

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 676**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05816281 .9**
- 96 Fecha de presentación: **21.10.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1802334**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **Método para el tratamiento de enfermedades neovasculares intraoculares**

30 Prioridad:  
**21.10.2004 US 621209 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.11.2012**

73 Titular/es:  
**GENENTECH, INC. (100.0%)**  
**1 DNA WAY**  
**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:  
**SHAMS, NAVEED**

74 Agente/Representante:  
**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 390 676 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento de enfermedades neovasculares intraoculares.

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 **[0001]** La presente invención se refiere a método para el tratamiento de un trastorno neovascular intraocular con un antagonista de VEGF. Los métodos para la administración a un mamífero que padece o presenta el riesgo de padecer un trastorno neovascular intraocular incluyen la dosificación mensual de una cantidad terapéuticamente eficaz de antagonista de VEGF, seguido de una dosificación menos frecuente de una cantidad terapéuticamente eficaz de antagonista de VEGF

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 **[0002]** La angiogénesis está implicada en la patogénesis de enfermedades neovasculares intraoculares, por ejemplo, retinopatías proliferativas, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), etc., así como una variedad de otros trastornos. Estos incluyen tumores sólidos, artritis reumatoide y psoriasis (Folkman et al. J. Biol. Chem. 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun et al. Annu. Rev. Physiol. 53:217-239 (1991); y Garner A, Vascular diseases. In: Pathobiology of ocular disease. A dynamic approach. Garner A, Klintworth GK, Eds. 2nd Edition Marcel Dekker, NY, pág. 1625-1710  
15 (1994)).

**[0003]** La búsqueda de reguladores positivos de la angiogénesis ha producido muchos candidatos, incluyendo aFGF, bFGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  HGF, TNF- $\alpha$ , angiogenina, IL-8, etc. (Folkman et al. y Klagsbrun et al). Los reguladores negativos identificados hasta ahora incluyen trombospondina (Good et al. Proc. Natl.Acad. Sci. USA. 87:6624-6628 (1990)), el fragmento N-terminal de 16 kilodalton de prolactina (Clapp et al. Endocrinology, 133:1292-1299 (1993)), angiostatina (O'Reilly et al. Cell, 79:315-328 (1994)) y endostatina (O'Reilly et al. Cell, 88:277-285 (1996)).

**[0004]** El trabajo realizado durante los últimos años ha establecido el papel clave del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la regulación de angiogénesis normal y anormal (Ferrara et al. Endocr. Rev. 18:4-25 (1997)). El descubrimiento de que la pérdida de incluso un único alelo de VEGF da lugar a letalidad embrionaria apunta a un papel insustituible jugado por este factor en el desarrollo y la diferenciación del sistema vascular (Ferrara et al.).

25 **[0005]** El VEGF humano existe como por lo menos seis isoformas (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, y VEGF<sub>206</sub>) que aparecen de empalme alternativo de ARNm de un único gen (Ferrara N, Davis Smyth T. Endocr Rev 18:1-22 (1997)). El VEGF<sub>165</sub>, la isoforma más abundante, es una glicoproteína dimérica básica de unión a heparina con una masa molecular de ~45.000 daltons (*kd*). Se han identificado dos tirosina quinasas receptoras de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2, (Shibuya et al. Oncogene 5:519-24 (1990); Matthews et al., Proc Natl Acad Sci U S A 88: 9026-30 (1991); Terman et al., Oncogene 6:1677-83 (1991); Terman et al. Biochem Biophys Res Commun 187:1579-86 (1992); de Vries et al., Science 255:989-91 (1992); Millauer et al. Cell 72:835-46 (1993); y, Quinn et al. Proc Natl Acad Sci USA 90:7533-7 (1993)). VEGFR1 presenta la mayor afinidad para VEGF, con una Kd de ~10-20 pM (de Vries et al., Science 255:989-91 (1992)), y VEGFR2 presenta una afinidad algo más baja para VEGF, con una Kd de ~75-125 pM (Terman et al., Oncogene 6: 1677-83 (1991); Millauer et al. Cell 72:835-46 (1993); y Quinn et al. Proc Natl Acad Sci USA 90:7533-7 (1993)).

30 **[0006]** El VEGF presenta varias funciones biológicas, incluyendo la regulación de la expresión génica de VEGF bajo condiciones hipóxicas (Ferrara N, Davis Smyth T. Endocr Rev 18:1-22 (1997)), actividad mitogénica para células endoteliales micro y macrovasculares (Ferrara N, Henzel WJ. Biochem Biophys Res Commun 161:851-8 (1989); Leung et al., Science 246:1306-9 (1989); Connolly et al. J Clin Invest 84: 1470-8 (1989a); Keck et al. Science 246:1309-12 (1989); Plouet et al., EMBO J 8:3801-6 (1989); Conn et al. Proc Natl Acad Sci USA 87:2628-32 (1990); y, Pepper et al., Exp Cell Res 210:298-305 (1994)), e inducción de la expresión de activadores de plasminógeno y colagenasa (Pepper et al., Biochem Biophys Res Commun 181: 902-6 (1991)).

45 **[0007]** Además, se ha observado que el VEGF es un mediador clave de la neovascularización asociada con tumores y trastornos intraoculares (Ferrara et al.). El ARNm de VEGF se sobreexpresa por la mayoría de tumores humanos examinados. Berkman et al. J Clin Invest 91:153-159 (1993); Brown et al. Human Pathol 26:86-91 (1995); Brown et al. Cancer Res 53:4727-4735 (1993); Mattern et al. Brit J Cancer. 73:931-934 (1996); y Dvorak et al. Am J Pathol 146:1029-1039 (1995). Además, la concentración de VEGF en los fluidos del ojo está altamente correlacionada con la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatías diabéticas y otras retinopatías relacionadas con isquemia. Aiello et al., N. Engl. J. Med. 331:1480-1487 (1994). Además, estudios recientes han demostrado la localización de VEGF en membranas neovasculares coroidales en pacientes afectados por AMD. Lopez et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-868 (1996); Kvantta et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 37:1929-34 (1996).

50 **[0008]** La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una causa principal de la pérdida de visión severa irreversible entre la gente mayor. Bressler, JAMA 291:1900-1 (2004). Se caracteriza por un amplio espectro de hallazgos clínicos y patológicos, tales como manchas amarillas pálidas conocidos como drusas, alteración del epitelio de pigmento retinal (RPE), neovascularización coroidal (CNV), y degeneración macular disciforme. Las manifestaciones de la enfermedad se clasifican en dos formas: no exudativa (seca) y exudativa (húmeda o neovascular). Las drusas son las lesiones características de la forma seca y la neovascularización caracteriza la forma húmeda. La AMD disciforme es la

etapa fibrótica de la lesión neovascular.

5 **[0009]** Existe un incremento espectacular en la prevalencia de AMD con la edad avanzada. Véase, por ejemplo, Leibowitz et al., *Surv Ophthalmol* 24(Suppl):335-610 (1980) y Klein et al., *Ophthalmology* 99:933-43 (1992). Aunque la forma húmeda de AMD es mucho menos común, es responsable del 80%-90% de la pérdida visual severa asociada con la AMD (Ferris et al., *Arch Ophthalmol* 102:1640-2 (1984)). Se estima 1-1,2 millones de casos prevalentes de AMD húmeda. La causa de la AMD es desconocida; sin embargo, está claro que el riesgo de desarrollo de AMD se incrementa con la edad avanzada. Otros factores de riesgo conocidos incluyen el historial familiar y fumar cigarrillos. Los factores de riesgo postulados incluyen estrés oxidativo, diabetes, ingestión de alcohol y exposición a la luz solar. D'Amico, *N Engl J Med* 331:95-106 (1994) y Christen et al., *JAMA* 276:1147-51 (1996).

10 **[0010]** La AMD seca se caracteriza por los cambios en el RPE y la membrana de Bruch. Se cree que el RPE, comprometido por la edad y otros factores de riesgo, deposita lipofuscina y residuos celulares en la membrana de Bruch. Estos cambios se pueden observar oftalmoscópicamente como drusas, que se dispersan a lo largo de la mácula y el polo retinal posterior. Existen también grados variables de atrofia y pigmentación del RPE. La AMD seca puede ser asintomática o acompañada por una pérdida visual variable y normalmente mínima y se considera que es un preludio del desarrollo de la AMD húmeda.

15 **[0011]** La AMD húmeda se caracteriza habitualmente por una CNV de la región macular. Los capilares coroidales proliferan y penetran en la membrana de Bruch para alcanzar el RPE y se pueden extender en el espacio subretinal. La permeabilidad incrementada de los capilares recién formados conduce a la acumulación de fluido seroso o sangre bajo el RPE y/o la retina neurosensorial o en el interior de la retina neurosensorial. Cuando las foveas se hinchan o desprenden, tiene lugar una disminución en la visión. Puede seguir la metaplasia y organización fibrosa, dando lugar a una masa subretinal elevada denominada una cicatriz disciforme que constituye AMD de etapa final y está asociada con una pérdida de visión permanente (D'Amico DJ. *N Engl J Med* 331:95-106 (1994)).

20 **[0012]** La neovascularización en AMD se puede clasificar en diferentes patrones basados en la angiografía de fluoresceína de lesiones neovasculares coroidales subfoveales. TAP and VIP Study Groups, *Arch Ophthalmol* 121:1253-68 (2003). Los principales patrones angiográficos se denominan clásico y oculto y están asociados con diferentes grados de agresividad, pérdidas de visión y respuesta a diferentes opciones de tratamiento.

25 **[0013]** La naturaleza difundible de VEGF y su especificidad de acción para las células endoteliales apoyan un papel clave en el proceso de crecimiento anormal de vasos sanguíneos y escape vascular. La expresión incrementada de VEGF en fotorreceptores retinales o RPE de ratones transgénicos estimula la neovascularización en la retina y los antagonistas de VEGF inhiben parcialmente la neovascularización retinal en modelos de animales (Okamoto et al. *Am J Pathol* 151:281-91 (1997); Schwesinger et al., *AM J Pathol. Mar*; 158(3):1161-72 (2001)). Los anticuerpos neutralizantes anti-VEGF inhiben la angiogénesis intraocular en modelos de trastornos retinales isquémicos (Adamis et al. *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996)), y también suprimen el crecimiento de una variedad de líneas celulares de tumores humanos en ratones desnudos (Kim et al. *Nature* 362: 841-844 (1993); Warren et al. *J. Clin. Invest.* 95: 1789-1797 (1995); Borgström et al. *Cancer Res.* 56: 4032-4039 (1996); y Melnyk et al. *Cancer Res.* 56: 921-924 (1996)). Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales anti-VEGF u otros antagonistas de VEGF son candidatos prometedores para utilizar en tratamientos de trastornos neovasculares intraoculares. De hecho, se ha utilizado un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante dirigido a VEGF (rhuFab VEGF) en monos cynomolgus para evitar el desarrollo de CNV clínicamente significativo después de la inducción de la lesión mediante fotocoagulación con láser (Krzystolik et al., *Arch Ophthalmol* 120:338-346 (2002)). Se necesitan nuevos métodos de administración de compuestos terapéuticos que incrementen la eficacia del compuesto terapéutico.

#### DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

**[0014]** Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método mejorado de administración de un compuesto terapéutico. Este y otros objetivos serán evidentes a partir de la siguiente descripción.

45 **[0015]** La presente invención proporciona medios, tal como se define en las reivindicaciones, para tratar enfermedades neovasculares intraoculares.

**[0016]** Por ejemplo, los métodos incluyen administrar a un mamífero un conjunto de primeras dosis individuales de un antagonista de VEGF, seguido de la administración al mamífero de un conjunto de segundas dosis individuales del antagonista, donde las segundas dosis individuales se administran de manera menos frecuente que las primeras dosis individuales.

**[0017]** En un aspecto, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF de longitud completa o un fragmento de anticuerpo. En una realización, el anticuerpo anti-VEGF es un fragmento de anticuerpo Fab. En una realización, el fragmento de anticuerpo es Y0317.

**[0018]** En una realización de la invención, las segundas dosis individuales se administran en intervalos de tres meses.

55 **[0019]** En una realización de la invención, el conjunto de primeras dosis individuales y el conjunto de segundas dosis individuales se administran durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 años.

**[0020]** En una realización, el antagonista de VEGF se administra durante menos de 2 años, u opcionalmente, se administran durante más de 2 años. Otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones que no pretenden ser limitantes de la invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **[0021]**

La figura 1 ilustra esquemáticamente el estudio en el ejemplo 1.

La figura 2 ilustra esquemáticamente una pauta de dosificación para el tratamiento, por ejemplo, de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) con un antagonista de VEGF.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 Definiciones

**[0022]** Antes de describir en detalle la presente invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, naturalmente, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada aquí es para el objetivo de describir realizaciones particulares únicamente y no se pretende que sean limitantes. Tal como se utiliza en esta memoria y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichas moléculas, y similares.

**[0023]** El término "VEGF humano" tal como se utiliza aquí se refiere al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos y los factores de crecimiento de células endoteliales vasculares relacionadas de 121, 189 y 206 aminoácidos (y otras isoformas), tal como se describe por Leung et al., *Science* 246:1306 (1989), y Houck et al., *Mol. Endocrin.* 5:1806 (1991), junto con las formas alélicas naturales y procesadas de estos factores de crecimiento.

**[0024]** Un "antagonista de VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, derogar, reducir o interferir con las actividades de VEGF que incluyen su unión a uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a VEGF, secuestrando así su unión a uno o más receptores, anticuerpos anti-receptor de VEGF y antagonistas de receptores de VEGF, tales como inhibidores de molécula pequeña de las tirosina quinasas VEGFR y proteínas de fusión, por ejemplo, VEGF-Trap (Regeneron), VEGF121-gelatina (Peregrine). Los antagonistas de VEGF también incluyen variantes antagonistas de VEGF, moléculas antisentido dirigidas a VEGF, aptámeros de ARN específicos para VEGF y ribozimas contra VEGF o receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF actúan mediante la interferencia con la unión de VEGF a un receptor celular, mediante la incapacitación de células asesinas que han sido activadas por VEGF, o mediante la interferencia con la activación de células endoteliales vasculares después de la unión de VEGF a un receptor celular. Sin embargo, la presente invención está limitada a los antagonistas especificados en las reivindicaciones.

**[0025]** Los antagonistas preferidos de VEGF son los anticuerpos antagonísticos anti-VEGF capaces de inhibir una o más de las actividades biológicas de VEGF, por ejemplo, su actividad mitogénica, angiogénica o permeabilidad vascular. Los anticuerpos antagonísticos anti-VEGF incluyen, pero sin limitación, anticuerpos A4.6.1, rhuMab VEGF (bevacizumab), Y0317 (ranibizumab), G6, B20, 2C3, y otros descritos, por ejemplo, en WO98/45331, US2003/0190317, patentes de Estados Unidos 6,582,959 y 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; WO2005/044853; EP0666868B1; y Popkov et al., *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004). Más preferiblemente, el anticuerpo antagonístico anti-VEGF de la invención es ranibizumab, que es un fragmento Fab de anticuerpo anti-VEGF humano humanizado madurado para afinidad que tiene las secuencias de dominio variable de cadena ligera y pesada de Y0317 tal como se describe en WO98/45331 y Chen et al *J Mol Biol* 293:865-881 (1999).

**[0026]** El anticuerpo es apropiadamente de cualquier origen, incluyendo pollo y mamífero, tal como roedor, cabra, primate y humano. Habitualmente, el anticuerpo es de la misma especie que la especie a tratar y más preferiblemente, el anticuerpo es humano o humanizado y el huésped es humano. Aunque el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal, habitualmente es un anticuerpo monoclonal, que se puede preparar mediante tecnología convencional. El anticuerpo es una IgG-1, -2, -3, o -4, IgE, IgA, IgM, IgD, o una quimera intraclase en que Fv o una CDR de una clase se sustituye en otra clase. El anticuerpo puede tener un dominio Fc capaz de una función efectora o puede no ser capaz de unirse al complemento o la participación en ADCC.

**[0027]** El término "receptor de VEGF o "VEGFr" tal como se utiliza aquí, se refiere a un receptor celular para VEGF, normalmente un receptor de la superficie celular hallado en células endoteliales vasculares, así como variantes del mismo que mantienen la capacidad de unirse a hVEGF. Un ejemplo de un receptor de VEGF es la tirosina quinasa de tipo fms (flt), un receptor transmembrana en la familia de tirosina quinasa. DeVries et al., *Science* 255:989 (1992); Shibuya et al., *Oncogene* 5:519 (1990). El receptor flt comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa. El dominio extracelular está implicado en la unión de VEGF,

- mientras que el dominio intracelular está implicado en la transducción de señales. Otro ejemplo de un receptor de VEGF es el receptor flk-1 (también referido como KDR). Matthews et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 88: 9026 (1991); Terman et al., Oncogene 6:1677 (1991); Terman et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 187: 1579 (1992). La unión de VEGF al receptor flt da lugar a la formación de por lo menos dos complejos de peso molecular elevado, que tiene un peso molecular aparente de 205.000 y 300.000 Daltons. El complejo de 300.000 Dalton se cree que es un dímero que comprende dos moléculas receptoras unidas a una única molécula de VEGF.
- [0028]** El término "epítipo A4.6.1" cuando se utiliza aquí, a menos que se indique lo contrario, se refiere a la región de VEGF humano a la que se une el anticuerpo A4.6.1 descrito en Kim et al., Growth Factors 7:53 (1992) y Kim et al. Nature 362:841 (1993).
- [0029]** "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos con necesidad de tratamiento incluyen los que ya presentan el trastorno, así como aquellos en que debe prevenirse el trastorno.
- [0030]** "Mamífero" para los objetivos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, eventos deportivos o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Habitualmente, el mamífero es humano.
- [0031]** El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de longitud completa o monoclonales intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, y fragmentos de anticuerpo (véase a continuación), siempre que muestran la actividad biológica deseada.
- [0032]** A menos que se indique lo contrario, la expresión "anticuerpo multivalente" se utiliza a lo largo de la memoria para indicar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente se diseña habitualmente para que tenga tres o más sitios de unión a antígeno y no es en general un anticuerpo IgM o IgA de secuencia nativa.
- [0033]** "Anticuerpos nativos" e "inmunoglobulinas nativas" son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también presenta puentes de disulfuro intracadenas espaciados regularmente.
- [0034]** Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un conjunto de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.
- [0035]** El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan la región armazón (FR). Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a 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), páginas 647-669). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).
- [0036]** El término "región hipervariable" cuando se utiliza aquí se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsable de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los residuos de "armazón" o "FR" son los residuos de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable aquí definidos.
- [0037]** La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su

capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento  $F(ab')_2$  que tiene dos sitios de combinación a antígeno y aún es capaz de reticular con el antígeno.

**[0038]** "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren una especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

**[0039]** El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos cuantos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación aquí para Fab' en que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes contienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo  $F(ab')_2$  se produjeron originalmente como parejas de los fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

**[0040]** Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a una de dos tipos claramente distintos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

**[0041]** Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son conocidas.

**[0042]** Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, en general que incluyen un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y de este modo mantienen la capacidad de unirse a antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo comprendidos por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene los dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C-terminal del dominio CH1; (iii) el fragmento Fd que tiene los dominios VH y CH1; (iv) el fragmento Fd' que tiene los dominios VH y CH1 y uno o más residuos de cisteína en el extremo C-terminal del dominio CH1; (v) el fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (vii) regiones de CDR aisladas; (viii) fragmentos  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que incluyen dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo de cadena única (por ejemplo, Fv de cadena única; scFv) (Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); y Huston et al., *PNAS (USA)* 85:5879-5883 (1988)); (x) "diabodies" con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden una pareja de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementaria, forman una pareja de regiones de unión a antígeno (Zapata et al. *Protein Eng.* 8(10): 1057 1062 (1995); y la patente de Estados Unidos No. 5,641,870).

**[0043]** El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo de ser obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se pueden fabricar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en 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.

**[0044]** Los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente aquí anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las correspondientes secuencias en

anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos No. 4,816,567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

5 **[0045]** "Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón ("framework") (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes  
10 residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos las regiones hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

20 **[0046]** Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano y/o ha sido producido utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos tal como se describen aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en el sector. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de expresión de fagos, donde la biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996); Sheets et al. *PNAS (USA)* 95: 6157-6162 (1998); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Los anticuerpos humanos también se pueden producir mediante la introducción de locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcialmente o completamente inactivados. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parecen estrechamente a los observados en humanos en todos los aspectos, incluyendo la redistribución de genes, ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nos. 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); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano se puede preparar mediante la inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (dichos linfocitos B se pueden recuperar de un individuo o se pueden haber inmunizado in vitro). Véase, por ejemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 (1991); y la patente de Estados Unidos No. 5,750,373.

40 **[0047]** El término "región Fc" se utiliza para definir la región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que se puede generar mediante la digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define normalmente como el tramo desde un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición Cys226 o desde aproximadamente la posición Pro230 hasta el extremo  
45 carboxilo de la región Fc. La región Fc de una inmunoglobulina comprende en general dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4.

**[0048]** Por "cadena de región Fc" en la presente invención se entiende una de las dos cadenas polipeptídicas de una región Fc.

50 **[0049]** El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana (también referida como dominio "Cg2") se extiende normalmente desde un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 231 a un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 340. El dominio CH2 es único en que no están emparejado estrechamente con otro dominio. En cambio, dos cadenas de carbohidratos ramificados unidos a N están interpuestos entre los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa intacta. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar en la estabilización del dominio CH2. Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985). El dominio CH2 aquí puede ser un dominio CH2 de secuencia nativa o una variante del dominio CH2.

60 **[0050]** El "dominio CH3" comprende el tramo de residuos C-terminal a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 341 a un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 447 de una IgG). La región CH3 aquí puede ser un dominio CH3 de secuencia nativa o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una "protuberancia" en una cadena del mismo y una "cavidad" introducida correspondiente en la otra cadena del mismo; véase la patente de Estados Unidos No. 5,821,333. Dichos dominios CH3 variantes se pueden utilizar para fabricar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) tal como se describe

aquí.

5 **[0051]** Región bisagra" se define en general como el tramo desde aproximadamente Glu216, o aproximadamente Cys226, hasta aproximadamente Pro230 de la IgG1 humana (Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 mediante la colocación del primer y último residuo de cisteína formando los enlaces S-S entre las cadenas pesadas en las mismas posiciones. La región bisagra aquí puede ser una región bisagra de secuencia nativa o una región bisagra variante. Las dos cadenas polipeptídicas de una región bisagra variante mantienen en general por lo menos un residuo de cisteína por cadena polipeptídica, de manera que las dos cadenas polipeptídicas de la región bisagra variante pueden formar un enlace disulfuro entre las dos cadenas. La región bisagra preferida aquí es una región bisagra humana de secuencia nativa, por ejemplo, una  
10 región bisagra de IgG1 humana de secuencia nativa.

15 **[0052]** Una "región Fc funcional" posee por lo menos una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" de ejemplo incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión a receptores de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación a la baja de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Estas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar mediante diversos análisis descritos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras del anticuerpo.

**[0053]** Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza.

20 **[0054]** Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa debido a por lo menos una modificación de aminoácido. Preferiblemente, la región Fc variante tiene por lo menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferiblemente de aproximadamente uno a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante de la presente invención poseerá preferiblemente por lo menos aproximadamente un 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, o por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia con la misma, o por lo menos aproximadamente un 95% o más de identidad en la secuencia con la misma.

30 **[0055]** "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcRs) (por ejemplo, células asesinas ("killer") naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). Para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo ADCC in vitro, tal como el descrito en las patentes de Estados Unidos 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede determinar in vivo, por ejemplo en un modelo  
40 animal, tal como el descrito en Clynes et al. PNAS (USA), 95:652-656 (1998).

45 **[0056]** "Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Habitualmente, las células expresan por lo menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMCs y NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC tal como se describe aquí.

**[0057]** Los términos "receptor de Fc" y "FcR" se utilizan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humana de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRIII incluyen FcγRIIIA (un "receptor activante") y FcγRIIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor activante FcγRIIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunoreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunoreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (revisado en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan 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 FcR, incluyendo los identificados en el futuro, están comprendidos por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable para la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976); y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)).

- 5 **[0058]** "Citotoxicidad dependiente del complemento" y "CDC" se refieren a la lisis de una diana en presencia del complemento. El mecanismo de activación de complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que está complejada a su antígeno afín. Para determinar la activación del complemento se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).
- 10 **[0059]** Un anticuerpo "madurado para afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más de CDR del mismo que dan lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esta alteración o alteraciones. Los anticuerpos madurados para afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados para afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración para afinidad por mezcla de los dominios de VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos de CDR y/o armazón se describe por: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).
- 15 **[0060]** Un "enlazador flexible" se refiere aquí a un péptido que comprende dos o más residuos de aminoácidos unidos por un enlace o enlaces peptídicos y proporciona más libertad rotacional para dos polipéptidos (tales como dos regiones Fd) unidos por el mismo. Dicha libertad rotacional permite que dos o más sitios de unión a antígeno unidos por el enlazador flexible a cada antígeno o antígenos dianas de acceso de manera más eficiente. Ejemplos de secuencias de péptido enlazador flexible adecuadas incluyen gly-ser, gly-ser-gly-ser, ala-ser, y gly-gly-gly-ser.
- 20 **[0061]** "Fv de cadena única" o fragmentos de anticuerpo "sFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido sFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology de Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).
- 25 **[0062]** El término "diabodies" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante la utilización de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los "diabodies" se describen con más detalle en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993).
- 30 **[0063]** La expresión "anticuerpos lineales" cuando se utiliza en esta solicitud se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden una pareja de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que forman una pareja de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.
- 35 **[0064]** Un anticuerpo anti-VEGF "variante", se refiere aquí a una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de anticuerpo anti-VEGF "parental" en base a la adición, eliminación y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo parental. En la realización preferida, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede comprender por lo menos una, por ejemplo de aproximadamente una a aproximadamente diez, y preferiblemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco, sustituciones en una o más regiones hipervariables del anticuerpo parental. Normalmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 75% de identidad en la secuencia de aminoácidos con las secuencias del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo parental, más preferiblemente por lo menos un 80%, más preferiblemente por lo menos un 85%, más preferiblemente por lo menos un 90%, y lo más preferiblemente por lo menos un 95%. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos con los residuos del anticuerpo parental, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. Ninguna de las extensiones, eliminaciones o inserciones N-terminal, C-terminal o internas en la secuencia del anticuerpo se interpretará como que afectan a la identidad u homología de la secuencia. La variante mantiene la capacidad de unirse a VEGF humano y preferiblemente tiene propiedades que son superiores a las del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más fuerte, mayor capacidad de inhibir la proliferación inducida por VEGF de las células endoteliales y/o una capacidad incrementada de inhibir la angiogénesis inducida por VEGF in vivo. Para analizar dichas propiedades, debe compararse una forma Fab de la variante con una forma Fab del anticuerpo parental o una forma de longitud completa de la variante con una forma de longitud completa del anticuerpo parental, por ejemplo, ya que se ha encontrado que el formato del anticuerpo anti-VEGF afecta a su actividad en los ensayos de actividad biológica descritos, por ejemplo, en WO98/45331 y US2003/0190317. En una realización, el anticuerpo variante es aquel que muestra por lo menos aproximadamente 10 veces, preferiblemente por lo menos aproximadamente 20 veces, y lo más preferiblemente por lo menos aproximadamente 50 veces, mayor actividad biológica cuando se compara con el anticuerpo parental.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

**[0065]** El anticuerpo "parental" aquí es aquel que es codificado por una secuencia de aminoácidos utilizada para la preparación de la variante. Preferiblemente, el anticuerpo parental presenta una región armazón humana y, si está presente, presenta una región o regiones constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

5 **[0066]** Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos terapéuticos o de diagnóstico para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el anticuerpo (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo determinado por el método de Lowry, y lo más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

10 **[0067]** El término "epítipo etiquetado", cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo anti-VEGF fusionado a un "epítipo etiqueta". El polipéptido epítipo etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítipo contra el que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del anticuerpo de VEGF. El epítipo etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 9 y 30 residuos de aminoácidos). Entre los ejemplos se incluyen el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)]. En ciertas realizaciones, el epítipo etiqueta es un "epítipo de unión a receptor de rescate". Tal como se utiliza aquí, el término "epítipo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable del incremento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula IgG.

20 **[0068]** Un "factor o agente angiogénico" es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, induce la angiogénesis, crecimiento de células endoteliales, estabilidad de vasos sanguíneos, y/o vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia de VEGF, PlGF, familia de PDGF, familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs), ligandos TIE (Angiopoietinas), efrinas, ANGPTL3, ANGPTL4, etc. También se incluirían factores que aceleran la curación de heridas, tales como la hormona del crecimiento, factor-I de crecimiento de tipo insulina (IGF-I), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de su familia, y TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53: 217-39 (1991); Streit y Detmar, Oncogene, 22: 3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5 (12):1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22: 6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1 que enumera factores angiogénicos); y Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003).

30 **[0069]** Un "agente anti-angiogénesis" o "inhibidor de angiogénesis" se refiere a una sustancia de peso molecular pequeño, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugado o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis, o permeabilidad vascular indeseable, ya sea directa o indirectamente. Por ejemplo, un agente anti-angiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista para una agente angiogénico, tal como se define anteriormente, por ejemplo, anticuerpos para VEGF, anticuerpos para receptores de VEGF, moléculas pequeñas que bloquean la señalización de receptor de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668). Los agente anti-angiogénesis también incluyen inhibidores de angiogénesis nativos, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003) (por ejemplo, la Tabla 3 que lista la terapia anti-angiogénica en melanoma maligno); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22: 6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 2 que enumera factores antiangiogénicos); y, Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1 enumera los agentes anti-angiogénicos utilizados en pruebas clínicas).

40 **[0070]** El término "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco efectiva para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso, de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la cantidad efectiva del fármaco puede reducir o prevenir la pérdida de visión. Para la terapia para AMD, la eficacia *in vivo*, se puede medir, por ejemplo, mediante uno o más de los siguientes: valorar el cambio promedio en la agudeza visual con la mejor corrección (BCVA) desde la línea base hasta un punto de tiempo deseado, valorar la proporción de sujetos que pierden menos de 15 letras de agudeza visual en un punto de tiempo deseado en comparación con la línea base, valorar la proporción de sujetos que ganan más o las mismas 15 letras de agudeza visual en un punto de tiempo deseado en comparación con la línea base, valorar la proporción de sujetos con una agudeza visual Snellen equivalente de 20/2000 o peor en un punto de tiempo deseado, valorar el Cuestionario de Funcionamiento Visual NEI, valorar el tamaño de CNV y la cantidad de pérdida de CNV en un punto de tiempo deseado, mediante angiografía de fluoresceína, etc.

**[0071]** Una dosis terapéutica es una dosis que muestra un efecto terapéutico en el paciente y una dosis subterapéutica es una dosis que no muestra un efecto terapéutico en el paciente tratado. Una “enfermedad neovascular intraocular” es una enfermedad caracterizada por la neovascularización ocular. Entre los ejemplos de enfermedades neovasculares intraoculares se incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, retinopatías proliferativas, neovascularización coroidal (CNV), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), retinopatías diabética y otras relacionadas con isquemia, edema macular diabética, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, Oclusión de Vena Retinal Central (CRVO), neovascularización corneal, neovascularización retinal, etc.

**[0072]** La palabra "marcador", cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

**[0073]** Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas comprendidas en la presente invención incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), de polisacáridos (por ejemplo, agarosa), de poliacrilamidas, de poliestireno, de polivinil alcohol y de siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tal como las descritas en la patente de Estados Unidos no. 4.275.149.

**[0074]** Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como los anticuerpos anti-VEGF) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

#### MODOS DE LA INVENCIÓN

**[0075]** Se ha descubierto que los efectos de tratamiento de un antagonista de VEGF, por ejemplo, Ranibizumab, se mantienen durante un periodo largo de tiempo, tal como más de un mes. El tratamiento con el antagonista de VEGF también se halló que era bien tolerado hasta 2 años. La presente invención describe una programación de tratamiento que comprende un intervalo inicial de administración de un compuesto terapéutico, seguido de un intervalo posterior menos frecuente de administración del compuesto terapéutico. La presente invención permite disminuir las dosis posteriores del compuesto terapéutico, a la vez que se mantiene la eficacia terapéutica.

**[0076]** El compuesto terapéutico que se administra utilizando la programación de tratamiento de la presente invención es un antagonista de VEGF, preferiblemente un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, Ranibizumab). VEGF es una proteína homodimérica secretada que es un potente mitógeno de células endoteliales vasculares (Ferrara N, Davis Smyth T. Endocr Rev 18: 1-22 (1997)). VEGF estimula el crecimiento de células endoteliales vasculares, funciona como un factor de supervivencia para vasos recién formados e induce la permeabilidad vascular. La expresión de VEGF se sobregula mediante hipoxia, así como mediante un conjunto de otros estímulos.

**[0077]** Los efectos terapéuticos de un antagonista de VEGF se proporcionan mediante la administración del antagonista según la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones.

**[0078]** El término “terapéutico” en este contexto dignifica que los compuestos se unen al ligando, VEGF, y producen un cambio en los síntomas o condiciones asociados con la enfermedad o patología que se trata. Es suficiente que una dosis terapéutica produzca un cambio incremental en los síntomas o condiciones asociados con la enfermedad; no es necesaria una cura o remisión completa de los síntomas. Un experto en la materia puede determinar fácilmente si una dosis es terapéutica mediante el establecimiento de criterios para medir cambios en los síntomas o condiciones de la enfermedad que se trata y, a continuación, la monitorización de los cambios en estos criterios según métodos conocidos. Las condiciones físicas externas, el examen histológico de los tejidos afectados en pacientes o la presencia o ausencia de células o compuestos específicos, asociados con una enfermedad, pueden proporcionar criterios objetivos para evaluar el efecto terapéutico. En un ejemplo, los métodos de la invención se pueden utilizar para tratar AMD donde el efecto terapéutico se valora mediante los cambios en la prevención de la pérdida de visión. Otros indicadores del efecto terapéutico serán fácilmente claros para un experto en la materia y se pueden utilizar para establecer la eficacia de la dosis. Véase también la sección titulada aquí, “Eficacia del tratamiento”.

**[0079]** Sujeto a los requisitos de las reivindicaciones, las dosis se pueden administrar según cualquier programación de tiempo que sea apropiado para el tratamiento de la enfermedad o patología.

**[0080]** Las dosis se pueden administrar antes, durante o después del desarrollo del trastorno. La programación de tiempo específica se puede determinar fácilmente por un médico experto en la administración del compuesto terapéutico mediante ajustes rutinarios de la programación de la dosis en el método de la presente invención. El tiempo de administración del conjunto de segundas dosis individuales, así como las posteriores dosis se ajusta para minimizar los efectos adversos manteniendo un efecto terapéutico máximo. La aparición de efectos adversos se puede monitorizar mediante entrevistas rutinarias a los pacientes y se ajustan para minimizar la aparición de efectos secundarios mediante el ajuste del tiempo de dosificación. Cualquier tiempo de dosificación debe considerarse en el alcance de la presente

invención, siempre que se administren tres primeras dosis individuales del antagonista de VEGF en intervalos mensuales seguido de un conjunto de segundas dosis individuales, que se administran menos frecuentemente, tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, las dosis se pueden administrar en una programación mensual seguidas de una posterior programación trimestral o más dosis. Las dosis de mantenimiento también son contempladas por la invención.

**[0081]** La segunda dosis se administra menos frecuentemente, por ejemplo, en intervalos de tres meses.

**[0082]** En una realización de la invención, el conjunto de primeras dosis individuales y el conjunto de segundas dosis individuales se administran durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 años. También se incluyen en la invención periodos de tiempo más cortos de 2 años.

**[0083]** La presente invención es diferente de los métodos de dosificación previos para el tratamiento de enfermedades neovasculares intraoculares, tales como la degeneración macular relacionada con la edad de forma húmeda, que generalmente se tratan con dosis uniforme con espaciado regular de un compuesto terapéutico. Por ejemplo, el Ranibizumab (rhuFab V2), que es un Fab madurado por afinidad de VEGF antihumano se ha administrado en dosis iguales mensuales (aproximadamente 28 días) de 0,3 mg ó 0,5 mg. En cambio, el método de la invención proporciona un conjunto de primeras dosis individuales que están habitualmente espaciadas de forma uniforme seguidas de un conjunto de segundas dosis individuales que se administran menos frecuentemente.

**[0084]** El paciente recibe una dosis inicial del antagonista de VEGF. Dado que los efectos del tratamiento con antagonista de VEGF se mantienen durante más de un mes, el paciente puede recibir menos dosis frecuentes del compuesto terapéutico en dosis posteriores. Sin embargo, es posible proporcionar más dosis frecuentes, en el alcance de la invención, a pacientes que no experimentan efectos en la primera administración.

**[0085]** La cantidad de dosificación depende de la enfermedad o patología específica que se trata y se puede determinar fácilmente utilizando técnicas de ajuste de dosis conocidas por un médico experto en el tratamiento de la enfermedad o patología. La cantidad de dosificación se encontrará generalmente con una ventana terapéutica establecida para el compuesto terapéutico que proporcionará un efecto terapéutico minimizando a la vez la morbilidad y mortalidad adicional. Habitualmente, los compuestos terapéuticos se administran en una dosificación que varían desde 0,001 mg a aproximadamente 100 mg por dosis, preferiblemente 0,1-20 mg.

**[0086]** También en el alcance de la presente invención se encuentran dosis adicionales, que se pueden administrar después del conjunto de primeras dosis individuales y después del conjunto de segundas dosis individuales. Por ejemplo, se puede administrar un tercer conjunto adicional de dosis.

**[0087]** Habitualmente, el compuesto terapéutico utilizado en los métodos de la presente invención se formula mezclándolo a temperatura ambiente al pH apropiado y en el grado de pureza deseado, con portadores fisiológicamente aceptables, es decir, portadores que no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas. El pH de la formulación depende principalmente del uso particular y la concentración de antagonista, pero preferiblemente varía desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 8. Cuando el compuesto terapéutico es un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, ranibizumab), una realización adecuada es una formulación a aproximadamente pH 5,5.

**[0088]** El compuesto terapéutico, por ejemplo un anticuerpo anti-VEGF, para utilizar aquí es preferiblemente estéril. La esterilidad se puede conseguir fácilmente mediante filtración estéril a través de membranas (0,2 micras). Preferiblemente, los péptidos y proteínas terapéuticas se almacenan como soluciones acuosas, aunque son aceptables formulaciones liofilizadas para reconstitución.

**[0089]** El compuesto terapéutico se puede formular, dosificar y administrar de una manera consistente con las buenas prácticas médicas. Los factores para considerar en este contexto incluyen el trastorno particular en tratamiento, el mamífero particular en tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el punto de liberación del agente, el método de administración, la programación de tiempo para la administración, y otros factores conocidos para los expertos médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto terapéutico a administrar está gobernada por dichas consideraciones y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar una enfermedad neovascular intraocular.

**[0090]** El compuesto terapéutico para el tratamiento de una enfermedad neovascular intraocular se administra mediante inyección intravítrea.

**[0091]** Tal como se describe aquí, el compuesto terapéutico para el tratamiento de un síndrome neovascular intraocular se puede formular, dosificar, y administrar de una manera consistente con las buenas prácticas médicas.

**[0092]** La eficacia del tratamiento de la invención se puede medir mediante varios puntos finales utilizados habitualmente en la evaluación de enfermedades neovasculares intraoculares. Por ejemplo, se puede evaluar la pérdida de visión. La pérdida de visión se puede evaluar mediante, pero sin limitación, por ejemplo, midiendo el cambio promedio en la agudeza visual con la mejor corrección (BCVA) desde la línea base hasta un punto de tiempo deseado (por ejemplo, cuando la BCVA se basa en la tabla de agudeza visual del Estudio del Tratamiento Precoz de la Retinopatía Diabética (ETDRS) y la valoración a una distancia de prueba de 4 metros), midiendo la proporción de

- 5 sujetos que pierden menos de 15 letras de agudeza visual en un punto de tiempo deseado en comparación con la línea base, midiendo la proporción de sujetos que ganan más o las mismas 15 letras de agudeza visual en un punto de tiempo deseado en comparación con la línea base, midiendo la proporción de sujetos con una agudeza visual Snellen equivalente de 20/2000 o peor en un punto de tiempo deseado, midiendo el Cuestionario de Funcionamiento Visual NEI, midiendo el tamaño de CNV y la cantidad de pérdida de CNV en un punto de tiempo deseado, por ejemplo, mediante angiografía de fluoresceína, etc. Las valoraciones oculares se pueden realizar, por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, realizar un examen del ojo, medir la presión intraocular, valorar la agudeza visual, medir la presión con una lámpara de hendidura, valorar la inflamación intraocular, etc.
- 10 **[0093]** Cualquier compuesto que se una a VEGF o un receptor de VEGF y reduzca la gravedad de los síntomas o condiciones asociados con una enfermedad neovascular intraocular se puede utilizar en esta realización de la invención. Los compuestos preferidos son compuestos de péptidos o proteínas, más preferiblemente son compuestos que son o que contienen un anticuerpo o fragmento del mismo o que son fusiones a un fragmento de anticuerpo, tal como una inmunoadhesina. Los compuestos particularmente preferidos son anticuerpos anti-VEGF o compuestos que contienen fragmentos de los mismos.
- 15 **[0094]** El VEGF se expresa en una variedad de células en la retina humana normal. La colocación de ARNm de VEGF y proteína se observa en la célula de ganglios, capas nuclear interna y plexiforme externa, las paredes de los vasos sanguíneos, y fotorreceptores (Gerhardinger et al., *Am J Pathol* 152:1453-62 (1998)). El epitelio de pigmento retinal, las células de Muller, pericitos, endotelio vascular, y células de ganglios producen todos VEGF (Miller et al., *Diabetes Metab Rev* 13: 37-50 (1997); y Kim et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2115-21 (1999)).
- 20 **[0095]** Estudios han documentado la localización inmunohistoquímica de VEGF en membranas de CNV extirpadas quirúrgicamente de pacientes con AMD. Kvantá et al. (1996) demostraron la presencia de ARNm y proteína de VEGF en células de RPE y células de tipo fibroblasto. Véase Kvantá et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:1929-34 (1996). Lopez et al. (1996) observaron que las células de RPE que eran fuertemente inmunoreactivas para VEGF estaban presentes principalmente en regiones altamente vascularizadas de membranas de CNV, mientras que las células de RPE halladas en regiones fibróticas de membranas de CNV mostraron poca reactividad de VEGF. Véase, Lopez et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:855-68 (1996). Kliffen et
- 25 al. (1997) también demostraron una expresión de VEGF aumentada en células RPE y vasos sanguíneos coroidales en las máculas de pacientes con AMD húmeda en comparación con los controles. Véase Kliffen et al., *Br J Ophthalmol* 81:154-62 (1997).
- 30 **[0096]** Se ha observado un incremento en la expresión de VEGF en modelos experimentales de CNV en ratas y en primates no humanos (Husain et al., *Ophthalmology* 104: 124250 (1997); y, Yi et al. *Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235:313-9 (1997)). Además, ratones transgénicos con una expresión de VEGF aumentada en fotorreceptores (Okamoto et al. 1997, supra) o en el epitelio de pigmento retinal (Schwesinger et al., *AM J Pathol*. 158(3):1161-72 (2001)) desarrollaron una neovascularización reminiscente de CNV observada en humanos con AMB neovascular. Esto apoya adicionalmente la implicación del VEGF en la neovascularización ocular.
- 35 **[0097]** De particular relevancia para AMD húmeda son las propiedades angiogénicas de VEGF, que se han demostrado en un conjunto de modelos in vivo, incluyendo la membrana corioalantoica de pollo (Leung et al., *Science* 246: 1306-9 (1989); y, Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. *EMBO J* 8:3801-6 (1989)), córnea de conejo (Phillips et al., *In Vivo* 8:961-5 (1994)), y hueso de conejo (Connolly et al. *J Clin Invest* 84:1470-8 (1989a)). El VEGF también actúa como factor de supervivencia para células endoteliales recién formadas (Dvorak HF. *N Engl J Med* 315:1650-9 (1986); y, Connolly et al. *J Biol Chem* 264:20017-24 (1989b)). De acuerdo con la actividad pro-supervivencia, el VEGF induce la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl 2 y A1 en células endoteliales humanas (Connolly et al. *J Biol Chem* 264:20017-24 (1989b)).
- 40 **[0098]** Se ha observado que el VEGF induce la pérdida vascular en piel de cobaya (Connolly et al. *J Biol Chem* 264: 20017-24 (1989b)). Dvorak (1986) y colaboradores (1987) propusieron que un incremento en la permeabilidad microvascular es una etapa crucial en la angiogénesis asociada con tumores y la curación de heridas. Dvorak HF. *N Engl J Med* 315:1650-9 (1986); y, Dvorak et al., *Lab Invest* 57: 673-86 (1987). La función principal de VEGF en el proceso angiogénico puede ser la inducción de la pérdida de proteína de plasma. Este efecto daría lugar a la formación de un gel de fibrina extravascular, el cual sirve como sustrato para células endoteliales. Esta actividad puede presentar relevancia para AMD, ya que está bien establecido que la permeabilidad de las membranas de CNV da lugar a la transudación de los componentes del suero bajo la retina y en la misma, conduciendo a un desprendimiento macular seroso, edema macular y pérdida de visión.
- 45 **[0099]** De este modo, los antagonistas de VEGF son buenos compuestos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neovasculares intraoculares.
- 50 **[0100]** Muchos compuestos terapéuticos son conocidos por ejercer un efecto terapéutico al unirse a un marcador o receptor o ligando de la superficie de células selectivas. Estos compuestos terapéuticos conocidos, por ejemplo, agentes anti-angiogénesis, son evidentes para un experto en la materia y se pueden utilizar en el método de la presente

invención. Entre los compuestos terapéuticos adecuados se incluyen compuestos orgánicos no peptídicos, preferiblemente que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 g/mol, más preferiblemente menos de aproximadamente 600 g/mol; compuestos terapéuticos peptídicos, que contienen generalmente de 8 a aproximadamente 200, preferiblemente aproximadamente 15 a aproximadamente 150, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos; y compuestos terapéuticos proteicos que tienen en general estructura secundaria, terciaria y posiblemente cuaternaria. Los compuestos peptídicos adecuados se pueden preparar mediante síntesis en fase sólida conocida o tecnología de ADN recombinante que son conocidos en la técnica.

**[0101]** Un método particularmente preferido de selección de un compuesto peptídico es a través de la utilización de la tecnología de expresión en fagos. Utilizando métodos de expresión en fagos conocidos, se preparan bibliotecas o péptidos o proteínas en que una o más copias de péptidos o proteínas individuales se expresan en la superficie de una partícula bacteriófago. El ADN que codifica el péptido o la proteína particular está dentro de la partícula fago. Los péptidos o proteínas expresados en la superficie están disponibles para la interacción y la unión a moléculas diana que generalmente están inmovilizadas en un soporte sólido, tal como una placa de 96 pocillos o material de soporte de columna de cromatografía. La unión y/o interacción del péptido o proteína de expresión con una molécula diana bajo condiciones de cribado seleccionadas permiten la selección de elementos de la biblioteca que se unen o reaccionan con la molécula diana bajo condiciones seleccionadas. Por ejemplo, se pueden seleccionar péptidos que se unen bajo condiciones de pH o iónicas particulares. Alternativamente, se puede inmovilizar una población de células diana en una superficie sólida utilizando técnicas conocidas y se puede cribar la biblioteca de fagos de péptido o proteína contra las células inmovilizadas para seleccionar péptidos o proteínas que se unen a receptores de la superficie celular en la población de células diana. Se describen técnicas de expresión de fagos, por ejemplo en las patentes de Estados Unidos Nos. 5,750,373; 5,821,047; 5,780,279; 5,403,484; 5,223,407; 5,571,698; y otras.

**[0102]** Una categoría de compuestos polipeptídicos son compuestos que contienen un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconocen inmunológicamente y se unen a receptores o ligandos de la superficie celular. Los métodos de preparación de anticuerpo son conocidos en la técnica y se han realizado durante muchos años. Se pueden preparar anticuerpos adecuados utilizando la tecnología de hibridoma convencional o mediante métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos preferidos son formas humanizadas de anticuerpos no humanos. Alternativamente, los anticuerpos se pueden preparar a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos utilizando métodos descritos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5,565,332; 5,837,242; 5,858,657; 5,871,907; 5,872,215; 5,733,743, y otras. Los compuestos adecuados incluyen anticuerpos de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos F<sub>v</sub>, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> que se pueden preparar mediante la modificación del formato de los anticuerpos de longitud completa utilizando métodos conocidos.

**[0103]** Los compuestos terapéuticos polipeptídicos preferidos adicionales son moléculas inmunoadhesina también conocidas como inmunoglobulinas híbridas. Estos polipéptidos son útiles como moléculas de adhesión celular y ligandos y también son útiles en composiciones y métodos terapéuticos o de diagnóstico. Una inmunoadhesina contiene habitualmente una secuencia de aminoácidos de una proteína compañera de unión a ligando en su extremo C terminal al extremo N terminal de una secuencia de región constante de inmunoglobulina. Las inmunoadhesinas y métodos de preparación de los mismos se describen en las patentes de Estados Unidos Nos. 5,428,130; 5,714,147; 4,428,130; 5,225,538; 5,116,964; 5,098,833; 5,336,603; 5,565,335; etc.

40 Composiciones farmacéuticas

**[0104]** Los compuestos terapéuticos de la invención utilizados según la presente invención se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla de un polipéptido o polipéptidos que tienen el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16<sup>a</sup> Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas o formulaciones liofilizadas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilenglicol (PEG).

**[0105]** Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización entre fases, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16<sup>a</sup> Edición, Osol, A. Ed. (1980).

**[0106]** Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

**[0107]** Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. En una realización de la invención, se puede utilizar un implante intraocular para proporcionar el antagonista de VEGF. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen un polipéptido de la invención, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico liberan las moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un largo tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, el uso de aditivos apropiados y el desarrollo de composiciones específicas de la matriz de polimérica.

## EJEMPLOS

Ejemplo 1: Pauta de dosificación

**[0108]** Este estudio valora la eficacia y la seguridad de inyecciones intravítreas del antagonista de VEGF (por ejemplo, ranibizumab) administrada mensualmente para 3 dosis seguidas de dosis cada 3 meses en comparación con inyecciones simuladas administradas en la misma programación en sujetos con neovascularización corooidal subfoveal (CNV) primaria o recurrente con o sin un componente de CNV clásica secundaria a AMD.

**[0109]** En este estudio, dos grupos de tratamiento reciben múltiples dosis intravítreas de antagonista de VEGF de 0,3 mg a 0,5 mg durante 24 meses. Véase la figura 1. Cada dosis del antagonista de VEGF se administra cada mes para 3 dosis (día 0, mes 1 y mes 2) seguido de dosis cada 3 meses (meses 5, 8, 11, 14, 17, 20, y 23) hasta la terminación del estudio. Véase la figura 2. Los sujetos aleatorios sometidos a inyección simulada siguen la misma programación que los sujetos que reciben ranibizumab. Durante el periodo de estudio de 24 meses, se pueden administrar un total de 10 inyecciones con ranibizumab o 10 inyecciones simulada. Habitualmente, la dosificación no tiene lugar antes de los 14 días después del tratamiento previo. Si se pospone o se pierde una dosis, opcionalmente se puede administrar en los 14 días después del tratamiento previo durante el periodo de inyección mensual o en los 45 días después del tratamiento previo durante el periodo de dosificación de 3 meses. Se administra un máximo de 10 dosis de fármaco de estudio durante este estudio. El ranibizumab se administra en un solo ojo (ojo de estudio) durante este estudio.

**[0110]** Un ejemplo de un antagonista de VEGF es ranibizumab (LUCENTIS™). Ranibizumab (rhuFab V2) es un fragmento de Fab de VEGF anti-humano humanizado madurado para afinidad. El ranibizumab se produce mediante métodos de tecnología recombinante estándar en el vector de expresión de Escherichia coli y fermentación bacteriana. El ranibizumab no está glicosilado y tiene una masa molecular de ~ 48.000 daltons. Véase WO98/45331 y US20030190317.

**[0111]** Inyección de Ranibizumab: Para la administración intravítrea, el fármaco de estudio, ranibizumab, se suministra en un vial lleno de líquido de ranibizumab. Cada vial contiene 0,7 mL de 6 mg/mL (nivel de dosis de 0,3 mg) o 10 mg/mL (nivel de dosis de 0,5 mg) de solución acuosa de ranibizumab (pH 5,5) con histidina 10 mM, 100 mg/mL de trehalosa, y polisorbato 20 al 0,01%. Todos los fármacos de estudio se almacenan a 2°C-8°C (36°F-46°F), y no deben congelarse. El fármaco debe estar en viales protegidos de la luz solar directa.

**[0112]** Los procedimientos se implementan para minimizar el riesgo de potenciales sucesos adversos asociados con inyecciones intraoculares en serie (por ejemplo, endoftalmítis). La técnica aséptica se observa para el ensamblaje de bandejas de inyección, preparación anestésica y administración, y preparación del fármaco de estudio y administración.

**[0113]** Se realizan inyecciones intravítreas mediante el practicante siguiendo el examen con lámpara de hendidura. Después de limpiar el párpado, la pestaña y el área periorbital con un antiséptico, se puede administrar anestesia local y antimicrobianos antes de la inyección del fármaco de estudio.

**[0114]** Se inserta una aguja de calibre 30 pulgadas a una jeringuilla de volumen bajo (por ejemplo, tuberculina) que contenía 50  $\mu$ g de la solución de fármaco de estudio a través de la conjuntiva y la esclerótica, aproximadamente 3,5-4,0 mm posterior al limbo, evitando el meridiano horizontal y dirigiéndose hacia el centro del globo. El volumen de inyección debe liberarse lentamente. A continuación, se extrae la aguja lentamente para asegurar que toda la solución de fármaco está en el ojo. Inmediatamente después de la inyección intraocular, se pueden administrar gotas antimicrobianas y el

sujeto es instruido para que se autoadministre gotas antimicrobianas cuatro veces al día durante 3 días después de cada inyección intraocular de ranibizumab. El sitio escleral para las posteriores inyecciones intravítreas debe rotar.

5 **[0115]** Inyección simulada: El practicante realiza los mismos procedimientos de limpieza y anestesia antes de la inyección (incluyendo la inyección por debajo de la conjuntiva de la anestesia) indicada anteriormente para sujetos que reciben ranibizumab. Se utiliza una jeringuilla vacía sin aguja en la inyección simulada. El practicante mimetiza una inyección intraocular mediante el contacto con la conjuntiva y la aplicación de presión sin la aguja. Inmediatamente después de la inyección simulada, el practicante realiza los mismos procedimientos después de la inyección que los realizados en sujetos que reciben ranibizumab.

10 **[0116]** Procedimientos de preinyección para todos los sujetos (inyección de Raninizumab o simulada): Los siguientes procedimientos se pueden implementar para minimizar el riesgo de potenciales sucesos adversos asociados con inyecciones intravítreas en serie (por ejemplo, endoftalmitis). La técnica aséptica se observa para el ensamblaje de bandejas de inyección, preparación anestésica, y preparación del fármaco de estudio y administración. Los siguientes procedimientos (excepto cuando se indique) pueden ser realizados por el médico realizando la inyección intravítrea de ranibizumab o la inyección simulada. Los sujetos reciben antimicrobianos

15 **[0117]** (por ejemplo, solución oftálmica de ofloxacina o solución oftálmica de polimixina B y trimetoprima) para la autoadministración cuatro veces al día diariamente durante 3 días antes del tratamiento.

20 • Se juntan los suministros y se prepara un campo estéril. Los suministros pueden incluir hisopos de yoduro de povidona al 10%, guantes quirúrgicos estériles, almohadillas estériles 4x4, paquete de aplicadores con punta de algodón estéril, espéculo de párpado, sábana oftálmica estéril, clorhidrato de proparacaína al 0,5%, solución oftálmica de yoduro de povidona al 5%, lidocaína al 1% para inyección, solución antimicrobiana oftálmica (por ejemplo, solución oftálmica de ofloxacina o solución oftálmica de polimixina B y trimetoprima, vial de uso único), y suministros de inyección.

• Se instilan dos gotas de clorhidrato de proparacaína al 0,5% en el ojo de estudio, seguido de 2 gotas de una solución antimicrobiana de amplio espectro (por ejemplo, solución oftálmica de ofloxacina o solución oftálmica de polimixina B y trimetoprima, vial de uso único).

25 • Se desinfectan la piel periocular y el párpado del ojo de estudio en preparación para la inyección. El párpado, las pestañas y la piel periorbital se frota con hisopos de yoduro de povidona al 10%, empezando con el párpado y las pestañas y se continúa con la piel periocular circundante. Los márgenes de los párpados y las pestañas se frota, por ejemplo, de manera sistemática, desde aspectos mediales a temporales.

30 • Se puede colocar una sábana oftálmica estéril para aislar el campo, y el espéculo se puede colocar bajo el párpado del ojo de estudio.

• Se instilan 2 gotas de solución oftálmica de yoduro de povidona al 5% en el ojo de estudio, asegurando que las gotas cubren el sitio de inyección planeado en la conjuntiva.

• Esperar 90 segundos.

35 • Se satura un aplicador con punta de algodón estéril con gotas de clorhidrato de proparacaína al 0,5% y el hisopo se mantiene contra el sitio de inyección intravítrea planeado durante 10 segundos en la preparación para la inyección subconjuntival de una solución oftálmica de clorhidrato de lidocaína al 1% para la inyección (sin epinefrina).

• Se inyecta de manera subconjuntiva lidocaína al 1% (sin epinefrina).

• Se puede utilizar una almohadilla 4x4 estéril en una única pasada para absorber el líquido en exceso y secar la piel periocular.

40 • El sujeto se instruye para dirigir la mirada a otro lado de la jeringuilla antes de la inyección de ranibizumab o simulada.

**[0118]** Instrucciones de preparación y administración de Ranibizumab: La inyección de ranibizumab se puede preparar tal como se indica aquí. Las soluciones de las dosis se preparan habitualmente inmediatamente antes de la dosificación. Las soluciones de dosificación son habitualmente sólo para usos únicos.

45 **[0119]** Después de la preparación del ojo de estudio tal como se ha indicado anteriormente, se extraen 0,2 ml de una solución de dosis de ranibizumab a través de una aguja del filtro de 5 µm. La aguja de filtro se extrae y se sustituye por una aguja de calibre de 30 pulgadas Precision Glide®, y se expulsa el exceso de ranibizumab, de manera que la jeringuilla contiene 0,05 ml de solución de ranibizumab. La jeringuilla se inserta a través de un área de 3,5-4,0 mm posterior al limbo, evitando el meridiano horizontal y dirigiéndose hacia el centro del globo. El volumen de inyección debe liberarse lentamente. A continuación, se extrae la aguja lentamente para asegurar que aproximadamente toda la solución de fármaco está en el ojo. El sitio escleral para inyecciones intravítreas posteriores debe rotar. Véase la siguiente sección para procedimientos posteriores a la inyección detallados.

50 **[0120]** El sujeto se puede monitorizar con un test de recuento de dedos para el ojo de estudio en, por ejemplo, 15 minutos desde la inyección de ranibizumab. Se puede obtener una medición de presión intraocular del ojo de estudio,

por ejemplo, 60 minutos ( $\pm$  10 minutos) después de la inyección de ranibizumab.

5 **[0121]** Procedimientos posteriores a la inyección para todos los sujetos: Inmediatamente después de la inyección de ranibizumab o simulada, se instilan 2 gotas de gotas antimicrobianas (por ejemplo, solución oftálmica de ofloxacina o solución oftálmica de polimixina B y trimetoprima, vial de uso único) en el ojo de estudio. El sujeto se instruye para autoadministrarse gotas antimicrobianas (por ejemplo, solución oftálmica de ofloxacina o solución oftálmica de polimixina B y trimetoprima, vial de uso único) cuatro veces diarias durante 3 días después de cada inyección (ranibizumab o simulada).

**[0122]** Preparación y administración de la inyección simulada: Véase anteriormente para las instrucciones detalladas para los procedimientos de preinyección.

10 **[0123]** Los sujetos que reciben las inyecciones simuladas no reciben una inyección real del fármaco de estudio. El médico sigue los procedimientos para la limpieza y la anestesia del ojo de estudio tal como se ha indicado anteriormente. El sujeto debe instruirse para dirigir su mirada a otro lado de la jeringuilla antes de la administración de la inyección simulada. El émbolo de la jeringuilla de tuberculina se extrae hasta la marca de 0,05 ml en la jeringuilla, a continuación se coloca el centro de la jeringuilla sin agujas contra la superficie conjuntival preanestesiada. El centro de la jeringuilla se presiona firmemente contra el globo y a continuación el émbolo se levanta lentamente, imitando la acción de una inyección intravítrea.

**[0124]** Para las posteriores inyecciones simuladas, se sigue el procedimiento de rotación de la localización del sitio de inyección, tal como se realiza con las inyecciones de ranibizumab. Véase anteriormente para procedimientos después de la inyección detallados.

20 **[0125]** El sujeto se puede monitorizar utilizando un test de recuento de dedos en, por ejemplo, 15 minutos desde la inyección simulada. Se puede obtener una medición de la presión intraocular, por ejemplo, 60 minutos ( $\pm$  10 minutos) después de la inyección simulada.

25 **[0126]** La seguridad se valora por la incidencia de sucesos adversos oculares y no oculares, incluyendo, pero sin limitación, sucesos adversos serios, valoraciones oculares, muertes, resultados de pruebas de laboratorio, señales vitales, anticuerpos para Ranibizumab, inflamación ocular, agudeza visual, presión intraocular, presión con lámpara de hendidura, oftalmoscopia indirecta, angiografía con fluoresceína, fotografía del fondo del ojo, hemorragia vítrea, rotura o desprendimiento retinal regmatógeno sensorial (incluyendo hueco macular), hemorragia subfoveal, infección local o sistémica, cirugía intraocular, etc. En una realización, si se administró PDT verteporfina en los últimos 28 días, se pospone la inyección de ranibizumab/simulada. La eficacia se valora mediante cambios en la prevención de la pérdida visual, por ejemplo, medida mediante el cambio promedio en la agudeza visual de mejor corrección (BCVA) desde la línea base hasta 12 meses o 24 meses (cuando la BCVA se basa en la tabla de la agudeza visual del Estudio del Tratamiento Precoz de la Retinopatía Diabética (ETDRS) y la valoración en un test a distancia de 4 metros), otros medios incluyen, pero sin limitación, la medición de la proporción de sujetos que pierden menos de 15 letras de agudeza visual a los 12 meses o 24 meses en comparación con la línea base, la medición de la proporción de sujetos que ganan más o las mismas 15 letras de agudeza visual a los 12 meses o 24 meses en comparación con la línea base, la medición de la proporción de sujetos con una agudeza visual Snellen equivalente de 20/2000 o peor a los 12 meses o 24 meses, la medición del Cuestionario de Funcionamiento Visual NEI, la medición del tamaño de CNV y la cantidad de pérdida de CNV a los 12 meses o 24 meses, por ejemplo, mediante angiografía de fluoresceína, etc.

**REIVINDICACIONES**

1. Antagonista de VEGF para utilizar en un método de tratamiento de enfermedades neovasculares intraoculares en un humano mediante administración intravítrea, comprendiendo el método:
- a) administrar tres primeras dosis individuales del antagonista de VEGF en intervalos de un mes; seguido de
  - 5 b) administrar seis segundas dosis individuales del antagonista, en el que:
    - i) las segundas dosis individuales se administran menos frecuentemente que las primeras dosis individuales,
    - ii) las tres primeras dosis individuales y las seis segundas dosis individuales se administran durante un periodo de dos años o menos, y
    - 10 iii) el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF, un receptor de VEGF o derivado de los mismos que se une a VEGF o a VEGF-Trap.
2. Antagonista de VEGF según la reivindicación 1, en el que la enfermedad neovascular intraocular es la degeneración macular relacionada con la edad de forma húmeda.
3. Antagonista de VEGF según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.
- 15 4. Antagonista de VEGF según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo anti-VEGF de longitud completa.
5. Antagonista de VEGF según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo anti-VEGF es un fragmento de anticuerpo.
6. Antagonista de VEGF según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo anti-VEGF es un fragmento de anticuerpo Fab.
- 20 7. Antagonista de VEGF según la reivindicación 5, en el que el fragmento de anticuerpo es Y0317.
8. Antagonista de VEGF según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el antagonista de VEGF es un receptor de VEGF o un derivado del mismo que se une a VEGF.
9. Antagonista de VEGF según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el antagonista de VEGF es VEGF-Trap.
- 25 10. Antagonista de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las segundas dosis individuales se administran a intervalos de tres meses.
11. Antagonista de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las segundas dosis individuales se administran empezando tres meses después de las primeras dosis individuales.
- 30 12. Antagonista de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las tres primeras dosis individuales y las seis segundas dosis individuales se administran durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 años.
13. Antagonista de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende administrar dosis adicionales después de las seis segundas dosis individuales.
- 35 14. Utilización de un antagonista de VEGF en la fabricación de un medicamento para utilizar en un método de tratamiento de enfermedades neovasculares intraoculares en un humano mediante administración intravítrea, comprendiendo el método:
- a) administrar tres primeras dosis individuales del antagonista de VEGF en intervalos de un mes; seguido de
  - b) administrar seis segundas dosis individuales del antagonista, en el que:
    - i) las segundas dosis individuales se administran menos frecuentemente que las primeras dosis individuales,
    - 40 ii) las tres primeras dosis individuales y las seis segundas dosis individuales se administran durante un periodo de dos años o menos, y
    - iii) el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF, un receptor de VEGF o derivado de los mismos que se une a VEGF o a VEGF-Trap.
15. Utilización según la reivindicación 14, en la que la enfermedad, el mamífero, la administración y el antagonista son tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.
- 45

Figura 1

# Diseño de prueba

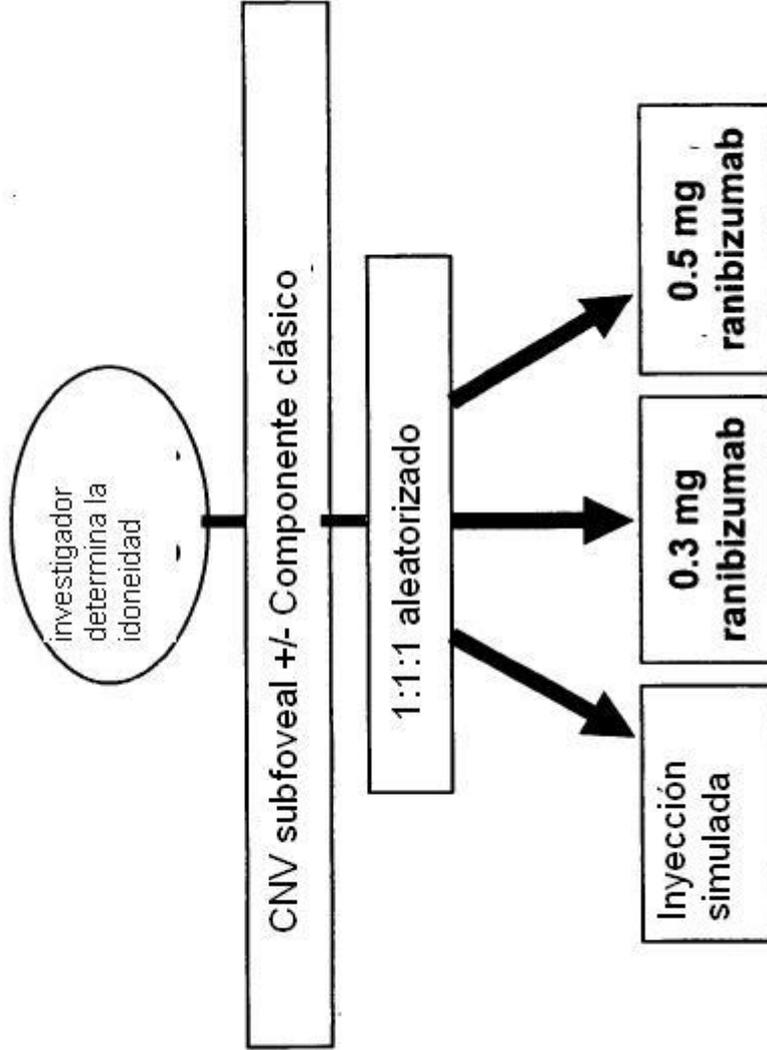


Figura 2

# Esquema de tratamiento

