

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 657**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2010 PCT/US2010/061347**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11084750**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2010 E 10798236 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2515941**

54 Título: **Formulación farmacéutica de bevacizumab**

30 Prioridad:

21.12.2009 US 288535 P

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

10.06.2020

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GOKARN, YATIN, R.;
KAMERZELL, TIMOTHY, J.;
LI, MEGAN;
CROMWELL, MARY y
LIU, HONG**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 765 657 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

Formulación farmacéutica de bevacizumab

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/288.535 presentada el 21 de diciembre de 2009.

10 Campo de la invención

La presente invención está dirigida a una formulación farmacéutica acuosa estable que comprende un anticuerpo.

15 Antecedentes

En los últimos años, los avances en biotecnología han hecho posible producir una variedad de proteínas para aplicaciones farmacéuticas usando técnicas de ADN recombinante. Debido a que las proteínas son más grandes y complejas que los fármacos orgánicos e inorgánicos tradicionales (por ejemplo, poseen múltiples grupos funcionales además de estructuras tridimensionales complejas), la formulación de dichas proteínas plantea problemas especiales. Para que una proteína permanezca biológicamente activa, una formulación debe mantener intacta la integridad conformacional de al menos una secuencia central de los aminoácidos de la proteína y al mismo tiempo proteger los múltiples grupos funcionales de la proteína frente a la degradación. Las vías de degradación de las proteínas pueden implicar inestabilidad química (por ejemplo, cualquier procedimiento que implique la modificación de la proteína mediante la formación o escisión de enlaces que dé como resultado una nueva entidad química) o inestabilidad física (por ejemplo, cambios en la estructura de orden superior de la proteína). La inestabilidad química puede ser el resultado de la desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, eliminación beta o intercambio de disulfuros. La inestabilidad física puede ser el resultado de la desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción, por ejemplo. Las tres vías de degradación de proteínas más comunes son la agregación de proteínas, la desamidación y la oxidación. Cleland *et al. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993).

En las proteínas usadas para aplicaciones farmacéuticas se incluyen anticuerpos. Un ejemplo de un anticuerpo útil para tratamiento es un anticuerpo de unión anti-VEGF. Existe una necesidad en la técnica de una formulación farmacéutica acuosa estable que comprenda un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-VEGF, que sea adecuado para uso terapéutico.

Sumario

La invención proporciona formulaciones farmacéuticas acuosas estables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal humanizado, bevacizumab, opcionalmente, no sometido a liofilización previa, un tampón de acetato de arginina que mantenga el pH en el intervalo de 4,5 a 5,5 y un tensioactivo opcional. Además se divulgan procedimientos para preparar la formulación y procedimientos de uso de la formulación.

En algunos modos de realización, el tampón es un tampón de acetato de arginina, pH 4,8 a 5,4. En algunos modos de realización, el tampón es un tampón de acetato de arginina, pH 5,2. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 240 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 225 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es aproximadamente 200 mM. En algunos modos de realización, la formulación comprende además un tensioactivo. En algunos modos de realización, el tensioactivo es polisorbato. En algunos modos de realización, el polisorbato es polisorbato 20. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de un 0,0001 % a aproximadamente un 1,0 %. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,05 %. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de un 0,04 %. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a 200 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 30 mg/ml a 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente

100 mg/ml. En algunos modos de realización, el anticuerpo no se somete a liofilización previa. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal es susceptible de agregación. En algunos modos de realización, el tampón es acetato de arginina 200 mM, pH 5,2, el tensioactivo es polisorbato en una cantidad de aproximadamente un 0,01-0,1 % v/v y la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 40 °C durante al menos 28 días.

5 En algunos modos de realización, la formulación es estéril. En algunos modos de realización, la formulación es estable tras almacenamiento a aproximadamente 40 °C durante al menos 28 días. En algunos modos de realización, la formulación es acuosa y se administra a un sujeto. En algunos modos de realización, la formulación es para administración intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.). En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a

10 aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos

15 modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml.

Otro modo de realización de la divulgación proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que

30 contiene una formulación farmacéutica acuosa estable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab, un tampón de acetato de arginina de pH 4,5 a 5,5 y un tensioactivo. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a 200 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 30 mg/ml a 175 mg/ml. En algunos modos de

35 realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunos modos de realización, el anticuerpo no se somete a liofilización previa. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal es susceptible de agregación. En algunos modos de

40 realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 100 mM a

45 aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 240 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 225 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es aproximadamente 200 mM. En algunos modos de realización, el tampón de acetato de arginina tiene un pH de aproximadamente 4,8 a

50 aproximadamente 5,4. En algunos modos de realización, el tampón de acetato de arginina tiene un pH de aproximadamente 5,2. En algunos modos de realización, el tensioactivo es polisorbato. En algunos modos de realización, el polisorbato es polisorbato 20. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de un 0,0001 % a aproximadamente un 1,0 %. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,05 %. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de un 0,04 %.

55 En algunos modos de realización, la formulación es estéril. En algunos modos de realización, la formulación es estable tras almacenamiento a aproximadamente 40 °C durante al menos 28 días. En algunos modos de realización, la formulación es acuosa y se administra a un sujeto. En algunos modos de realización, la formulación es para administración intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.). En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de

60 aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a

65 aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos

de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml.

Otra divulgación proporciona un procedimiento para estabilizar un anticuerpo en una formulación farmacéutica acuosa combinando una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab, un tampón de acetato de arginina de pH 4,5 a 5,5 y un tensioactivo. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a 200 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 30 mg/ml a 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunos modos de realización, el anticuerpo no se somete a liofilización previa. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal es susceptible de agregación. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 240 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 225 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es aproximadamente 200 mM. En algunos modos de realización, el tampón de acetato de arginina tiene un pH de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,4. En algunos modos de realización, el tampón de acetato de arginina tiene un pH de aproximadamente 5,2. En algunos modos de realización, el tensioactivo es polisorbato. En algunos modos de realización, el polisorbato es polisorbato 20. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de un 0,0001 % a aproximadamente un 1,0 %. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,05 %. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de un 0,04 %. En algunos modos de realización, la formulación es estéril. En algunos modos de realización, la formulación es estable tras almacenamiento a aproximadamente 40 °C durante al menos 28 días. En algunos modos de realización, la formulación es acuosa y se administra a un sujeto. En algunos modos de realización, la formulación es para administración intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.). En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml.

Aún otro modo de realización de la invención proporciona una formulación farmacéutica acuosa estable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab, tampón de acetato de arginina 200 mM a pH 5,2 y un tensioactivo, en la que el tensioactivo es polisorbato en una cantidad de aproximadamente un 0,01-0,1 % v/v, y en la que la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 40 °C durante al menos 28 días. En

algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a 200 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 30 mg/ml a 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunos modos de realización, el anticuerpo no se somete a liofilización previa. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal es susceptible de agregación. En algunos modos de realización, el polisorbato es polisorbato 20. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de un 0,01 % a un 0,1 %. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de un 0,04 %. En algunos modos de realización, la formulación es estéril. En algunos modos de realización, la formulación es estable tras almacenamiento a aproximadamente 40 °C durante al menos 28 días. En algunos modos de realización, la formulación es acuosa y se administra a un sujeto. En algunos modos de realización, la formulación es para administración intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.). En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml.

Otro modo de realización de la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende: (a) bevacizumab; (b) tampón de acetato de arginina, pH 4,5 a 5,5; y (c) polisorbato 20 en una cantidad de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,1 %. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a 200 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 30 mg/ml a 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunos modos de realización, el anticuerpo no se somete a liofilización previa. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 240 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 225 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es aproximadamente 200 mM. En algunos modos de realización, el tampón de acetato de arginina tiene un pH de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,4. En algunos modos de realización, el tampón de acetato de arginina tiene un pH de aproximadamente 5,2. En algunos modos de realización, el polisorbato 20 es de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,1 %. En algunos modos de realización, el polisorbato 20 es al 0,04 %. En algunos modos de realización, la formulación es estéril. En algunos modos de realización, la formulación es estable tras almacenamiento a aproximadamente 40 °C durante al menos 28 días. En algunos modos de realización, la formulación es acuosa y se administra a un sujeto. En algunos modos de realización, la formulación es para administración intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.). En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la

concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml.

Aún otro modo de realización de la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende bevacizumab en un tampón de acetato de arginina a un pH de 4,5 a 5,5 y un tensioactivo. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a 200 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 30 mg/ml a 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunos modos de realización, el anticuerpo no se somete a liofilización previa. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal es susceptible de agregación. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 240 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 225 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es aproximadamente 200 mM. En algunos modos de realización, el tampón de acetato de arginina tiene un pH de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,4. En algunos modos de realización, el tampón de acetato de arginina tiene un pH de aproximadamente 5,2. En algunos modos de realización, el tensioactivo es polisorbato. En algunos modos de realización, el polisorbato es polisorbato 20. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de un 0,0001 % a aproximadamente un 1,0 %. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,05 %. En algunos modos de realización, la concentración de tensioactivo es de un 0,04 %. En algunos modos de realización, la formulación es estéril. En algunos modos de realización, la formulación es estable tras almacenamiento a aproximadamente 40 °C durante al menos 28 días. En algunos modos de realización, la formulación es acuosa y se administra a un sujeto. En algunos modos de realización, la formulación es para administración intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.). En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml.

Otra divulgación proporciona un procedimiento para reducir la agregación de un anticuerpo monoclonal terapéutico, bevacizumab, que comprende formular el anticuerpo en un tampón de acetato de arginina, pH 4,5 a 5,5. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a 200 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 30 mg/ml a

175 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunos modos de realización, el anticuerpo no se somete a liofilización previa. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal es susceptible de agregación. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 240 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 225 mM. En algunos modos de realización, la concentración de acetato de arginina en el tampón es aproximadamente 200 mM. En algunos modos de realización, el tampón de acetato de arginina tiene un pH de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,4. En algunos modos de realización, el tampón de acetato de arginina tiene un pH de aproximadamente 5,2. En algunos modos de realización, la formulación es estéril. En algunos modos de realización, la formulación es estable tras almacenamiento a aproximadamente 40 °C durante al menos 28 días. En algunos modos de realización, la formulación es acuosa y se administra a un sujeto. En algunos modos de realización, la formulación es para administración intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.). En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.v. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración s.c. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación es para administración i.m. y la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml.

Incluso otra divulgación proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene una cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento.

Aún otra divulgación proporciona un vial con un tapón perforable por una jeringa, que comprende una cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento. En alguna divulgación, el vial se almacena a aproximadamente 2-8 °C. En algunos modos de realización, el vial es un vial de 3 ml, 20 ml o 50 ml.

Otra divulgación proporciona un depósito de acero inoxidable que comprende una cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento en el interior del depósito. En alguna divulgación, la formulación está congelada.

Otra divulgación proporciona un procedimiento de preparación de una formulación farmacéutica, que comprende: (a) preparar una cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento; y (b) evaluar la estabilidad física, la estabilidad química o la actividad biológica del anticuerpo en la formulación.

Aún otra divulgación proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar una cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o trastorno. En algunos modos de realización, la enfermedad es cáncer. En alguna divulgación, el cáncer se selecciona de cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer renal y glioblastoma.

Estos y otros modos de realización de la invención se describen además mediante la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra los niveles de agregado total detectados en formulaciones de anti-VEGF (100 mg/ml) almacenadas durante hasta 4 semanas a 40 °C.

La figura 2 ilustra los niveles de agregado total detectados en formulaciones de anticuerpo anti-VEGF (0, 50, 100 y 150 mg/ml).

5 La figura 3 ilustra los niveles de dímero detectados en formulaciones de anticuerpo anti-VEGF (100 mg/ml) en comparación con las almacenadas durante hasta 4 semanas a 40 °C.

La figura 4 ilustra la viscosidad de las formulaciones de anticuerpo anti-VEGF a 20 °C en función de la concentración de anticuerpo anti-VEGF (25, 50, 100, 125, 150 o 175 mg/ml).

10

Descripción detallada

I. Definiciones

15 Se debe entender que la terminología usada en el presente documento se utiliza con el propósito solo de describir modos de realización particulares y no pretende ser limitante. Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichas moléculas, y similares.

20

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles. Los excipientes "farmacéuticamente aceptables" (vehículos, aditivos) son aquellos que se pueden administrar razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis eficaz del ingrediente activo empleado.

25

Una formulación "estéril" es aséptica o está libre o esencialmente libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

30 En el presente documento, una formulación "congelada" es una a una temperatura inferior a 0 °C. En general, la formulación congelada no se liofiliza ni se somete a liofilización previa o posterior. En determinados modos de realización, la formulación congelada comprende una sustancia farmacéutica congelada para su almacenamiento (en un depósito de acero inoxidable) o un producto farmacéutico congelado (en la configuración final del vial).

35 Una formulación "estable" es una en la que la proteína en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o química y/o su actividad biológica tras su almacenamiento. Preferentemente, la formulación retiene esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica tras su almacenamiento. El periodo de almacenamiento se selecciona, en general, en base a la vida útil prevista de la formulación. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. En determinadas divulgaciones, la formulación es estable a aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 o más días. En determinadas divulgaciones, la formulación es estable a aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más semanas. En determinadas divulgaciones, la formulación es estable a aproximadamente 25 °C durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más meses. En determinadas divulgaciones, la formulación es estable a aproximadamente 5 °C durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más meses. En determinadas divulgaciones, la formulación es estable a aproximadamente -20 °C durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o más meses. En determinadas divulgaciones, la formulación es estable a 5 °C o -20 °C durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o más meses. Además, la formulación es estable preferentemente después de la congelación (por ejemplo, a -20 °C o -70 °C) y descongelación de la formulación, por ejemplo, después de 1, 2, 3, 4 o 5 ciclos de congelación y descongelación. La estabilidad se puede evaluar cualitativa y/o cuantitativamente en una variedad de maneras diferentes, incluyendo la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño, midiendo la turbidez y/o por inspección visual); mediante evaluación de la heterogeneidad de cargas usando cromatografía de intercambio catiónico, isoelectroenfoque capilar con detección de imágenes (icIEF) o electroforesis de zonas capilares; análisis de secuencias aminoterminales o carboxiterminales; análisis espectrométrico de masas; análisis de SDS-PAGE para comparar el anticuerpo reducido y el inalterado; análisis por cartografía peptídica (por ejemplo, tripsínico o LYS-C); evaluación de la actividad biológica o la función de unión a antígeno del anticuerpo; etc. La inestabilidad puede implicar uno cualquiera o más de: agregación, desamidación (por ejemplo, desamidación de Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación de Met), isomerización (por ejemplo, isomerización de Asp), recorte/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de regiones de bisagra), formación de succinimida, cisteína(s) desemparejada(s), extensión N terminal, procesamiento C terminal, diferencias de glucosilación, etc.

65

Una proteína "retiene su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no muestra signos o muestra muy pocos de agregación, precipitación y/o desnaturalización en el examen visual del color y/o la turbidez, o como se mide por dispersión de luz UV o por cromatografía de exclusión por tamaño.

5 Una proteína "retiene su estabilidad química" en una formulación farmacéutica, si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que la proteína todavía retiene su actividad biológica como se define a continuación. La estabilidad química se puede evaluar detectando y cuantificando formas químicamente alteradas de la proteína. La alteración química puede implicar una modificación del tamaño (por ejemplo, recorte) que se puede evaluar usando cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o espectrometría de masas por ionización por desorción láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (EM MALDI/TOF), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen la alteración de la carga (por ejemplo, que se produce como resultado de la desamidación) que se puede evaluar mediante cromatografía de intercambio iónico o icIEF, por ejemplo.

15 Un anticuerpo "retiene su actividad biológica" en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado está dentro de aproximadamente un 10 % (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica presentada en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica, como se determina en un ensayo de unión a antígeno, por ejemplo. Otros ensayos de "actividad biológica" para anticuerpos se explican a continuación en el presente documento.

20 En el presente documento, "actividad biológica" de un anticuerpo monoclonal se refiere a la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno. Puede incluir además la unión del anticuerpo al antígeno y dar como resultado una respuesta biológica mensurable que se puede medir *in vitro* o *in vivo*. Dicha actividad puede ser antagonista o agonista.

25 Un anticuerpo monoclonal "desamidado" es uno en el que uno o más residuos de asparagina del mismo se han derivatizado, por ejemplo, a un ácido aspártico o un ácido isoaspártico.

30 Un anticuerpo que es "susceptible a la desamidación" es uno que comprende uno o más residuos que se ha encontrado que son propensos a la desamidación.

Un anticuerpo que es "susceptible a la agregación" es uno que se ha observado que se agrega a otra(s) molécula(s) de anticuerpo, especialmente tras su congelación y/o agitación.

35 Un anticuerpo que es "susceptible a la fragmentación" es uno que se ha encontrado que se escinde en dos o más fragmentos, por ejemplo, en una región de bisagra del mismo.

40 Por "reducción de la desamidación, agregación o fragmentación" se pretende evitar o disminuir la cantidad de desamidación, agregación o fragmentación en relación con el anticuerpo monoclonal formulado a un pH diferente o en un tampón diferente.

45 El anticuerpo que se formula preferentemente es esencialmente puro y deseablemente es esencialmente homogéneo (es decir, libre de proteínas contaminantes, etc.). Anticuerpo "esencialmente puro" significa una composición que comprende al menos aproximadamente un 90 % en peso del anticuerpo, en base al peso total de la composición, preferentemente al menos aproximadamente un 95 % en peso. Anticuerpo "esencialmente homogéneo" significa una composición que comprende al menos aproximadamente un 99 % en peso del anticuerpo, en base al peso total de la composición.

50 Por "isotónico" se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán en general una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. La isotonicidad se puede medir usando un osmómetro de tipo presión de vapor o de congelación de hielo, por ejemplo.

55 Como se usa en el presente documento, "tampón" se refiere a una solución tamponada que resiste cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados de ácido-base. El tampón de esta divulgación tiene preferentemente un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0, preferentemente de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, por ejemplo, de 4,5 a 6,0, de 4,5 a 5,9, de 4,5 a 5,8, de 4,5 a 5,7, de 4,5 a 5,6, de 4,5 a 5,5, de 4,5 a 5,6, de 4,5 a 5,5, de 4,5 a 5,4, de 4,5 a 5,3, de 4,5 a 5,2, de 4,5 a 5,1, de 4,5 a 5,0, de 4,5 a 4,9, de 4,5 a 4,8, de 4,5 a 4,7 o de 4,5 a 4,6. En una divulgación, el tampón tiene un pH 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,8, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen acetato, succinato, gluconato, histidina, citrato, glicilglicina y otros tampones de ácido orgánico.

60 Un "tampón de arginina" es un tampón que comprende iones de arginina. Los ejemplos de tampones de arginina incluyen acetato de arginina, cloruro de arginina, fosfato de arginina, sulfato de arginina, succinato de arginina, etc. En una divulgación, el tampón de arginina es acetato de arginina. En una divulgación, el tampón de acetato de arginina se prepara valorando L-arginina (base libre, sólida) con ácido acético (líquido). En determinadas

divulgaciones, el tampón de arginina tiene un pH de 4,5 a 6,0, de 4,5 a 5,9, de 4,5 a 5,8, de 4,5 a 5,7, de 4,5 a 5,6, de 4,5 a 5,5, de 4,5 a 5,6, de 4,5 a 5,5, de 4,5 a 5,4, de 4,5 a 5,3, de 4,5 a 5,2, de 4,5 a 5,1, de 4,5 a 5,0, de 4,5 a 4,9, de 4,5 a 4,8, de 4,5 a 4,7 o de 4,5 a 4,6. En una divulgación, el tampón tiene un pH 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,8, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0.

En el presente documento, un "tensoactivo" se refiere a un agente tensoactivo, preferentemente un tensoactivo no iónico. Los ejemplos de tensoactivos en el presente documento incluyen polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80); poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; dodecilsulfato de sodio (SDS); laurilsulfato de sodio; octil glucósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil-taurato de sodio o metil oleil-taurato de disodio; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); polietilenglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68, etc.); etc. En una divulgación, el tensoactivo en el presente documento es polisorbato 20.

En un sentido farmacológico, en el contexto de la invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o el tratamiento de un trastorno para cuyo tratamiento el anticuerpo es eficaz. Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Un "conservante" es un compuesto que se puede incluir opcionalmente en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en el mismo, facilitando, por tanto, la producción de una formulación de usos múltiples, por ejemplo. Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos, tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. En una divulgación, el conservante en el presente documento es alcohol bencílico.

Un "poliol" es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alditoles y azúcares ácidos. Se puede incluir opcionalmente un poliol en la formulación. En determinadas divulgaciones, los polioles en el presente documento tienen un peso molecular que es inferior a aproximadamente 600 kDa (por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 120 a aproximadamente 400 kDa). Un "azúcar reductor" es aquel que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir iones metálicos o reaccionar covalentemente con lisina y otros grupos amino en proteínas, y un "azúcar no reductor" es uno que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor. Ejemplos de azúcares reductores son fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melezitosa y rafinosa. El manitol, el xilitol, el eritritol, el treitol, el sorbitol y el glicerol son ejemplos de alditoles. En cuanto a los azúcares ácidos, estos incluyen L-gluconato y las sales metálicas del mismo. Cuando se desea que la formulación sea estable en congelación-descongelación, el poliol es preferentemente uno que no cristaliza a temperaturas de congelación (por ejemplo, -20 °C) de modo que desestabilice el anticuerpo en la formulación. En determinadas divulgaciones, los azúcares no reductores tal como la sacarosa y la trehalosa son ejemplos de polioles, siendo preferente la trehalosa sobre la sacarosa, debido a la estabilidad en solución de la trehalosa.

El término "VEGF" o "VEGF-A" como se usa en el presente documento se refiere al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos y los factores de crecimiento de células endoteliales vasculares humanos de 121, 189 y 206 aminoácidos relacionados, como se describe por Leung *et al.* (1989) *Science* 246:1306, y Houck *et al.* (1991) *Mol. Endocrin.*, 5:1806, conjuntamente con las formas alélicas naturales y procesadas de los mismos. El término "VEGF" también se refiere a VEGF de especies no humanas, tales como ratón, rata o primate. A veces, el VEGF de una especie específica se indica mediante términos tales como hVEGF para VEGF humano, mVEGF para VEGF murino y etc. El término "VEGF" también se usa para hacer referencia a formas truncadas del polipéptido que comprende los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos. Se puede identificar la referencia a cualquiera de dichas formas de VEGF en la presente solicitud, por ejemplo, mediante "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" o "VEGF165". Las posiciones de aminoácidos para un VEGF natural "truncado" se numeran como se indica en la secuencia de VEGF natural. Por ejemplo, la posición del aminoácido 17 (metionina) en el VEGF natural truncado también es la posición 17 (metionina) en el VEGF natural. El VEGF natural truncado tiene afinidad de unión por los receptores KDR y Flt-1 en comparación con el VEGF natural.

La "actividad biológica del VEGF" incluye la unión a cualquier receptor de VEGF o cualquier actividad de señalización de VEGF tal como la regulación de la angiogénesis y vasculogénesis tanto normales como anómalas (Ferrara y Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-25; Ferrara (1999) *J Mol. Med.* 77:527-543); promover la vasculogénesis y la angiogénesis embrionarias (Carmeliet *et al.* (1996) *Nature* 380:435-439; Ferrara *et al.* (1996) *Nature* 380:439-442); y modular la proliferación cíclica de vasos sanguíneos en el aparato reproductor femenino y

para el crecimiento óseo y la formación de cartílago (Ferrara *et al.* (1998) *Nature Med.* 4:336-340; Gerber *et al.* (1999) *Nature Med.* 5:623-628). Además de ser un factor angiogénico en la angiogénesis y la vasculogénesis, el VEGF, como factor de crecimiento pleiótrofo, presenta múltiples efectos biológicos en otros procesos fisiológicos, tales como la supervivencia de las células endoteliales, la permeabilidad de los vasos y la vasodilatación, la quimiotaxis de monocitos y la entrada de calcio (Ferrara y Davis-Smyth (1997), *supra* y Cebe-Suarez *et al.* *Cell. Mol. Life Sci.* 63:601-615 (2006)). Además, estudios recientes han informado de efectos mitógenos del VEGF en algunos tipos de células no endoteliales, tales como células del epitelio pigmentario de la retina, células del conducto pancreático y células de Schwann. Guerrin *et al.* (1995) *J. Cell Physiol.* 164:385-394; Oberg-Welsh *et al.* (1997) *Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125-132; Sondell *et al.* (1999) *J. Neurosci.* 19:5731-5740.

Un "antagonista del VEGF" o "antagonista específico del VEGF" se refiere a una molécula que se puede unir al VEGF, reducir los niveles de expresión de VEGF o neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir en las actividades biológicas del VEGF, incluyendo, pero sin limitarse a, la unión del VEGF a uno o más receptores de VEGF y la angiogénesis, la supervivencia o la proliferación de células endoteliales mediadas por el VEGF. Como antagonistas específicos del VEGF útiles en los procedimientos de la divulgación se incluyen polipéptidos que se unen específicamente al VEGF, anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente al VEGF secuestrando de este modo su unión a uno o más receptores, proteínas de fusión (por ejemplo, VEGF-Trap (Regeneron)) y VEGF₁₂₁-gelonina (Peregrine). Los antagonistas específicos del VEGF también incluyen variantes antagonistas de polipéptidos del VEGF, oligómeros de nucleobases de antisentido dirigidos al VEGF, pequeñas moléculas de ARN dirigidas al VEGF, aptámeros de ARN, peptidocuerpos y ribozimas contra el VEGF. Los antagonistas específicos de VEGF también incluyen moléculas pequeñas no peptídicas que se unen al VEGF y pueden bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir en las actividades biológicas del VEGF. Por tanto, el término "actividades del VEGF" incluye específicamente actividades biológicas del VEGF mediadas por el VEGF. En determinadas divulgaciones, el antagonista del VEGF reduce o inhibe, en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, el nivel de expresión o la actividad biológica del VEGF.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. En determinadas divulgaciones, el anticuerpo seleccionado normalmente tendrá una afinidad de unión suficiente por el VEGF, por ejemplo, el anticuerpo se puede unir a hVEGF con un valor de K_d de entre 100 nM-1 pM. Las afinidades de los anticuerpos se pueden determinar mediante un ensayo basado en resonancia de plasmón de superficie (tal como el ensayo BIAcore como se describe en la publicación de la solicitud PCT n.º WO 2005/012359); ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA); y ensayos de competencia (por ejemplo, RIA), por ejemplo.

En determinadas divulgaciones, el anticuerpo anti-VEGF se puede usar como un agente terapéutico para dirigirse a e interferir en enfermedades o afecciones en las que está implicada la actividad del VEGF. Además, el anticuerpo se puede someter a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso previsto del anticuerpo. Los ejemplos incluyen el ensayo de inhibición con HUVEC; ensayos de inhibición del crecimiento de células tumorales (como se describe en el documento WO 89/06692, por ejemplo); ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad mediada por complemento (CDC) (patente de EE. UU. n.º 5.500.362); y ensayos de actividad agonista o hematopoyesis (véase el documento WO 95/27062). Un anticuerpo anti-VEGF normalmente no se unirá a otros homólogos del VEGF, tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF. En una divulgación, el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-VEGF monoclonal A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709. En otra divulgación, el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599, incluyendo, pero sin limitarse a, el anticuerpo conocido como bevacizumab (BV; AVASTIN®).

El anticuerpo anti-VEGF "bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMAb VEGF" o "AVASTIN®", es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599. Comprende regiones estructurales de IgG1 humana mutadas y regiones determinantes de complementariedad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino A.4.6.1 que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente un 93 % de la secuencia de aminoácidos de bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones estructurales, se deriva de la IgG1 humana, y aproximadamente un 7 % de la secuencia se deriva del anticuerpo murino A4.6.1. Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149 000 dalton y está glucosilado. Bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados se describen además en la patente de EE. UU. n.º 6.884.879 expedida el 26 de febrero de 2005.

El término "polipéptido de la serie B20", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido, que incluye un anticuerpo que se une al VEGF. Los polipéptidos de la serie B20 incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos derivados de una secuencia del anticuerpo B20 o un anticuerpo derivado de B20 descrito en la publicación de EE. UU. n.º 20060280747, la publicación de EE. UU. n.º 20070141065 y/o la publicación de EE. UU. n.º 20070020267. En una divulgación, el polipéptido de la serie B20 es B20-4.1 como se describe en la publicación de EE. UU. n.º 20060280747, la publicación de EE. UU. n.º 20070141065 y/o la publicación de EE. UU. n.º 20070020267. En otra divulgación, el polipéptido de la serie B20 es B20-4.1.1 descrito en la solicitud de patente de

EE. UU. 60/991.302.

El término "polipéptido de la serie G6", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido, que incluye un anticuerpo que se une al VEGF. Los polipéptidos de la serie G6 incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos derivados de una secuencia del anticuerpo G6 o un anticuerpo derivado de G6 descrito en la publicación de EE. UU. n.º 20060280747, la publicación de EE. UU. n.º 20070141065 y/o la publicación de EE. UU. n.º 20070020267. Los polipéptidos de la serie G6, como se describe en la publicación de EE. UU. n.º 20060280747, la publicación de EE. UU. n.º 20070141065 y/o la publicación de EE. UU. n.º 20070020267 incluyen, pero sin limitarse a, G6-8, G6-23 y G6-31.

Para anticuerpos adicionales, véanse las patentes de EE. UU. n.º 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020; 6.054.297; los documentos WO 98/45332; WO 96/30046; WO 94/10202; EP 0666868B1; las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. n.ºs 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409 y 20050112126; y Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004). En determinadas divulgaciones, otros anticuerpos incluyen aquellos que se unen a un epítipo funcional en el VEGF humano que comprende los residuos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104 o, de forma alternativa, que comprende los residuos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89.

También se conocen otros anticuerpos anti-VEGF, y se describen, por ejemplo, en Liang *et al.*, *J Biol Chem* 281, 951-961 (2006).

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos en los que se ha de prevenir el trastorno.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento, incluyendo, pero sin limitarse a, trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los trastornos incluyen trastornos angiogénicos. "Trastorno angiogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier afección que implique una angiogénesis anómala o una permeabilidad vascular anómala o fuga. Los ejemplos no limitantes de trastornos angiogénicos que se van a tratar en el presente documento incluyen tumores malignos y benignos; neoplasias malignas distintas de leucemias y linfáticas; y, en particular, metástasis tumoral (cáncer).

Se produce "angiogénesis anómala" cuando los vasos sanguíneos nuevos crecen excesivamente o inapropiadamente de otro modo (por ejemplo, la localización, el momento o la aparición de la angiogénesis no se desea desde un punto de vista médico) en una enfermedad o de modo que provoca una enfermedad. En algunos casos, se produce una angiogénesis excesiva, descontrolada o inapropiada de otro modo cuando hay crecimiento de vasos sanguíneos nuevos que contribuye al empeoramiento de la enfermedad o la causa de una enfermedad. Los nuevos vasos sanguíneos pueden alimentar a los tejidos enfermos, destruir tejidos normales y, en el caso del cáncer, los nuevos vasos pueden permitir que las células tumorales lleguen a la circulación y se alojen en otros órganos (metástasis tumorales). Los ejemplos de trastornos que implican una angiogénesis anómala incluyen, pero no se limitan a, cáncer, especialmente tumores sólidos vascularizados y tumores metastásicos (incluyendo cáncer de colon, pulmón (especialmente carcinoma de pulmón microcítico) o cáncer de próstata), enfermedades causadas por neovascularización ocular, especialmente ceguera diabética, retinopatías, principalmente retinopatía diabética o degeneración macular senil, neovascularización coroidea (NVC), edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de Von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, oclusión venosa central de la retina (OVCR), neovascularización corneal, neovascularización retiniana y rubeosis; psoriasis, artritis psoriásica, hemangioblastoma tal como hemangioma; enfermedades renales inflamatorias, tales como glomerulonefritis, especialmente glomerulonefritis mesangioproliferativa, síndrome urémico hemolítico, nefropatía diabética o nefrosclerosis hipertensiva; diversas enfermedades inflamatorias, tales como artritis, especialmente artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, sarcoidosis, arterioesclerosis arterial y enfermedades que se producen después de trasplantes, endometriosis o asma crónica y otras afecciones.

Se produce "permeabilidad vascular anómala" cuando el flujo de líquidos, moléculas (por ejemplo, iones y nutrientes) y células (por ejemplo, linfocitos) entre los compartimentos vascular y extravascular es excesivo o inapropiado de otro modo (por ejemplo, la localización, el momento, el grado o el inicio de la permeabilidad vascular no se desea desde un punto de vista médico) en una enfermedad o de modo que causa una enfermedad. Una permeabilidad vascular anómala puede dar lugar a una "fuga" excesiva o inapropiada de otro modo de iones, agua, nutrientes o células a través de la vasculatura. En algunos casos, la permeabilidad vascular excesiva, no controlada o inapropiada de otro modo o la fuga vascular exacerbada o induce enfermedades que incluyen, por ejemplo, edema asociado con tumores, incluyendo, por ejemplo, tumores cerebrales; ascitis asociada con neoplasias malignas; síndrome de Meigs; inflamación pulmonar; síndrome nefrótico; derrame pericárdico; derrame pleural; permeabilidad asociada con enfermedades cardiovasculares tales como la afección que sigue a infartos de miocardio y apoplejías y similares. La presente invención contempla el tratamiento de aquellos pacientes que han desarrollado o corren el riesgo de desarrollar las enfermedades y trastornos asociados con una permeabilidad vascular anómala o fuga.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian con algún grado de proliferación celular anómala. En una divulgación, el trastorno proliferativo celular es cáncer. En una divulgación, el trastorno proliferativo celular es un tumor.

5 "Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en el presente documento.

10 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias malignas linfocíticas. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, pero sin limitarse a, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer epitelial de células escamosas), cáncer de pulmón, incluyendo carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma pulmonar de células escamosas, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer del estroma gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peneano, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma sobre lentigo maligno, melanomas lentiginosos acros, melanomas nodulares, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no hodgkiniano (LNH) de bajo grado/folicular; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH de grado intermedio/folicular; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de alto grado; LNH linfoblástico de alto grado; LNH de células pequeñas no escindidas de alto grado; LNH con gran masa tumoral; linfoma de células de manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (como el asociado con tumores cerebrales) y síndrome de Meigs, cáncer cerebral, así como de cabeza y cuello, y metástasis asociadas. En determinadas divulgaciones, los cánceres que son tributarios de tratamiento por los anticuerpos de la divulgación incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, carcinoma de pulmón no microcítico, glioblastoma, linfoma no hodgkiniano (NHL), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de partes blandas, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, mesotelioma y mieloma múltiple. En algunas divulgaciones, el cáncer se selecciona de: carcinoma de pulmón microcítico, glioblastoma, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR) y carcinoma hepatocelular. Sin embargo, en algunas divulgaciones, el cáncer se selecciona de: carcinoma de pulmón no microcítico, cáncer colorrectal, glioblastoma y carcinoma de mama, incluyendo formas metastásicas de esos cánceres.

40 El término "tratamiento antineoplásico" se refiere a un tratamiento útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos antineoplásicos incluyen, pero se limitan a, por ejemplo, agentes quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénicos, agentes apoptóticos, agentes antitubulina y otros agentes para tratar el cáncer, tales como anticuerpos anti-HER2, anticuerpos anti-CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina-cinasas), inhibidor de HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™), inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (mesilato de imatinib)), un inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o receptor(es) de VEGF, TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. También se incluyen en la divulgación combinaciones de los mismos.

Un "factor o agente angiogénico" es un factor de crecimiento o su receptor que interviene en la estimulación del desarrollo de los vasos sanguíneos, por ejemplo, promueve la angiogénesis, el crecimiento de células endoteliales, la estabilidad de los vasos sanguíneos y/o la vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, VEGF y los miembros de la familia del VEGF y sus receptores (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3), PIGF, familia de PDGF, familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), ligandos de TIE (angiopoyetinas, ANGPT1, ANGPT2), TIE1, TIE2, efrinas, Bv8, ligando similar a Delta 4 (DLL4), Del-1, factores de crecimiento de fibroblastos: ácidos (aFGF) y básicos (bFGF), FGF4, FGF9, BMP9, BMP10, folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), GM-CSF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/factor de dispersión (SF), interleucina-8 (IL-8), CXCL12, leptina, midkina, neuropilinas, NRP1, NRP2, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas, especialmente PDGF-BB, PDGFR-alfa o PDGFR-beta, pleiotrofina (PTN), progranulina, proliferina, factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), Alk1, CXCR4, Notch1, Notch4, Sema3A, Sema3C, Sema3F, Robo4, etc. Incluiría además factores que promueven la angiogénesis, tales como ESM1 y Perlecan. También incluiría factores que aceleran la cicatrización de heridas, tales como hormona del crecimiento,

factor de crecimiento insulínico I (IGF-I), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), dominio similar al EGF, múltiple 7 (EGFL7), CTGF y miembros de su familia, y TGF-alfa y TGF-beta. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit y Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179; Ferrara y Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5 (12):1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (por ejemplo, tabla 1 que enumera factores angiogénicos conocidos); y Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206.

Un "agente antiangiogénico" o "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido (incluyendo, por ejemplo, un ARN inhibidor (ARNi o ARNip)), un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, la vasculogénesis o la permeabilidad vascular indeseable, ya sea directa o indirectamente. Se debe entender que el agente antiangiogénico incluye aquellos agentes que se unen y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo u otro antagonista de un agente angiogénico como se define anteriormente, por ejemplo, anticuerpos contra VEGF-A o contra el receptor de VEGF-A (por ejemplo, receptor KDR o receptor Flt-1), inhibidores anti-PDGFR, moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU 11248 (malato de sunitinib), AMG706, o los descritos en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2004/113304). Los agentes antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes agentes: inhibidores de VEGF tales como un antagonista específico de VEGF, inhibidor de EGF, inhibidores de EGFR, Erbitux® (cetuximab, ImClone Systems, Inc., Branchburg, N.J.), Vectibix® (panitumumab, Amgen, Thousand Oaks, CA), inhibidores de TIE2, inhibidores de IGF1R, inhibidores de la COX-II (ciclooxigenasa II), inhibidores de MMP-2 (metaloproteínasa de la matriz 2) e inhibidores de MMP-9 (metaloproteínasa de la matriz 9), CP-547.632 (Pfizer Inc., NY, EE. UU.), Axitinib (Pfizer Inc.; AG-013736), ZD-6474 (AstraZeneca), AEE788 (Novartis), AZD-2171, VEGF Trap (Regeneron/Aventis), Vatalanib (también conocido como PTK-787, ZK-222584: Novartis & Schering AG), Macugen (pegaptanib octasódico, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech), IM862 (Cytran Inc. de Kirkland, Wash., EE. UU.); y angiozima, una ribozima sintética de Ribozyme (Boulder, Colorado) y Chiron (Emeryville, California), y combinaciones de los mismos. Otros inhibidores de la angiogénesis incluyen trombospondina 1, trombospondina 2, colágeno IV y colágeno XVIII. Se divulgan inhibidores de VEGF en las patentes de EE. UU. n.ºs 6.534.524 y 6.235.764. Los agentes antiangiogénicos también incluyen inhibidores naturales de la angiogénesis, por ejemplo, angioestatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit y Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (por ejemplo, la tabla 3 que enumera el tratamiento antiangiogénico en el melanoma maligno); Ferrara y Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5 (12):1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, la tabla 2 que enumera los factores antiangiogénicos conocidos); y Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (por ejemplo, la tabla 1 que enumera agentes antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).

El término "tratamiento antiangiogénico" se refiere a un tratamiento útil para inhibir la angiogénesis, que comprende la administración de un agente antiangiogénico.

El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o provoca la muerte o destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² y los isótopos radiactivos de Lu); agentes quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

Una "toxina" es cualquier sustancia que puede tener un efecto perjudicial sobre el crecimiento o la proliferación de una célula.

Un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilfosforamida, trietilfosforamida y trimetilmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán, HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina;

antibióticos, tales como los antibióticos enodiinos (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma 1I y calicheamicina omega 1I (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor oral de la integrina alfa-4, dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos enodiinos de cromoproteínas relacionados),

5 aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposomas de doxorubicina HCl (DOXIL®), doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposómica pegilada (CAELYX®) y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina,

10 mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina;

15 análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; agentes antisuprarrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico, tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina, demecolcina diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano, lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguzona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet, pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2'-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano, vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®);

25 dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas genomanipuladas con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino, tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®) y carboplatino; vincas, que evitan que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; ácido folínico; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bifosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo nucleosídico de citosina de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos de antisentido, en particular, aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)); y VEGF-A que reduce la proliferación celular;

40 vacunas, tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de genoterapia, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor del complejo endopeptidásico multicatalítico (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2, tal como oblimersen sódico (GENA SENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR; inhibidores de tirosina-cinasas; inhibidores de serina-treonina-cinasas, tales como rapamicina (sirólimus, RAPAMUNE®); inhibidores de la farnesiltransferasa, tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura para una politerapia de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y ácido folínico, y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Los agentes quimioterápicos como se define en el presente documento incluyen "agentes antihormonales" o "tratamientos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que

55 pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser las hormonas en sí mismas, incluyendo, pero sin limitarse a: antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de citosina de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos de antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas, tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas, tales como vacunas de genoterapia, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y

65

vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; vinorelbina y esperamicinas (véase la patente de EE.UU. n.º 4.675.187) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

5 Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En una divulgación, el agente inhibidor del crecimiento es un anticuerpo inhibidor del crecimiento que evita o reduce la proliferación de una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo. En otra divulgación, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Bloqueantes clásicos de la fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que interrumpen la G1 también actúan sobre la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluoruracilo y Ara-C. Se puede encontrar más información en Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", por Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados del árbol del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

25 Por "radioterapia" se quiere decir el uso de rayos beta o rayos gamma dirigidos para inducir suficiente daño a una célula para limitar su capacidad de funcionar normalmente o destruir la célula por completo. Se apreciará que hay muchas maneras conocidas en la técnica para determinar la dosificación y duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se proporcionan como una administración en una sola dosis y las dosificaciones típicas varían de 10 a 200 unidades (grays) al día.

30 "Mamífero" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para la práctica de deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.

35 El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

40 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas divulgaciones, un anticuerpo se purifica (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo como se determina mediante, por ejemplo, el procedimiento de Lowry, y en algunas divulgaciones hasta más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de cubilete giratorio o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, azul de Coomassie o tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

55 Los "anticuerpos naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene un extremo en un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de cadena pesada. Se cree que residuos aminoacídicos particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

60 El término "dominio constante" se refiere a la parte de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada en relación con la otra parte de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión al antígeno. El dominio constante contiene los dominios C_H1 , C_H2 y C_H3 (colectivamente, CH) de la cadena pesada y el dominio CHL (o CL) de la cadena ligera.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminotermiales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar "VL". Estos dominios son, en general, las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren extensamente en las secuencias entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente por los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , que se conectan mediante tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las HVR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Se pueden asignar las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

El término "isotipo" o "subclase" de IgG, como se usa en el presente documento, significa cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , β , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen en general en, por ejemplo, Abbas *et al.*, *Cellular and Mol. Immunology*, 4.^a ed., (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo inalterado" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo en su forma sustancialmente inalterada, no a fragmentos de anticuerpo como se definen a continuación. Los términos se refieren en particular a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Un "anticuerpo no marcado" para los propósitos del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado con un resto citotóxico o radiomarcador.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo inalterado, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de los 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 con antígeno y todavía se puede reticular con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una divulgación, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv) se pueden enlazar covalentemente un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera mediante un conector peptídico flexible, de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración en la que las tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Conjuntamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera, y contiene también 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 pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica única. En general, el polipéptido de scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL, que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), pág. 269-315.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, por ejemplo, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de distintos anticuerpos. En determinadas divulgaciones, dicho anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Se debe entender que una secuencia de unión a la diana seleccionada se puede alterar además, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en un cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de la presente divulgación. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas al no estar típicamente contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiera la producción del anticuerpo por algún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hibridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen parte o la totalidad de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE. UU. n.ºs 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, por la inmunización de macacos con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una divulgación, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR del receptor se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se pueden elaborar para refinar más el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para otros detalles, véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlé y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); y las patentes de EE. UU. n.ºs 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo colecciones de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los procedimientos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados por medio de una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

Un "anticuerpo dependiente de la especie" es uno que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie se "une específicamente" a un antígeno humano (por ejemplo, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M y preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero es preferentemente un anticuerpo humanizado o humano.

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel exclusivo al conferir una especificidad precisa a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido naturales que consisten en una cadena pesada solo son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Varias delimitaciones de HVR están en uso y se engloban en el presente documento. Las regiones determinantes de

la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). En cambio, Chothia se refiere a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk. *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un término medio entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeración de Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeración de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en el VH. Los residuos del dominio variable se enumeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*, para cada una de estas definiciones.

Los residuos "estructurales" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de HVR, como se definen en el presente documento.

El término "numeración de residuos del dominio variable según Kabat" o "numeración de la posición de aminoácidos según Kabat", y las variaciones del mismo, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra*. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un solo aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo FR 82 de cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado por alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "estándar".

El sistema de numeración de Kabat se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU del que se informa en Kabat *et al.*, *supra*). El "índice EU según Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo humano IgG1 EU.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.* (1995 *Protein Eng*, 8(10):1057-1062). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, conjuntamente con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

Como se usa en el presente documento, "colección" se refiere a una pluralidad de secuencias de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, polipéptidos de la divulgación), o los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias, siendo las secuencias diferentes en la combinación de aminoácidos variantes que se introducen en estas secuencias de acuerdo con los procedimientos de la divulgación.

La "presentación en fagos" es una técnica mediante la que los polipéptidos variantes se presentan como proteínas de fusión para al menos una parte de la proteína de la cubierta en la superficie del fago, por ejemplo, fagos filamentosos, partículas. Una utilidad de la presentación en fagos reside en el hecho de que grandes colecciones de variantes de proteínas aleatorizadas se pueden clasificar rápida y eficazmente para aquellas secuencias que se unen a un antígeno diana con alta afinidad. La presentación de colecciones de péptidos y proteínas en fagos se ha usado para el cribado de millones de polipéptidos para aquellos con propiedades de unión específicas. Se han usado procedimientos de presentación en fagos polivalentes para presentar péptidos aleatorios pequeños y proteínas pequeñas a través de fusiones al gen III o bien al gen VIII del fago filamentosos. Wells y Lowman (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:355-362, y referencias citadas en el mismo. En una presentación en fagos monovalentes, una colección de proteínas o péptidos se fusiona con un gen III o una parte del mismo, y se expresa a niveles bajos en presencia de proteína del gen III natural, de modo que las partículas de fago presentan una copia o ninguna de

las proteínas de fusión. Los efectos de avidéz se reducen en relación con el fago polivalente, de modo que la clasificación se basa en la afinidad intrínseca del ligando, y se usan vectores fagómidos, que simplifican las manipulaciones de ADN. Lowman y Wells (1991) *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3:205-0216.

5 Un "fagómido" es un vector plasmídico que tiene un origen de replicación bacteriano, por ejemplo, Co1E1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagómido se puede usar en cualquier bacteriófago conocido, incluyendo un bacteriófago filamentoso y un bacteriófago lambdaide. El plásmido también contendrá, en general, un marcador seleccionable para la resistencia a antibióticos. Los segmentos de ADN clonados en estos vectores se pueden propagar como plásmidos. Cuando las células que albergan estos vectores están provistas de todos los genes necesarios para la producción de partículas de fago, el modo de replicación del plásmido cambia a replicación en círculo rodante para generar copias de una hebra del ADN del plásmido y empaquetar las partículas de fago. El fagómido puede formar partículas de fago infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagómidos que contienen un gen de proteína de la cubierta de fago o fragmento del mismo enlazado a un gen de polipéptido heterógeno como una fusión génica de modo que el polipéptido heterógeno se presenta en la superficie de la partícula de fago.

II. Modos para llevar a cabo la invención

La divulgación en el presente documento se refiere a una formulación acuosa estable que comprende un anticuerpo. El anticuerpo en la formulación se prepara usando técnicas disponibles en la técnica para generar anticuerpos, cuyos procedimientos ejemplares se describen con más detalle en las siguientes secciones.

El anticuerpo está dirigido contra un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece un trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos que no son polipéptidos.

Si el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembranaria (por ejemplo, receptor) o ligando, tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen moléculas tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); ox-LDL; ox-ApoB100; renina; una hormona del crecimiento, incluyendo hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor liberador de la hormona del crecimiento; hormona paratiroides; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, tromboplastina tisular y factor de Von Willebrand; factores anticoagulantes, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana o activador tisular del plasminógeno (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinas; RANTES (expresadas y secretadas por linfocitos T normales y reguladas en función de su grado de activación); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico, tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento y transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una parte de la envoltura del sida; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adreínas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

En determinadas divulgaciones, las dianas moleculares para anticuerpos englobados por la divulgación incluyen el VEGF. En una divulgación, el anticuerpo en el presente documento es uno que se une al VEGF humano.

A. Preparación de la formulación

Después de la preparación del anticuerpo de interés (por ejemplo, las técnicas para producir anticuerpos que se pueden formular como se divulga en el presente documento se elaborarán a continuación y son conocidas en la técnica), se prepara la formulación farmacéutica que lo comprende. En determinadas divulgaciones, el anticuerpo que se va a formular no se ha sometido a liofilización previa y la formulación de interés en el presente documento es

una formulación acuosa. En determinadas divulgaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En una divulgación, el anticuerpo en la formulación es un fragmento de anticuerpo, tal como un F(ab')₂, en cuyo caso puede no ser necesario abordar los problemas que pueden producirse para el anticuerpo de longitud completa (tal como el recorte del anticuerpo en Fab). La cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo presente en la formulación se determina teniendo en cuenta los volúmenes de dosis deseados y el(los) modo(s) de administración, por ejemplo. De aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, o de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml es una concentración de anticuerpo ejemplar en la formulación.

Se prepara una formulación acuosa que comprende el anticuerpo en una solución de pH tamponado. El tampón de esta divulgación tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,5. En determinadas divulgaciones, el pH está en el intervalo de pH 4,25 a 6,25, o en el intervalo de pH 4,5 a 6,0, o en el intervalo de pH 4,75 a 5,75, o en el intervalo de pH 5,0 a 5,5, o en el intervalo de pH 5,1 a 5,4. En determinadas divulgaciones de la invención, la formulación tiene un pH de 5,2 o aproximadamente 5,2. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH dentro de este intervalo incluyen acetato (por ejemplo, acetato de arginina o acetato de sodio), succinato (tal como succinato de arginina o succinato de sodio), gluconato, citrato y otros tampones de ácidos orgánicos y combinaciones de los mismos. La concentración de tampón puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 600 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y la isotonicidad deseada de la formulación. En determinadas divulgaciones, el tampón contiene arginina en la concentración de 50 mM a 500 mM, 75 mM a 400 mM, 100 mM a 250 mM, 120 mM a 240 mM, 150 mM a 225 mM o 175 mM a 210 mM. En determinadas divulgaciones de la invención, el tampón contiene arginina en la concentración de 200 mM o aproximadamente 200 mM. En una divulgación, el tampón es acetato de arginina (por ejemplo, a 200 mM o aproximadamente 200 mM), pH 5,2.

Opcionalmente, se puede añadir un tensioactivo a la formulación de anticuerpo. Los tensioactivos ejemplares incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20, 80, etc.) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188). La cantidad de tensioactivo añadida es tal que reduce la agregación del anticuerpo formulado y/o minimiza la formación de partículas en la formulación y/o reduce la adsorción. Por ejemplo, el tensioactivo puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 0,5 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,2 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,1 %, o de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,06 %, o de aproximadamente un 0,03 % a aproximadamente un 0,05 %. En determinadas divulgaciones, el tensioactivo está presente en la formulación en una cantidad de un 0,04 % o aproximadamente un 0,04 %. En una divulgación, la formulación no comprende un tensioactivo.

En una divulgación, la formulación contiene los agentes identificados anteriormente (por ejemplo, anticuerpo, tampón y/o tensioactivo) y está esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y Cl de bencetonio. En otra divulgación, se puede incluir un conservante en la formulación, en particular cuando la formulación es una formulación multidosis. La concentración de conservante puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 2 %, preferentemente de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 1 %. Se pueden incluir en la formulación uno o más de otros vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980), siempre que no afecten negativamente a las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los destinatarios en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen; agentes tamponantes adicionales; codisolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes, tales como EDTA; complejos de metal (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión intersticial de fármacos, tales como glucoproteínas de hialuronidasa activa a pH neutro soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Se describen determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, en las publicaciones de patente de EE. UU. n.^{os} 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Si bien las diversas descripciones de quelantes en el presente documento a menudo se centran en EDTA, se apreciará que otros quelantes de iones metálicos también están englobados dentro de la divulgación. Los quelantes de iones metálicos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, entre otros, aminopolicarboxilatos, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EGTA (ácido etilenglicol-bis(beta-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético), NTA (ácido nitrilotriacético), EDDS (disuccinato de etilendiamina), PDTA (ácido 1,3-propilendiaminotetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), ADA (ácido beta-alaninadiacético), MGCA (ácido metilglicinadiacético), etc. Además, algunas divulgaciones en el presente documento comprenden quelantes de fosfonatos/ácido fosfónico.

La formulación en el presente documento también puede contener más de una proteína según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no afecten de forma adversa a la otra proteína. Por ejemplo, cuando el anticuerpo es anti-VEGF, se puede combinar

con otro agente (por ejemplo, un agente quimioterápico, y un agente antineoplásico y anti.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes, o después, de la preparación de la formulación.

5

B. Administración de la formulación

La formulación se administra a un mamífero que necesita tratamiento con el anticuerpo, preferentemente un ser humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa como una inyección intravenosa rápida o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intracelofarraqúidea, subcutánea, intrarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. En una divulgación, la formulación se administra al mamífero mediante administración intravenosa. Para dichos propósitos, la formulación se puede inyectar usando una jeringa o por medio de una línea i.v., por ejemplo. En una divulgación, la formulación se administra al mamífero mediante administración subcutánea.

15

La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") del anticuerpo dependerá, por ejemplo, de la afección que se vaya a tratar, de la gravedad y evolución de la afección, de si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis y respuesta del paciente al anticuerpo, del tipo de anticuerpo usado y del criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos y se puede administrar al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. El anticuerpo se puede administrar como el único tratamiento o junto con otros fármacos o tratamientos útiles en el tratamiento de la afección en cuestión.

20

Como una proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo administrado estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente ya sea por una o más administraciones, siendo el intervalo típico de anticuerpo usado de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 15 mg/kg, administrados diariamente, por ejemplo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas dosificación. En una divulgación, el antagonista es un anticuerpo anti-VEGF que se administra a una dosis de aproximadamente 100 o 400 mg cada 1, 2, 3 o 4 semanas o se administra una dosis de aproximadamente 1, 3, 5, 7,5, 10, 15 o 20 mg/kg cada 1, 2, 3 o 4 semanas. La dosis se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tal como infusiones. La evolución de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas convencionales.

25

30

C. Preparación del anticuerpo

35

(i) Preparación de antígeno

Se pueden usar antígenos o fragmentos de los mismos solubles, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranarias, tales como receptores, se pueden usar fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. De forma alternativa, se pueden usar células que expresan la molécula transmembranaria como inmunógeno. Se pueden derivar dichas células de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

45

(ii) Determinados procedimientos basados en anticuerpos

Los anticuerpos policlonales se generan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína que sea inmunógena en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), *N*-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

55

Se inmunizan animales contra el antígeno, conjugados inmunógenos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde, se administra a los animales una dosis de refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde se extrae sangre de los animales y el suero se somete a ensayo para determinar el valor cuantitativo de anticuerpos. Se administra una dosis de refuerzo a los animales hasta alcanzar una meseta del valor cuantitativo. Preferentemente, se administra una dosis de refuerzo al animal con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. También se pueden preparar conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Además, se usan adecuadamente agentes de agregación, tales como alumbre, para potenciar la respuesta inmunitaria.

65

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales de la invención usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), y descrito además, por ejemplo, en Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) con respecto a los hibridomas humano-humano. Procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales IgM natural humana a partir de líneas celulares de hibridoma. La tecnología de hibridoma humano (tecnología de triomas) se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y en Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Para otras técnicas de hibridoma diversas, véanse, por ejemplo, los documentos US 2006/258841; US 2006/183887 (anticuerpos totalmente humanos), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; y las patentes de EE. UU. n.ºs 7.078.492 y 7.153.507. Un protocolo ejemplar para producir anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma se describe como sigue. En una divulgación, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para generar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína usada para la inmunización. Los anticuerpos se generan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) de un polipéptido de la divulgación o un fragmento del mismo, y un adyuvante, tal como monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Se puede preparar un polipéptido de la divulgación (por ejemplo, antígeno) o un fragmento del mismo usando procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como procedimientos recombinantes, algunos de los cuales se describen además en el presente documento. Se somete a ensayo el suero de los animales inmunizados para detectar anticuerpos antiantígeno, y se administran opcionalmente inmunizaciones de refuerzo. Se aíslan los linfocitos de animales que producen anticuerpos antiantígeno. De forma alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

Los linfocitos se fusionan a continuación con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986). Se pueden usar células de mieloma que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como el medio HAT. Las células de mieloma ejemplares incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. También se han descrito líneas celulares de heteromieloma de ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), evitando dichas sustancias el crecimiento de células carentes de HGPRT. Preferentemente, se usan procedimientos de cultivo de células de hibridoma sin suero para reducir el uso de suero derivado de animales tal como suero fetal bovino, como se describe, por ejemplo, en Even *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006).

Los oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de los cultivos de células de hibridoma se describen en Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Específicamente, se enriquecen medios de cultivo estándar con determinados aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina) o con fracciones de hidrolizado de proteínas, y la apoptosis se puede suprimir significativamente por oligopéptidos sintéticos, constituidos por tres a seis residuos aminoácidos. Los péptidos están presentes en concentraciones milimolares o mayores.

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede someter a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales que se unen a un anticuerpo de la divulgación. Se puede determinar la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard. Véase, por ejemplo, Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de que se identifiquen las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos estándar. Véase, por ejemplo, Goding, *supra*. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in*

vivo como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Un procedimiento para el aislamiento de proteínas a partir de células de hibridoma se describe en el documento US 2005/176122 y la patente de EE. UU. n.º 6.919.436. El procedimiento incluye el uso de sales mínimas, tales como sales liotrópicas, en el procedimiento de unión y preferentemente también el uso de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el procedimiento de elución.

(iii) Determinados procedimientos de cribado de colecciones

Se pueden preparar anticuerpos de la invención usando colecciones combinatorias para cribar anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se describen en general en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). Por ejemplo, un procedimiento de generación de anticuerpos de interés es a través del uso de una colección de anticuerpos en fagos como se describe en Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93.

En principio, se seleccionan clones de anticuerpos sintéticos cribando colecciones de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de la región variable del anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína de la cubierta del fago. Dichas colecciones de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv que se pueden unir al antígeno deseado se adsorben al antígeno y, por tanto, se separan de los clones que no se unen en la colección. Los clones de unión se eluyen a continuación del antígeno, y se pueden enriquecer además mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de la invención se puede obtener diseñando un procedimiento de cribado de antígenos adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

En determinadas divulgaciones, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), presentando ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden presentar funcionalmente en fago, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en los que VH y VL están enlazados covalentemente a través de un péptido corto y flexible, o bien como fragmentos Fab, en los que están fusionados cada uno con un dominio constante e interactúan no covalentemente, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones de fago que codifican scFv y los clones de fago que codifican Fab se denominan conjuntamente "clones de fago Fv" o "clones Fv".

Los repertorios de genes de VH y VL se pueden clonar por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinar aleatoriamente en colecciones de fagos que, a continuación, se pueden inspeccionar para determinar los clones de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad por el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos para una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar de manera sintética colecciones sin exposición previa clonando segmentos génicos V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

En determinadas divulgaciones, se usa fago filamentoso para presentar fragmentos de anticuerpos por fusión a la proteína pIII de la cubierta menor. Los fragmentos de anticuerpos se pueden presentar como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como se describe por Marks *et al.* *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula huésped bacteriana, donde se ensambla una estructura de Fab-proteína de la cubierta que se llega a presentar en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de la cubierta natural, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.* *Nucl. Acidos Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen de células inmunitarias extraídas de seres humanos o animales. Si se desea una colección sesgada en favor de clones antiantígeno, se inmuniza al sujeto con antígeno para generar una respuesta de anticuerpos, y se recuperan los esplenocitos y/o linfocitos B en circulación, otros linfocitos de sangre periférica (LSP) para la construcción de colecciones. En una divulgación, se obtiene una colección de fragmentos de genes de anticuerpos humanos

sesgada en favor de los clones antiantígeno generando una respuesta de anticuerpos antiantígeno en ratones transgénicos que portan una micromatriz genética de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales), de modo que la inmunización con antígeno da lugar a linfocitos B que producen anticuerpos humanos frente al antígeno. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe a continuación.

Se puede obtener un enriquecimiento adicional en cuanto a las poblaciones celulares reactivas antiantígeno usando un procedimiento de cribado adecuado para aislar linfocitos B que expresan anticuerpo unido a membrana específico de antígeno, por ejemplo, mediante separación celular usando cromatografía de afinidad por antígeno o adsorción de células sobre antígeno marcado con fluorocromo seguido de clasificación de células activadas por flujo (FACS).

De forma alternativa, el uso de esplenocitos y/o linfocitos B u otros LSP de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una colección de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que el antígeno no es antigénico. Para colecciones que incorporan una construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, se obtienen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifiquen segmentos de genes de anticuerpos no reordenados. Las células inmunitarias de interés se pueden obtener a partir de una variedad de especies animales, tales como las especies humana, ratón, rata, lagomorfa, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y aviar, etc.

Se recuperan de las células de interés y se amplifican ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes variables del anticuerpo (incluyendo los segmentos VH y VL). En el caso de las colecciones de genes de VH y VL reordenados, se puede obtener el ADN deseado aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coinciden con los extremos 5' y 3' de genes de VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)*, 86: 3833-3837 (1989), preparando de este modo repertorios diversos de genes de V para su expresión. Los genes de V se pueden amplificar a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio de V maduro y cebadores directos basados en el segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también se pueden basar en el exón líder como se describe en Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), y cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar redundancia en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). En determinadas divulgaciones, se maximiza la diversidad de la colección usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes de V para amplificar todas las disposiciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de células inmunitarias, por ejemplo, como se describe en el procedimiento de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el procedimiento de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción infrecuentes dentro del cebador de PCR como una marca en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o mediante una amplificación por PCR adicional con un cebador marcado como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Los repertorios de genes de V reordenados sintéticamente se pueden derivar *in vitro* de segmentos de genes de V. La mayoría de los segmentos del gen de VH humano se han clonado y secuenciado (como se informa en Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), y cartografiado (como se informa en Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) se pueden usar para generar diversos repertorios de genes de VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de secuencia y longitud diversas como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). También se pueden preparar repertorios de VH con toda la diversidad de secuencia enfocada en un bucle H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Se han clonado y secuenciado segmentos Vk y Vλ humanos (como se informa en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden usar para preparar repertorios de cadenas ligeras sintéticas. Los repertorios de genes de V sintéticos, basados en una gama de plegamientos de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Después de la amplificación de los ADN que codifican genes de V, se pueden reordenar *in vitro* segmentos de genes de V de la estirpe germinal de acuerdo con los procedimientos de Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 221: 381-388 (1992).

Se pueden construir repertorios de fragmentos de anticuerpos combinando repertorios de genes de VH y VL conjuntamente de varias maneras. Cada repertorio se puede crear en vectores diferentes y se pueden recombinar *in vitro* los vectores, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128:119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* explota la naturaleza bicatenaria de fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la colección impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin exposición previa se clonan por separado, uno en un fagómido y el otro en un vector de fago. A continuación, se combinan las dos colecciones mediante infección por fagos de bacterias que contienen fagómidos, de modo que cada célula contenga una combinación diferente y el tamaño de la colección esté limitado únicamente por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo*

de modo que los genes de VH y VL se recombinen en un único replicón y se coempaqueten en viriones de fago. Estas inmensas colecciones proporcionan grandes números de diversos anticuerpos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

5 De forma alternativa, los repertorios se pueden clonar secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o se pueden ensamblar conjuntamente por PCR y a continuación clonar, por ejemplo, como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). También se puede usar ensamblaje por PCR para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). Aún en otra técnica, se usa "ensamblaje por PCR en célula" para combinar genes de VH y VL en linfocitos mediante PCR y, a continuación, clonar repertorios de genes enlazados como se describe en Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

15 Los anticuerpos producidos por las colecciones sin exposición previa (naturales o bien sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de la afinidad también se puede imitar *in vitro* construyendo y reseleccionando a partir de colecciones secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), *supra*. Por ejemplo, se puede introducir al azar una mutación *in vitro* usando una polimerasa propensa a errores (como se informa en Leung *et al.*, *Technique*, 1: 11-15 (1989)) en el procedimiento de Hawkins *et al.* *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) o en el procedimiento de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración de la afinidad se puede realizar mutando aleatoriamente una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que portan secuencias aleatorias que se extienden a lo largo de la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y cribando para determinar clones de afinidad más alta. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describió un procedimiento para inducir mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una colección de genes de cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios de VH o VL seleccionados mediante presentación en fagos con repertorios de variantes de dominios de V naturales obtenidas a partir de donantes no inmunizados y cribar para determinar afinidades más altas en varias tandas de rebarajado de cadenas como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades de aproximadamente 10^{-9} M o menos.

30 El cribado de las colecciones se puede conseguir mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un antígeno para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresar en células huésped fijadas a placas de adsorción o usar en la clasificación de células, o conjugar a biotina para la captura con microesferas recubiertas con estreptavidina o usar en cualquier otro procedimiento conocido en la técnica para seleccionar colecciones de presentación en fagos.

35 Las muestras de las colecciones de fagos se ponen en contacto con el antígeno inmovilizado en condiciones adecuadas para la unión de al menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, que incluyen pH, fuerza iónica, temperatura y similares, se seleccionan para imitar condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y a continuación se eluyen por ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o por álcali, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.* *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o por competencia con antígeno, por ejemplo, en un procedimiento similar al procedimiento de competencia con antígeno de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer 20-1000 veces en una sola tanda de selección. Además, se pueden cultivar los fagos enriquecidos en cultivos bacterianos y someter a nuevas tandas de selección.

45 La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y si múltiples fragmentos de anticuerpos en un solo fago se pueden acoplar simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) se pueden retener mediante el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalentes y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la unión nuevamente del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de lavados largos y presentación en fagos monovalentes como se describe en Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

55 Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para el antígeno. Sin embargo, es probable que la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas técnicas de maduración de la afinidad) dé lugar a muchos mutantes, uniéndose la mayor parte al antígeno, y unos pocos con afinidad más alta. Con antígeno limitante, el fago de alta afinidad infrecuente podría quedar fuera. Para retener todos los mutantes de afinidad más alta, los fagos se pueden incubar con exceso de antígeno biotinilado, pero con el antígeno biotinilado a una concentración de molaridad más baja que la constante de afinidad molar diana para el antígeno. Los fagos de alta afinidad de unión se pueden capturar a continuación por microesferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que se seleccionen los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permita el aislamiento de clones mutantes con una afinidad tan solo dos veces más alta a partir de un gran exceso de fagos con afinidad más baja. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida

también se pueden manipular para discriminar en base a la cinética de disociación.

Se pueden seleccionar clones antiantígeno en base a la actividad. En determinadas divulgaciones, la divulgación proporciona anticuerpos antiantígeno que se unen a células vivas que expresan naturalmente el antígeno o se unen al antígeno flotante libre o al antígeno unido a otras estructuras celulares. Los clones Fv correspondientes a dichos anticuerpos antiantígeno se pueden seleccionar (1) aislando clones antiantígeno a partir de una colección de fagos como se describe anteriormente y, opcionalmente, amplificando la población aislada de clones de fago cultivando la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) seleccionando el antígeno y una segunda proteína frente a la que se desea actividad de bloqueo y de no bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fago antiantígeno sobre el antígeno inmovilizado; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a antígeno que se solapan o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, se pueden enriquecer además clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseadas repitiendo los procedimientos de selección descritos en el presente documento una o más veces.

El ADN que codifica anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones Fv de presentación en fagos de la divulgación se aísla y secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de la cadena pesada y ligera de interés a partir de un molde de ADN de fago o hibridoma). Una vez aislado, el ADN se puede disponer en vectores de expresión que, a continuación, se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256 (1993) y Plukthun, *Immunol. Revs.*, 130:151 (1992).

El ADN que codifica los clones Fv de la divulgación se puede combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener de Kabat *et al.*, *supra*) para formar clones que codifiquen las cadenas pesada y/o ligera de longitud parcial o completa. Se apreciará que se pueden usar regiones constantes de cualquier isotipo para este propósito, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener a partir de cualquier especie humana o animal. Un clon Fv derivado del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como humana) y, a continuación, fusionado a ADN de la región constante de otra especie animal para formar secuencia(s) codificante(s) de la cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa "híbrida" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En determinadas divulgaciones, un clon Fv derivado de ADN variable humano se fusiona a ADN de la región constante humana para formar secuencia(s) codificante(s) de cadenas pesadas y/o ligeras de longitud parcial o completa humanas.

También se puede modificar el ADN que codifica un anticuerpo antiantígeno derivado de un hibridoma de la divulgación, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en el lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el procedimiento de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Se puede modificar además el ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de clones de hibridoma o Fv uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos derivados de clones Fv o de hibridoma de la divulgación.

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

Son conocidos en la técnica diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoacídicos introducidos en el mismo desde una fuente que no es humana. Estos residuos aminoacídicos no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986), Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano por CDR o secuencias de CDR de roedor. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda

la colección de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana más próxima a la del roedor se acepta entonces como la región estructural humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Es también importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con una divulgación de procedimiento, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Están disponibles comúnmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y son conocidos por los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar residuos de FR a partir de las secuencias receptora y de importación de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada por el(los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y más sustancialmente implicados en la influencia en la unión a antígeno.

Se pueden construir anticuerpos humanos de la divulgación combinando secuencia(s) del dominio variable de clones Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos con secuencia(s) del dominio constante humanas conocidas como se describe anteriormente. De forma alternativa, se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación mediante el procedimiento de hibridoma. Las líneas celulares de heteromioma de ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147:86 (1991).

Es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión a la cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de estirpe germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la micromatriz genética de inmunoglobulina de estirpe germinal humana a dichos ratones mutantes de estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Duchosal *et al.* *Nature* 355:258 (1992).

También se puede usar el barajado de genes para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se llama "sellado por epítipo", la región variable de cadena pesada o bien ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación en fagos como se describe en el presente documento se reemplaza por un repertorio de genes de dominio de V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena humana/cadena no humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana/cadena no humana, en el que la cadena humana restablece el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, es decir, el epítipo regula (sella) la elección del compañero de cadena humana. Cuando se repite el procedimiento para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

(v) Fragmentos de anticuerpo

Se pueden generar fragmentos de anticuerpo por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o por técnicas recombinantes. En determinadas circunstancias, existen ventajas del uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite un aclaramiento rápido y puede dar lugar a un acceso mejorado a tumores sólidos. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de digestión proteolítica de anticuerpos inalterados (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science*,

229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar en y secretar a partir de *E. coli*, permitiendo, por tanto, la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Por ejemplo, se pueden aislar fragmentos de anticuerpo de las colecciones de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. De forma alternativa, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos F(ab')₂ a partir del cultivo de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')₂ con semivida *in vivo* incrementada que comprende residuos de epítipo de unión a receptor de rescate se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica. En determinadas divulgaciones, el anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; las patentes de EE. UU. n.ºs 5.571.894 y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación inalterados que carecen de regiones constantes; por tanto, pueden ser adecuados para una unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Se pueden construir proteínas de fusión de scFv para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amínico o bien carboxílico de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, donde los epítopos son habitualmente de diferentes antígenos. Si bien dichas moléculas normalmente solo se unirán a dos epítopos diferentes (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAb), anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos trispecíficos están englobados por esta expresión cuando se usan en el presente documento. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Son conocidos en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature* 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Trauneker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Es típico que la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones con la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en divulgaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

En una divulgación de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para obtener más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede genomanipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. Una interfase comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales aminoácidas pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales aminoácidas grandes

con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales indeseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, se puede acoplar uno de los anticuerpos en el heteroconjugado a avidina, el otro a biotina. Por ejemplo, se han propuesto dichos anticuerpos para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

En la literatura también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos inalterados se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente arsenito de sodio que forma complejos con ditiol para estabilizar los ditioles vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar directamente fragmentos de anticuerpo biespecífico del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a que los dominios V_H y V_L de un fragmento se emparejen con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

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

(vii) Anticuerpos de dominio único

En algunas divulgaciones, un anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena polipeptídica única que comprende la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas divulgaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). En una divulgación, un anticuerpo de dominio único consiste en la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

(viii) Variantes de anticuerpo

En algunas divulgaciones, se contemplan una o más modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se prepara esa secuencia.

(ix) Derivados de anticuerpo

Los anticuerpos de la invención se pueden modificar además para que contengan restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. En determinadas divulgaciones, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxitilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo puede variar, y si se fija más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, se pueden determinar el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado del anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

(x) Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

También se pueden producir anticuerpos usando procedimientos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo antiantígeno, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(a) Componente de secuencia señal

Un anticuerpo de la invención se pueden producir de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterógeno, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heterógena seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariontas que no reconocen y procesan una secuencia señal de anticuerpo natural, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal natural se puede sustituir, por ejemplo, por la secuencia líder de invertasa de levadura, una secuencia líder de factor α (incluyendo las secuencias líder de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o la secuencia líder de la fosfatasa ácida, la secuencia líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la secuencia señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero, así como secuencias líder secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

(b) Origen de replicación

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que posibilita que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que posibilita que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. En general, el componente de origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 se puede usar típicamente solo porque contiene el promotor temprano).

(c) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Típicamente, los genes de selección codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y, por tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, tales como DHFR, glutamina sintetasa (GS), timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, se identifican células transformadas con el gen de DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En estas condiciones, el gen de DHFR se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. Se puede usar una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) carente de actividad de DHFR endógena (por ejemplo, ATCC CRF-9096).

De forma alternativa, se identifican células transformadas con el gen de GS cultivando los transformantes en un medio de cultivo que contiene F-metionina sulfoximina (Msx), un inhibidor de GS. En estas condiciones, el gen de GS se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. El sistema de selección/amplificación de GS se puede usar en combinación con el sistema de selección/amplificación de DHFR descrito anteriormente.

De forma alternativa, las células huésped (en particular huéspedes naturales que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, un gen de DHFR natural y otro marcador seleccionable tal como la aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE. UU. n.º 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature* 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona a continuación un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levadura carentes de *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan con plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, se pueden usar vectores derivados del plásmido circular de 1,6 µm pKD1 para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. De forma alternativa, se ha informado de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han divulgado vectores de expresión estables de múltiples copias para la secreción de seroalbúmina humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology* 9:968-975 (1991).

(d) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen, en general, un promotor que lo reconoce el organismo huésped y está enlazado de forma funcional al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor de *phoA*, los sistemas promotores de β-lactamasa y lactosa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor de *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) enlazada de forma funcional al ADN que codifica un anticuerpo.

Las secuencias de promotor son conocidas para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos hay una secuencia AATAAA que puede ser la secuencia señal para la adición de la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucarióticos.

Los ejemplos de secuencias de promotor adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglicosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción

controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones de promotor de la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levaduras se describen además en el documento EP 73.657. También se usan de forma ventajosa potenciadores de levadura con promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo a partir de vectores en células huésped de mamífero se puede controlar, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B, virus de simio 40 (SV40), o de promotores de mamífero heterógenos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de *HindIII* E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como vector se divulga en la patente de EE. UU. n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. De forma alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

(e) Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa a menudo mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras son conocidas ahora a partir de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el promotor/potenciador temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucarióticos. El potenciador se puede empalmar al vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del anticuerpo, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

(f) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles de regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión divulgado en el mismo.

(g) Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levaduras o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferente es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Se pueden producir anticuerpos de longitud completa, proteínas de fusión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una semivida mayor en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.648.237 (Carter *et al.*), la patente de EE. UU. n.º 5.789.199 (Joly *et al.*), la patente de EE. UU. n.º 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describe la región de iniciación de la traducción (TIR) y secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. Véase

también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pág. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través, por ejemplo, de una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al procedimiento para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más usada entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, otros varios géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para una revisión que analiza el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gemgross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

Se pueden seleccionar determinadas cepas de hongos y levaduras en las que las vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (que describe la humanización de la vía de glucosilación en *Pichia pastoris*); y Gemgross *et al.*, *supra*.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células huésped permisivas de insecto de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están públicamente disponibles una variedad de cepas víricas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus se pueden usar como el virus en el presente documento de acuerdo con la divulgación, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, lenteja de agua (*Lemnaceae*), alfalfa (*M. truncatula*) y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Se pueden usar células de vertebrados como huéspedes, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su cultivo en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); linfocitos TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células LS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pág. 255-268.

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(h) Cultivo de las células huésped

Las células huésped usadas para producir un anticuerpo de la presente invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles tales como L10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Bames *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), las patentes de EE. UU. n.ºs 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762;

4.560.655; o 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de EE. UU. re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro complemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

(ix) Purificación de anticuerpo

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o se puede secretar directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, se retiran los restos de partículas, células huésped o bien fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta de células en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en primer lugar, en general, usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes casuales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxipatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una de las etapas de purificación típicamente preferentes. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Se puede usar proteína A para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Findmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es lo más a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna con poli(ácido aspártico)), cromatografía de exclusión y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, pruebas y en clínica están bien establecidas en la técnica, consecuentes con las metodologías descritas anteriormente y/o según lo considere apropiado un experto en la técnica para un anticuerpo particular de interés.

D. Selección de anticuerpos biológicamente activos

Los anticuerpos producidos como se describe anteriormente se pueden someter a uno o más ensayos de "actividad biológica" para seleccionar un anticuerpo con propiedades beneficiosas desde una perspectiva terapéutica. El anticuerpo se puede cribar por su capacidad de unirse al antígeno contra el que se generó. Por ejemplo, para un anticuerpo anti-VEGF, como se muestra en el ejemplo a continuación, las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo se pueden evaluar en un ensayo que detecta la capacidad de unirse al VEGF.

En otra divulgación, la afinidad del anticuerpo se puede determinar mediante unión por saturación; ELISA; y/o ensayos de competencia (por ejemplo, RIA), por ejemplo.

Además, el anticuerpo se puede someter a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso previsto del anticuerpo.

Para cribar anticuerpos que se unan a un epítipo particular en el antígeno de interés (por ejemplo, aquellos que bloquean la unión del anticuerpo anti-VEGF del ejemplo a VEGF), se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). De forma alternativa, se puede realizar cartografiado de epítopos, por ejemplo, como se describe en Champe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995), para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés.

E. Artículos de fabricación

5 En otra divulgación, se proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la formulación farmacéutica acuosa de la invención y opcionalmente proporciona instrucciones para su uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales y jeringas. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. Un recipiente ejemplar es un vial de vidrio de un solo uso de 3-20 ml. De forma alternativa, para una formulación multidosis, el recipiente puede ser un vial de vidrio de 3-100 ml. El recipiente contiene la formulación y la etiqueta en, o asociada con, el recipiente puede indicar instrucciones para su uso. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos del envase con instrucciones para su uso.

15 La invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

La memoria descriptiva se considera que es suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención.

20 **Ejemplos**

Se entiende que los ejemplos y modos de realización descritos en el presente documento son solo para propósitos ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos se sugerirán a los expertos en la técnica y se incluirán dentro del espíritu y el ámbito de esta solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25 **Ejemplo 1: Formulaciones líquidas de anticuerpos anti-VEGF estables**

Estos ejemplos describen el desarrollo y las pruebas de estabilidad de formulaciones líquidas estables que comprenden anticuerpo anti-VEGF a concentraciones de proteína en el intervalo de aproximadamente 20 mg/ml-200 mg/ml en diversas formulaciones líquidas que comprenden histidina, arginina, acetato o cloruro de sodio. Se almacenó un mililitro de cada formulación en viales de vidrio de 3 ml a 40 °C y se evaluó la estabilidad a las 1, 2 y 4 semanas. La estabilidad del anticuerpo anti-VEGF se controló mediante varios ensayos que incluyen UV (para concentración y turbidez), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para análisis de variantes de tamaño, isoelectroenfoque capilar con detección por imágenes (icIEF) para análisis de variantes de carga, CE-SDS para distribución de tamaños y ensayo de unión para actividad. Después de cuatro semanas de pruebas de estabilidad, nuestros resultados indican que el anticuerpo anti-VEGF es estable en acetato de arginina 200 mM, cloruro de sodio 150 mM, PS20 al 0,04 %, pH 5,2.

40 La estabilidad (por ejemplo, formación de agregados, viscosidad, etc.) del anticuerpo anti-VEGF se investigó en varias formulaciones líquidas que comprenden histidina, cloruro de sodio, arginina y acetato. La estabilidad del anticuerpo anti-VEGF se controló mediante varios ensayos, incluyendo cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para el análisis de formación de agregados. Nuestros resultados indican que el anticuerpo anti-VEGF es estable a aproximadamente pH 5,2 en tampones que contienen arginina.

45 Se formuló el anticuerpo anti-VEGF en diferentes tampones por diálisis usando casetes Slide-a-Lyzer® para lograr las concentraciones finales enumeradas en la tabla 1. Cada formulación se filtró a esterilidad con unidades de filtro Steriflip® de 0,22 µm y se rellenó asepticamente en viales esterilizados en autoclave, se taponó y se selló. Las muestras se colocaron a 2-8 °C, 25 °C y 40 °C y se realizaron estudios de estabilidad a temperaturas seleccionadas.

50 *Tabla 1: Formulaciones*

Formulación

55	A	Fosfato de sodio 51 mM, trehalosa 159 M, PS20 al 0,04 %, pH 6,2
	B	Acetato de arginina 200 mM, PS20 al 0,04 %, pH 5,2
	C	Acetato de sodio 20 mM, sacarosa 240 mM, PS20 al 0,04 %, pH 5,2
60	D	Cloruro de histidina 20 mM, cloruro de arginina 200 mM, PS20 al 0,04 %, pH 5,2

Procedimientos

65 *pH*: Se colocó un volumen de 200 µl de cada muestra en tubos Eppendorf de 1,5 ml a temperatura ambiente y se midió su pH usando un medidor de pH Thermo Orion equipado con un semimicroelectrodo Ross®. El medidor de pH se calibró usando los patrones de tampón Thermo Orion de pH 4,0, 5,0 y 7,0.

Viscosidad: La viscosidad en cizallamiento se midió usando un reómetro Anton Paar Physica MCR300 con un cono de 25 mm (CP 25-1) ajustado a una altura de 0,049 mm. Se cargaron 75 µl de cada muestra en una placa Peltier a 25 °C y se midieron 10 veces por intervalo de 100 s a una velocidad de cizallamiento constante de 1000 1/s.

Cromatografía de intercambio de exclusión por tamaño (SEC): Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño para cuantificar los niveles de agregado total (con inyecciones sin diluir) y los niveles de agregado de disociación lenta (con inyecciones diluidas). Las inyecciones diluidas se diluyeron con tampón de fase móvil (fosfato de potasio 0,20 M, cloruro de potasio 0,25 M, pH 6,2) a 0,5 mg/ml. Se incubaron todas las muestras a 30 °C durante 24 horas antes del análisis. Se inyectaron 10 µl de cada muestra sin diluir y 100 µl de cada muestra diluida en una columna TSK G3000SWXL, 7,8 X 300 mm (TOSHAAS, número de componente 08541) usando un sistema de HPLC Agilent 1100. El tomamuestras automático se mantuvo a 30 °C mientras que la columna se mantuvo a temperatura ambiente. El caudal fue de 0,5 ml/min y el tiempo de desarrollo total por muestra fue de 30 minutos. Los datos se analizaron con una absorbancia de la muestra a 280 nm usando HP Chemstation.

Cromatografía de intercambio iónico (IEC): Se realizó cromatografía de intercambio iónico para cuantificar variantes cargadas en muestras digeridas con carboxipeptidasa B (CpB). Se diluyeron muestras a 1 mg/ml con disolvente A (tampón de ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES) 20 mM, pH 6,5), se trataron con una adición al 1 % p/p de 1 mg/ml de CpB y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C. A continuación se inyectaron 50 µl de cada muestra en una columna Dionex ProPac WCX-10, 4,6 X 250 mm usando un sistema de HPLC Agilent 1100. La temperatura del tomamuestras automático se mantuvo a 2-8 °C mientras que la columna se mantuvo a 40 °C. El caudal fue de 0,5 ml/min mientras se usaba un gradiente de disolvente A y disolvente B (cloruro de sodio 200 mM en disolvente A) durante 90 minutos, como se indica en el procedimiento de prueba. Los datos se analizaron con una absorbancia de la muestra a 280 nm usando HP Chemstation.

Ensayo de turbidez: Para controlar la turbidez, se midió la densidad óptica de cada formulación a 350 nm usando un espectrofotómetro de UV-VIS Agilent 8453. Todas las muestras se analizaron sin dilución usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de trayectoria.

Estudios de estabilidad a -20 °C y de congelación-descongelación: Se llenan asépticamente las formulaciones A-D en minibotes de acero inoxidable 316 L (15 ml/minibote). Todas las muestras se almacenan a -20 °C durante cantidades de tiempo variables (por ejemplo, 24, 48, 72 o más horas; 4, 5, 6, 7 o más días; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más semanas; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más meses, y continuamente se toman muestras asépticamente bajo una campana de flujo laminar. Además, se introducen las formulaciones A-D en viales de vidrio de 6 ml y se almacenan a -20 °C. Cada vial se somete a cinco ciclos de congelación y descongelación y se analiza mediante ensayos de SEC, IEC y turbidez. El ciclo de congelación-descongelación implica almacenamiento durante al menos 24 horas a -20 °C seguido de almacenamiento durante al menos 24 horas a 5 °C.

Resultados y análisis

Este estudio investigó la estabilidad (por ejemplo, formación de agregados, viscosidad, estabilidad química, etc.) de diferentes concentraciones de anticuerpo anti-VEGF en una formulación basada en arginina. Se usaron SEC e IEC para controlar la estabilidad del anticuerpo anti-VEGF en condiciones de almacenamiento extremas y de envejecimiento acelerado. Se midieron la agregación y la viscosidad del anticuerpo anti-VEGF y se exponen en la tabla 2 a continuación y se ilustran en las figuras 2 y 4.

Tabla 2: propiedades físicas de las formulaciones estudiadas

Formulación	[Proteína] (mg/ml)	% de agregado total	Viscosidad (cP)
A	25	7	
A	30	8	
A	100	10	
A	150	13	
B	20	N/D	1,3
B	50	2,6	1,9
B	100	3,8	4,2
B	110	N/D	4,7
B	125	N/D	6,1
B	150	N/D	9,5
C	20	N/D	1,6
C	50	3	2,3
C	100	5,3	5,7
C	125	N/D	12,4

Formulación	[Proteína] (mg/ml)	% de agregado total	Viscosidad (cP)
C	150	N/D	23,5
C	175	N/D	52
D	20	N/D	1,3
D	50	2,1	1,8
D	100	3,4	4,3
D	125	N/D	6
D	150	N/D	11,3
D	175	N/D	17,7

Agregación de todas las formulaciones a 40 °C: Se midió la cantidad de agregado total y dímero formado en cada formulación anti-VEGF después de almacenamiento durante 0, 1, 2 y 4 semanas a 40 °C y se expone en las tablas 3, 4 y 5 a continuación y se ilustra en las figuras 1 y 3.

5

Tabla 3: Agregado total después de almacenamiento a 40 °C

Muestra	% de agregado total 4 semanas
A	10,3
B	5
C	7,1
D	10,8

Tabla 4: Agregado total después de almacenamiento a 40 °C

10

Muestra	% de agregado total 0 semanas	% de agregado total 1 semana	% de agregado total 2 semanas	% de agregado total 4 semanas
B	3,9	4,7	5,3	6,1
C	5,4	6,8	8,3	8,1
D	3,4	5,2	8,4	13,1

Tabla 5: Dímero después de almacenamiento a 40 °C

Muestra	% de dímero 0 semanas	% de dímero 1 semana	% de dímero 2 semanas	% de dímero 4 semanas
B	3,3	3,9	4,4	5,0
C	4,7	6,0	7,4	7,1
D	2,8	4,2	6,7	10,8

15

Agregación de formulaciones a 25 °C: Se midió la cantidad de agregado total y dímero formado en cada formulación anti-VEGF (100 mg/ml) después de almacenamiento durante 0, 2, 4 y 8 semanas a 25 °C y se expone en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Agregado total después de almacenamiento a 25 °C

20

Formulación	% de agregado total 0 semanas	% de agregado total 2 semanas	% de agregado total 4 semanas	% de agregado total 8 semanas
B	3,9	4,6	4,3	3,4
C	5,4	6,6	6,6	4,8
D	3,4	5,1	6,4	6,1

Agregación de formulaciones a 2-8 °C: Se midió la cantidad de agregado y dímero formado en cada formulación anti-VEGF (100 mg/ml) después de almacenamiento durante 0 y 4 semanas a 2-8 °C y se expone en la tabla 7 a continuación.

25

Tabla 7: Agregado total y dímero después de almacenamiento a 2-8 °C

Formulación	% de agregado total 0 semanas	% de agregado total 4 semanas	% de dímero 0 semanas	% de dímero 4 semanas
B	3,9	3,8	3,3	3,2
C	5,4	5,7	4,7	5,1
D	3,4	3,5	2,8	2,9

Agregación a varias concentraciones de arginina a 40 °C: Se midió la cantidad de agregado total formado en cada formulación anti-VEGF a diversas concentraciones de acetato de arginina y se expone en la tabla 8 a continuación.

5

Tabla 8: Agregado total a diversas concentraciones de acetato de arginina

Concentración de acetato de arginina (mM)	% de agregado total
25	5,2
50	4,8
100	4,4
200	4,2

10

Efecto de los excipientes y la fuerza iónica: Se investigó el efecto de diferentes excipientes sobre la estabilidad del anticuerpo anti-VEGF. Una lista de excipientes explorados incluye fosfato de sodio, acetato de arginina, acetato de sodio y cloruro de histidina. Nuestros resultados mostraron que las formulaciones que contienen cloruro de arginina y cloruro de histidina se agregan más rápido que todas las otras formulaciones.

15

La estabilidad del anticuerpo anti-VEGF se evaluó en diversas condiciones de tampón. Los datos obtenidos del estudio mostraron que el anticuerpo anti-VEGF es más estable en tampones de acetato de arginina entre pH 4,0 y pH 6,0. Los datos obtenidos del estudio de cribado de la formulación mostraron que el anticuerpo anti-VEGF es estable y ha reducido la formación de agregados y dímeros a una concentración de proteína de 100 mg/ml en acetato de arginina 200 mM, PS20 al 0,04 % a pH 5,2.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación farmacéutica acuosa estable, comprendiendo la formulación una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal humanizado en un tampón de acetato de arginina, pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5, en la que el anticuerpo es bevacizumab.
2. La formulación de la reivindicación 1, en la que el pH del tampón de acetato de arginina es pH 5,2.
- 10 3. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la concentración de acetato de arginina en el tampón es aproximadamente 200 mM.
4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además polisorbato 20 al 0,04 % como tensioactivo.
- 15 5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.
- 20 6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml.
7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml.
- 25 8. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el anticuerpo no se somete a liofilización previa.
- 30 9. La formulación de la reivindicación 1, en la que el tampón es acetato de arginina 200 mM pH 5,2, el tensioactivo es polisorbato en una cantidad de aproximadamente un 0,01-0,1 % v/v, en la que la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 40 °C durante al menos 28 días.



