención incluyen aquellos que son derivados a partir de aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparagina.

Tampones y sales "farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellos derivados de ambas sales de adición ácidas y básicas de los ácidos y bases anteriormente indicados. Tampones y/o sales específicas incluyen histidina, succinato y acetato.

Un "lioprotector" es una molécula que, combinada con una proteína de interés, evita o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína durante la liofilización y almacenamiento posterior. Lioprotectores ejemplares incluyen azúcares y sus correspondientes alcoholes de azúcar; un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como una betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes de azúcar trihídrico o de mayor peso molecular, por ejemplo glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic®; y combinaciones de los mismos. Lioprotectores ejemplares adicionales incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares mellibiosa, melezitosa, rafinosa, mannotriosa y estaquiosa. Ejemplos de azúcares reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa. Ejemplos de azúcares reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos polihidroxilo seleccionados a partir de alcoholes de azúcar y otros polialcoholes de cadena lineal. Los alcoholes de azúcares preferidos son monoglicosidos, especialmente aquellos compuestos obtenidos mediante reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glicosídico puede ser tanto glucosídico o galactosídico. Ejemplos adicionales de alcoholes de azúcar son glucitol, maltitol, lactitol e iso-maltulosa. Los lioprotectores preferidos son los azúcares no reductores trehalosa o sacarosa.

Al preparar las formulaciones de viscosidad reducida de la invención, debe tenerse cuidado utilizando los excipientes enumerados anteriormente así como otros aditivos, especialmente cuando se añaden en alta concentración, para no incrementar la viscosidad de la formulación.

El lioprotector se añade a la formulación pre-liofilizada en una "cantidad lioprotectora" que significa que, a continuación de la liofilización de la proteína en presencia de la cantidad lioprotectora del lioprotector, la proteína esencialmente retiene estabilidad física y química e integridad ante la liofilización y el almacenamiento.

5 El "diluyente" de interés aquí es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de la liofilización. Los dirigentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWF1), una solución de pH tamponado (por ejemplo salino tamponado con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o fusión de dextrosa. En una realización alternativa, los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o tampones.

10 Un "conservante" es un compuesto que puede ser añadido a las formulaciones del presente documento para reducir la acción bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación multi-uso (dosis múltiples). Ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbenzil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbenzildimetilamonio en los cuales los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de benzetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos, tales como fenol, butil y bencil alcohol, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y *m*-cresol. El conservante más preferido en el presente documento es bencil alcohol.

15 Un "agente de carga" es un compuesto que añade masa a una mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la masa liofilizada (por ejemplo facilita la producción de una torta liofilizada esencialmente uniforme que mantienen una estructura de poro abierto). Agentes de carga ejemplares incluyen manitol, glicina, polietilenglicol y sorbitol. Las formulaciones líquidas de la presente invención obtenidas mediante reconstitución de una formulación liofilizada pueden contener dichos agentes de carga.

20 "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como profiláctico o a medidas preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos en los cuales el trastorno debe prevenirse.

25 "Mamífero" para los propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales del zoológico, deportes, o mascotas, tales como perros, caballos, conejos, ganado, cerdos, hámsteres, ratones, gatos, *etc.* preferentemente, el mamífero es humano.

30 Un "trastorno" es cualquier condición que se beneficiará del tratamiento con la proteína. Este incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades incluyendo aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos a tratar aquí incluyen carcinomas y alergias.

35 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es por lo menos la concentración mínima requerida para efectuar una mejora medible o prevención de un trastorno particular. Cantidades terapéuticamente efectivas de proteínas conocidas son bien conocidas en la técnica, mientras que cantidades efectivas de proteínas descubiertas más adelante pueden ser determinadas mediante técnicas estándar están correctamente dentro de las habilidades de un operario entendido, tal como un médico ordinario.

40 "Viscosidad" como se utiliza aquí puede ser "viscosidad cinemática" o "viscosidad absoluta." "Viscosidad cinemática" es una medida del flujo resistente de un fluido bajo la influencia de la gravedad. Cuando dos fluidos de igual volumen se colocan en viscosímetros de capilaridad idéntica y se permiten fluir por gravedad, un fluido viscoso demora más que un fluido menos viscoso para fluir a través del capilar. Si un fluido tarda 200 segundos en completar su flujo y otro fluido tarda 400 segundos, el segundo fluido es dos veces más viscoso que el primero en una escala de viscosidad cinemática. "Viscosidad absoluta", algunas veces llamada viscosidad dinámica o simple, es el producto de la viscosidad cinemática y la densidad del fluido:

45
$$\text{Viscosidad Absoluta} = \text{Viscosidad Cinemática} \times \text{Densidad}$$

50 La dimensión de la viscosidad cinemática es L^2/T donde L es una longitud y T es un tiempo. Comúnmente, la viscosidad cinemática expresa en centistokes (cSt). La unidad SI de viscosidad cinemática es mm^2/s , que es 1 cSt. La viscosidad absoluta se expresa en unidades de centipoise (cP). La unidad SI de viscosidad absoluta es el miliPascal-segundo (mPa-s), donde 1 cP = 1 mPa-s.

55 II. Formas de llevar a cabo la invención

55 A. Preparación de la proteína

60 La proteína inmunoglobulina a formular puede ser producida mediante cualquier técnica conocida, como cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica la proteína, como es bien conocido en la técnica, o a través de técnicas sintéticas (tales como técnicas recombinantes y síntesis de péptidos o una combinación de estas técnicas) o puede ser aislado a partir de una fuente endógena de la proteína.

La preparación de la proteína inmunoglobulina a formular mediante el procedimiento de la invención a través de medios recombinantes puede lograrse mediante la transfección o transformación de células huésped adecuadas con vectores de expresión o clonados y cultivadas en un medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden seleccionarse por parte del operario entendido sin experimentación desproporcionada. En general, principios, protocolos, y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares puede encontrarse en en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butter, Ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press. Procedimientos de transfección son conocidos para el operario ordinariamente hábil, e incluyen por ejemplo, transfección CaPO_4 y CaCl_2 , electroporación, micro inyección, etc. técnicas adecuadas también son descritas en Sambrook *et al.*, *supra*. Técnicas adicionales de transfección son descritas en Shaw *et al.*, *Gene* 23: 315 (1983); WO 89/05859; Graham *et al.*, *Virology* 52: 456-457 (1978) y la patente US 4.399.216.

El ácido nucleico que codifica la proteína inmunoglobulina deseada para la formulación según el presente procedimiento puede ser insertado en un vector replicable para el clonado por la expresión. Vectores adecuados están públicamente disponibles y pueden tomar la forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede ser insertada dentro del vector a través de una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio (s) de restricción de endonucleasa apropiado utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes vector generalmente incluyen, pero no están limitados a, uno o más de una ser social de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, y un elemento mejorador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligado estándar que son conocidas para el operario entendido.

Formas de inmunoglobulina de la proteína a ser formulada pueden ser recuperadas del medio de cultivo o a partir de lisados de células huéspedes. Si está unido a la membrana, puede liberarse de la membrana utilizando un detergente adecuado o a través de división enzimática. Las células empleadas para la expresión también pueden ser rotas a través de varios medios físicos o químicos, tales como ciclo de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o agentes de lisado de células.

La purificación de la proteína inmunoglobulina a formular puede realizarse mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica, tal como por ejemplo, fraccionado sobre una columna de intercambio de iones, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice o resinas de intercambio de cationes (por ejemplo, DEAE), cromatofocalización, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, filtración con gel utilizando columnas proteína A Sefarosa (por ejemplo, Sephadex® G-75) para extraer contaminantes tales como IgG, y columnas quelantes de metal para unir las formas etiquetadas con epítipo.

B. Preparación del anticuerpo

(i) *Anticuerpos policlonales*

Los anticuerpos policlonales generalmente se desarrollan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante a una proteína que es inmunogénica en la especie a ser inmunizada, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes que puede ser empleados incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvantes MPL-TDM (monofosforil Lipid A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede seleccionarse por un entendido en la técnica sin gran experimentación.

Un mes más tarde los animales son reforzados con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección cutánea en múltiples sitios. De 7 a 14 días más tarde se hace sangrar a los animales y se realiza un ensayo con el suero para el título del anticuerpo. Se estimula a los animales hasta que los títulos alcanzan niveles adecuados. Preferentemente, el animal es estimulado con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también pueden hacerse en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteína. También se utilizan agentes de agregación tales como el alumbre de forma apropiada para mejorar la respuesta inmune.

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, la población comprende anti-post individuales idénticos excepto por las posibles mutaciones producidas naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter de anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden hacerse utilizando el procedimiento del hibridoma descrito primero por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), o pueden hacerse mediante procedimientos de ADN recombinante (patente US 4.816.567).

5

En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, es inmunizado como se describió anteriormente para extraer linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Los linfocitos se fusionan entonces con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986).

10

El agente de inmunización incluirá típicamente la proteína a ser formulada. Generalmente se utilizan tanto linfocitos de sangre periférica ("PBLs") si se desean células de origen humano, como células del bazo o células del nódulo linfático si se desean fuentes mamíferas no humanas. Los linfocitos se fusionan entonces con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula hibridoma. Goding, Monoclonal antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), pp. 59-103. Las líneas celulares inmortalizadas son usualmente células de mamífero transformadas, particularmente células mieloma de roedor, bovino y origen humano. Usualmente, se emplean líneas celulares mieloma de rata o de ratón. Las células hibridoma así preparadas son sembradas y cultivadas en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células mieloma no fusionadas, parentales. Por ejemplo, si las células mieloma parentales carece del enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), dichas sustancias emite el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

15

20

25

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan un alto nivel de producción estable de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre estas, las líneas celulares mieloma preferidas son líneas mieloma murina, tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y células SP-2 disponibles en American Type Culture Collection, Rockville, Mar y land USA. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

30

35

Se realiza un ensayo del medio de cultivo en el cual las células hibridoma son cultivadas para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos mediante células hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como ensayo radioinmune (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

40

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, ser determinada mediante el análisis Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

45

Después de que las células hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas son identificadas, los clones pueden ser subclonados mediante procedimientos de dilución limitada y crecimiento mediante procedimientos estándar (Goding, *supra*). El medio de cultivo adecuado para este propósito incluye, por ejemplo, D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células hibridoma pueden ser cultivadas *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

50

El agente de inmunización típicamente incluirá la proteína epítipo a la cual se une el anticuerpo. Generalmente, se utilizan linfocitos sanguíneos periféricos ("PBLs") si se desean células de origen humano, o se utilizan células del bazo o células del nodo linfático si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos fusionan entonces con una línea celular inmortalizada utilizan un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula hibridoma. Goding, Monoclonal Antibodies: Principals and Practice, Academic Press (1986), pág. 59-103.

55

Las líneas celulares inmortalizadas usualmente son células mamíferos transformadas, particularmente células mieloma de roedor, bovino y origen humano. Usualmente, se emplean líneas celulares mieloma de rata o ratón. Las células hibridoma pueden ser cultivadas en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contienen uno más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células no fusionadas, inmortalizadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen del enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), dichas sustancias evitan el crecimiento de células y sientes en HGPRT.

60

- Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que funcionan eficientemente, soportan un alto nivel de expresión estable de anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden ser obtenidas, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Las líneas celulares del mieloma humano y del heteromioma ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63.
- El medio de cultivo en el cual las células hibridoma son cultivadas puede ser ensayado entonces para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína a formular. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos mediante células hibridoma es determinada mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, ser determinada mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).
- Después de que células hibridoma deseadas sean identificadas, los clones pueden ser subclonados mediante procedimientos de limitación de la dilución y cultivados mediante procedimientos estándar. Goding, *supra*. Medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células hibridoma pueden ser cultivadas *in vivo* como ascitas en un mamífero.
- Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones son adecuadamente separados del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.
- El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales es fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murina). Las células hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión, que son entonces transfectados en células huésped tales como células *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hamster chino (CHO), o células mieloma que no producen de otra manera proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huéspedes recombinantes. La revisión de artículos sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluye Skerra *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthum, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).
- En una realización adicional, los anticuerpos pueden ser aislados de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas realizando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describe el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) mediante mezclado de cadenas (Marks *et al.*, *Biol/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas muy grandes de fagos (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales.
- El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación para los niños constantes humanos de cadenas pesada y ligera en lugar de las secuencias murina homólogas (Patente US 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo de forma covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no inmunoglobulina.
- Típicamente, dichos polipéptidos no inmunoglobulina son sustituidos por dominios constantes de un anticuerpo, son sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación de un antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende combinación del antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación del antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.
- Anticuerpos quiméricos o híbridos también pueden prepararse *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química de la proteína sintética, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden ser construidas utilizando una reacción de intercambio de bisulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.
- (iii) *Anticuerpos humanizados y humanos*

Los anticuerpos objeto del procedimiento de formulación pueden comprender además anticuerpos humanizados o humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otra subsecuencia de unión a antígeno de anticuerpos) que contiene secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el cual residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son reemplazados por residuos de un CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos ejemplos, los residuos de marco Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por correspondientes residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o en la secuencia de marco. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos un, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas esencialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá por lo menos una porción de una región constante inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988) and Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos en él desde una fuente que es no humana. Estos residuos aminoácidos no humanos con frecuencia son referidos como residuos "importados", que son típicamente tomados a partir de un dominio variable "importado". La humanización esencialmente puede realizarse siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores, Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988), o a través de la sustitución de secuencias de roedor CDRs o CDR por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente US 4.816.567), donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a utilizar en la realización de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir antigenicidad. Según el procedimiento llamado "mejor ajuste", la secuencia de dominio variable de un anticuerpo de roedor es revisada contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas. La secuencia humana que es más próxima a la del roedor se acepta entonces como el marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado. Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987). Otro procedimiento utiliza un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede ser utilizado para varios anticuerpos humanizados diferentes. Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993).

Es importante además que los anticuerpos sean humanizados con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos inmunoglobulina tridimensionales tan comúnmente disponibles y son familiares para aquellos entendidos en la técnica. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis de la probabilidad del rol de los residuos en el funcionamiento de la secuencia inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen la habilidad de la inmunoglobulina candidata para unir su antígeno. De esta forma, los residuos FR pueden ser seleccionados combinados a partir del receptor y las secuencias importadas de forma tal que se logra la característica del anticuerpo deseada, tal como afinidad incrementada para el antígeno (s) objetivo. En general, los residuos CDR están directamente y más sustancialmente implicados influenciando la unión del antígeno.

Alternativamente, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, mediante inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y la línea germinal resulta en la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del gen inmunoglobulina de línea germinal humana puesto en dicho ratón de línea germinal mutante resultará en la producción de anticuerpos humanos ante la amenaza del antígeno. De, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immunol., 7:33 (1993). Los anticuerpos humanos también pueden ser derivados a partir

de bibliotecas de exhibición de fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)).

5 Los anticuerpos humanos también pueden ser producidos utilizando diferentes técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de exhibición de fagos. Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581 (1991). Las técnicas de Cole *et al.*, y Boerner *et al.*, también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner *et al.*, J. Immunol. 147 (1): 86-95 (1991). De forma similar, anticuerpos humanos pueden hacerse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los cuales los genes inmunoglobulina endógenos han sido parcial completamente inactivados. Ante el desafío, se observa la producción de cuerpos humanos, que se asemeja mucho a la vista en humanos en todos los aspectos, incluyendo reacomodamiento de genes, montaje y repertorio de anticuerpos. Esta aproximación se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.545.807; 5.545.806. 5.569.825. 5.625.126. 5.633.425. 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994), Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996), Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996) and Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

(iv) *Terapia de profármacos mediada con enzimas dependientes del anticuerpo (ADEPT)*

20 Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo en una enzima de activación del profármaco que convierten un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, ver la patente WO 81/01145) en un fármaco contra el cáncer activo. Ver, por ejemplo, la patente WO 88/07378 y la patente US 4.975.278.

25 El componente de la enzima del inmunocombinado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

30 Las enzimas que son útiles en el procedimiento de esta invención incluyen, pero no están limitadas a, glicosidasa, glucosa oxidasa, lisozima humana, glucuronidasa humana, alcalina fosfatasa útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina deaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco contra el cáncer 5-fluorouracil; proteasas, tales como serratina proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas (por ejemplo, carboxipeptidasa G2 y carboxipeptidasa A) y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de aminoácidos D; 35 enzimas de separación de carbohidratos tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útil para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa útiles para compartir fármacos derivados con β -lactamos en fármacos libres; y amidasas de penicilina, tal como penicilina Vamidasa o penicilina G amidasa, útil para convertir fármacos derivados en sus electrógenos de amina con grupos fenoxiacetil o fenilacetil, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas" se pueden utilizar para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (ver, por ejemplo Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar tal como se ha descrito aquí para el suministro de la abzima con una población celular tumoral.

45 Las enzimas de esta invención se pueden unir de manera covalente a los anticuerpos anti-IL-17 o anti-LIF mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tal como la utilización de los agentes de reticulación heterobifuncionales descritos anteriormente. Alternativamente, se pueden construir proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión del antígeno del anticuerpo de la invención enlazado con por lo menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención utilizando técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica (ver, por ejemplo Neuberger *et al.*, Nature 312: 604-608 (1984)).

50 (iv) *Anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos*

Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de unión para por lo menos dos epítopos diferentes. Estos anticuerpos se pueden derivar a partir de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab)₂).

60 Los procedimientos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de postales de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades. Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983). Debido a la distribución aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales solamente una tiene la estructura

biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza usualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada, y los rendimientos de productos son bajos. Procedimientos similares se describen en la patente WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

5 Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar consecuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Confusión preferiblemente es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifica las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para detalles adicionales de la generación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology 121: 210 (1986).

15 Según una aproximación diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se funden consecuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, las regiones CH2, y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contienen sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifica las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando relaciones diferentes de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en relaciones iguales resulta en altos rendimientos o cuando las relaciones no tienen una significación particular.

25 Según otra aproximación descrita en la patente WO 96/27011, se puede realizar la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que están recubiertos a partir de cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende por lo menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar que las cadenas laterales mayores en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo reemplazando grandes cadenas laterales de aminoácidos con menores (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar la producción del heterodímero sobre productos finales no deseados tales como homodímeros.

30 En una realización preferida de esta aproximación, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha encontrado que esta estructura asimétrica facilita la separación del componente biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Esta aproximación se describe en la patente WO 94/04690, publicada el 3 marzo 1994. Para detalles adicionales de la generación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

40 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar con avidina, el otro con biotina. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para marcar las células del sistema inmune con células no deseadas (patente US 4.676.980), y para el tratamiento de infección VIH (WO 91/00360, WO 92/200373). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden hacer utilizando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la patente US 4.676.980, junto con una pluralidad de técnicas de reticulación.

45 También se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos específicos a partir de fragmentos de anticuerpos. Las siguientes técnicas también se pueden utilizar para la producción de fragmentos de anticuerpos bivalentes que no son necesariamente biespecíficos. Por ejemplo, fragmentos Fab' recuperados a partir de *E. coli* se pueden acoplar químicamente *in vitro* para formar anticuerpos bivalentes. Ver Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992).

50 Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F (ab')₂). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlace químico. Brennan *et al.*, Science 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el cual los anticuerpos

intactos se separan de manera proteolítica para generar fragmentos F (ab')₂. Estos fragmentos o reducen en presencia de la arsenita de sodio del agente complejante de ditiol para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en el derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de las enzimas.

Los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describe la producción de moléculas de anticuerpo biespecífico F (ab')₂ completamente humanizadas. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado era capaz de unirse a las células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y las células T humanas normales, así como activan la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra las dianas de tumores de mama humanos.

Varias técnicas para hacer y aislar fragmentos de anticuerpo bivalentes directamente a partir del cultivo de células recombinantes también se han descrito. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes utilizando cremalleras de Lucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron a la región de bisagra para formar monómeros de continuación y se volvieron a oxidar para formar heterodímeros del cuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por parte de Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para hacer fragmentos de anticuerpo biespecíficos/bivalentes. Los fragmentos comprenden un dominio de cadena pesada variable (V_H) conectado con un dominio de cadena ligera variable (V_L) mediante un enlace que es demasiado corto para permitir el emparejado entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios V_H y V_L del fragmento son forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios del otro fragmento, formando así dos sitios de unión del antígeno. Otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpo biespecíficos/bivalentes mediante la utilización de dímeros de cadena simple Fv (sFv) también se han indicado. Ver Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147: 60 (1991).

Anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítomos diferentes en una molécula dada. Alternativamente, un brazo anti-proteína se puede combinar con un brazo que se une a una molécula de activación sobre un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para focalizar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa la proteína particular. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan una proteína particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a la proteína timbrado que se une a un agente citotóxico o un quelador radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une a la proteína de interés y también se une al factor de tejido (TF).

(v) Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de los anticuerpos unidos de manera covalente. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para marcar células del sistema inmune con células no deseadas, patente US 4.676.980, y para el tratamiento de infección VIH. Documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089. Se contempla que los anticuerpos se preparan *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo los que incluyen agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de una unión tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato los descritos, por ejemplo, en la patente US 4.676.980.

B. Preparación de formulaciones liofilizadas

Aunque las formulaciones en el presente documento no están limitadas a formulaciones liofilizadas reconstituidas, en una realización particular, las proteínas de inmunoglobulina se liofilizaron y a continuación se reconstituyen para producir las formulaciones líquidas estables de viscosidad reducida de la invención. En esta realización particular, después de la preparación de la proteína de inmunoglobulina de interés tal como se ha descrito anteriormente, se produce una "formulación pre-liofilizada". La cantidad de proteína de inmunoglobulina presente en la formulación pre-liofilizada se determina teniendo en cuenta los volúmenes de dosis deseados, el modo de administración, etc. Por ejemplo, la concentración inicial de un anticuerpo intacto puede ser de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, preferiblemente entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 40 mg/ml y más preferiblemente entre aproximadamente 20-30 mg/ml.

La proteína de inmunoglobulina a formular está generalmente presente en solución. Por ejemplo, en las formulaciones de viscosidad reducida insistencia y resistencia iónica elevada de la invención, la proteína puede estar presente en una solución de pH tamponado en un pH de aproximadamente 4-8, y preferiblemente entre aproximadamente 5-7. La concentración de tampón puede ser entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 20 mM, alternativamente entre aproximadamente 3 mM y aproximadamente 15 mM, dependiendo como por ejemplo, el tampón y de la tonicidad deseada de la formulación (por ejemplo, de la formulación reconstituida). Tampones y/o sales de ejemplo son aquellos que son farmacéuticamente aceptables y se pueden crear a partir de ácidos, bases y sales adecuados de los mismos, tal como los que se definen bajo ácidos, bases o tampones "farmacéuticamente aceptables".

En una realización, un lioprotector se añade a la formulación pre-liofilizada. La cantidad de lioprotector en la formulación pre-liofilizada es generalmente tal que, bajo la reconstitución, la formulación resultante será isotónica. Sin embargo, también pueden ser adecuadas formulaciones reconstituidas hipertónicas. Además, la cantidad de lioprotector no debe ser demasiado baja, de manera que se produzca una cantidad inaceptable de degradación/agregación de la proteína en la liofilización. Sin embargo, las concentraciones de lioprotector de ejemplo en la formulación pre-liofilizada son entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 400 mM, alternativamente entre aproximadamente 30 mM y aproximadamente 300 mM, alternativamente entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM. Los lioprotectores de ejemplo incluyen azúcares y alcoholes de azúcar tales como sacarosa, manosa, trehalosa, glucosa, sorbitol, manitol. Sin embargo, bajo circunstancias particulares, ciertos lioprotectores también pueden contribuir a un aumento en la viscosidad de la formulación. Como tal, debe tenerse cuidado para seleccionar lioprotectores particulares que minimicen o neutralicen este efecto. Lioprotectores adicionales se describen posteriormente bajo la definición de "lioprotectores".

La relación de proteína y lioprotector puede variar para cada proteína de inmunoglobulina particular o la combinación de anticuerpo y lioprotector. En el caso de un anticuerpo como la proteína de elección y un azúcar (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) como lioprotector para generar una formulación reconstituida isotónica con una alta concentración de proteínas, la relación molar de lioprotector y anticuerpo puede ser de aproximadamente 100 a aproximadamente 1500 moles de lioprotector por 1 mol de anticuerpo, y preferiblemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 1000 moles de lioprotector por 1 mol de anticuerpo, por ejemplo entre aproximadamente 200 y aproximadamente 600 moles de lioprotector por 1 mol de anticuerpo.

En una realización preferida, puede ser deseable añadir un surfactante a la formulación pre-liofilizada. Alternativamente, o además, el surfactante se puede añadir a la formulación liofilizada y/o a la formulación reconstituida. Los surfactantes incluyen surfactantes no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo polisorbatos 20 u 80); polioxámeros (por ejemplo polioxámero 188); Triton; sodio octyl glucósido; lauril-, miristil-, linoleil-, o estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil-, o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, o isosteamidopropil-betaína (por ejemplo lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil-, o isosteamidopropil-dimetilamina; sodio metil cocoil-, o disodio metil oleil-taurato; y las series MONAQUA™ (Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey), polietil glicol, polipropil glicol, y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo Pluronic, PF68 etc). La cantidad de surfactante añadido es tal que reduce la formación de partículas de la proteína reconstituida y minimiza la formación de partículas después de la reconstitución. Por ejemplo, el surfactante puede estar presente en la formulación pre-liofilizada en una cantidad de entre 0, 001-0, 5%, alternativamente entre aproximadamente 0, 005-0, 05%.

Una mezcla del lioprotector (tal como sacarosa o trehalosa) y un agente de carga (por ejemplo manitol o glicina) se pueden utilizar en la preparación de la formulación previa a la liofilización. El agente de carga puede permitir la producción de una masa liofilizada uniforme sin bolsas excesivas en su interior, etc. Otros portadores, incipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tal como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) se pueden incluir en la formulación antes de la liofilización (y/o la formulación liofilizada y/o la formulación reconstituida) previendo que no afecten adversamente a las características deseadas de la formulación. Los portadores, incipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los recipientes en las dosis y las concentraciones utilizadas e incluyen agentes de tampón adicionales, conservantes, co-solventes, antioxidantes se incluyen ácido ascórbico y metionina, agentes quelantes tales como EDTA, complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína de Zn), polímeros biodegradables tales como poliésteres, y/o contraiones formadores de sales tales como sodio.

La formulación aquí también puede contener también más de una proteína de inmunoglobulina, tal como es necesario para la indicación particular se trata, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no afectan adversamente a la otra proteína. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar dos o más anticuerpos que se unen al receptor HER2 o IgE en una única formulación. Estas proteínas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito deseado.

Las formulaciones que se utilizan para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución. Alternativamente, la esterilidad de toda la mezcla se puede realizar mediante el autoclave de los ingredientes, excepto para la proteína, aproximadamente 120°C durante 30 minutos, por ejemplo.

5 Después de que la proteína de inmunoglobulina, lioprotector opcional y otros componentes opcionales se mezclan juntos, la formulación se liofiliza. Muchos liofilizadores diferentes están disponibles para este propósito, tal como los liofilizadores Hull50™ (Hull, Estados Unidos) o GT20™ (Leybold-Heraeus, Alemania). La liofilización se realiza congelando la formulación y sublimando posteriormente el hielo del contenido congelado a una temperatura adecuada para secado primario. Bajo esta condición, la temperatura del producto está por debajo del punto eutéctico o la temperatura de colapso de la formulación. Típicamente, la temperatura de almacenamiento del secado primario variará entre aproximadamente -30 a 25°C (previando que el producto permanece congelado durante el secado primario) una presión adecuada, que varía típicamente entre aproximadamente 50 y 250 mTorr. La formulación, el tamaño y el tipo de recipiente que contiene la muestra (por ejemplo, vial de vidrio) y el volumen del líquido dictarán principalmente el tiempo requerido para el secado, que puede variar entre unas pocas horas a varios días (por ejemplo, 40-60 horas). Opcionalmente, también se puede realizar una etapa de secado secundaria entendiendo el nivel de humedad residual deseado en el producto. La temperatura a la cual el secado secundario se realiza varía entre aproximadamente 0-40°C, dependiendo principalmente del tipo y el tamaño del recipiente y del tipo de proteína utilizada. Por ejemplo, la temperatura de almacenamiento lo largo de toda la fase de retirada de agua de la liofilización puede estar entre aproximadamente 15-30°C (por ejemplo, aproximadamente 20°C). El tiempo y la presión requeridos para secado secundario serán las que producen una masa liofilizada adecuada dependiendo, por ejemplo, de la temperatura y otros parámetros. El tiempo de secado secundario se dicta mediante el nivel de humedad residual deseado en el producto y típicamente dura aproximadamente cinco horas (por ejemplo, 10-15 horas). La presión puede ser la misma que la utilizada durante la etapa de secado primario. Las condiciones de liofilización pueden variar dependiendo de la formulación y el tamaño del vial.

25 C. Reconstitución de una formulación liofilizada

Antes de la administración al paciente, la formulación liofilizada se reconstituye con un diluyente éticamente aceptable, de manera que la concentración de proteína de inmunoglobulina en la formulación reconstituida es por lo menos aproximadamente 80 mg/ml, por ejemplo entre aproximadamente 80 mg/ml aproximadamente 300 mg/ml, alternativamente entre aproximadamente 90 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. Estas altas concentraciones de proteínas en la formulación reconstituida se consideran que son particularmente útiles como se pretende el suministro subcutáneo de la formulación reconstituida. En ciertas realizaciones, la concentración de proteína en la formulación reconstituida es significativamente mayor que en la formulación antes de la liofilización. Por ejemplo, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser aproximadamente 2-40 veces, alternativamente 3-10 veces, alternativamente 3-6 veces (por ejemplo, por lo menos tres veces o por lo menos cuatro veces) la de la formulación antes de la liofilización.

La reconstitución generalmente se realiza a una temperatura de aproximadamente 25°C para asegurar una hidratación completa, aunque otras temperaturas se pueden utilizar como se desee. El tiempo requerido para la reconstitución dependerá, por ejemplo, del tipo de diluyente, la cantidad de excipientes y la proteína. Los diluyentes ejemplo incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFJ), una solución de pH tamponado (por ejemplo, salino tamponado con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. El diluyente contiene opcionalmente un conservante. Conservantes de ejemplo se han descrito anteriormente, con alcoholes aromáticos como benzil o fenil alcohol siendo los conservantes preferidos. La cantidad de conservante utilizado se determina mediante la determinación de diferentes concentraciones de conservante para su compatibilidad con la proteína y probando la eficacia de conservante.

Por ejemplo, si el conservante es un alcohol aromático (tal como bencil alcohol), puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 0, 1-2, 0% y preferiblemente entre aproximadamente 0, 5-1, 5%, pero más preferiblemente aproximadamente 1, 0-1, 2%.

50 Preferiblemente, la formulación reconstituida tiene menos de 6000 partículas por vial, que son de un tamaño $\geq 10 \mu\text{m}$.

D. Administración de la formulación

55 Las formulaciones de la presente invención, incluyendo pero no estando limitadas a formulaciones reconstituidas, se puede administrar al mamífero que necesita tratamiento con proteína de inmunoglobulina, preferiblemente un humano, según procedimientos conocidos, tal como administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo tiempo, mediante rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica o inhalación.

60

Tal como se describe en el presente documento, las formulaciones se pueden administrar al mamífero mediante administración subcutánea (es decir, por debajo de la piel). Para estos propósitos, la formulación se puede intentar utilizando una jeringuilla. Sin embargo, otros dispositivos para la administración de la formulación están disponibles, tal como dispositivos de inyección (por ejemplo los dispositivos Inject-ease™ y Genject™); lápices inyectoros (tal como el GenPen™), dispositivo sin agujas (por ejemplo MediJector™ y BioJector™); y sistemas de suministro de parche subcutáneo.

La dosis apropiada ("cantidad terapéuticamente efectiva") de la proteína de inmunoglobulina dependerá, por ejemplo, de la condición a tratar, la severidad y el transcurso de la condición, de si la proteína se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, de la previa terapia, de la historia clínica del paciente y la respuesta a la proteína, del tipo de proteína utilizada, y de la discreción del médico que lo atiende. La proteína de inmunoglobulina se administra adecuadamente al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos y se podrá administrar al paciente en cualquier momento para diagnóstico. La proteína de inmunoglobulina se pueda administrar como el único tratamiento con conjunción con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento de la condición en cuestión.

Si la proteína de la inmunoglobulina de elección es un anticuerpo, entre aproximadamente 0,1-20 mg/kg es la dosis candidata inicial para administración al paciente, por ejemplo, en una o más administraciones separadas. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas convencionales.

Las utilidades de una formulación anti-IgE (por ejemplo, rhuMAbE-25, rhMAbE-26) incluyen el tratamiento o la profilaxis de trastornos alérgicos, infecciones de parásitos, cistitis intersticial y asma mediadas con IgE, por ejemplo. Dependiendo de la enfermedad o trastorno a tratar, se administra una cantidad terapéutica mente efectiva (por ejemplo entre aproximadamente 1-15 mg/kg) del anticuerpo anti-IgE al paciente.

E. Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene la formulación tal como se define en las reivindicaciones y proporciona preferiblemente instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales (por ejemplo viales de doble cámara), jeringuillas (tal como jeringuillas de doble cámara) y tubos de prueba. El recipiente puede estar formado a partir una variedad de materiales, tal como vidrio o plástico. El recipiente mantiene la formulación tal como se definen las reivindicaciones y la etiqueta en, o asociada con, el recipiente puede indicar las instrucciones de uso. La etiqueta también puede indicar que la formulación es útil o está pensada para administración subcutánea. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de uso múltiple, que permite administraciones repetidas (por ejemplo, entre 2-6 administraciones) de la formulación. El artículo de fabricación también puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas e inserciones de empaquetado con instrucciones de uso. La invención se entenderá de manera más completa mediante la referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no debe construirse como limitativos del alcance de la invención. Los ejemplos fuera del alcance de las reivindicaciones son solamente para referencia.

EJEMPLO 1

Los efectos de las concentraciones de proteínas sobre la viscosidad de una formulación de anticuerpo monoclonal anti-IgE recombinante (rhuMAb E25) se estudiaron a 25°C. Es anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-IgE humanizado que se ha desarrollado por parte de Genentech Inc. como un agente terapéutico potencial para el tratamiento de rinitis alérgica y asma alérgico (Presta *et al.*, J. Immunol. 151 (5): 2623-2632 (1993) (PCT/US92/06860). El rhuMAb E25 formulado se formuló en una concentración final de 40 mg/ml, 85 mM Sacarosa, 5 mM Histidina, 0, 01% Polisorbato 20 y siguiendo en viales de 5 cc. Las muestras se congelaron a continuación entre 5°C y -50°C en 45 minutos y se siguió mediante un aumento secuencial en la temperatura de almacenamiento del liofilizador dedicados centígrados por hora desde -50°C a 25°C. Se realizó una etapa de secado a una temperatura de almacenamiento de 25°C y una presión de cámara de 50 mTorr durante 39 horas. El rhuMAb E25 liofilizado se reconstituyó con SWFI para producir una solución con rhuMAb E25 a 125 mg/ml, 266 mM sacarosa, 16 mM histidina, 0,03% polisorbato 20.

La viscosidad de las muestras reconstituidas se midió en un viscosímetro capilar Cannon-Fenske Routine (Industrial Research Glassware LTD). Las muestras se midieron aproximadamente en 8 ml con una pipeta de vidrio y se cargaron en un viscosímetro capilar de tamaño 50 para muestras del líquido con viscosidad cinemática entre 0, 8 y 4 cs o tamaño 200 para las de entre 20 y 100 cs. La temperatura de la muestra se mantuvo a 25°C en un baño de agua con un sistema de control de temperatura digital. El viscosímetro se colocó en soporte verticalmente y se insertó en el baño de agua, se mantuvo a una temperatura fija. Se midió el tiempo de emanación permitiendo que la muestra del líquido fluyera libremente hacia abajo pasadas las marcas. Se calculó la viscosidad cinemática de la muestra líquida en centistokes mediante la

multiplicación del tiempo de emanación en segundos mediante las constantes del viscosímetro (0,004 para el tamaño 50 y 0,015 para el tamaño 100). La viscosidad de la solución E25 depende mucho de la concentración de las moléculas de proteína (figura 1). Aumenta de manera exponencial con el aumento de la concentración de rhuMAb E25. A 25°C, el rhuMAb E25 reconstituido a 125 mg/ml es aproximadamente 80 veces más viscoso que el agua.

5

EJEMPLO 2

El rhuMAb E25 liofilizado del ejemplo 1 se reconstituyó con diferentes concentraciones de solución de NaCl. La viscosidad de la solución reconstituida se midió a 25°C en un viscosímetro capilar Cannon-Fenske Routine utilizando el mismo procedimiento que el descrito en el ejemplo 1.

10

Los resultados tal como se muestran en la figura 2 se muestran que la adición de NaCl puede reducir significativamente la viscosidad de la formulación de proteína. El rhuMAb E25 reconstituido con 100 mM NaCl proporcionará la solución que es aproximadamente cuatro veces menos viscosa que la reconstituida con SWFI.

15

La preparación de una formulación liofilizada de rhuMAb E25 con 100 mM NaCl resultó en una solución ligeramente hipertónica. Sin embargo, tal como se indicó anteriormente, una isotonicidad estricta no es absolutamente necesaria porque el daño en el tejido se detectó solamente en niveles de tonicidad extremadamente altos (1300 mOsmol/Kg).

20

Así, la administración de una formulación que contiene una concentración mayor de sal (100 mM a 200 mM NaCl resultante en una osmolaridad de ~600 a ~700 mOsmol/Kg para los materiales liofilizados de rhuMAb E25 actuales) tal como se contempla aquí, para reducir la viscosidad de la formulación, no parece que presente un riesgo de daños en el tejido el sitio de administración.

EJEMPLO 3

Los efectos de las diferentes sales sobre la viscosidad de la solución rhuMAb E25 se estudiaron a 25°C. El rhuMAb E25 liofilizado se reconstituyó primero con SWFI para producir una solución con rhuMAb E25 a 125 mg/ml, 266 mM sacarosa, 16 mM histidina, 0,03% Polisorbato 20. Las muestras se diluyeron a continuación con 10 mM histidina, 250 mM sacarosa, pH 6,0 con una concentración final de 40 mg/ml. A continuación se añadieron varias sales concentradas a la solución para llevar la concentración de sal final entre 0-200 mM. La viscosidad de la solución se determinó en un viscosímetro capilar Cannon-Fenske Routine utilizando el mismo procedimiento que el descrito en el ejemplo 1.

30

Los resultados se muestran en la figura 3. Aunque cada sal muestra un impacto ligeramente diferente sobre el cambio de viscosidad, parece que siguen una tendencia similar mediante la cual la viscosidad de la solución disminuye con el aumento en la concentración del tampón y resistencia iónica.

35

EJEMPLO 4

También se estudiaron los efectos de diferentes tampones sobre la viscosidad de la solución de rhuMAbE25 a 25°C. Una formulación líquida que contiene 80 mg/ml de rhuMAb E25, 50 mM histidina, 150 mM trehalosa y 0,05% de Polisorbato 20 se añadió con diferentes cantidades de componentes de histidina, acetato o tampón de succinato. El pH de la muestra se mantuvo a ~6,0 para toda la preparación. La viscosidad de la solución se determinó en un viscosímetro capilar Cannon-Fenske Routine utilizando el mismo procedimiento tal como se describe en el Ejemplo 1.

45

Tal como se muestra en la Figura 4, la viscosidad de la solución que contiene tampones de histidina o acetato disminuye al aumentar la concentración del tampón hasta 200 mM. Sin embargo, para el tampón de succinato, la viscosidad de la solución disminuye solamente en baja concentración del tampón (<100 mM), pero no en alta concentración del tampón (>200 mM). Similares resultados también se han observado en otros tampones que contienen componentes de tampón multivalentes cargados negativamente, tal como fosfato, citrato y carbonato.

50

EJEMPLO 5

Este ejemplo usó una segunda generación de anticuerpo monoclonal anti-IgE, rhuMAb E26. Este anticuerpo monoclonal es un homólogo del rhuMAb E25 con cinco diferencia de residuos de aminoácidos en la región CDR I en la cadena ligera y se describe en la patente WO 99/01556. El rhuMAb E26 recombinante también se expresó en la línea celular CHO y se purificó con procedimientos de cromatografía similares tal como se describen anteriormente para rhuMAb E25. Las muestras se formularon en 5 mM histidina y 275 mM sacarosa con una concentración de rhuMAb E25 a 21 mg/ml. La viscosidad de las muestras se midió a 6°C en un viscosímetro capilar Cannon-Fenske Routine utilizando el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 1.

55

60

Los efectos del NaCl sobre la viscosidad del rhuMAb E26 se muestran en la figura 5. El resultado demuestra que el aumento de la concentración de NaCl puede reducir de manera efectiva la viscosidad de la solución de rhuMAb E26.

EJEMPLO 6

5

Los efectos del pH sobre la viscosidad de un anticuerpo monoclonal anti-IgE muy concentrado, rhuMAb E25 en formulaciones líquidas se ha examinado en condiciones hipotónicas e isotónicas. Las soluciones hipotónicas se prepararon mediante la adición de pequeñas cantidades de 10% ácido acético o 0,5 M arginina en una solución de rhuMAb E25 no tamponada que se concentró a ~130 mg/ml en agua Milli-Q. Las concentraciones finales del tampón y la sal totales se mantuvieron a 17,5 mM. Las soluciones hipotónicas se mezclaron a continuación con un pequeño volumen de 5 M NaCl para producir las soluciones isotónicas con una concentración final de NaCl de aproximadamente 150 mM NaCl. La viscosidad de la solución se determinó a 25°C en un viscosímetro capilar Cannon-Fenske Routine utilizando el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 1. Tal como se muestra en la figura 6, la viscosidad de la solución rhuMAb E25 depende mucho del pH del tampón, especialmente en soluciones muy hipotónicas. La adición de especies iónicas, tal como NaCl, puede reducir significativamente estos efectos del pH.

10

15

EJEMPLO 7

Los efectos del pH sobre la viscosidad de un anticuerpo monoclonal anti-IgE reconstituido, rhuMAb E25 también se han examinado en presencia de otros excipientes, tal como trehalosa. El rhuMAb E25 liofilizado se reconstituyó con SWFI y a continuación se dializó contra 20 mM Histidina, 250 mM Trehalosa, a pH 5. La concentración de proteína es aproximadamente 94 mg/ml. El pH de la solución se ajustó con 1 M NaOH. La viscosidad de la solución se determinó a 25°C en un viscosímetro capilar Cannon-Fenske Routine utilizando el mismo procedimiento tal como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados, tal como se muestra en la figura 7, demostraron que la viscosidad del anticuerpo se puede alterar significativamente mediante el pH de la solución.

20

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulaci3n l3quida estable que comprende una inmunoglobulina en una cantidad de por lo menos 80 mg/ml y una sal y/o tamp3n en una cantidad de por lo menos 100 mM, y que tiene una viscosidad cinemática de 50 mm²/s o menos a 25°C, en la que la inmunoglobulina es el anticuerpo rhuMAb-E25, rhuMAb-E26 o rhuMAb-E27, y en la que dicha sal no es cloruro de sodio.
- 10 2. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, que comprende:
(a) dicha sal y/o tamp3n en una cantidad de 100-200 mM; o
(b) dicha sal y/o tamp3n en una cantidad de 200 mM.
- 15 3. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicha sal y/o tamp3n deriva de:
(a) un 3cido orgánico o inorgánico y un metal o una amina que forman una base; o
(b) un aminoácido.
- 20 4. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 3, en la que:
(a) el metal que forma la base se selecciona del grupo que consiste en metales alcalinos, metales alcalinotérreos, Al, Zn y Fe; o
(b) la amina que forma la base es NR₄⁺, en la que R es independientemente H o alquilo C₁₋₄.
- 25 5. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que la sal y/o tamp3n derivan de un aminoácido.
6. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicha sal se selecciona del grupo que consiste en tiocianato de sodio, tiocianato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, cloruro de calcio, clorhidrato de arginina, cloruro de zinc y acetato de sodio.
- 30 7. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, que:
(a) tiene una viscosidad cinemática de 40 mm²/s o menos a 25°C; o
(b) tiene una viscosidad cinemática de 30 mm²/s o menos a 25°C; o
(c) tiene una viscosidad cinemática de 20 mm²/s o menos a 25°C; o
(d) tiene una viscosidad cinemática de 10 a 30 mm²/s a 25°C.
- 35 8. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, que tambi3n comprende un lioprotector.
9. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 8, en la que dicho lioprotector es un az3car.
- 40 10. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 9, en la que dicho az3car es sacarosa o trehalosa.
11. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 9, que comprende dicho az3car en una cantidad de 60-300 mM.
- 45 12. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, que tambi3n comprende un tensoactivo.
13. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, que es hipert3nica.
14. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, que es una formulaci3n reconstituida.
- 50 15. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 14, en la que la concentraci3n de prote3na inmunoglobulina en la formulaci3n reconstituida es 2-40 veces mayor que la concentraci3n de prote3na inmunoglobulina en la mezcla antes de la liofilizaci3n.
16. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, que es una formulaci3n farmac3utica l3quida.
- 55 17. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 16, que es para administraci3n subcutánea.
18. Procedimiento de reducci3n de la viscosidad cinemática de una formulaci3n que contiene una inmunoglobulina en una cantidad de por lo menos 80 mg/ml, que comprende la adici3n de una sal y/o tamp3n en una cantidad de por lo menos 100 mM, en el que la inmunoglobulina es el anticuerpo rhuMAb-E25, rhuMAb-E26 o rhuMAb-E27, y en el que dicha sal no es cloruro de sodio.
- 60 19. Procedimiento, seg3n la reivindicaci3n 18, en el que dicha sal se selecciona entre el grupo que consiste en tiocianato de sodio, tiocianato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, cloruro de calcio y clorhidrato de arginina.

20. Procedimiento, según la reivindicación 18, en el que dicha formulación es una formulación reconstituida.
21. Procedimiento, según la reivindicación 18, en el que la formulación es hipertónica.
- 5 22. Procedimiento, según la reivindicación 20, en el que la concentración de proteína en dicha formulación reconstituida es 2-40 veces mayor que la concentración de proteína en la mezcla antes de la liofilización.
23. Procedimiento, según la reivindicación 18, en el que la viscosidad cinemática de dicha formulación se reduce a 50 mm²/s o menos tal como se determina a 25°C.
- 10 24. Artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la formulación, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
- 15 25. Artículo de fabricación, según la reivindicación 24, que también comprende instrucciones para la administración de dicha formulación.

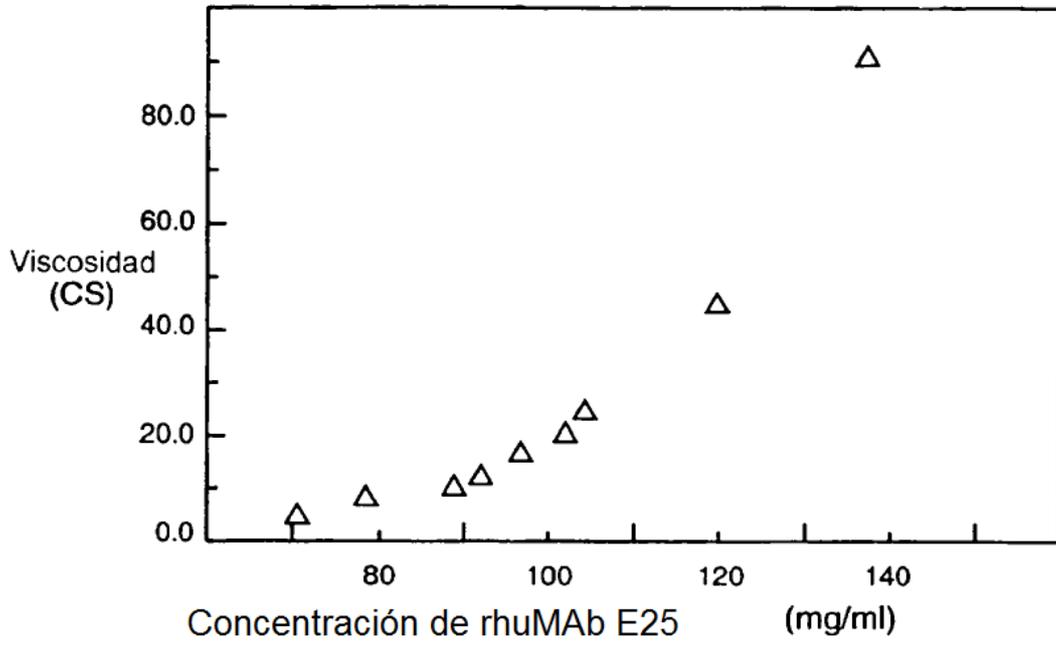


FIG._1

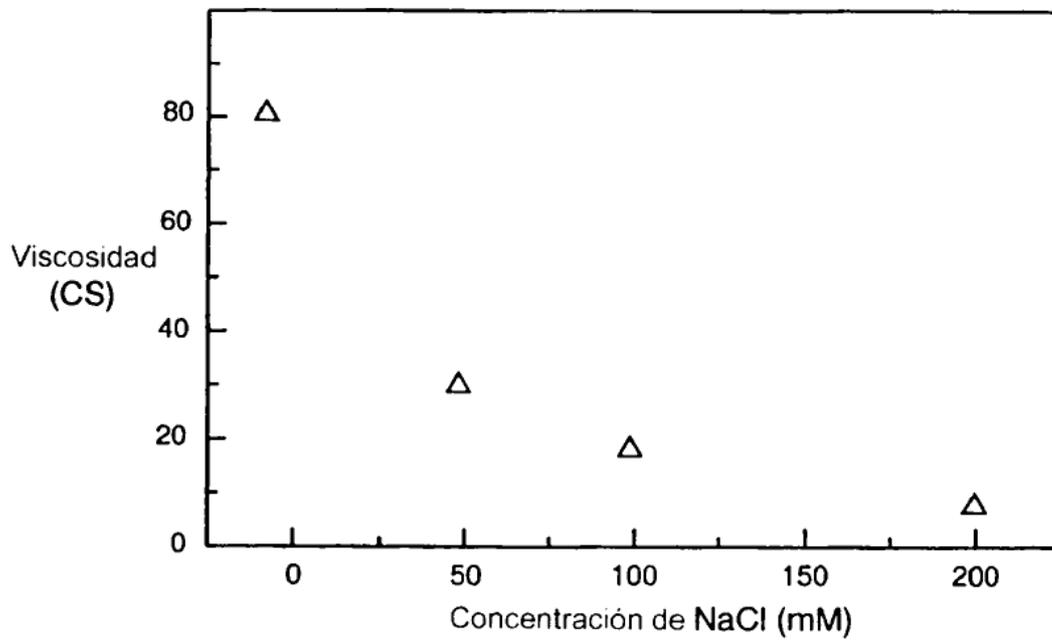


FIG._2

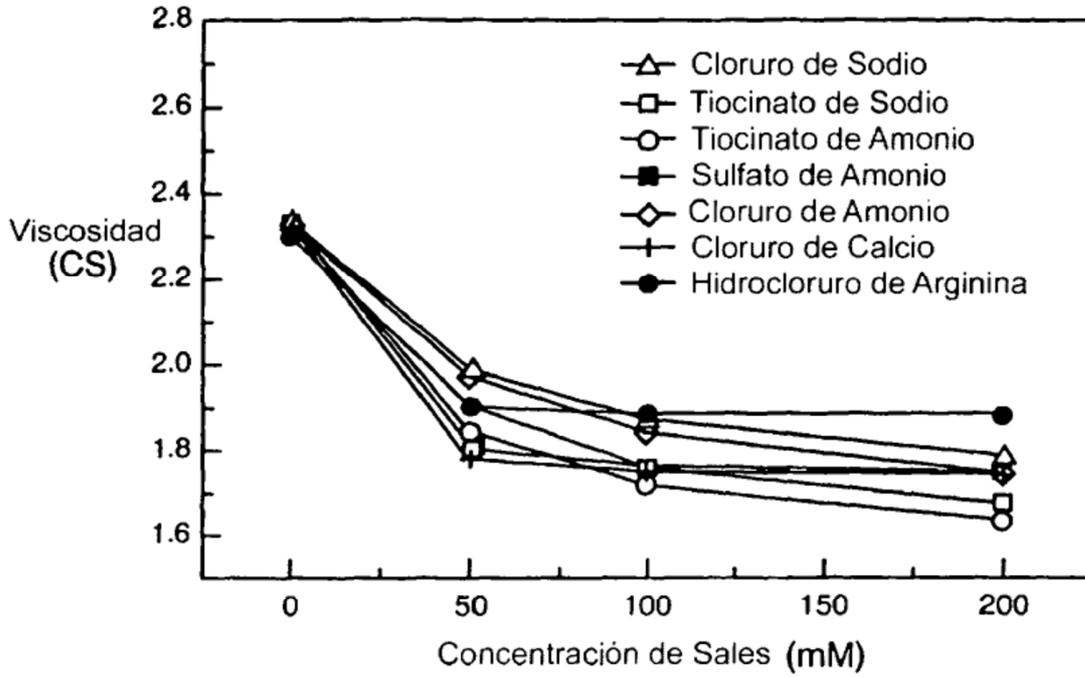


FIG. 3

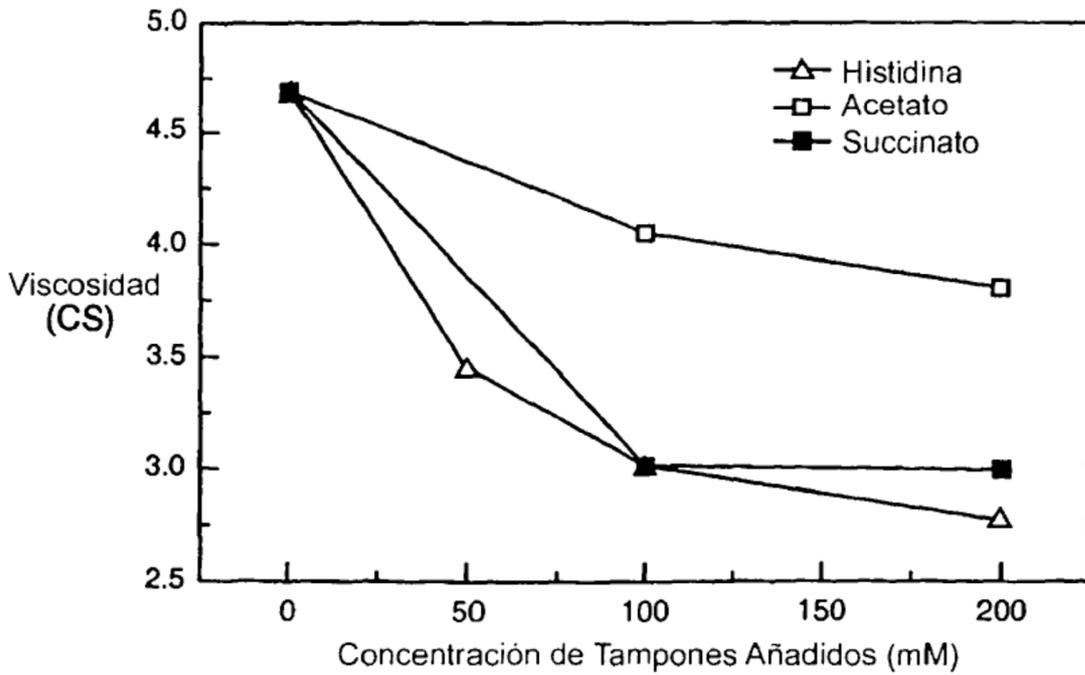


FIG. 4

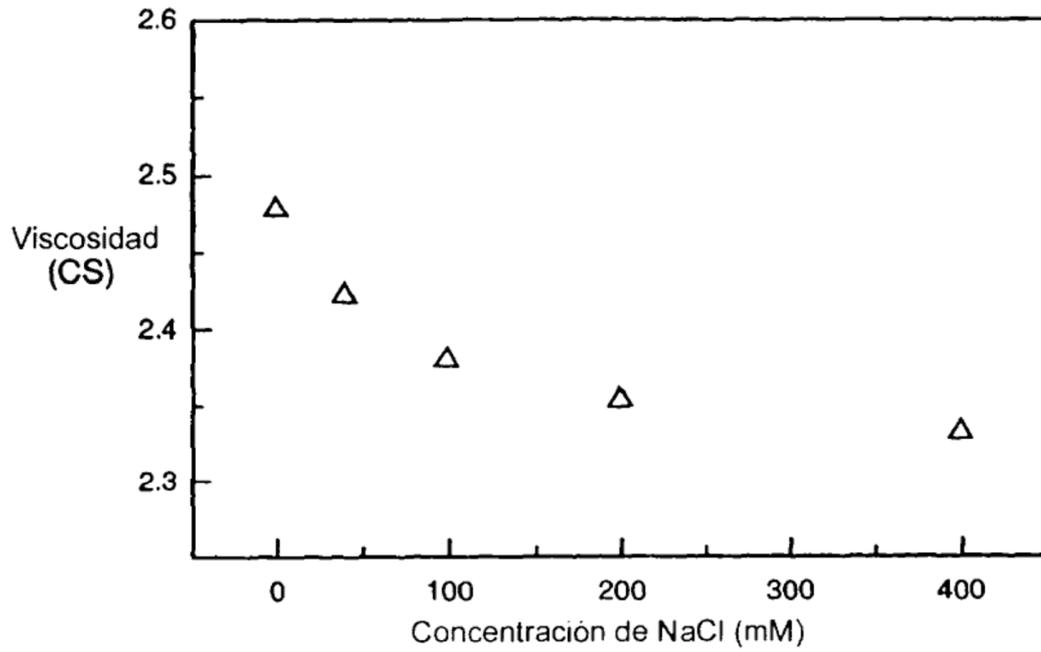


FIG._5

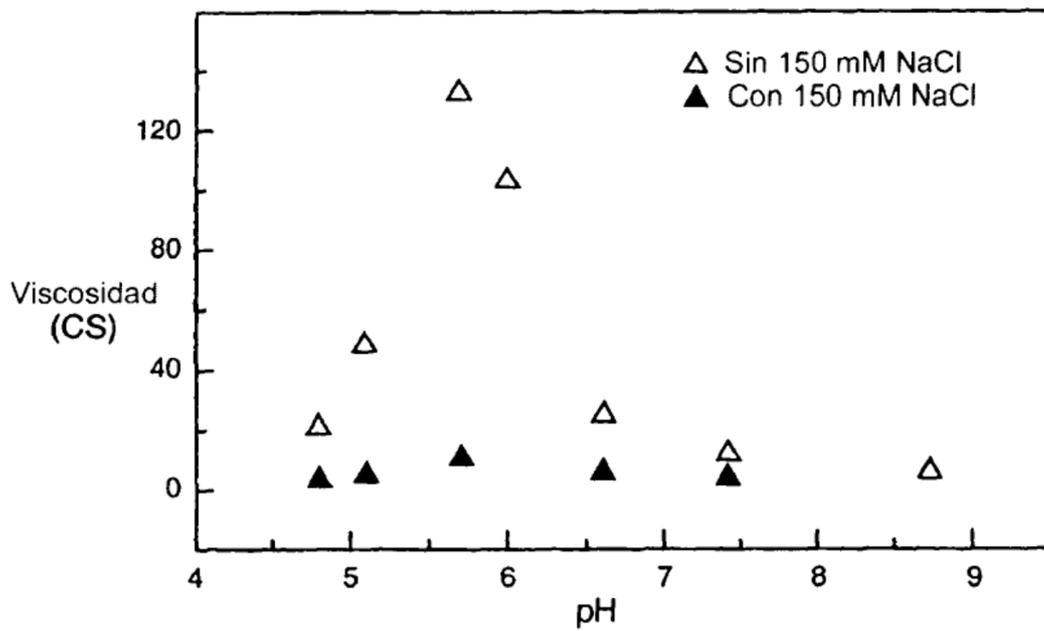


FIG._6

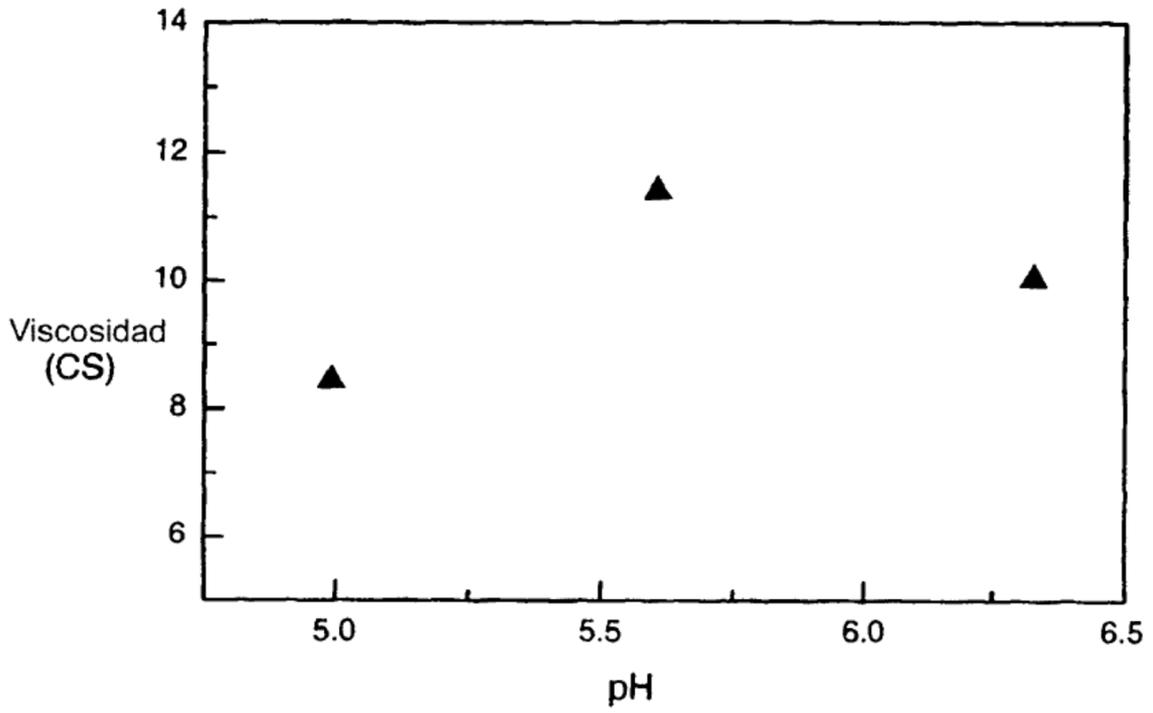


FIG._7