



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 779**

51 Int. Cl.:
C07K 16/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04759018 .7**

96 Fecha de presentación : **29.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1610820**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2006**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpos y de proteínas a concentración elevada.**

30 Prioridad: **04.04.2003 US 460659 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.01.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.01.2011

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4, US
NOVARTIS AG.

72 Inventor/es: **Liu, Jun y**
Shire, Steven

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 349 779 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de anticuerpos y de proteínas a concentración elevada.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

Esta invención se refiere a formulaciones de anticuerpos a concentración elevada, que son particularmente adecuadas para administración subcutánea. La invención proporciona además formulaciones líquidas estables muy concentradas (*por ejemplo*, ≥ 100 mg/ml de proteínas).

Descripción de la técnica relacionada

Existe una demanda significativa de formulaciones líquidas de anticuerpos muy concentradas. Sin embargo, las formulaciones de proteínas muy concentradas presentan diversos problemas. Un problema es la inestabilidad debida a la formación de material particulado. En las preparaciones liofilizadas reconstituidas para generar formulaciones líquidas, este problema se ha resuelto mediante el uso de tensioactivos (*por ejemplo*, un polisorbato), pero los tensioactivos son inadecuados para las formulaciones líquidas, debido a que dificultan el procesado adicional. Además, los tensioactivos no reducen el incremento de la viscosidad producido como resultado de las numerosas interacciones moleculares debidas a la naturaleza macromolecular de los anticuerpos.

Aunque se ha demostrado que los tensioactivos reducen significativamente el grado de formación de partículas de las proteínas, no resuelven el problema del incremento de la viscosidad que dificulta la manipulación y la administración de formulaciones concentradas de anticuerpos. Los anticuerpos tienden a formar disoluciones viscosas con elevada concentración debido a su naturaleza macromolecular y al potencial de interacciones intermoleculares. Además, a menudo se usan como estabilizantes azúcares farmacéuticamente aceptables en grandes cantidades. Dichos azúcares pueden potenciar las interacciones intermoleculares, incrementando por tanto la viscosidad de la formulación. Formulaciones muy viscosas son difíciles de fabricar, arrastrar en una jeringuilla e inyectar subcutáneamente. El uso de fuerza en la manipulación de formulaciones viscosas conduce a una excesiva formación de espuma, que puede acarrear la desnaturalización y la inactivación de los compuestos biológicos activos. Se carece de solución satisfactoria para este problema.

Aunque la técnica anterior indica numerosos ejemplos de excipientes que se pueden emplear adecuadamente para crear formulaciones farmacéuticas, se han formulado satisfactoriamente muy pocas proteínas por encima de 100 mg/ml, o se han descrito técnicas para realizar lo anterior.

Los solicitantes han descubierto que la Arginina, específicamente Arginina-HCl es particularmente adecuada para formulaciones líquidas muy concentradas de proteínas o anticuerpos.

Se dan a conocer formulaciones estables de proteínas liofilizadas isotónicas en la publicación PCT WO 97/04801, publicada el 13 de febrero de 1997. Las formulaciones liofilizadas dadas a conocer se pueden reconstituir para generar formulaciones líquidas con elevada concentración de proteínas sin pérdida aparente de estabilidad. Se ha reducido previamente la agregación de las proteínas mediante la adición de azúcares, pero al hacer eso, se puede incrementar drásticamente la viscosidad y la osmolaridad, haciendo por tanto poco práctico el procesado y el uso.

La solicitud PCT de los solicitantes, publicación WO02/30463, publicada el 18 de abril de 2002 da a conocer formulaciones con concentraciones elevadas de proteínas, pero de baja viscosidad, conseguidas: 1) mediante pH bajo (aproximadamente 4,0 a 5,3); 2) pH alto (aproximadamente 6,5 a 12,0), o 3) incrementando la fuerza iónica total de la formulación mediante la adición de sales o tampones. Sin embargo, aunque el aumento de la fuerza iónica disminuye la viscosidad de la formulación (tal como con NaCl) esto puede dar también como resultado un incremento de la turbidez, que está asociado a menudo con la formación de partículas de proteínas (*por ejemplo*, agregación). De esta manera, una formulación óptima con una elevada concentración de proteínas debe superar los desafíos de la estabilidad, viscosidad, osmolaridad y turbidez.

55 **Resumen de la invención**

La presente invención se refiere a formulaciones muy concentradas de anticuerpos E25 dirigidos contra IgE que son estables, y de baja viscosidad y turbidez, según se define en las reivindicaciones.

En particular, la presente invención se refiere a formulaciones de anticuerpos muy concentradas de baja turbidez que comprenden proteínas o anticuerpos (100-260 mg/ml), histidina (10-100 mM), arginina-HCl (50-200 mM) y Polisorbato (0,01%-0,1%), que tienen un pH de 5,5-7,0, una viscosidad de 50 cs o menos y una osmolaridad entre 200 mOsm/kg-450 mOsm/kg. Alternativamente, el anticuerpo en las formulaciones puede variar entre 120-260 mg/ml, alternativamente 150-260 mg/ml, alternativamente 180-260 mg/ml, alternativamente 200-260 mg/ml de anticuerpo. Alternativamente, la osmolaridad varía entre 250 mOsm/kg-350 mOsm/kg. Alternativamente, la concentración de arginina-HCl varía entre 100-200 mM, alternativamente 150-200 mM, alternativamente 180-200 mM.

Se describen también en el presente documento formulaciones de anticuerpos muy concentradas de baja turbidez que comprende el anticuerpo (40-150 mg/ml), histidina (10-100 mM), azúcar (*por ejemplo*, trehalosa o sacarosa, 20-350 mM) y Polisorbato (0,01%-0,1%).

- 5 En una realización particular, la invención proporciona una formulación que contiene elevadas concentraciones de proteínas de gran peso molecular, que son anticuerpos o inmunoglobulina. Los anticuerpos se dirigen contra un antígeno predeterminado concreto, cuyo antígeno es IgE (rhuMABE-25 descrito en los documentos U.S.P. 6.329.509 y WO 99/01556).
- 10 Las formulaciones de la presente invención pueden ser formulaciones farmacéuticas. En un aspecto específico, la formulación se administra subcutáneamente.

- En otra realización adicional, la invención proporciona el uso médico de las formulaciones dadas a conocer en el presente documento que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo en un procedimiento para el tratamiento, profiláctico o terapéutico, de un trastorno tratable mediante el anticuerpo formulado. Dichas formulaciones son particularmente útiles para la administración subcutánea. En un aspecto específico, el trastorno es un trastorno mediado por IgE. En otro aspecto específico adicional, el trastorno mediado por IgE es rinitis alérgica, asma (*por ejemplo*, asma alérgica y asma no alérgica), dermatitis atópica, gastroenteropatía alérgica, hipersensibilidad (*por ejemplo*, anafilaxis, urticaria, alergias alimentarias, etc.), aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasitarias, cistitis intersticial, síndrome de hiper IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, alinoplasia tímica, mieloma de IgE y reacción de hospedador frente a injerto.

- En otra realización adicional, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende un envase que encierra una formulación dada a conocer en el presente documento. En un aspecto, el artículo de fabricación es una jeringuilla precargada. En otro aspecto específico adicional, la jeringuilla precargada está contenida adicionalmente dentro de un dispositivo de inyección. En otro aspecto específico adicional, el dispositivo de inyección es un autoinyector.

Breve descripción de las figuras

- 30 Figura 1. Cromatografía de interacción hidrófoba de un anticuerpo monoclonal dirigido contra IgE digerido con pepsina. Se formularon las muestras a diferentes pH y tampones: (●) Acetato 20 mM, (Δ) Succinato 20 mM, (▲) Na₂HPO₄ 20 mM, (▽) K₂PO₄ 20 mM y (*) tampón Tris 20 mM. Se almacenaron las muestras a 30°C durante 6 meses.

- 35 Figura 2. Cromatografía de exclusión por tamaño de un anticuerpo monoclonal dirigido contra IgE almacenado a 40°C durante 6 meses. Se formularon las muestras a diferentes pH y tampones: (■) Glutamato 20 mM, (●) Acetato 20 mM, (Δ) Succinato 20 mM, (□) Histidina 20 mM, (▲) Na₂HPO₄ 20 mM, (▼) K₂PO₄ 20 mM y (*) tampón Tris 20 mM.

- 40 Figura 3. Actividad de un anticuerpo monoclonal dirigido contra IgE almacenado a 30°C durante 6 meses. Se formularon las muestras a diferentes pH y tampones: (●) Acetato 20 mM, (Δ) Succinato 20 mM, (□) Histidina 20 mM, (▲) Na₂HPO₄ 20 mM, (▼) K₂PO₄ 20 mM y (*) tampón Tris 20 mM.

- 45 Figura 4. Efectos de Polisorbato 20 en la turbidez del anticuerpo monoclonal estresado dirigido contra IgE. Las muestras contienen 100 mg/ml de anticuerpo, Succinato 20 mM, Trehalosa 192 mM y diversas cantidades de Polisorbato 20 a pH 6,0. Las concentraciones de Polisorbato son (■) 0, (▲) 0,01%, (●) 0,02% y (Δ) 0,05%.

- Figura 5. Turbidez de un anticuerpo monoclonal dirigido contra IgE a ~150 mg/ml con diferentes excipientes (▲) CaCl₂, (▽) MgCl₂ y (Δ) Arginina-HCl.

- 50 Figura 6. Turbidez de un anticuerpo monoclonal dirigido contra IgE a ~150 mg/ml con diversos excipientes. Se almacenaron las muestras a (▲) -70°C, (■) 2-8°C, (Δ) 15°C, (□) 30°C y (▽) 40°C.

- Figura 7. Análisis mediante cromatografía de interacción hidrófoba de un anticuerpo monoclonal dirigido contra IgE digerido con papaína. Se formularon las muestras a -150 mg/ml con diversos excipientes y se almacenaron a (▼) -70°C, (■) 2-8°C, (▲) 15°C, (Δ) 30°C y (□) 40°C.

- Figura 8. Cromatografía de exclusión por tamaño de un anticuerpo monoclonal dirigido contra IgE a -150 mg/ml en (■) arginina-HCl 200 mM, histidina 23 mM, pH 6,0 (▲) arginina-HCl 182 mM, histidina 20 mM, pH 6,0 (●) arginina-HCl 182 mM, histidina 20 mM, sacarosa 91 mM, pH 6,0 (□) MgCl₂ 50 mM, 27 mg/ml de trehalosa, acetato al 0,01%, (Δ) MgCl₂ 50 mM, MgAc₂ 30 mM, acetato al 0,01%, y (○) MgCl₂ 50 mM, MgAc₂ 45 mM, acetato al 0,01%. Se almacenaron las muestras a 30°C durante 6 meses.

- Figura 9. Análisis mediante cromatografía de interacción hidrófoba de un anticuerpo monoclonal dirigido contra IgE digerido con papaína. Se formularon las muestras mostradas en (■) arginina-HCl 200 mM, histidina 23 mM, (▲) arginina-HCl 182 mM, histidina 20 mM, (●) arginina-HCl 182 mM, histidina 20 mM, sacarosa 91 mM, (□) MgCl₂ 50 mM, 27 mg/ml de trehalosa, acetato al 0,01%, (Δ), MgCl₂ 50 mM, MgAc₂ 30 mM, acetato al 0,01% y (○) MgCl₂ 50 mM, MgAc₂ 45 mM, acetato al 0,01%. Se almacenaron las muestras a 30°C durante 6 meses.

Figura 10. Muestra una comparación de las secuencias de longitud completa de las cadenas variable y constante de los anticuerpos E25, E26 y Hu-901 dirigidos contra IgE. Se muestran subrayadas las regiones CDR de Hu-901. Para E25 y E26, se muestran en negrita las regiones CDR según se define por Chothia, mientras que las regiones CDR según se define por Kabat se delimitan con paréntesis. La Figura 10A muestra las secuencias de la cadena ligera de E25, E26 y Hu-901 (SEC de ID N^{os}: 1-3), mientras que la Figura 10B muestra las secuencias de la cadena pesada de E25, E26 y Hu-901 (SEC de ID N^{os}: 4-6).

Descripción detallada de la realización preferida

1. Definiciones

Por “proteína” se entiende una secuencia de aminoácidos por la cual la longitud de la cadena es suficiente para producir los niveles superiores de la estructura terciaria y/o cuaternaria. De esta manera, las proteínas se distinguen de los “péptidos”, que son también moléculas basadas en aminoácidos que no tienen dicha estructura. Normalmente, una proteína para uso en el presente documento tendrá un peso molecular de al menos aproximadamente 15-20 kD, preferiblemente al menos aproximadamente 20 kD.

Los ejemplos de proteínas abarcadas dentro de la definición en el presente documento incluyen proteínas de mamíferos, tales como, *por ejemplo*, hormona del crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora del tiroides; lipoproteínas; α -1-antitripsina; cadena A de la insulina; proinsulina; hormona estimuladora del folículo; calcitonina; hormona luteneizante; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular, y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensioactivo pulmonar, un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA, *por ejemplo*, Activase[®], TNKase[®], Retevase[®]); bombazina; trombina, factor- α y β de necrosis tumoral; encefalinas; RANTES (célula T expresada y segregada normalmente regulada en la activación); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1- α); albúmina de suero tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorelaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o factores de crecimiento; una integrina; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina 3, 4, 5, 6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de los fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF- α y TGF- β , incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; factor I y II de crecimiento tipo insulina (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-1 (IGF-I de cerebro); proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina, proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPO); factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón α , β , y γ , factores estimuladores 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 células T; proteínas superficiales de membrana; factor acelerador de la descomposición (DAF); un antígeno vírico tal como, *por ejemplo*, una porción de la envoltura del virus del SIDA; proteínas de transporte; receptores localizadores; adreínas, proteínas reguladoras; inmunoadhesinas; anticuerpos; y fragmentos o variantes biológicamente activas de cualquiera de los polipéptidos anteriormente relacionados.

La proteína que se formula es, preferiblemente, esencialmente pura y, deseablemente, esencialmente homogénea (*es decir*, exenta de proteínas contaminantes). Proteína “esencialmente pura” significa una composición que comprende al menos aproximadamente un 90% en peso de la proteína, basándose en el peso total de la composición, preferiblemente, al menos un 95% en peso. Proteína “esencialmente homogénea” significa una composición que comprende al menos aproximadamente un 99% en peso de proteína, basándose en el peso total de la composición.

En algunas realizaciones, la proteína es un anticuerpo. El anticuerpo puede unirse por ejemplo a cualquiera de las moléculas anteriormente mencionadas. Las dianas moleculares de los anticuerpos a modo de ejemplo abarcadas por la presente invención incluyen IgE, las proteínas CD CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 y CD40; los miembros de la familia de receptores HER tales como el receptor EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; 2c4, 4D5, PSCA, LDP-2, moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y la integrina α v/ β 3 que incluye las subunidades α y β de la misma (*por ejemplo*, anticuerpos dirigidos contra CD11, dirigidos contra CD18 o dirigidos contra CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de la obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4, y proteína C.

El término “anticuerpo”, según se usa en el presente documento incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de la inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, Fab, F(ab')₂, y Fv). En el presente documento, se usa el término “inmunoglobulina” (Ig) de manera intercambiable con “anticuerpo”.

La unidad básica de anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetrámera compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM está constituido por 5 unidades básicas heterotetrámeras junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y contiene 10 sitios de unión al antígeno, mientras que los anticuerpo IgA comprenden entre 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas que pueden polimerizarse

para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG la unidad de 4 cadenas es generalmente aproximadamente de 150.000 dalton. Cada cadena L se une a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L tiene también puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada

5 cadena H tiene en el término N, una región variable (V_H) seguida por tres regiones constantes (C_H) por cada una de las cadenas α y γ y cuatro regiones C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el término N, una región variable (V_L) seguida por una región constante en su otro extremo. La V_L se alinea con la V_H y la C_L se alinea con la primera región constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que los restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada. El emparejamiento de una V_H y una

10 V_L conjuntamente forma un único sitio de unión al antígeno. Para la estructura y las propiedades de los anticuerpos, véase, *por ejemplo*, Basic and Clinical Immunology, 8ª Edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

Se puede asignar la cadena L de cualquier especie de vertebrado a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes. Dependiendo de la

15 secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas (CH), se pueden asignar las inmunoglobulinas a diferentes tipos o isotipos. Existen cinco tipos de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tiene cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Los tipos γ y μ se dividen adicionalmente en subtipos sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y función de las CH, *por ejemplo*, los seres humanos expresan los siguientes subtipos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2.

20

El término “variable” se refiere al hecho de que algunos segmentos de las regiones variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos. La región V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye por igual a lo largo del espacio

25 completo de las regiones variables. En vez de esto, las regiones V están constituidas por tramos relativamente invariantes denominados regiones marco (FR) de aproximadamente 15-30 restos de aminoácidos separados por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas “regiones hipervariables” o algunas veces “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR) que son cada una de aproximadamente 9-12 restos de aminoácidos de longitud. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada naturales, comprenden cada una cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de β lámina, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la β lámina. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otras cadenas, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Las regiones constantes no están

30 implicadas directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan algunas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo dependiente de la citotoxicidad celular (ADCC).

El término “región hipervariable” (conocido también como “regiones determinantes de la complementariedad” o CDR) cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que están

40 (usualmente tres o cuatro regiones cortas de la secuencia de variabilidad extrema) dentro del dominio de la región V de una inmunoglobulina que forma el sitio de unión al antígeno y son los determinantes principales de la especificidad del antígeno. Existen al menos dos procedimientos para identificar los restos CDR: (1) Un enfoque basado en la variabilidad de la secuencia de las especies cruzadas (*es decir*, Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, MS 1991); y (2) Un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia, C. y col., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Sin embargo, en la extensión en la que las técnicas de identificación de los dos restos definen regiones de solapamiento, pero no regiones idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida.

45

El término “anticuerpo monoclonal”, según se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que se producen naturalmente y/o las modificaciones posteriores a la traducción (*por ejemplo*, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Adicionalmente a su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se sintetizan mediante cultivo del hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se construye requiriendo la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar según la presente invención se pueden preparar mediante el procedimiento del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y col., Nature, 256: 495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567). Se pueden aislar también “anticuerpos monoclonales” a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando por ejemplo las técnicas descritas en Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991).

50

55

60

65

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con un homóloga a las correspondientes

secuencias en los anticuerpos derivadas de una especie particular o que pertenecen a un tipo o subtipo de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena(s) es(son) idéntica con una homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivadas de otras especies o que pertenecen a otro tipo o subtipo de anticuerpo, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión a antígeno de la región variable derivadas de un primate no humano (*por ejemplo*, Mono del Viejo Mundo, Simio, *etc.*), y secuencias de la región constante humana.

Un anticuerpo “intacto” es el que comprende un sitio de unión a antígeno así como una CL y al menos las regiones de la cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Las regiones constantes pueden ser regiones constantes de la secuencia natural (por ejemplo, regiones constantes de la secuencia natural humana) o variantes de la secuencia de aminoácidos de la misma. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Un “fragmento de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la unión al antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la Patente de los Estados Unidos 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata y col., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión de los anticuerpos con papaína produjo dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, y un fragmento “Fc” residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab está constituido por una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y la primera región constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo da como resultado un único fragmento grande F(ab')₂ que corresponde de manera grosera a dos fragmentos Fab unidos mediante un enlace disulfuro que tienen diferente actividad de unión al antígeno es aún capaz de reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos pocos restos adicionales en el término carboxi de la región C_H1 que incluyen una o más cisteínas procedentes de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento de Fab' en la que el resto(s) de cisteína de las regiones constantes soporta un grupo tiol libre. Los fragmento de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de los fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. Se conocen también otros acoplamientos químicos de los fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxi terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas mediante enlaces disulfuros. Se determinaron las funciones efectoras de los anticuerpos mediante las secuencias en la región Fc, la región que se reconoce también mediante los receptores Fc (FcR) que se encuentran en algunos tipos de células.

“Fv” es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y de unión a antígeno. Este fragmento está constituido por un dímero de un dominio de la región variable de una cadena pesada y una ligera en asociación estrecha no covalente. Del plegado de estas dos regiones emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada una procedentes de la cadena H y la L) que contribuyen a los restos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren especificidad de unión al antígeno con el anticuerpo. Sin embargo, incluso una única región variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno de unión, aunque a una afinidad inferior que la del sitio de unión completo.

“Fv monocatenario” abreviado también como “sFv” o “scFv” son fragmentos de anticuerpos que comprenden las regiones V_H y V_L de los anticuerpos conectadas en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un enlazante polipeptídico entre las regiones V_H y V_L que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión del sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados construyendo fragmentos sFv (véase párrafo anterior) con enlazantes cortos (aproximadamente 5-10) restos entre las regiones V_H y V_L de tal manera que se consigue el emparejamiento de la intercadena pero no el de la intracadena de las regiones V, dando como resultado por tanto un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv “entrecruzados” en los que las regiones V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Se describen los diacuerpos con mayor detalle en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

Un anticuerpo que “se une específicamente a” o es “específico de” un polipéptido o un epítipo particular en un polipéptido particular es el que se une al polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

El término “fase sólida” describe una matriz no acuosa a la cual puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas abarcadas en el presente documento incluyen las formadas parcial o completamente por vidrio (*por ejemplo*, vidrio de porosidad controlada), polisacáridos (*por ejemplo*, agarosa), poliacrilamidas, po-

lietireno, alcohol polivinílico y siliconas. En algunas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (*por ejemplo*, una columna de cromatografía por afinidad). Este término incluye también una fase sólida discontinua de partículas discretas, tal como la descrita en la Patente de los Estados Unidos N° 4.275.149.

“Formas humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) de secuencias principalmente humanas, que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los restos de una región hipervariable (también CDR) del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos ejemplos, los restos de la región marco de Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por lo correspondientes restos no humanos. Además, “anticuerpos humanizados” según se usa en el presente documento puede comprender también restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Se hacen estas modificaciones para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann y col., *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

Un “anticuerpo dependiente de la especie”, por ejemplo, un anticuerpo de mamífero dirigido contra IgE humana, es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno procedente de una primera especie de mamífero que la que tiene por un homólogo de este antígeno procedente de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie se “une específicamente” a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, alternativamente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M, alternativamente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno procedente de una segunda especie de mamífero no humana que es al menos de aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que esta afinidad de unión por el antígeno no humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser de cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos según se ha definido anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

“Funciones efectoras” del anticuerpo se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una secuencia natural de la secuencia FC o la secuencia de aminoácidos de la región Fc variante) de un anticuerpo, y varía con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por defecto de los receptores superficiales celulares (por ejemplo, receptores de las células B; y activación de las células B.

“Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” o ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig segregada se une a los receptores Fc (FcR) presentes en algunas células citotóxicas (*por ejemplo*, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula diana que soporta un antígeno y eliminar posteriormente la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos “arman” las células citotóxicas y se requieren para eliminar la célula diana mediante este mecanismo. Las células primarias para mediar ADCC, las células NK, expresan únicamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. En la Tabla 3 se resume la expresión de Fc en las células hematopoyéticas en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede llevar a cabo un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el dado a conocer en Clynes y col., *PNAS USA* 95: 652-656 (1998).

“Receptor Fc” o “FcR” describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es una secuencia natural de FcR humano. Además, un FcR preferido es el que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de los subtipos FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo las variantes alélicas y las formas alternativamente de corte y empalme de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor de activación”) y FcγRIIB (un “receptor de inhibición”) que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus regiones citoplásmicas. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en el inmunoreceptor de la tirosina (ITAM) en su región citoplásmica. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en el inmunoreceptor de la tirosina (ITIM) en su región citoplásmica. (véanse M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997). Se revisaron los FcR en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel y col., *Immunometlzods* 4: 25-34 (1994); y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en el presente documento. El término incluye también el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de las IgG en el feto. Guyer y col., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) and Kim y col., *J. Immunol.* 24: 249 (1994).

“Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo funciones efectoras de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de la sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos, siendo preferidas las células PBMC y MNK. Se pueden aislar las células efectoras a partir de una fuente natural, *por ejemplo*, sangre.

“Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) con los anticuerpos (del subtipo apropiado) que se unen a su antígeno análogo. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo CDC, *por ejemplo*, según se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

“Aislado”, cuando se usa para describir los diversos polipéptidos y anticuerpos dados a conocer en el presente documento, significa un polipéptido o anticuerpo que se ha identificado, separado y/o recubierto a partir de un componente de su entorno de producción. Preferiblemente, el polipéptido aislado está libre de asociación con otros componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tal como los resultantes de las células transfectadas recombinantes, son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En las realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de cápsula giratoria, o (2) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Ordinariamente, sin embargo, se preparará un polipéptido o anticuerpo aislado mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” que codifica los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa a partir de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia ordinariamente en el entorno en que se produjo. Preferiblemente, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el entorno de producción. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento están en una forma diferente que en la forma o configuración en la que se encuentran en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen por tanto del ácido nucleico que codifica los polipéptidos y los anticuerpos en el presente documento, que existen naturalmente en las células.

El término “secuencias control” se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida de manera operable en un organismo hospedador particular. Las secuencias control que son adecuadas para los procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se conocen células eucariotas que utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

El ácido nucleico se “une de manera operable” cuando se sitúa en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretora se une de manera operable al ADN de un polipéptido si éste se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une de manera operable a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma se une de manera operable a una secuencia de codificación si se sitúa de tal manera que facilita la traducción. Generalmente, “unido de manera operable” significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de una líder secretora, contigua y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligadura en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazantes de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

El término “epítipo etiquetado”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento condensado a un “polipéptido etiquetado”. El polipéptido etiquetado tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el cual se puede preparar un anticuerpo, adicionalmente, es suficientemente corto, de tal manera que no interfiere con la actividad del polipéptido al cual se condensa. El polipéptido etiquetado es también preferiblemente único de tal manera que el anticuerpo no reacciona sustancialmente en cruzado con otros epítopos. Los polipéptidos etiquetados adecuados tienen generalmente al menos seis restos de aminoácidos y usualmente entre aproximadamente y 50 restos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

Según se usa en el presente documento, el término “inmunoadhesina” designa moléculas tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de las regiones constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una condensación de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente de la del sitio de reconocimiento y unión del antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”), y una secuencia de la región constante de la inmunoglobulina. La parte de la adhesina de una molécula de inmunoadhesina es normalmente una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. Se puede obtener la secuencia de la región constante de la inmunoglobulina en la inmunoadhesina a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una región de un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento en lugar de al menos una región variable en el interior de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la

condensación de la inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, regiones CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de las condensaciones de la inmunoglobulina véase también la Patente de los Estados Unidos N° 5.428.130 otorgada el 27 de junio de 1995.

5 Una formulación “estable” es aquella en la que la proteína de la anterior retiene esencialmente su estabilidad e integridad física y química tras almacenamiento. Están disponibles en la técnica algunas técnicas analíticas para medir la estabilidad de la proteína y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Se puede medir la estabilidad a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Para un cribado
10 rápido, se puede mantener la formulación a 40°C durante 2 semanas a 1 mes, en cuyo momento se mide la estabilidad. Cuando la formulación es para almacenarse a 2-8°C, generalmente, la formulación debería ser estable a 30°C o 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a 2-8°C durante al menos 2 años. Cuando la formulación es para almacenarse a 30°C, generalmente la formulación debería ser estable durante al menos 2 años a 30°C y/o estable a 40°C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, se puede usar la extensión de la agregación durante el almacenamiento como un
15 indicador de la estabilidad de la proteína. De esta manera, una formulación “estable” puede ser la que en menos de aproximadamente un 10% y preferiblemente menos de un 5% de la proteína están presentes como un agregado en la formulación. En otras realizaciones, se puede determinar cualquier incremento en la formación de un agregado durante el almacenamiento de la formulación.

20 Una formulación “reconstituida” es la que se ha preparado disolviendo una formulación de proteína o anticuerpo liofilizado en un diluyente de tal manera que la proteína se disuelva completamente. La formulación reconstituida es adecuada para la administración (por ejemplo, administración parenteral) a un paciente que se va a tratar con la proteína de interés y, en algunas realizaciones de la invención, puede ser una que sea adecuada para la administración subcutánea.

25 Una formulación “isotónica” es la que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica entre aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término “hipotónica” describe una formulación con una presión osmótica por debajo de la de la sangre humana. En correspondencia, el término “hipertónica” describe se usa para describir una formulación con una presión osmótica
30 por encima de la de la sangre humana. Se puede medir la isotonicidad usando, por ejemplo, una presión de vapor o un osmómetro de tipo criocongelación. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o tampón.

35 Una formulación “reconstituida” es la que se ha preparado disolviendo una formulación de proteína liofilizada en un diluyente de tal manera que la proteína se dispersa en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para la administración (*por ejemplo*, administración parenteral) a un paciente que se va a tratar con la proteína de interés, en algunas realizaciones de la invención, puede ser una que sea adecuada para la administración subcutánea.

40 Un “ácido farmacéuticamente aceptable” incluye ácidos inorgánicos y orgánicos que no son tóxicos a la concentración y manera en la que se formulan. Por ejemplo, los ácidos inorgánicos adecuados incluyen clorhídrico, perclórico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, *etc.* Los ácidos orgánicos adecuados incluyen alquilo de cadena lineal y ramificada, aromáticos, cíclicos, cicloalifáticos, arilalifáticos, heterocíclicos, saturados, insaturados, mono, di y tricarboxílicos, incluyendo por ejemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, *t*-butil acético, antranílico, propanoico, 2-hidroxiopropanoico, 2-oxopropanoico, propandioico, ciclopentanopropiónico, ciclopentano propiónico, 3-fenilpropiónico, butanoico, butandioico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, 2-acetoxi-benzoico, ascórbico, cinámico, lauril sulfúrico, esteárico, mucónico, mandélico, succínico, embónico, fumárico, málico, maleico, hidroximaleico, malónico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glicónico, glucónico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmoico, palmeico, tiociánico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, *p*-toluensulfónico, alcanforsulfónico, 4-metilbicio[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, glucoheptónico, ácido 4,4'-metilenobis-3-(hidroxi-2-eno-1-carboxílico), hidroxinaftoico.

55 Las “bases farmacéuticamente aceptables” incluyen las bases inorgánicas y orgánicas cuando son no tóxicas a la concentración y manera en la que se formulan. Por ejemplo, las bases adecuadas incluyen las formadas a partir de metales que forman bases inorgánicas tales como litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio, N-metilglucamina, morfina, piperidina y las bases no tóxicas orgánicas que incluyen aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, aminas cíclicas, y resinas básicas de intercambio iónico, [por ejemplo, N(R')₄⁺ (en la que R' es independientemente H o alquilo C₁₋₄, amonio, Tris)], por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Las bases orgánicas no tóxicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, dicitclohexilamina, colina, y cafeína.

65 Los ácidos y las bases adicionales farmacéuticamente aceptables utilizables con la presente invención incluyen las que se derivan de los aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparagina.

Los tampones y sales “farmacéuticamente aceptables” incluyen los derivados de las sales de adición de ácido y base de los ácidos y bases anteriormente indicados. Los tampones y/o las sales específicas incluyen histidina, succinato y acetato.

Un “lioprotector” es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, evita o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína tras la liofilización y el posterior almacenamiento. Los lioprotectores a modo de ejemplo incluyen azúcares y sus correspondientes alcoholes azucarados; un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes azucarados trihídricos o de mayor peso molecular, *por ejemplo*, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic®; y sus combinaciones. Los lioprotectores adicionales a modo de ejemplo incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares melibiosa, melezitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Los ejemplos de azúcares reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa. Los ejemplos de azúcares no reductores incluyen glicósidos no reductores de compuestos polihidroxi seleccionados entre alcoholes azucarados y otros polialcoholes de cadena ramificada. Los alcoholes azucarados preferidos son monoglicósidos, especialmente los compuestos obtenidos mediante la reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo glicosídico lateral puede ser tanto glucosídico como galactosídico. Los ejemplos adicionales de alcoholes azucarados son glucitol, maltitol, lactitol e iso-maltulosa. Los lioprotectores preferidos son los azúcares no reductores trehalosa o sacarosa.

Se añade el lioprotector a la formulación preliofilizada en una “cantidad lioprotectora” lo que significa que, tras la liofilización de la proteína en presencia de la cantidad lioprotectora de lioprotector, la proteína retiene esencialmente su estabilidad en integridad física y química tras la liofilización y el almacenamiento.

En la preparación de las formulaciones de viscosidad reducida de la invención, debería tenerse cuidado al usar los excipientes enumerados anteriormente así como otros aditivos, especialmente cuando se añaden a elevada concentración, de tal manera que no aumenten la viscosidad de la formulación.

Un “azúcar farmacéuticamente aceptable” es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, evita o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína tras el almacenamiento. Cuando se pretende liofilizar y a continuación reconstituir la formulación, se pueden conocer también los “azúcares farmacéuticamente aceptables” como “lioprotectores”. Los azúcares a modo de ejemplo y sus correspondientes alcoholes azucarados incluyen: un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes azucarados trihídricos o de mayor peso molecular, *por ejemplo*, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic®; y sus combinaciones. Los lioprotectores adicionales a modo de ejemplo incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares melibiosa, melezitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Los ejemplos de azúcares reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa. Los ejemplos de azúcares no reductores incluyen glicósidos no reductores de compuestos polihidroxi seleccionados entre alcoholes azucarados y otros polialcoholes de cadena ramificada. Los alcoholes azucarados preferidos son monoglicósidos, especialmente los compuestos obtenidos mediante la reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo glicosídico lateral puede ser tanto glucosídico como galactosídico. Los ejemplos adicionales de alcoholes azucarados son glucitol, maltitol, lactitol e iso-maltulosa. Los azúcares farmacéuticamente aceptables preferidos son los azúcares no reductores trehalosa o sacarosa.

Se añaden los azúcares farmacéuticamente aceptables a la formulación en una “cantidad protectora” (*por ejemplo*, preliofilización), lo que significa que la proteína retiene esencialmente su estabilidad e integridad física y química durante el almacenamiento (*por ejemplo*, tras la reconstitución y el almacenamiento).

El diluyente de interés en el presente documento es el que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida tras la liofilización. Los diluyentes a modo de ejemplo incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWI), una disolución de pH tamponado (*por ejemplo*, disolución salina tamponada con fosfatos), disolución salina estéril, disolución de Ringer o disolución de dextrosa. En una realización alternativa, los diluyentes pueden incluir, disoluciones acuosas de sales y/o tampones.

Un “conservante” es un compuesto que se puede añadir a las formulaciones en el presente documento para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación multiuso (dosis múltiple). Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetildibencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de benetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y *m*-cresol. El conservante más preferido en el presente documento es el alcohol bencílico.

“Tratamiento” se refiere a tratamiento terapéutico y profiláctico o medidas preventivas. Los individuos animales en necesidad de tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno así como aquellos en los que se puede evitar el trastorno.

“Mamífero” para los objetivos del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo los seres humanos, animales domésticos y de granja, y de zoo, deportes, o mascotas, tales como perros, caballos, conejos, ganado, cerdos, hámsters, gerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, etc.

5 Un “trastorno” es cualquier dolencia que podría beneficiarse del tratamiento con la proteína. Este incluye los trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen las dolencias patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se van a tratar en el presente documento incluyen carcinomas y alergias.

10 Una “cantidad terapéuticamente eficaz” es al menos la concentración mínima requerida para efectuar una mejor o prevención mensurable de un trastorno particular. Se conocen bien en la técnica las cantidades terapéuticamente eficaces de proteína conocidas, mientras que se pueden determinar las cantidades eficaces de proteínas descubiertas a partir de ahora en el presente documento mediante las técnicas normalizadas que están comprendidas dentro de los conocimientos del técnico o persona técnica experta, tal como un médico ordinario.

15 “Viscosidad”, según se usa en el presente documento puede ser “viscosidad cinemática” o “viscosidad absoluta”. “Viscosidad cinemática” es una medida del flujo resistivo de un fluido bajo la influencia de la gravedad. Cuando se colocan dos fluidos de igual volumen en viscosímetros capilares idénticos y se dejan fluir por gravedad, un fluido viscoso tarda más que un fluido menos viscoso en fluir a través del capilar. Si un fluido tarda 200 segundos hasta
20 completar su flujo y otro fluido tarda 400 segundos, el segundo fluido es el doble de viscoso que el primero en una escala de viscosidad cinemática. “Viscosidad absoluta”, algunas veces denominada viscosidad dinámica o simple, es el producto de la viscosidad cinemática y la densidad del fluido:

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

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

30 Una “antihistamina” según se usa en el presente documento es un agente que antagoniza el efecto fisiológico de la histamina. La unión de la histamina a sus receptores, H_1 y H_2 da como resultado los característicos síntomas y efectos alérgicos o picor, enrojecimiento, hinchazón, etc. Muchas antihistaminas actúan bloqueando la unión de la histamina a sus receptores, H_1 , H_2 ; sin embargo, se cree que otros operan inhibiendo la liberación de la histamina. Ejemplos de antihistaminas son clorfeniramina, difenildramina, prometazina, cromolina de sodio, astemizol,
35 maleato de azatadina, maleato de bronfeniramina, maleato de carbinoxamina, clorhidrato de cetirizina, fumarato de clemastina, clorhidrato de ciproheptadina maleato de dexbronfeniramina, maleato de desclorfeniramina, clorhidrato de terfenadina, clorhidrato de hidroxizina, loratidina, clorhidrato de meclizina, citrato de tripelemina, clorhidrato de tripelemina, clorhidrato de tripolidina.

40 Un “broncodilatador”, según se usa en el presente documento, describe agentes que antagonizan o invierten la broncoconstricción, un episodio fisiológico que se produce normalmente en la fase temprana en las reacciones asmáticas que dan como resultado una disminución de la capacidad pulmonar y un acortamiento de la respiración. Los broncodilatadores a modo de ejemplo incluyen epinefrina, un alfa y beta adrenérgico de amplia actuación, y los beta
45 adrenérgicos albuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol, e isotarina. Se puede conseguir también la broncodilatación mediante la administración de xantinas, incluyendo aminofilina y teofilina.

Un “glucocorticoide”, según se usa en el presente documento describe agentes basados en esteroides que tienen actividad antiinflamatoria. Se usan comúnmente los glucocorticoides para atenuar la fase tardía de la reacción asmática. Los glucocorticoides a modo de ejemplo incluyen, prednisona, dipropionato de beclometasona, triamcinolona
50 acetona, flunisolide, betametasona, budesonide, dexametasona, acetato de fludrocortisona, flunisolide, propionato de fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona.

Un “fármaco antiinflamatorio no esteroideo” o “NSAID”, según se usa en el presente documento, describe agentes
55 que tienen actividad antiinflamatoria que no están basados en esteroides. Los NSAID a modo de ejemplo incluyen acetaminofeno, aspirina, bromfenaco de sodio, diclofenaco de sodio, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno de calcio, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, meclofenamato de sodio, ácido mefenámico, nabumetona, naproxen, naproxen de sodio, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicamo, sulindaco, tolmetina de sodio.

60 II Modos de llevar a cabo la invención

A. Preparación de polipéptidos y anticuerpos

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de los polipéptidos o anticuerpos descritos en
65 el presente documento mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el mismo y la purificación de la proteína o anticuerpo resultante. Se contempla, por supuesto, que se pueden emplear procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar dichos polipéptidos o anticuerpos. Por ejemplo, se pueden producir dichas secuencias, o porciones de las mismas, mediante síntesis directa

de péptidos usando técnicas en fase sólida [véanse, por ejemplo, Stewart y col., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. *Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2154 (1963)]. Se puede llevar a cabo la síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o automática. Se puede llevar a cabo la síntesis automatizada, por ejemplo, usando un Sintetizador de Péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente de manera separada diversas porciones de las proteínas o anticuerpos descritos en el presente documento y combinarse usando procedimientos químicos o enzimáticos.

1. Aislamiento del ADN que codifica las proteínas descritas en el presente documento

Se puede obtener el ADN que codifica las proteínas descritas en el presente documento a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm correspondiente y que expresa éste a un nivel detectable. Según esto, se puede obtener convenientemente dicho ADN que codifica la proteína humana a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, según se describe en los Ejemplos. Se puede obtener también el gen que codifica la proteína a partir de una genoteca o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

Se pueden cribar las genotecas con sondas (tales como oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés. Se puede llevar a cabo la criba del ADNc o de la genoteca con la sonda seleccionada usando procedimientos normalizados, según se describe en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el gen deseado es usar la metodología de la PCR [Sambrook y col., *más arriba*; Dieffenbach y col., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los Ejemplos siguientes describen las técnicas de cribado de una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionados como sondas deben ser de suficiente longitud y suficientemente sin ambigüedad para que se minimicen los falsos positivos. Se marca preferiblemente el oligonucleótido de tal manera que se pueda detectar tras la hibridación con el ADN en la biblioteca que se está cribando. Se conocen bien en la técnica los procedimientos de marcado, e incluyen el uso de radiomarcas del tipo de ATP marcado con ^{32}P , biotilación o marcado enzimático. Se proporcionan en Sambrook y col., *más arriba*, las condiciones de hibridación, que incluyen restricción moderada y restricción elevada.

Se pueden comparar las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de las bibliotecas y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como Genbank u otras bases de datos de secuencias privadas. Se puede determinar la identidad de la secuencia (tanto a nivel de aminoácido como de nucleótido) dentro de regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud completa usando procedimientos conocidos en la técnica según se describe en el presente documento.

Se puede obtener el ácido nucleico que tiene la secuencia que codifica la proteína cribando el ADNc o las genotecas seleccionadas usando la secuencia de aminoácidos deducida dada a conocer en el presente documento por vez primera, y, si es necesario, los procedimientos convencionales de extensión del cebador, según se describe en Sambrook y col., *más arriba*, para detectar los precursores y lo intermedios de proceso del ARNm que no se han transcrito de manera inversa en el ADNc.

2. Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras se transfectan o transforman con vectores de expresión o de clonación que contienen las proteínas o anticuerpos descritos en el presente documento para la producción y se cultivan en medios nutrientes convencionales según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. El técnico experto puede las condiciones de cultivo, tales como los medios, temperatura, pH y similares sin experimentación innecesaria. En general, se pueden encontrar los principios, protocolos, y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., *más arriba*.

La persona normalmente experta en la técnica conoce los procedimientos de transfección de células eucariotas y de transformación de células procariotas, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediada por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se lleva a cabo usando las técnicas normalizadas apropiadas para dichas células. Para procariotas, se usan el tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, según se describe en Sambrook y col., *más arriba*, o la electroporación. Se usa la infección con *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de algunas células de plantas, según se describe por Shaw y col., *Gene*, 23: 315 (1983) y en el documento WO 89/05859, publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamíferos en dichas paredes celulares, se puede emplear el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Se han descrito aspectos generales de las transfecciones en el sistema de células hospedadoras de mamíferos en la Patente de los Estados Unidos N° 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo normalmente según el procedimiento de Van Solingen y col., *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, se pueden usar también otros procedimientos para introducir ADN en las células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para las diversas técnicas para transformar células de mamíferos, véanse Keown y col., *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) y Mansour y col., *Nature*, 336: 348-352 (1988).

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores en el presente documento incluyen células procariotas, levaduras, o células eucariotas superiores. Los procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Están públicamente disponibles algunas cepas de *E. coli*, tales como la cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); las cepas W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635) de *E. coli*. Otras células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P dado a conocer en el documento DD 266,710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos más bien que limitantes. La cepa W3110 es un hospedador u hospedador parental particularmente preferido debido a que es una cepa hospedadora común para el producto de ADN recombinante de las fermentaciones. Preferiblemente, la célula hospedadora segrega mínimas cantidades de enzimas proteolíticas. Se puede modificar, por ejemplo, la cepa W3110 para efectuar una mutación genética en los genes que codifican las proteínas endógenas en el hospedador, incluyendo los ejemplos de dichos hospedadores la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo de *tonA*; la cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo de *tonA ptr3*, la cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244) que tiene el genotipo completo de *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan'*; la cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con una mutación con delección de *degP* no resistente a la kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene una proteasa mutante periplásmica dada a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 4.946.786 otorgada el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados los procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, la PCR u otras reacciones de ácidos nucleicos con la polimerasa.

Adicionalmente a los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos o levaduras filamentosas son hospedadores de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican las proteínas o los anticuerpos descritos en el presente documento. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 mayo de 1985); hospedadores de *Kluyveromyces* (Patente de los Estados Unidos N° 4.943.529; Fleer y col., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (cepas MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., J. Bacteriol., 154(2): 737-42 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., Bio/Technology, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna y col., J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de Octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de junio de 1991), y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn y col., Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]). Las levaduras metilótropas son adecuadas en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, levaduras capaces de crecer en metanol seleccionadas entre los géneros constituidos por *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Se puede encontrar una lista de especies específicas que son a modo de ejemplo de estos tipos de levaduras en C. Anthony, The Biochemistry of Methyloprotophytes, 269 (1982).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de la forma glicosilada de los polipéptidos y anticuerpos descritos en el presente documento se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células de plantas. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Los ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en un cultivo en suspensión Graham y col., J. Gen Virol., 36: 59 (1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). Se considera que la selección de la célula hospedadora apropiada está comprendida dentro del conocimiento de la persona experta en la técnica.

3. Selección y uso de un vector replicable

Se puede insertar el ácido nucleico (por ejemplo, el ADNc o el ADN genómico) que codifica los polipéptidos y anticuerpos descritos en el presente documento en un vector replicable par clonación (amplificación del ADN) o para expresión. Están públicamente disponibles diversos vectores. El vector puede, por ejemplo, estar en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica, o fago. Se puede insertar la secuencia de ácido nucleico apropiada en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general se inserta el ADN en un sitio(s) de la endonucleasa de restricción apropiada usando las técnicas conocidas en la técnica. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más de 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. la construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de esto componentes emplea técnicas de ligadura normalizadas que conocen los técnicos expertos.

Se puede llevar a cabo la producción recombinante de los polipéptidos o anticuerpos no solo directamente, sino también como un polipéptido de condensación con un polipéptido heterólogo. La porción heteróloga puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el término N de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el polipéptido o anticuerpo que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, o líderes de la enterotoxina II térmicamente estables. Para la secreción de las levaduras la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la líder de la invertasa de levadura, la líder del factor alfa (que incluye *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, las líderes del factor α , la última descrita en la Patente de los Estados Unidos N° 5.010.182), o la líder de la fosfatasa ácida, la líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de una célula de mamífero, se pueden usar secuencias señal de mamífero para dirigir la secreción de la proteína, tal como las secuencias señal de los polipéptidos segregados de la misma o de especies relacionadas, así como las líderes secretoras víricas.

Los vectores de expresión y de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. Se conocen bien dichas secuencias para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación procedente del plásmido pBR322 es adecuado para la mayor parte de bacterias Gram negativas. El origen del plásmido 2μ es adecuado para la levadura, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos.

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

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamíferos son los que permiten la identificación de células competentes para capturar la secuencia de ADN que codifica los polipéptidos o anticuerpos descritos en el presente documento, tales como DHFR o timidina quinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada según se describe por Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 de levadura [Stinchcomb y col., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10: 157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

Los vectores de expresión y de clonación contienen usualmente un promotor unido de manera operable a las mencionadas secuencias de ADN para dirigir la síntesis de ARNm. Se conocen bien los promotores reconocidos por una variedad de células hospedadoras potenciales. Los promotores adecuados para el uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de la β -lactamasa y la lactosa [Chang y col., Nature, 275: 615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281: 544 (1979)], la fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980); documento EP 36.776], y promotores híbridos tales como el promotor *tac* [deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos contendrán también una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida de manera operable a dichas secuencias de ADN.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con hospedadores de levaduras incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otros enzimas glicolíticos [Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglicosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada en condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradadoras asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y las enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

Se puede controlar la transcripción de vectores en células hospedadoras de mamíferos, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de los virus tales como el virus del polioma, el virus de la viruela (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989) adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B, y Virus 40 de Simio (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de la inmunoglobulina, y a partir de promotores del choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células hospedadoras.

Se puede incrementar la transcripción de ácido nucleico que codifica los polipéptidos o anticuerpos en el presente documento por eucariotas superiores insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, usualmente aproximadamente entre 10 y 300 pb, que actúan sobre un promotor para

incrementar su transcripción. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras procedentes de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador procedente de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado posterior del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado posterior del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus. Se puede cortar y empalmar el potenciador en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia de codificación, pero se localiza preferiblemente en el sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos, o células nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones 5', y ocasionalmente 3' no traducidas de los ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica los polipéptidos o anticuerpos descritos en el presente documento.

Otros procedimientos adicionales, vectores, y células hospedadoras adecuadas para la adaptación a la síntesis de los polipéptidos o anticuerpos descritos en el presente documento en cultivos celulares recombinantes de vertebrados se describen en Gething y col., *Nature*, 293: 620-625 (1981); Mantei y col., *Nature*, 281: 40-46 (1979); en el documento EP 117.060; y en el documento EP 117.058.

4. Detección de la amplificación/expresión del gen

Se puede medir la amplificación y/o la expresión del gen en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201-5205 (1980)], inmunotransferencia (análisis del ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Alternativamente, se pueden emplear anticuerpos que pueden dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Se pueden marcar a la vez los anticuerpos y se puede llevar a cabo el ensayo cuando el dúplex se une a una superficie, de tal manera que tras la formación del dúplex en la superficie, se pueda detectar la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

Se puede medir, alternativamente, la expresión génica, mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivos celulares o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de muestras de fluidos pueden ser tanto monoclonales como policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, se pueden preparar los anticuerpos contra los polipéptidos descritos en el presente documento o contra un péptido sintético basándose en las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento o contra secuencias exógenas condensadas con el ADN que codifica dichos polipéptidos y anticuerpos y que codifica un epítipo específico de anticuerpo.

5. Purificación del polipéptido

Así pueden recuperar formas procedentes de un medio de cultivo o de lisados de células hospedadoras. Si están unidas a la membrana, se pueden liberar de la membrana usando una disolución detergente adecuada (*por ejemplo*, Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Se pueden perturbar las células empleadas en la expresión de los polipéptidos o anticuerpos descritos en el presente documento mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclación mediante congelación-descongelación, sonicación, perturbación mecánica, o agentes lisantes celulares.

Se puede desear purificar los polipéptidos o los anticuerpos descritos en el presente documento a partir de proteínas celulares recombinantes u otros polipéptidos. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de los procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía sobre gel de sílice o sobre resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatofocalización; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A Sefarosa para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas de quelación de metales para unirse a formas de epítipos etiquetados del polipéptido o el anticuerpo. Se pueden emplear diversos procedimientos de purificación de proteínas y se conocen dichos procedimientos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa(s) de purificación seleccionada dependerá, por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción usado y del polipéptido o anticuerpo particular producido.

B. Preparación del anticuerpo

En algunas realizaciones, la proteína de elección es un anticuerpo. A continuación se describen las técnicas para la producción de anticuerpos, incluyendo anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1) *Anticuerpos policlonales*

Se incrementan generalmente los anticuerpos policlonales en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunógena en la especie que se va a inmunizar, *por ejemplo*, hemocianina de lapa californiana/KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de la tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, *por ejemplo*, maleimidobenzilo, éster de sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R^1 son independientemente grupos de alquilo inferior. Los ejemplos de adyuvantes que se pueden emplear incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintética. Una persona experta en la técnica puede seleccionar el protocolo de inmunización sin experimentación innecesaria.

Se inmunizaron los animales contra el antígeno, los conjugados inmunogénicos, o los derivados, combinando, *por ejemplo*, 100 μg o 5 μg o la proteína o el conjugado (de conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, se estimularon los animales 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. Siete a catorce días después, se sangraron los animales y se ensayó el suero por los títulos de anticuerpos. Se estimularon los animales hasta que los títulos alcanzaron una meseta. Se pueden preparar también conjugados en cultivos celulares recombinantes como proteínas de condensación. También, agentes de agregación tales como alum, se usan para potenciar la respuesta inmune.

2) *Anticuerpos monoclonales*

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente y/o modificaciones postraduccionales (*por ejemplo*, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. De esta manera, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como de que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, se pueden preparar los anticuerpos monoclonales usando el procedimiento del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567).

En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente en el presente documento para estimular linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente con la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, se pueden inmunizar linfocitos *in vitro*. A continuación se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986).

El agente inmunizante incluirá normalmente la proteína antigénica o una variante de condensación de la misma. Generalmente, o se usan linfocitos de sangre periférica (“PBL”) si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de nódulos linfoides si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación se fusionan los linfocitos con una línea celular immortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103.

Las líneas celulares immortalizadas son normalmente células de mamíferos transformadas, particularmente células de mieloma de roedor, bovino y de origen humano. Usualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de mieloma preparadas de esta manera se siembran y se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parental carecen del enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma immortalizadas preferidas son las que se fusionan eficazmente, soportan un nivel de producción estable elevado del anticuerpo por las células que producen el anticuerpo seleccionado, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre éstas, se prefieren las líneas de mieloma de murino, tales como las derivadas de tumores MOPC-21 y MPC-11 de ratón disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA., y las células SP-2 (y sus derivados, por ejemplo X63-Ag8-653) disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA. Se han descrito también líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Se ensayó medio de cultivo en el que se hicieron crecer células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, se determinó la especificidad de la unión de los anticuerpos monoclonales por las células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

Se puede evaluar el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno deseado. Preferiblemente se puede determinar la afinidad y la especificidad de la unión del anticuerpo monoclonal mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo unido a enzima (ELISA). Se conocen en la técnica dichas técnicas y ensayos. Por ejemplo, se puede determinar la afinidad de la unión mediante el análisis Scatchard de Munson y col., Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

Después que se identifican las células del hibridoma que producen anticuerpos de especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas, se pueden subclonar los clones limitando los procedimientos de dilución y crecimiento mediante procedimientos normalizados (Goding, *más arriba*). Los medios de cultivo adecuados para este objetivo incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Adicionalmente, se pueden hacer crecer las células de hibridoma *in vivo* como tumores de ascites en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido de ascites, o suero, mediante procedimientos de purificación de la inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Se pueden preparar también anticuerpos monoclonales mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567, y según se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (*por ejemplo*, usando sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de murino). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, se puede colocar el ADN en vectores de expresión, que a continuación se transfecta en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera la proteína de la inmunoglobulina, con el fin de sintetizar anticuerpos monoclonales en dichas células hospedadoras recombinantes. Los artículos para revisión sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opin. Immunol., 5: 256-262 (1993) y Plückerthun, Immunol. Revs. 130: 151-188 (1992).

En una realización adicional, se pueden aislar anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., Nature, 348: 552-554 (1990). Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) que describen el aislamiento de anticuerpos de murino y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de afinidad elevada (intervalo nM) de anticuerpos humanos mediante reorganización de la cadena (Marks y col., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas muy grandes de fagos (Waterhouse y col., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)). De esta manera, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales del hibridoma de los anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Se puede modificar también el ADN, sustituyendo, por ejemplo, la secuencia de codificación de las regiones constantes de la cadena pesada y ligera en lugar de las secuencias homólogas de murino (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison, y coll., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido no de inmunoglobulina. Normalmente, dichos polipéptidos no de inmunoglobulina están sustituidos por las regiones constantes de un anticuerpo, o están sustituidos por las regiones variables de un sitio de combinación con un antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con un antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con un antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento pueden ser monovalente, la preparación de los cuales es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera de la inmunoglobulina y una cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc de tal manera que se evita la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, se pueden sustituir los restos de cisteína relevantes con otros restos de aminoácidos o se eliminan de tal manera que se evita la reticulación. Son también adecuados los procedimientos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmento Fab, se puede llevar a cabo usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

Se pueden preparar también anticuerpos quiméricos o híbridos *in vitro* usando procedimientos conocidos en la química de las proteínas sintéticas, que incluyen los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados a este objeto incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

3) *Anticuerpos humanizados*

Los anticuerpos pueden comprender además anticuerpos humanizados o humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se sustituyen los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos ejemplos, se sustituyen los restos del marco Fv de la inmunoglobulina humana por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o en las secuencias marco. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente toda de al menos una, y normalmente dos, regiones variables, en las que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprenderá también al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Jones y col., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332: 323-329 (1988) y Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

Se conocen bien en la técnica los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en éste procedentes de una fuente que es no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo restos de "importación", que se obtiene normalmente de una región variable de "importación". Se puede llevar a cabo esencialmente la humanización siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores, Jones y col., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeven y col., *Science* 239: 1534-1536 (1988), o a través de secuencias que sustituyen la CDR o secuencias de la CDR por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Según esto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567), en los que sustancialmente se ha sustituido menos de una región variable humana intacta por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de las regiones variables humanas, la ligera y la pesada, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según esto, en el así denominado procedimiento de "mejor ajuste", se criba la secuencia de la región variable de un anticuerpo de roedor contra la biblioteca completa de secuencias de la región variable humana conocidas. A continuación se acepta la secuencia que está más cercana a la del roedor como el marco humano (FR) del anticuerpo humanizado. Sims y col., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987). Otro procedimiento usa un marco particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Se puede usar el mismo marco para diversos anticuerpos diferentes humanizados. Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993).

Adicionalmente, es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de la elevada afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir esta meta, según un procedimiento preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para las personas expertas en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran las estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas pantallas permite el análisis del probable papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influencia la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar los restos del FR y combinarse a partir de las secuencias del receptor e importación, de tal manera que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como un aumento de la afinidad por el antígeno(s) diana. En general, los restos de la CDR están directa y más sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agente(s) citotóxico con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

4) *Anticuerpos humanos*

Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, es ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica de la región de unión a la cadena pesada del anticuerpo (J_H) del gen en ratones mutantes de líneas quimérica y germinal da como resultado la completa inhibición de la producción de anticuerpo

endógeno. La transferencia de la matriz del gen de la inmunoglobulina de línea germinal humana en dicha línea germinal de ratones mutantes dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras el estímulo con el antígeno. Véanse, *por ejemplo*, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann y col., Year in Immuno., 7:33 (1993); Patente de los Estados Unidos N° 5.591.669 y documento WO 97/17852.

Alternativamente, se puede usar la tecnología de presentación de fagos par producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de la región variable de la inmunoglobulina (V) de repertorios de genes de donantes no inmunizados. McCafferty y col., Nature 348: 552-553 (1990); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991). Según esta técnica, se clonan en marco los genes de la región V del anticuerpo en cualquier gen de una proteína mayor o menor recubierta de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia del ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo dan como resultado de esta manera la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta aquellas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de las células B. Se puede llevar a cabo la presentación del fago en una variedad de formatos, revisada en, *por ejemplo*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Curr. Opin. Struct. Biol. 3: 564-571 (1993). Se pueden usar diversas fuentes de segmentos de genes V para la presentación del fago Clackson y col., Nature 352: 624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar los anticuerpos para una matriz diversa de antígenos) incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véanse también las Patentes de los Estados Unidos N°s 5.565.332 y 5.573.905.

Están también disponibles las técnicas de Cole y col., y Boerner y col., para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner y col., J. Immunol. 147(1): 86-95 (1991). Similarmente, se pueden preparar anticuerpos humanos introduciendo loci de la inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los se han inactivado parcial o completamente los genes de la inmunoglobulina endógena. Tras el estímulo, se observa producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la redistribución del gen, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Se describe esta solución, *por ejemplo* en las Patentes de los Estados Unidos N°s 5.545.807; 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994), Fishwild y col., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996), Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

Finalmente, se pueden generar también anticuerpos humanos *in vitro* mediante células B activadas (véanse las Patentes de los Estados Unidos N°s 5.567.610 y 5.229.275).

5) Fragmentos de anticuerpos

En algunas circunstancias existen ventajas en el uso de fragmentos de anticuerpos, más bien que en el de anticuerpos completos.

Se han desarrollado algunas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, se derivaron estos fragmentos mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, *por ejemplo*, Morimoto y col., J Biochem Biophys. Method. 24: 107-117 (1992); y Brennan y col., Science 229: 81 (1985)). Sin embargo, se pueden producir ahora estos fragmentos directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Se pueden expresar todos los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv en y segregarse de *E. coli*, permitiendo de esta manera la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Se pueden aislar fragmentos de anticuerpos a partir de las bibliotecas de anticuerpos de fagos discutidas anteriormente. Alternativamente, se pueden recuperar fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Según otra solución, se pueden aislar fragmentos F(ab')₂ directamente de cultivos celulares de hospedadores recombinantes. Se describen Fab y F(ab')₂ con incremento *in vivo* de la semivida en la Patente de los Estados Unidos 5.869.046. en otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; la Patente de los Estados Unidos N° 5.571.894 y la Patente de los Estados Unidos N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, según se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.641.870. dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos y biespecíficos.

6) Terapia de profármacos mediada por enzimas de pendientes de anticuerpos (ADEPT)

Se pueden usar también los anticuerpos de la presente invención en ADEPT conjugando el anticuerpo con un enzima activador de un profármaco que convierte un profármaco (*por ejemplo*, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO 81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véanse, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la Patente de los Estados Unidos N° 4.975.278.

El componente del enzima del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que los convierta en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles en el procedimiento de esta invención incluyen, pero no se limitan a, Glicosidasa, glucosa oxidasa, lisozima humana, glucuronidasa humana, fosfatasa alcalina útil para convertir los profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir los profármacos que contienen sulfato en profármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso 5-fluoroacilo; proteasas, tales como proteasa de Serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas (*por ejemplo*, carboxipeptidasa G2 y carboxipeptidasa A) y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; Dalanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de aminoácidos D en fármacos libres; β lactamasa, útil para convertir fármacos derivatizados con β lactamas en fármacos libres; y penicilin amidasa, tales como penicilin V amidasa o penicilin G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos con actividad enzimática, conocidos también en la técnica como "abzimas" para convertir o profármacos de la invención en fármacos libres activos (véase, *por ejemplo*, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Se pueden preparar conjugados de anticuerpo-abzima según se describe en el presente documento por la administración de la abzima a una población de células tumorales.

Se pueden unir covalentemente los anteriores enzimas al polipéptido o a los anticuerpos descritos en el presente documento mediante técnicas bien conocidas en la técnica tales como el uso de los agentes de reticulación heterobifuncionales discutidos anteriormente. Alternativamente, se pueden construir proteínas de condensación que comprendan al menos la región de unión al antígeno del anticuerpo unida a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención, usando las técnicas del ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, *por ejemplo*, Neuberger y col., Nature 312: 604-608 (1984)).

7) Anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos (BsAb) son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes, incluyendo aquellos en la misma u otra proteína. Se puede instalar un brazo para unirse al antígeno diana, y se puede combinar otro brazo con un brazo que se une a una molécula estimuladora sobre un leucocito tal como una molécula receptora de células T (*por ejemplo*, CD3), o receptores Fc para IgG (Fc γ R) tales como Fc γ R1 (CD64), Fc γ R2 (CD32) y Fc γ R3 (CD16), de tal manera que focalicen y localicen los mecanismos de defensa celular de la célula que expresa el antígeno diana. Se pueden derivar dichos anticuerpos de anticuerpos de longitud completa o de fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Se pueden usar también anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en las células que expresan el antígeno diana. Dichos anticuerpos poseen un brazo que se une al antígeno deseado y otro brazo que se une al agente citotóxico (*por ejemplo*, saporina, anti-interferón- α , vinca alcaloide, cadena A de la ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo), los ejemplos de anticuerpos biespecíficos conocidos incluyen los anticuerpos dirigidos contra ErbB2/anticuerpos dirigidos contra Fc γ R3 (documento WO 96/16673), los anticuerpos dirigidos contra ErbB2/anticuerpos dirigidos contra Fc γ R1 (documento U.S.P. 5.837.234), los anticuerpos dirigidos contra ErbB2/anticuerpos dirigidos contra CD3 (documento U.S.P. 5.821.337).

Se conocen en la técnica los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión simultánea de dos parejas de la cadena pesada/cadena ligera de la inmunoglobulina, en las que las dos cadenas tienen especificidades diferentes. Millstein y col., Nature, 305: 537-539 (1983). Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se lleva a cabo usualmente mediante cromatografía de afinidad por etapas, es más bien engorrosa, y los resultados del producto son bajos. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Trautnecker y col., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

Según un enfoque diferente, las regiones variables de los anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con las secuencias de la región constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, las regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan simultáneamente en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en las realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usados en la construcción proporcionan óptimos rendimientos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias de codificación de dos de las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales da como resultado elevados rendimientos o cuando las relaciones no son de particular significancia.

En una realización preferida de esta solución, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones no deseadas de la cadena de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de la inmunoglobulina en únicamente una mitad de las moléculas biespecíficas proporciona un medio fácil de separación. Se da a conocer esta solución en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

Según otra solución descrita en el documento WO 96/27011 o en el documento U.S.P. 5.731.168, se puede diseñar mediante ingeniería genética la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan a partir de un cultivo celular recombinante. La interfase preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de la región constante de un anticuerpo. En este procedimiento, se sustituyen una o más de las pequeñas cadenas laterales de aminoácidos procedentes de la interfase de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la cadena(s) lateral grande sobre la interfase de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las grandes cadenas laterales de aminoácidos con unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos terminales no deseados tales como homodímeros.

Se han descrito en la bibliografía las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando el enlace químico. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles del vicinal y evitar la formación del disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en el derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Se pueden usar los anticuerpos biespecíficos como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Se pueden recuperar directamente los fragmentos Fab' a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describe la producción de moléculas F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Se segregó cada fragmento Fab' separadamente a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera fue capaz de unirse a células que expresaban por exceso el receptor ErbB2 y a células T humanas normales, así como estimular la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

Se han descrito también diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos bivalentes directamente de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Se enlazaron los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun a las porciones Fab' de dos diferentes anticuerpos mediante fusión génica. Se redujeron los homodímeros de los anticuerpos en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de los anticuerpos. La tecnología del “diacuerpo” descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos Biespecíficos/bivalentes. Los fragmentos comprenden una región variable de la cadena pesada (V_H) conectada a un región variable de la cadena ligera (V_L) por un enlazante que es demasiado corto para permitirle emparejarse entre las dos regiones de la misma cadena. Según esto, las regiones V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con las regiones V_L y V_H complementarias de otro fragmento, formando por tanto dos sitios de unión a antígeno. Se ha informado también de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos/bivalentes mediante el uso de dímeros Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber y col., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

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

Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítopos diferentes en una molécula dada. Alternativamente, se puede combinar un brazo dirigido contra la proteína con un brazo que se une a una molécula estimuladora en un leucocito, tal como una molécula del receptor de la célula T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o de los receptores Fc de IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD 16) de tal manera que focalicen los mecanismos de defensa celular de la célula que expresa la proteína particular. Se pueden usar también anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en las células que expresan una proteína particular. Dichos anticuerpos poseen un brazo de unión a la proteína y un brazo que se une a un agente citotóxico o a un quelador de radionucleido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une a la proteína de interés y se une además al factor tisular (TF).

6) Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar con avidina, el otro con biotina. Se han propuesto dichos

anticuerpos, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmune hacia células no deseadas., documento U.S.P. 4.676.980, y para el tratamiento de la infección por VIH. Documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 0308936. Se contempla que se puedan preparar los anticuerpos *in vitro* usando procedimientos conocidos en la química de las proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Se pueden construir, por ejemplo, inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados a este objeto incluyen iminotiolato y metil-4.mercaptobutirimidato y los dados a conocer, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980. Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Se conocen bien en la técnica los agentes de reticulación adecuados, y se dan a conocer, en la Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980, junto con numerosas técnicas de reticulación.

7) Diseño mediante ingeniería genética de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, con el fin de potenciar la efectividad del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo se puede introducir un resto(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo por tanto la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. En anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener capacidad de internalización mejorada y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y muerte celular mediada por el complemento aumentadas. Véanse Caron y col., J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando reticuladores heterobifuncionales según se describe Wolff y col., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar mediante ingeniería genética un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y puede tener por tanto potenciada la lisis del complemento y las capacidades ADCC. Véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

8) Inmunoconjugados

La invención pertenece también a los inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (*por ejemplo*, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico de plantas, o animales, o sus fragmentos), o un isótopo radioactivo (*es decir*, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina, vinblastina, adriamicina y 5-fluorouracilo.

Las toxinas y sus fragmentos enzimáticamente activos que se pueden usar incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de la difteria, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de la diantina, proteínas de la *Phytolaca americana* (PAPI-PAPII y PAP-S) inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de la saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos.

Se preparan los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico usando una variedad de proteínas bifuncionales-agentes de acoplamiento tales como N-succinimidil-3-(2-piridiltiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados funcionales de imidoésteres (tales como HCl de dimetil adipimidato), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), bis-azido compuestos (tales como bis(pazidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-disocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina según se describe en Vitetta y col, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase documento WO 94/11026. El enlazante puede ser un "enlazante escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Se puede usar, por ejemplo, un enlazante lábil a ácido, enlazante sensible a peptidasa, enlazante de dimetilo o enlazante que contiene disulfuro (Chari y col., Cancer Res. 52: 127-131 (1992)).

Adicionalmente, se contemplan también pequeñas moléculas de toxinas tales como caliqueamicina, maitansina (documento U.S.P. 5.208.020), tricoteno y CC1065 y toxinas conjugables para uso con la formulación inventiva. En una realización, el anticuerpo de longitud completa o sus fragmentos de unión a antígeno se pueden conjugar con una o más moléculas maitansinoides (por ejemplo aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas maitansinoides por molécula de anticuerpo). Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. Se han descrito maitansinoides, aislados de fuentes naturales o preparados sintéticamente, incluyen maitansina, maitansinal y sus derivados y análogos, véanse, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N° 5.208.020 y las referencias citadas en la anterior (véase col. 2, línea 53 a col. 3, línea 10) y las Patentes de los Estados Unidos 3.896.111 y 4.151.042. Se describe también el procedimiento para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide en la Patente de los Estados Unidos N° 5.208.020. en una realización preferida, se une un maitansinoide con el anticuerpo mediante un enlace disulfuro u otro grupo enlazante que contenga azufre. Se puede convertir, por ejemplo, la maitansina en May-SS-Me, que se puede reducir a May-SH3 y reaccionar con el anticuerpo modificado para generar un inmunoconjugado de maitansinoide-anticuerpo. Chari y col., Cancer Res. 52: 127-131 (1992). Se puede modificar el anticuerpo mediante procedimientos conocidos y el anticuerpo que contiene grupos tioles libres o protegidos se hace reaccionar a continuación con un maitansinoide que contiene disulfuro. Se puede medir la citotoxicidad del conjugado anticuerpo-maitansinoide *in vitro* o *in vivo* mediante procedimientos conocidos y determinarse la CI₅₀.

La caliqueamicina es otro inmunoconjugado de interés. La familia de antibióticos de la caliqueamicina son capaces de producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Los análogos estructurales de la caliqueamicina que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman y col., Cancer Res. 53: 3336-3342 (1993) y Lode y col., Cancer Res. 58: 2925-2928 (1998)). Otros fármacos antitumorales que se pueden conjugar con el anticuerpo incluyen QFA, que es un antifolato. La caliqueamicina y QFA tienen sitios intracelulares de acciones y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por el anticuerpo potencia mucho sus efectos citotóxicos.

Se contemplan también los inmunoconjugados formados entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o endonucleasa de ADN tal como desoxiribonucleasa, DNasa).

Se puede conjugar también el anticuerpo con un átomo muy radioactivo. Están disponibles una variedad de radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , Bi^{212} , I^{131} , In^{131} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , P^{32} , Pb^{212} , y los isótopos radioactivos de Lu. Cuando se usa el conjugado para diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios de centelleo, por ejemplo Tc^{99} o I^{123} , o una marca de spin para diagnóstico por imágenes mediante resonancia magnética nuclear (rmn) (conocido también como formación de imágenes mediante resonancia magnética, mri) tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se pueden incorporar radio u otras marcas en el conjugado por medios conocidos. Por ejemplo, se puede biosintetizar el péptido o se puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos usando aminoácidos precursores adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Se pueden unir marcas tales como Tc^{99} o I^{123} , Re^{186} e In^{111} mediante un resto cisteína en el péptido. Se puede unir Itrio-90 mediante un resto lisina. Se puede usar el procedimiento IODOGEN® para incorporar yodo-123, Fraker y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57 (1978). Se describen otros procedimientos de conjugar radionucleidos en "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", (Chatal, CRC Press 1989).

Alternativamente, se puede preparar una proteína de condensación que comprenda el anticuerpo y el agente citotóxico mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender las regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado, tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido enlazante que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización, se puede conjugar el anticuerpo con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el predireccionamiento de tumores en el que se administra el conjugado de anticuerpo-receptor al paciente, seguido por la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y a continuación la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

9) Inmunoliposomas

Se pueden formular también los anticuerpos dados a conocer en el presente documento como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos, que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y Patentes de los Estados Unidos N°s. 4.485.045 y 4.544.545. se dan a conocer liposomas con tiempo de circulación potenciados en la Patente de los Estados Unidos N° 5.013. 556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extruden los liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido para dar como resultado liposomas con el diámetro deseado. Se pueden conjugar fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas según se describe en Martin y col., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina) está opcionalmente contenido en el interior del liposoma. Véase Gabizon y col., J. National Cancer Inst. 81(19): 1484 (1989).

10) Otras modificaciones del anticuerpo

Se contemplan en el presente documento otras modificaciones. Por ejemplo, se puede unir el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Se puede atrapar el anticuerpo en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en microemulsiones. Se dan a conocer dichas técnicas y otras formulaciones adecuadas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed., Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

C. Formulaciones liofilizadas

Se pueden preparar también las formulaciones descritas en el presente documento como formulaciones liofilizadas reconstituidas. Las proteínas o anticuerpos descritos en el presente documento se liofilizan y a continuación se reconstituyen para producir las formulaciones líquidas estables de viscosidad reducida de la invención. En esta realización particular, tras la preparación de la proteína de interés según se ha descrito anteriormente, se produce “una formulación prelioofilizada”. La cantidad de proteína presente en la formulación prelioofilizada se determina teniendo en cuenta los volúmenes de dosis deseados, el modo(s) de administración, etc. Por ejemplo, la concentración de partida de un anticuerpo intacto puede estar entre aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, preferiblemente entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 40 mg/ml y más preferiblemente entre aproximadamente 20-30 mg/ml.

1) Preparación de formulaciones liofilizadas

La proteína que se va a formular está generalmente presente en disolución. Por ejemplo, en las formulaciones de viscosidad reducida con elevada fuerza iónica de la invención, puede estar presente la proteína en una disolución de pH tamponado a un pH entre aproximadamente 4-8, y preferiblemente entre aproximadamente 5-7. La concentración del tampón puede ser entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 20 mM, alternativamente entre aproximadamente 3 mM y aproximadamente 15 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y de la tonicidad deseada de la formulación (por ejemplo, de la formulación reconstituida). Los tampones y/o las sales a modo de ejemplo son aquellos que son farmacéuticamente aceptables y se pueden crear a partir de ácidos, bases y sales de los mismos adecuadas, tales como los que se definen como ácidos, bases o tampones “farmacéuticamente aceptables”.

En una realización, se añade un lioprotector a la formulación prelioofilizada. La cantidad de lioprotector en la formulación prelioofilizada es generalmente tal que, tras reconstitución, la formulación resultante será isotónica. Sin embargo, pueden ser también adecuadas formulaciones reconstituidas hipertónicas. Adicionalmente, la cantidad de lioprotector no debe ser tan baja que se produzca una cantidad inaceptable de degradación/agregación de la proteína tras la liofilización. Sin embargo, las concentraciones lioprotectoras a modo de ejemplo en la formulación prelioofilizada están entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 400 mM, alternativamente entre aproximadamente 30 mM y aproximadamente 200 mM, alternativamente entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM. Los lioprotectores a modo de ejemplo incluyen azúcares y alcoholes azucarados tales como sacarosa, manosa, trehalosa, glucosa, sorbitol, manitol. Sin embargo, en circunstancias concretas, algunos lioprotectores pueden contribuir también a un incremento en la viscosidad de la formulación. Como tal, debe tenerse cuidado en la selección de lioprotectores particulares que minimicen o neutralicen este efecto. Se han descrito anteriormente lioprotectores adicionales con la definición de “lioprotectores”, denominados también en el presente documento “azúcares farmacéuticamente aceptables”.

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

En una realización preferida, puede ser deseable añadir un tensioactivo a la formulación prelioofilizada. Alternativa, o adicionalmente, se puede añadir el tensioactivo a la formulación liofilizada y/o a la formulación reconstituida. Los tensioactivos a modo de ejemplo incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (*por ejemplo* polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (poloxámero 188); Triton; octil glicósido de sodio; lauril, miristil, linoleil, o estearil-sulfobetaina, lauril, miristil, linoleil o estearil Sarcosina; linoleil, miristil, o cetil-betaína; lauroamidopropil, cocoamidopropil, linoleamidopropil, miristamidopropil, palmidopropil, o isostearamidopropil-betaína (*por ejemplo*, lauroamidopropil); miristamidopropil, palmidopropil, o isostearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil de sodio, o metil oleil-taurato de sodio; y la serie MONAQUATM (Mona Industries, Inc., Paterson, Nueva Jersey), polietilglicol, polipropilglicol, y los copolímeros de etilen y propilenglicol (*por ejemplo*, Pluronic, PF68, etc.). La cantidad de tensioactivo añadido es tal que reduce la formación de partículas de la proteína reconstituida y minimiza la formación de partículas tras la reconstitución. Por ejemplo, el tensioactivo puede estar presente en la formulación prelioofilizada en la cantidad de entre aproximadamente 0,001-0,5%, alternativamente entre aproximadamente 0,005-0,05%.

Se puede usar una mezcla de lioprotector (tal como sacarosa o trehalosa) y un agente de volumen (*por ejemplo* manitol o glicina) en la preparación de la formulación de prelioofilización. El agente de volumen puede facilitar la producción de una torta liofilizada uniforme sin excesivas bolsas en la misma, etc. Se pueden incluir otros vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) en la formulación prelioofilizada (y/o la formulación liofilizada y/o la formulación reconstituida) con la condición de que no afecten adversamente las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no sean tóxicos para los receptores a las dosificaciones y las concentraciones empleadas e incluyen; agentes tamponantes adicionales; conservantes; cosolventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (*por ejemplo*, complejos Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sales tales como sodio.

La formulación en el presente documento puede contener también más de una proteína según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no afecten adversamente a la otra proteína. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar dos o más anticuerpos que se unan a la diana deseada (por ejemplo, receptor o antígeno) en una única formulación. Dichas proteínas están presentes en combinación de manera adecuada en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de, o después, de la liofilización y la reconstitución. Alternativamente, se puede llevar a cabo la esterilidad de la mezcla completa autoclavando los ingredientes, excepto la proteína, a aproximadamente 120°C durante aproximadamente 30 minutos, por ejemplo.

Después que se mezclan conjuntamente la proteína, el lioprotector opcional y los otros componentes opcionales, se liofiliza la formulación. Están disponibles muchos criodesecadores diferentes a este objeto tales como los criodesecadores Hull150™ (Hull, EE.UU.) o GT20™ (Leybold-Heraeus, Alemania). Se lleva a cabo la criodesecación congelando la formulación y posteriormente sublimando el hielo del contenido congelado a una temperatura adecuada para un secado primario. En estas condiciones, la temperatura del producto está por debajo del punto eutéctico o la temperatura de colapso de la formulación. Normalmente, la temperatura de almacenamiento para el secado primario oscilará entre aproximadamente -30 a 25°C (con la condición de que el producto permanezca congelado durante el secado primario) a una presión adecuada, que varía normalmente entre aproximadamente 50 y 250 mTorr. La formulación, el tamaño y el tipo del envase en el que se mantiene la muestra (*por ejemplo*, un vial de vidrio) y el volumen del líquido dictarán principalmente el tiempo requerido para el secado, que puede variar entre unas pocas horas a algunos días (*por ejemplo*, 40-60 horas). Opcionalmente, se puede llevar también a cabo una etapa de secado secundario dependiendo del nivel de humedad residual deseado en el producto. La temperatura a la cual se lleva a cabo el secado secundario varía entre aproximadamente 0-40°C, dependiendo principalmente del tipo y tamaño del envase y del tipo de proteína empleada. Por ejemplo, la temperatura de almacenamiento a través de la fase completa de eliminación del agua de la liofilización puede ser de aproximadamente 15-30°C (*por ejemplo*, aproximadamente 20°C). El tiempo y la presión requerida para el secado secundario será el que produzca una torta liofilizada adecuada, dependiente, *por ejemplo*, de la temperatura y de otros parámetros. El tiempo de secado secundario viene dictado por el nivel de humedad residual deseado en el producto y normalmente tarda al menos aproximadamente 5 horas (*por ejemplo*, 10-15 horas). La presión puede ser la misma que la empleada durante la etapa de secado primario. Se pueden variar las condiciones de criocongelación dependiendo de la formulación y del tamaño del vial.

2. Reconstitución de una formulación liofilizada

Antes de la administración al paciente, la formulación liofilizada se reconstituye con un diluyente farmacéuticamente aceptable de tal manera que la concentración de proteína en la formulación reconstituida sea al menos de aproximadamente 50 mg/ml, *por ejemplo* entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 400 mg/ml, alternativamente entre aproximadamente 80 mg/ml y aproximadamente 300 mg/ml, alternativamente entre aproximadamente 90 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. Dichas elevadas concentraciones de proteína en la formulación se considera que son particularmente útiles cuando se pretende la administración subcutánea de la formulación reconstituida. Sin embargo, para otras rutas de administración, tales como la administración intravenosa, se pueden desear concentraciones más bajas de la proteína en la formulación reconstituida (*por ejemplo*, entre aproximadamente 5-50 mg/ml, o entre aproximadamente 10-40 mg/ml de proteína en la formulación reconstituida). En algunas realizaciones, la concentración de proteína en la formulación reconstituida es significativamente mayor que la de la formulación prelioofilizada. Por ejemplo, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser aproximadamente 2-40 veces, alternativamente 3-10 veces, alternativamente 3-6 veces (*por ejemplo*, al menos tres veces o al menos cuatro veces) la de la formulación prelioofilizada.

La reconstitución tiene lugar generalmente a un temperatura de aproximadamente 25°C para asegurar la completa hidratación, aunque se pueden emplear otras temperaturas según se desee. El tiempo requerido para la reconstitución dependerá, *por ejemplo*, del tipo de diluyente, la cantidad de excipiente(s) y la proteína. Los diluyentes a modo de ejemplo incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWEI), una disolución a pH tamponado (*por ejemplo*, disolución salina tamponada con fosfato), disolución salina estéril, disolución de Ringer o disolución de dextrosa. El diluyente contiene opcionalmente un conservante. Se han descrito anteriormente los conservantes a modo de ejemplo, siendo preferidos como conservantes los alcoholes aromáticos tales como alcohol bencílico o fenólico. La cantidad de conservante empleado se determina evaluando las concentraciones de los diferentes conservantes para la compatibilidad con la proteína y el ensayo de la eficacia del conservante. Por ejemplo, si el conservante es un alcohol aromático (tal como alcohol bencílico), puede estar presente en una cantidad entre aproximadamente un 0,1-2,0% y preferiblemente entre aproximadamente un 0,5-1,5%, pero lo más preferible aproximadamente un 1,0-1,2%.

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

D. Formulaciones líquidas

Las formulaciones terapéuticas se preparan para el almacenamiento mezclando el ingrediente activo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 18ª edición, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 [1990]). Los vehículos, excipientes,

o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y la concentraciones empleadas, e incluyen, tampones, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico, metionina Vitamina E, metabisulfito de sodio; conservantes, isotonicantes, estabilizantes, complejos metálicos (*por ejemplo*, complejos Zn-proteína); agentes quelantes tales como EDTA y/o tensioactivos no iónicos.

Cuando el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente con la región de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar fragmentos de anticuerpos o incluso moléculas de péptidos que retengan la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Se pueden sintetizar dichos péptidos químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, Marasco y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893 [1993]).

Se usan tampones para controlar el pH en un intervalo que optimice la efectividad terapéutica, especialmente si la estabilidad es dependiente del pH. Los tampones están preferiblemente presentes a concentraciones que varían entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 250 mM. Los agentes tamponantes adecuados para uso con la presente invención incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sus sales. Por ejemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Adicionalmente. Los tampones pueden estar comprendidos por histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

Se añaden conservantes para retardar el crecimiento microbiano, y están típicamente presentes en un intervalo entre 0,2%-1,0% (p/v). Los conservantes adecuados para uso con la presente invención incluyen (los mencionados como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; haluros de benzalconio (*por ejemplo*, cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de bencetonio; timerosal, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol, y *m*-cresol.

Los agentes de tonicidad, conocidos algunas veces como “estabilizantes” están presentes para ajustar o mantener la tonicidad del líquido de una composición. Cuando se usan con grandes biomoléculas cargadas tales como proteínas y anticuerpos, se denominan a menudo “estabilizantes” debido a que pueden interactuar con los grupos cargados de las cadenas laterales de aminoácidos, disminuyendo el potencial de las interacciones inter e intramoleculares. Pueden estar presentes los agentes de tonicidad en cualquier cantidad entre 0,1% y 25% en peso, preferiblemente 1 a 5%, teniendo en cuenta las cantidades relativas de los otros ingredientes. Los agentes de tonicidad incluyen alcoholes azucarados polihídricos, preferiblemente trihídricos o alcoholes azucarados superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

Los excipientes adicionales incluyen agentes que pueden servir como uno o más de los siguientes:

- (1) Agentes de volumen, (2) potenciadores de la solubilidad, (3) estabilizantes y (4) agentes que evitan la desnaturalización o la adherencia a la pared del contenedor. Los estabilizantes pueden estar presentes en el intervalo entre 0,1 y 10.000 partes por peso de proteína activa o anticuerpo. Los estabilizantes típicos incluyen:

alcoholes azucarados polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc.; azúcares orgánicos o alcoholes azucarados tales como sacarosa, lactosa, lactitol, trehalosa, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mionisitos, mionisitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitols (*por ejemplo*, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina u otras inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos (*por ejemplo*, xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos (*por ejemplo*, lactosa, maltosa, sacarosa); trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrina o dextrano.

Los tensioactivos no iónicos o detergentes (conocidos también como “agentes humectantes” están presentes para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por la agitación, lo que permite también que la formulación se exponga al estrés superficial por cizalladura sin que se produzca la desnaturalización de la proteína terapéutica o anticuerpo activo. Los tensioactivos no iónicos están presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 40, 60, 65, 80, etc.), poloxámeros (184, 188, etc.), polioles Pluronic®, Triton, monoéteres de polioxietileno sorbitán (Tween®-20, Tween®-80, etc.), laurmacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, éster de sacarosa ácido graso, metil celulosa y carboximetil celulosa. Los detergentes aniónicos que se pueden usar incluyen lauril sulfato de sodio, sulfosuccinato de dioctilo sodio y sulfonato de dioctil sodio. Los detergentes catiónicos incluyen cloruro de benzalconio o cloruro de benzetonio.

Con el fin de usar las formulaciones para la administración *in vivo*, deben ser estériles. Se puede volver estéril la formulación mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones terapéuticas en

el presente documento se colocan en un envase que tiene puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

La ruta de administración está de acuerdo con los procedimientos conocidos y aceptados, tales como mediante bolo o infusión única o múltiple durante un largo periodo de tiempo de una manera adecuada, por ejemplo, inyección o infusión mediante rutas subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional o intraarticular, administración tópica, inhalación o mediante liberación mantenida o medios de liberación extendida.

La formulación en el presente documento puede contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten adversamente entre sí. Alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son efectivas para el objetivo pretendido.

Se pueden atrapar también los ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Se dan a conocer dichas técnicas en Remington's Pharmaceutical Sciences 18ª edición, *más arriba*.

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos N° 3.773.919) copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido, y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Se ha llevado a cabo satisfactoriamente la microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación mantenida con la hormona de crecimiento humana (rhGH), interferón- γ (rhIFN), interleucina-2, y MN rpg 120. Johnson y col., Nat. Med. 2: 795-799 (1996); Yasuda y col., Biomed. Ther. 27: 1221-1223 (1993); Hora y col., Bio/Technology 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems", in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds., (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; documentos WO 97/03692; WO 96/40072; WO 96/07399; y Patente de los Estados Unidos N° 5.654.010.

Se pueden desarrollar las formulaciones de liberación mantenida de estas proteínas usando un polímero de ácido poliláctico-coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y a la amplia gama de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, los ácidos láctico y glicólico, se pueden aclarar bastante en el interior del cuerpo humano. Además, se puede ajustar la degradabilidad de este polímero de meses a años dependiendo de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", en Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker; Nueva York, 1990), M. Chasin y R. Langer (Eds.) pp. 1-41.

Mientras que polímeros tales como acetato de etilen-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico liberan las moléculas durante 100 días, algunos hidrogeles liberan las proteínas en periodos más cortos de tiempo. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden concebir estrategias racionales de estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace S-S intermolecular mediante un intercambio tio-disulfuro, se puede conseguir la estabilización modificando los restos sulfidrílo, liofilizándolos a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando los aditivos apropiados y desarrollando composiciones específicas de matriz polimérica.

Se pueden usar también composiciones liposomales o proteoínoides para formular las proteínas o los anticuerpos dados a conocer en el presente documento. Véanse las Patentes de los Estados Unidos N°s 4.925.673 y 5.013.556.

Se puede potenciar la estabilidad de las proteínas y anticuerpos descritos en el presente documento mediante el uso de "sales metálicas polivalentes solubles en agua" no tóxicas. Los ejemplos incluyen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{2+} y Al^{3+} . Los aniones modo de ejemplo que pueden formar sales solubles en agua con los cationes metálicos polivalentes anteriores incluyen los formados a partir de ácidos inorgánicos y/o ácidos orgánicos. Dichas sales solubles en agua tienen una solubilidad en agua (a 20°C) de al menos aproximadamente 20 mg/ml, alternativamente al menos aproximadamente 100 mg/ml, alternativamente al menos aproximadamente 200 mg/ml.

Los ácidos inorgánicos adecuados que se pueden usar para formar las "sales metálicas polivalentes solubles en agua" incluyen el ácido clorhídrico, acético, sulfúrico, nítrico, tiocianico y fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados que se pueden usar incluyen ácidos carboxílicos alifáticos y ácidos aromáticos. Los ácidos alifáticos comprendidos dentro de esta definición se pueden definir como ácidos carboxílicos C_{2-9} saturados o insaturados (por ejemplo, ácidos mono, di y tricarboxílicos). Por ejemplo, los ácidos monocarboxílicos a modo de ejemplo comprendidos dentro de esta

definición incluyen los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} saturados acético, propiónico, butírico, valérico, caproico, enántico, caprílico, pelargónico y capríónico, y los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} insaturados acrílico, propiólico, metacrílico, crotonico e isocrotonico. Los ácidos dicarboxílicos a modo de ejemplo incluyen los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} saturados malónico, succínico, glutárico, adipico y pimélico, mientras que los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} insaturados incluyen los ácidos maleico, fumárico, citacrónico y mesacónico. Los ácidos tricarboxílicos a modo de ejemplo incluyen los ácidos tricarboxílicos C_{2-9} saturados tricarbálico, y 1,23-butanotricarboxílico. Adicionalmente, los ácidos carboxílicos de esta definición pueden contener también uno o dos grupos hidroxilo para formar ácidos hidroxi carboxílicos. Los ácidos hidroxi carboxílicos a modo de ejemplo incluye el ácido glicólico, láctico, glicérico, tartrónico, málico, tartárico y cítrico. Los ácidos aromáticos comprendidos dentro de esta definición incluyen ácido benzoico y salicílico.

Las sales metálicas polivalentes solubles en agua comúnmente empleadas que se pueden usar para ayudar a estabilizar los polipéptidos encapsulados de esta invención incluyen, por ejemplo: (1) las sales metálicas de ácidos inorgánicos de haluros (*por ejemplo*, cloruro de cinc, cloruro de calcio), sulfatos, nitratos, fosfatos y tiocianatos; (2) las sales metálicas de ácidos carboxílicos alifáticos (*por ejemplo*, acetato de calcio, acetato de cinc, propionato de calcio, glicolato de cinc, lactato de calcio, lactato de cinc y tartrato de cinc); y (3) las sales metálicas de ácidos carboxílicos aromáticos de benzoatos (*por ejemplo*, benzoato de cinc) y los salicilatos.

E. Procedimientos de tratamiento

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un agente activo dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, según se ha definido anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el agente se administra con objetivos preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al agente, y de la discreción del médico especialista que atiende la enfermedad. El agente se administra adecuadamente al paciente en una vez o en una serie de tratamientos.

Un procedimiento preferido de tratamiento es el tratamiento de los trastornos mediados por IgE. Los trastornos mediados por IgE incluyen trastornos atópicos, que se caracterizan por una propensión heredada a responder inmunológicamente a cualquier antígeno que se produzca naturalmente, inhalado o ingerido y a la continua producción de anticuerpos IgE. Los trastornos atópicos específicos incluyen asma alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica y gastroenteropatía alérgica. Los pacientes atópicos tienen a menudo múltiples alergias, lo que significa que tienen anticuerpos IgE de, y síntomas de, muchos alérgenos ambientales, que incluyen pólenes, hongos (*por ejemplo*, mohos), residuos animales y de insectos y algunos alimentos.

Sin embargo, los trastornos asociados con elevados niveles de IgE no se limitan a aquellos con una etiología heredada (atópica). Otros trastornos asociados con elevados niveles de IgE, que parecen estar mediados por IgE y son tratables con la formulaciones de esta presente invención incluyen hipersensibilidad (*por ejemplo*, hipersensibilidad anafiláctica), eczema, urticaria, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasíticas, síndrome de hiper-IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, alinfoflasia tímica, mieloma de IgE, y reacción del hospedador frente a injerto.

La *rinitis alérgica*, conocida también como rinoconjuntivitis alérgica o fiebre del heno, es la manifestación más común de una reacción atópica a alérgenos inhalados, la gravedad y duración de la cual está a menudo correlacionada con la intensidad y la longitud de la exposición al alérgeno. Es una enfermedad crónica, que puede aparecer en primer lugar a cualquier edad, pero el comienzo es usualmente durante la infancia o la adolescencia. Un ataque típico consiste en una rinorrea acuosa profusa, estornudos paroxísmicos, obstrucción nasal y picor de la nariz y del paladar. El drenado del moco postnasal produce también dolor de garganta, aclarado de la garganta y tos. Pueden ser también síntomas de blefarconjuntivitis alérgica, con picor intenso de la conjuntiva y los párpados, enrojecimiento, carraspera, y fotofobia. Los ataques graves se ven a menudo acompañados por malestar sistémico, debilidad, fatiga, y algunas veces, dolor muscular tras intensos periodos de estornudos.

Asma, conocida también como enfermedad obstructiva reversible de las vías aéreas, se caracteriza por hipersensibilidad del árbol traqueobronquial a los irritantes respiratorios y a los agentes químicos broncoconstrictores, produciendo ataques de estornudos, disnea, opresión en el pecho, y tos, que son reversibles espontáneamente o con tratamiento. Es una enfermedad crónica que implica la vía aérea completa, pero que varía en la gravedad desde ligeros episodios transitorios ocasionales a obstrucción bronquial crónica, grave, con riesgo para la vida. El asma y la atopía pueden coexistir, pero únicamente aproximadamente la mitad de los asmáticos son también atópicos, e incluso un porcentaje más pequeño de pacientes atópicos tienen también asma. Sin embargo, la atopía y el asma no son completamente independientes ya que el asma se produce más frecuentemente entre individuos atópicos que entre no atópicos, especialmente durante la infancia. De manera adicional, se ha clasificado el asma históricamente en dos subgrupos, asma extrínseca y asma intrínseca.

El asma extrínseca, conocida también como asma alérgica, atópica o inmunológica, es descriptiva de pacientes que desarrollan generalmente asma de una manera temprana durante la vida, usualmente durante la primera o segunda infancia. Coexisten a menudo otras manifestaciones de atopía, que incluyen eccemas o rinitis alérgica. Se pueden producir los ataques asmáticos durante las estaciones con polen, en presencia de animales, o en exposición al polvo en las casas, almohadas de plumas, u otros alérgenos. Las pruebas en piel muestran reacciones de habón y eritema positivas a los alérgenos causantes. De manera interesante, las concentraciones de IgE en suero con frecuentemente elevadas, pero algunas veces normales.

El asma intrínseca, conocida también como asma no alérgica o idiopática, se produce normalmente en primer lugar durante la vida adulta, tras una infección respiratoria aparente. Los síntomas incluyen obstrucción bronquial crónica o recurrente no relacionada con las estaciones con polen o exposición a otros alérgenos. Las pruebas en piel son negativas a los alérgenos atópicos usuales, la concentración de IgE en suero es normal. Los síntomas adicionales incluyen esputos de sangre y eosinofilia. Otros esquemas para clasificar el asma en subgrupos, del tipo sensible a la aspirina, inducida por ejercicio, factores estimuladores externos que definen solamente características infecciosas y psicológicas que afectan a algunos pacientes más que a otros.

Finalmente, es importante señalar que se han asociado históricamente algunas clasificaciones únicamente al asma alérgica con dependencia de IgE, existen ahora importantes datos estadísticamente significativos que muestran una correlación entre IgE y asma (alérgica y no alérgica). Capítulo 27, "The Atopic Diseases", A.I. Terr en Medical Immunology, 9ª Ed., Simon and Schuster, Stites y col, Ed. (1997). Como resultado, el término "trastornos mediados por IgE", para los objetivos de esta solicitud de patente, incluye el asma alérgica y no alérgica.

Los signos físicos de un ataque de asma incluyen taquipnea, estertor audible, y uso de los músculos accesorios de la respiración. Están también presentes un pulso rápido y una elevada presión sanguínea, tal como así mismo elevados niveles de eosinófilos en la sangre periférica y secreciones nasales. Las funciones pulmonares muestran una disminución en los caudales y un volumen expiratorio forzado de 1 segundo (FEV₁). La capacidad pulmonar total y la capacidad residual funcional son típicamente normales o ligeramente incrementadas, pero pueden disminuir con broncoespasmos extremos.

Se puede distinguir la patología del asma mediante las reacciones de la fase temprana y la fase tardía. La fase temprana se caracteriza por la contracción del músculo liso, edema e hipersecreción, mientras que las reacciones de la fase tardía por la inflamación celular. Se puede inducir el asma por diversos estimuladores no específicos que incluyen las infecciones (*por ejemplo*, infecciones respiratorias víricas), factores fisiológicos (*por ejemplo*, ejercicio, hiperventilación, respiración profunda, factores psicológicos), factores atmosféricos (*por ejemplo*, dióxido de azufre, amoníaco, aire frío, ozono, vapor de agua destilada), ingestivos (*por ejemplo*, propanolol, aspirina, fármacos antiinflamatorios no esteroideos), inhalantes experimentales (*por ejemplo*, isocianatos). Los diversos alérgenos laborales o ambientales que producen asma alérgica pueden incluir, productos animales, insectos del polvo, criaturas marinas, productos para el cuidado de las plantas, frutos, semillas hojas y polenes, colorantes y tintas orgánicas, agentes microbianos, enzimas, agentes terapéuticos, agentes esterilizantes, compuestos químicos inorgánicos y orgánicos.

La *dermatitis atópica*, conocida también como eczema, neurodermatitis, eczema tópico o prurigo de Besnier, es el trastorno crónico común de la piel específico de un subconjunto de pacientes con características familiares e inmunológicas de atopia. La característica esencial es una respuesta inflamatoria dérmica prurítica que induce una erupción en la piel distribuida simétricamente de forma característica con predilección por algunos sitios. Existe también una frecuente producción en exceso de IgE por los linfocitos B. Aunque la dermatitis atópica se clasifica como una forma cutánea de atopia debido a que está asociada con la rinitis alérgica y el asma y elevados niveles de IgE, la gravedad de la dermatitis, sin embargo, no se correlaciona siempre con la prueba de alérgenos en piel, y la desensibilización (a diferencia de otras enfermedades alérgicas) no es un tratamiento eficaz. Aunque un elevado nivel de IgE en suero es confirmativo de un diagnóstico de asma alérgica, niveles normales no excluyen ésta. El comienzo de la enfermedad puede producirse a cualquier edad, y las lesiones comienzan de manera aguda con pápulas o placas edematosas eritematosas con escarificaciones. El picor conduce al llanto y la formación de costras y a continuación a la liquenificación. A nivel celular, la lesión aguda es edematosa y la dermis está infiltrada con células mononucleares, linfocitos CD4. Son raros los neutrófilos, eosinófilos, las células plasmáticas y los basófilos, pero están presentes mastocitos desgranulados. hiperplasia epidérmica característica de las lesiones crónicas, hiperqueratosis y parakeratosis, y la dermis está infiltrada con células mononucleares, células de Langerhans y mastocitos. Pueden existir zonas focales de fibrosis que incluyen la implicación del perineuro de pequeño nervios.

La *gastroenteropatía alérgica*, conocida también como gastroenteropatía eosinofílica, es una manifestación atópica inusual en la que se asocian múltiples sensibilidades alimentarias a IgE con una reacción mucosal local en el tracto gastrointestinal. Es rara en adultos, pero más común, aunque transitoria, en niños. Se produce la dolencia cuando los alérgenos alimentarios ingeridos reaccionan con los anticuerpos IgE locales en la mucosa yeyunal y liberan mediadores mastocíticos, dando como resultado síntomas gastrointestinales poco después de la comida. La exposición continuada produce inflamación crónica, dando como resultado la pérdida de proteínas gastrointestinales y edema hipoproteínico. La pérdida de sangre a través de la mucosa intestinal inflamada puede ser suficientemente significativa para producir anemia por deficiencia en hierro. La reacción alérgica se produce localmente en la mucosa gastrointestinal superior tras la exposición al alérgeno, pero se resuelve evitando el alérgeno.

Anafilaxis y urticaria están claramente mediadas por IgE, aunque carecen de determinantes genéticos, y no tienen predilección por individuos atópicos. La anafilaxis es una reacción alérgica aguda generalizada con implicación simultánea de diversos sistemas orgánicos, usualmente cardiovascular, respiratorio, cutáneo y gastrointestinal. La reacción está inmunológicamente mediada, y se produce por la exposición a un alérgeno al cual el sujeto se ha sensibilizado anteriormente. La urticaria y el angiodema están referidos a hinchazón física, eritema y picor, resultantes de receptores estimulados por histaminas en los vasos sanguíneos cutáneos superficiales, y es la característica cutánea de contraste de la anafilaxis sistémica. La anafilaxis sistémica es la incidencia de una reacción mediada por IgE simultáneamente en múltiples órganos resultante de fármacos, venenos de insectos o alimentos. Se produce repentinamente por los mastocitos inducidos por alérgeno saturados de IgE, dando como resultado una profunda alteración con riesgo para

la vida en el funcionamiento de diversos órganos vitales. El colapso vascular, obstrucción aguda de las vías aéreas, vasodilatación cutánea y edema, y espasmos musculares gastrointestinales y genitourinarios se producen siempre simultáneamente, aunque no siempre en el mismo grado.

5 La patología de la anafilaxis incluye el angiodema y los pulmones hiperinflamados, con taponamiento mucosos de las vías aéreas y atelectasis focal. A nivel celular, los pulmones aparecen similarmente como durante un ataque agudo de asma con hipersecreción de las glándulas submucosales bronquiales, edema mucosal y submucosal, congestión vascular peribronquial, y eosinofilia en las paredes bronquiales. Pueden estar presentes el edema pulmonar y hemorragias. Pueden estar también presentes espasmos musculares bronquiales, hiperinflamación, e incluso rotura de
10 los alveolos. Las características importantes de la anafilaxis humana incluyen edema, congestión vascular y eosinofilia en la lámina propia de la laringe, tráquea, epiglotis e hipofaringe.

La exposición al alérgeno puede ser mediante ingestión, inyección, inhalación o contacto con la piel o la membrana mucosa. La reacción comienza en segundos o minutos tras la exposición al alérgeno. Puede ser un miedo o sensación
15 inicial de muerte inminente, seguido rápidamente por síntomas en uno o más sistemas orgánicos diana: cardiovascular, respiratorio, cutáneo y gastrointestinal.

Los alérgenos responsables de la anafilaxis difieren de los comúnmente asociados con la atopía. Alimentos, fármacos, venenos de insectos o látex son fuentes comunes. Los alérgenos alimentarios incluyen los que se encuentran en crustáceos, moluscos (por ejemplo, langosta, camarón, cangrejo), pescado, legumbres (por ejemplo, cacahuetes, guisantes, alubias, regaliz), semillas (por ejemplo, sésamo, semillas de algodón, alcaravea, mostaza semillas de lino, girasol), nueces, bayas, huevos blancos, trigo sarraceno y leche. Los alérgenos de fármacos incluyen los que se encuentran en proteínas y polipéptidos heterólogos, polisacáridos y fármacos hapténicos. Los alérgenos de insectos incluyen insectos himenópteros, que incluyen, la abeja, avispa germánica, avispa, hormiga colorada.
25

Aunque el tratamiento típico para la epinefrina es la anafilaxis, se prescriben normalmente antihistaminas u otros bloqueantes de las histaminas para la urticaria menos intensa o la reacción angioedémica.

F. Terapias de combinación

30 Se puede combinar el procedimiento de la invención con procedimientos conocidos de tratamiento para el trastorno mediado por IgE bien como etapas combinadas bien como tratamientos adicionales o como componentes adicionales de una formulación terapéutica.

35 Por ejemplo, se pueden administrar histaminas, especialmente antihistaminas no sedantes, antes, antes de, o en proporción con los anticuerpos dirigidos contra IgE de la invención. Las antihistaminas adecuadas incluyen las de la alquilamina (*por ejemplo*, clorfeniramina), etanolamina (*por ejemplo*, difenhidramina) y fenotiazina (*por ejemplo*, prometazina). Aunque muchas antihistaminas antagonizan los efectos farmacológicos de la histamina bloqueando sus sitios receptores en las células efectoras, otros fármacos antihistamínicos comunes operan bloqueando la liberación
40 de la histamina desde los mastocitos que se han sensibilizado y provisto con IgE específica de alérgeno (*por ejemplo*, cromolina de sodio). Las antihistaminas a modo de ejemplo incluyen astemizol, maleato de azatadina, maleato de brofeniramina, maleato de carbinoxamina, clorhidrato de cetirizina, fumarato de clemastina, clorhidrato de ciproheptadina, maleato de dexbronfeniramina, maleato de dexclorfeniramina, dimenhidrinato, clorhidrato de difenhidramina, succinato de doxilamina, clorhidrato de fexofenadina, clorhidrato de terfenadina, clorhidrato de hidroxizina, loratidina, clorhidrato de meclizina, citrato de triptenamina, clorhidrato de triptenamina, clorhidrato de triptolidina.
45

Se pueden mejorar los síntomas particulares de los trastornos mediados por IgE (*por ejemplo* reacciones en la fase temprana) con simpaticomiméticos o fármacos que tienen efecto broncodilatador. La epinefrina es un alfa y beta-adrenérgico de amplio espectro que se administra a menudo por vía subcutánea en una dosis de 0,1-0,5 ml de una disolución acuosa 1:100. Una forma de actuación a largo plazo (*es decir*, terbutalina) incluye albuterol, pirbuterol, metaproteterol, salmeterol, isoetarina y formoterol para administración nasal (*por ejemplo*, nebulizador de manipulación manual), dispositivo de respiración intermitente a presión positiva, o inhaladores presurizados de dosis medida) o por vía oral.
50

Se puede conseguir también la broncodilatación mediante la administración de xantinas, especialmente cuando se administran en combinación con los anteriores fármacos simpaticomiméticos. Las xantinas a modo de ejemplo incluyen aminofilina (iv. 250-500 mg) y teofilina (oral, 10-20 µg/ml de concentración en suero).
55

Se pueden atenuar otros síntomas de diversos trastornos mediados por IgE (*por ejemplo*, trastornos en la fase tardía) mediante el tratamiento con glucocorticoides u otros fármacos que tienen efectos antiinflamatorios. Se administra prednisona (30-60 mg diariamente) sistémicamente para ataques graves, mientras que se administran dipropionato de beclometasona, triamcinolona acetona y flunisolida en forma de aerosol como terapia de mantenimiento a largo plazo. Adicionalmente, los corticoesteroides que tienen efectos antiinflamatorios incluyen: betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de fludrocortisona, flunisolida, propionato de fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona.
60

65 Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos que se pueden usar también en combinación con los procedimientos terapéuticos de la invención incluyen, acetaminofeno, aspirina, bromfenaco de sodio, diclofenaco de sodio, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno de calcio, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, meclofenamato de sodio, áci-

do mefenámico, nabumetona, naproxeno, naproxeno de sodio, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicamo, sulindaco, tolmetina de sodio.

Adicionalmente se puede conseguir también el máximo beneficio terapéutico con la administración de descongestivos (por ejemplo, fenilefrina, fenilpropalamina, pseudoefedrina), supresores de la tos (por ejemplo, dextrometorfan, codeína, o hidrocodona) o analgésicos (por ejemplo, acetaminofeno, aspirina).

La desensibilización del alérgeno es una forma de tratamiento en la que se inyectan alérgenos en el paciente a objeto de reducir o eliminar la respuesta alérgica. Se conoce también como inmunoterapia alérgica, hiposensibilización o terapia de inyección para la alergia. Se usa a menudo con otros tratamientos de la alergia, pero no a menudo como tratamiento principal. Se ha empleado satisfactoriamente cuando es imposible evitar el alérgeno. Un tratamiento de desensibilización alérgica típico incorpora la inyección subcutánea de alérgeno estéril en dosis crecientes una o dos veces a la semana hasta que se consiga una dosis que produzca una pequeña zona local transitoria de inflamación en el sitio de la inyección. A continuación se proporciona la dosis en un programa de mantenimiento una vez cada 2-4 semanas. Se usa más a menudo la desensibilización de la alergia en el tratamiento del asma alérgica y la rinitis alérgica, aunque ha tenido éxito en el tratamiento de la anafilaxis. Se ha usado eficazmente la desensibilización mediante el uso de adyuvantes, tales como el adyuvante incompleto de Freund, que es una emulsión de un antígeno acuoso en aceite mineral. El efecto fisiológico crea un depósito de líquido insoluble en el que se liberan gradualmente gotículas de alérgeno. Otra forma de desensibilización alérgica es polimerizar alérgenos monoméricos con glutaraldehído para crear una molécula con alergenicidad relativamente baja (es decir, produce la respuesta alérgica), reteniendo a la vez un eficaz grado de inmunogenicidad.

G. Dosificaciones farmacéuticas

Las dosificaciones y la concentración de fármaco deseada de las composiciones de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosificación o de las rutas de administración apropiadas esta bien comprendida dentro del conocimiento de la persona normalmente experta en la técnica. Los experimentos con animales proporcionan directrices fiables para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana. Se puede llevar a cabo el escalado interespecies de las dosis eficaces siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi y col., Eds, Pergamon Press, Nueva York 1989, pp.42-46.

Cuando se usa la administración *in vivo* de los polipéptidos o anticuerpos descritos en el presente documento, las cantidades de dosificación normales pueden variar entre aproximadamente 10 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferiblemente, aproximadamente 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la ruta de administración. Se proporcionan en la bibliografía las directrices como dosificaciones o procedimientos de administración particulares; véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. esta dentro del alcance de la invención que diferentes formulaciones sean efectivas para diferentes tratamientos y diferentes trastornos, y la administración pretendida para tratar un órgano o tejido específico puede necesitar la administración de una manera diferente de la de otro órgano o tejido. Además, se pueden administrar las dosificaciones mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas durante algunos días o más, dependiendo de la dolencia, se mantiene el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. Se puede vigilar fácilmente el progreso de esta terapia mediante las técnicas y ensayos convencionales.

H. Administración de la formulación

Las formulaciones de la presente invención, incluyendo, pero sin limitarse a las formulaciones reconstituidas, se administran a un mamífero en necesidad de tratamiento con la proteína, preferiblemente un ser humano, según los procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o mediante inhalación.

En las realizaciones preferidas, se administran las formulaciones al mamífero mediante administración subcutánea (*es decir*, debajo de la piel). A dicho objeto, se puede inyectar la formulación usando una jeringuilla. Sin embargo, están disponibles otros dispositivos para la administración de la formulación tales como dispositivos de inyección (*por ejemplo*, los dispositivos Inject-easeTM y GenjectTM; plumas inyectoras (tales como GenPenTM); dispositivos autoinyectores, dispositivos sin aguja (*por ejemplo*, MediJectorTM y BioJectorTM); y sistemas de administración mediante parches subcutáneos.

En una realización específica, la presente invención se dirige a kits para una unidad de administración de dosis única. Dicho kit comprende un envase de una formulación acuosa de proteína o anticuerpo terapéutico que incluye jeringuillas precargadas individuales o multicámara. Están disponibles jeringuillas precargadas a modo de ejemplo de Vetter GmbH, Ravensburg, Alemania.

La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") de la proteína dependerá, *por ejemplo*, de la dolencia que se va tratar, la gravedad y el curso de la dolencia, de si se administra la proteína con objetivos preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta a la proteína, el tipo de proteína usada,

y de la discreción del especialista médico que atiende la enfermedad. La proteína se administra adecuadamente al paciente de una vez o en una serie de tratamientos y se puede administrar al paciente en cualquier momento del diagnóstico progresivo. Se puede administrar la proteína como un único tratamiento o en conjunción con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento de la dolencia en cuestión.

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

Los usos para la formulación dirigida contra IgE (por ejemplo, rhuMAbE-25, rhMAbE-26, Hu-901) incluyen, por ejemplo, el tratamiento o la profilaxis de las enfermedades alérgicas mediadas por IgE, infecciones parasíticas, cistitis intersticial y asma. Dependiendo de la enfermedad o trastornos que se va tratar, se administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz (*por ejemplo*, entre aproximadamente 1-15 mg/kg) del anticuerpo dirigido contra IgE.

I. Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene la formulación y se proporcionan preferiblemente instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un envase, Los envases adecuados contienen, por ejemplo, botellas, viales (*por ejemplo*, viales de doble cámara), jeringuillas (tales como jeringuillas individuales o de doble cámara) y tubos de ensayo. El contenedor puede estar formado por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase mantiene la formulación y la marca en, o asociada con, el envase puede indicar directrices para la reconstitución y/o el uso. La marca puede indicar adicionalmente que la formulación es útil o pretendida para la administración subcutánea. El envase que mantiene la formulación puede ser un vial multiusos, que permite administraciones repetidas (*por ejemplo*, entre 2-6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo envase que comprende un diluyente adecuados (*por ejemplo*, BWF). Tras mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final de proteína en la formulación reconstituida será generalmente al menos de 50 mg/ml. 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, e inserciones empaquetadas con instrucciones para el uso.

Se entenderá más completamente la invención con referencia a los siguientes ejemplos. No deberían, sin embargo, construirse como limitantes del alcance de la invención.

En otra realización, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende las formulaciones descritas en el presente documento para la administración en un dispositivo autoinyector. Se puede describir un autoinyector como un dispositivo de inyección que tras la activación, administrará sus contenidos sin acción necesaria adicional del paciente o el administrador. Son particularmente adecuados para la automedicación de las formulaciones terapéuticas cuando la velocidad de administración debe ser constante y el tiempo de administración es mayor que unos pocos momentos.

Ejemplo 1

Preparación de una formulación rhuMAbE25 ("E25") dirigida contra IgE

Se prepararon formulaciones del anticuerpo rhuMAbE25 dirigido contra IgE a partir del lote K9094A residual a granel de E25 (50 mg/ml de rhuMAb E25, trehalosa 85 mM, histidina 5 mM, pH 6, Tween 20 al 0,01%) o rhuMAbE25 Q-Pool (5 mg/ml de rhuMAb E25, Tris 25 mM, NaCl 200 mM).

Se prepararon disoluciones acuosas de rhuMAbE25 mediante diálisis en diferentes tampones (His-HCl 20 mM y Arg-HCl 200 mM, pH 6,0) a 2-8°C usando un Casete de Diálisis Slide-A-Lyzer (Pierce). A continuación se transfirieron las muestras en el depósito de muestras de unos microconcentradores centrífugos Centricon-30 (Amicon). Se concentraron las proteínas mediante centrifugación del concentrador Centricon-3 a 4000-5000 g hasta que se alcanzó la concentración deseada de proteína.

A continuación se concentraron las muestras a ~150 mg/ml de rhuMAb E25 usando la ultrafiltración. Se añadió Tween 20 a cada preparación hasta una concentración final de 0,02%. Se filtraron todas las formulaciones, se rellenaron asépticamente en viales FormaVitrum de 3 cc y se taponaron los viales con tapones Diakyo de 13 mm en una sala de Tipo 100.

Ejemplo 2

Procedimientos y materiales

Estudios de estabilidad: Se rellenaron todas las formulaciones a 1 ml en viales FormaVitrum de 3 cc y se taponaron con tapones Diakyo de 13 mm en una sala de rellenado estéril de Tipo 100. Se colocaron los viales a -70, 2-8, 15, 30 y 40°C en recipientes impermeables a la luz.

ES 2 349 779 T3

Estudio de agitación: se colocaron alícuotas de cada formulación en viales de vidrio. Se agitaron los viales horizontalmente en un Agitador de Sobremesa Glas-Col a temperatura ambiente. Se ajustó el agitador a 70 con una longitud del brazo de 30 cm (máximo). Tras la agitación se inspeccionaron las muestras y se analizaron según el siguiente protocolo.

Estudio de Congelación-Descongelación: las muestras de E25 experimentaron tres ciclos de congelación-descongelación. Cada ciclo consistió en una congelación a -70°C durante la noche y posteriormente a una descongelación a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora. Después de cada ciclo, se inspeccionaron las muestras visualmente usando una caja de luz para evaluar el color y la claridad del líquido. Se midieron la turbidez y los agregados solubles siguiendo el protocolo descrito a continuación.

Procedimientos analíticos: se analizó la estabilidad de las muestras mediante los procedimientos reseñados en la Tabla 1.

TABLA 1

Procedimientos analíticos

Ensayo	Objetivo
Color, Transparencia, Apariencia ^a	Inspección visual de formulaciones líquidas
Cromatografía de Exclusión por tamaño (SEC) ^b	Mide el % de monómero, los agregados solubles y los componentes de bajo peso molecular
Cromatografía de Interacción Hidrófoba (HIC) ^c	Mide el nivel de isomerización de Asp-32 y de tiol libre
Barrido de Espectro UV (Gravimétrico) ^f	Mide la concentración de proteína
Turbidez (DO promedio 340-360 nm)	Mide los agregados solubles e insolubles
Actividad ^e	Determina la actividad de unión de anti-IgE
^a <u>Paso por Color, Apariencia y Transparencia:</u> Se evaluaron visualmente el color, la apariencia y la transparencia de la muestra frente al fondo blanco y negro de la inspección y se compararon con un volumen igual de control negativo. Se deben hacer girar las muestras cuidadosamente para asegurar una mezcla homogénea, pero no demasiado vigorosamente para que no aparezcan burbujas. ^b <u>Cromatografía de Exclusión por Tamaño:</u> Se usó una columna TSK SUPER SW3000 (4,6 x 300 mm) y se eluyó en fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,8. Se midió la muestra a 280 nm mediante un detector UV. ^c <u>Cromatografía de Interacción Hidrófoba (HIC):</u> Se llevaron a cabo experimentos HIC usando una columna TSK Phenyl-5PW (7,5 x 75 mm) (TosoHaas) en un sistema de cromatografía líquida HP 1100. Se introdujo la columna con 28 µg de fragmentos Fab digeridos con papaína y se eluyó a un gradiente de concentración de sulfato de	

amonio en tampón Tris 20 mM de 2 M a 0 M. Se vigilaron los picos a 210 nm mediante un detector UV.

^d Turbidez: Se determinó la turbidez de las muestras en una cubeta de 1 cm de camino óptico usando un espectrómetro HP. Se calculó la turbidez como la absorbancia promedio entre 340-360 nm.

^e Se determinó la actividad del anticuerpo monoclonal dirigido contra IgE mediante un ensayo de inhibición de unión al receptor. Se diluyeron las muestras hasta que estuvieron comprendidas dentro del intervalo de la curva estándar entre 100 y 1,56 µg/ml en un diluyente de ensayo que contenía tampón fosfato, BSA al 0,5 %, polisorbato 20 al 0,05 %, timerosol al 0,01 %. Se recubrió una placa de microvaloración con receptor de IgE, a continuación se incubó con IgE-biotina y una muestra anti-IgE diluida. Se midió la cantidad de IgE-biotina unida al receptor que se correlacionó con la actividad del anticuerpo monoclonal dirigido contra IgE usando Estreptavidina-HRP. Se analizaron los datos usando un programa logístico de ajuste de curvas de 4 parámetros

^f Se obtuvo la concentración del anticuerpo en un espectrofotómetro de matriz de diodos Hewlett Packard 8453 con una cubeta de cuarzo de 1 cm. Se calculó la concentración usando una absortividad de 1,5 cm⁻¹ (mg/ml)⁻¹.

Resumen de Formulaciones Líquidas

Formulaciones	Intervalos de proteína	Tampón/ intervalos	Excipientes/ intervalos
80mg/ml de E25 50 mM Histidina-HCl 150 mM Trehalosa al 0,05 % Polisorbato 20 pH 6,0	40-150 mg/ml	His-HCl o His-Acetato Intervalos: 10 mM-100 mM	Azúcar trehalosa o sacarosa Intervalos: 20 mM-350 mM Polisorbato: 0,01 %-0,1 %
150 mg/ml de E25 20 mM Histidina-HCl 200 mM ArgHCl al 0,02 % Polisorbato 20 pH 6,0	40-260 mg/ml	His-HCl o His-Acetato Intervalos: 10 mM-100mM ^o	ArgHCl Intervalos: 50 mM-200 mM Polisorbato: 0,01 %-0,1 %

ES 2 349 779 T3

Datos de estabilidad para 150 mg/ml de E25 en formulación de Histidina y ArgHCl

Temp (°C)	Tiempo (meses)	Visual	pH	SEC ^a % de monómero	HIC ^b % de principal	Potencia ^c	Turbidez ^d
5	0	Pasa	6,2	99,0	64	106	0,25
	1	Pasa	6,0	99,2	63	100	0,27
	3	Pasa	6,0	99,3	63	111	0,25
	16	Pasa	6,0	98,9	62	83	0,27
30	1	Pasa	5,9	98,43	54	91	0,25
	3	Pasa	6,1	97,53	42	65	0,30
	16	Pasa	6,0	90,63	19	28	0,54

Datos de estabilidad para 80 mg/ml de E25 en formulación de Histidina y Trehalosa

Temp (°C)	Tiempo (meses)	Visual	pH	SEC ^a % de monómero	HIC ^b % de principal	Potencia ^c	Turbidez ^d
5	0	Pasa	5,7	99,1	64	100	0,20
	1	Pasa	5,8	98,7	63	92	0,20
	3	Pasa	5,7	98,8	63	124	0,20
	6	Pasa	5,7	99,1	63	97	0,21
	14	Pasa	5,7	99,0	62	83	0,21
	24	Pasa	5,7	98,8	62	84	0,20
30	1	Pasa	5,8	98,7	55	77	0,20
	3	Pasa	5,7	97,4	41	76	0,29
	6	Pasa	5,8	95,5	31	48	0,38
	14	Pasa	5,7	93,1	22	30	0,48

a. Cromatografía de exclusión por tamaño para medir los agregados y fragmento solubles

b. Cromatografía de interacción hidrófoba de E25 digerido con papaína

c. Ensayo de inhibición de la unión del receptor de IgE

d. DO promedio (340-360 nm)

Estudio de agitación

	PARA			Agitación después de 3 días		
Formulación	Visual	SEC (% de monómero)	Turbidez	Visual	SEC (% de monómero)	Turbidez
1	Pasa	99,5	0,18	Pasa	99,3	0,18
2	Pasa	99,0	0,19		99,4	0,19

Estudio de congelación-descongelación:

Formulación	Para			Después del 1º Ciclo			Después del 3º Ciclo		
	Visual	SEC % de Monómero	Turbidez	Visual	SEC % de Monómero	Turbidez	Visual	SEC % de Monómero	Turbidez
1	Pasa	99,5	0,18	Pasa	99,3	0,17	Pasa	99,4	0,17
2	Pasa	99,0	0,19	Pasa	99,2	0,19	Pasa	99,2	0,18
Formulación 1: 156 mg/ml de E25, ArgCl 200 mM, His 23 mM, T20 al 0,02 %									
Formulación 2: 150 mg/ml de E25, ArgCl 182 mM, His 20 mM, T20 al 0,02 %									

Ejemplo 3

Se prepararon muestras de formulaciones líquidas de anticuerpo monoclonal dirigido contra IgE (E26) en tampones 20 mM y se almacenaron a continuación a 30°C y 40°C. Se determinó la estabilidad de E26 mediante cromatografía y medidas de actividad. Se usó la cromatografía de exclusión por tamaño para determinar los agregados solubles, y se usó la cromatografía de interacción hidrófoba de la muestra digerida con pepsina para medir la isomerización. Se vigiló la actividad de la muestra usando un ensayo de unión al receptor de IgE. Según se muestra en la figura 1, 2 y 3 la degradación de E26 es muy dependiente del pH de los tampones. El E26 parece ser el más estable alrededor de pH 6,0.

Ejemplo 4

La formación de partículas es un desafío principal para preparar la formulación líquida a elevada concentración debido a que ésta aumenta normalmente con el incremento de la concentración de proteína en condiciones de estrés. La Figura 4 muestra el resultado del estudio de agitación de una formulación líquida concentrada de E26. Se preparó la formulación en succinato 20 mM, trehalosa 192 mM a pH 6,0 con diferente concentración de polisorbato 20. Se vigiló la formación de partículas mediante medida de la turbidez. El resultado muestra que la turbidez de la disolución de E26 aumenta con el tiempo de agitación. La adición de al menos 0,01% de polisorbato es esencial para reducir la formación de partículas en condiciones de estrés. Se observaron también resultados similares para la formulación líquida concentrada de E25.

Ejemplo 5

La Figura 5 muestra la formulación líquida de 150 mg/ml de E25 preparada mediante reconstitución de E25 liofilizado. El incremento de la concentración salina inhibe la formación reversible de partículas y da como resultado la reducción de la lectura de la turbidez. Entre todas las sales ensayadas, la formulación con Arg-HCl parece tener la menor turbidez. Se ha observado también el efecto de la concentración salina sobre la disminución de la lectura de la turbidez para E25 preparado usando un procedimiento TFF.

Ejemplo 6

La formulación líquida de E25 en presencia de ArgHCl también parece tener mejor estabilidad que las otras formulaciones líquidas. La Figura 6 y 7 muestra el estudio de estabilidad de E25 a 150 mg/ml en las formulaciones líquidas que contienen ArgHCl, CaCl₂ y MgCl₂. Para la formulación líquida que contiene ArgHCl con o sin sacarosa, existe una pequeña diferencia en su estabilidad en términos de turbidez, isomerización y fragmentación. Las formulaciones líquidas que contienen ArgHCl son más estables que la formulación que contiene MgCl₂ y CaCl₂.

Ejemplo 7

La Figura 8 muestra los resultados de un estudio de estabilidad de la formulación líquida de E25 con formulaciones de acetato e histidina. La formulación con histidina tiene mayor pH que la formulación con acetato. Los resultados mostraron claramente que E25 en una formulación líquida de histidina, ArgHCl son más estables que en otras condiciones.

Ejemplo 8

La elevada concentración de E25 puede formar un gel sólido en presencia de algunos iones, tales como citrato, succinato y sulfato (Tabla I), particularmente a la temperatura de almacenamiento de 2-8°C. Usar arginina-HCl como excipiente permite formular E25 hasta más de 200 mg/ml si formación de gel o precipitado.

ES 2 349 779 T3

TABLA 1

Efecto de diversos excipientes sobre la gelación de E25 a 125 mg/ml, pH ~6,0

<i>Excipiente</i>	<i>Concentración de excipiente MM</i>	<i>Preparación</i>	<i>Turbidez a T0 (340-360 nm)</i>	<i>Concentración de anticuerpo mg/ml</i>	<i>Apariencia visual</i>
SWFI		Lio Recons	0,21	125	Transp.
NaCl	188	Lio Recons	0,25	125	Transp.
Succinato	94	Lio Recons	0,31	125	Gel
Succinato	19	Lio Recons	0,28	125	Gel
Citrato	188	Lio Recons	Pendiente	125	Gel
Citrato	19	Lio Recons	Pendiente	125	Gel
Na ₂ SO ₄	Pendiente	Lio Recons	Pendiente	125	Gel
Na ₂ SO ₄	Pendiente	Lio Recons	Pendiente	125	Opalesc.
Fosfato	Pendiente	Lio Recons	Pendiente	125	Opalesc.
Acetato	188	Lio Recons	Pendiente	125	Transp.
Acetato	94	Lio Recons	Pendiente	125	Transp.
Acetato	19	Lio Recons	Pendiente	125	Transp.
Histidina	94	Lio Recons	0,19	125	Transp.
Histidina	47	Lio Recons	0,24	125	Transp.
Arg-HCl	150	Lio Recons	0,25	137	Transp.
Arg-HCl	200	TFF	0,19	162	Transp.
Arg-SO ₄	150	Lio Recons	0,27	137	Gel
CaCl ₂	125	TFF	0,32	147	Transp.
MgCl ₂	125	TFF	0,48	147	Opalesc.

Ejemplo 9

Expresión de la proteína o del anticuerpo en E. coli

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de una proteína o anticuerpo deseados mediante la expresión recombinante en *E. coli*.

Se amplifica inicialmente la secuencia de ADN que codifica la proteína o el anticuerpo deseado usando cebadores de la PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener los sitios para el enzima de restricción que corresponden a los sitios para el enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se puede emplear una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar y col., Gene, 2: 95 (1977)) que contiene los genes de la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. Se digiere el vector con el enzima de restricción y se desfosforila. A continuación se ligan las secuencias amplificadas mediante la PCR en el vector. El vector incluirá preferiblemente las secuencias que codifican el gen de resistencia a un antibiótico, un promotor trp, una líder polihis (que incluye los seis primeros codones STII, la secuencia polihis, y el sitio de escisión de la enterocinasa), la región de codificación de la proteína o el anticuerpo deseado, el finalizador transcripcional lambda, y un gen argU. Adicionalmente, el vector puede incluir al menos porciones no insignificantes de las secciones 5' y 3' no traducidas de la secuencia natural del ácido nucleico que codifica la proteína o el anticuerpo deseado.

A continuación se usa la mezcla de ligadura para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada usando los procedimientos descritos en Sambrook y col., *más arriba*. Se identifican los transformantes por su capacidad para crecer en placas LB y a continuación se seleccionan las colonias resistentes. Se puede aislar el ADN plásmido y confirmarse mediante el análisis de restricción y la secuenciación del ADN.

Se pueden hacer crecer los clones seleccionados durante la noche en medio de cultivo líquido tal como caldo LB suplementado con antibióticos. Se puede usar posteriormente el cultivo desarrollado durante la noche para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación se hacen crecer las células a una densidad óptica deseada, durante la cual se activa el promotor de la expresión.

Tras cultivar las células durante algunas horas más, se pueden cosechar las células mediante centrifugación. Se puede solubilizar el aglomerado celular obtenido mediante la centrifugación usando diversos agentes conocidos en la técnica, y a continuación puede purificarse la proteína o el anticuerpo solubilizado deseado usando una columna quelante de metales en condiciones que permitan una estrecha unión de la proteína o anticuerpo solubilizado.

Se puede expresar la proteína o el anticuerpo deseado en *E. coli* en una forma etiquetada con poli-His, usando el siguiente procedimiento. Se amplifica inicialmente el ADN que codifica la proteína o el anticuerpo deseado usando cebadores de la PCR seleccionados. Los cebadores contendrán los sitios para el enzima de restricción que corresponden a los sitios para el enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de la traducción eficaz y fiable, purificación rápida en una columna de quelación de metales, y eliminación proteolítica con enteroquinasa. A continuación se ligan las secuencias etiquetadas con polihis, amplificadas mediante la PCR en un vector de expresión, que se usa para transformar un hospedador de *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) Ion galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Se hacen crecer en primer lugar los transformantes en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta que se alcanza una D.O. 600 de 3.5. A continuación se diluyen los cultivos 50-100 veces en medios CRAP (preparados mezclando 3,57 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,71 g de citrato de sodio•2H₂O, 1,07 g KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, 0,55% (p/v) glucosa y MgSO₄ 7 mM) y se hacen crecer durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Se retiran las muestras para verificar la expresión mediante análisis SDS-PAGE, y se centrifuga el volumen del cultivo para aglomerar las células. Las células aglomeradas se congelan hasta purificación y replegado.

Se volvió a suspender pasta de *E. coli* de fermentaciones de entre 0,5 a 1 l (aglomerados de 6-10 g) en 10 volúmenes (p/v) en guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampón a pH 8. Se añadieron bisulfito de sodio sólido y tetratiónato de sodio para preparar concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y se agitó la disolución durante la noche a 4°C. Esta etapa dio como resultado una proteína desnaturalizada con todos los restos de cisteína bloqueados mediante sulfitolización. Se centrifugó la disolución a 40.000 rpm en una Ultracentrífuga Beckman durante 30 min. Se diluyó el sobrenadante con 3-5 volúmenes de tampón de columna quelante de metales (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) a se filtró a través de filtros de 0,22 micrómetros para clarificar. Se introdujo el extracto clarificado en una columna quelante de metales Ni-NTA de Quiagen de 5 ml equilibrada en el tampón de columna quelante de metales. Se lavó la columna con más tampón que contenía imidazol 50 mM (Calbiochem, calidad Utrol), pH 7,4. Se eluyó la proteína con tampón que contenía imidazol 250 mM. Se combinaron las fracciones que contenían la proteína deseada y se almacenaron a 4°C. Se estimó la concentración de la proteína por su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción calculado basándose en su secuencia de aminoácidos.

Se replegaron las proteínas diluyendo la muestra lentamente en tampón de replegado preparado recientemente constituido por: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Se escogieron los volúmenes de replegado de tal manera que la concentración final de proteína está entre 50 y 100 microgramos/ml. Se agitó la disolución de replegado suavemente a 4°C durante 12-36 horas. Se detuvo rápidamente la reacción de replegado mediante la adición de TFA hasta una concentración final de 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de la purificación adicional de la proteína, se filtró la disolución a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se añadió acetonitrilo hasta una concentración final de 2-10%. Se cromatografió la proteína replegada en una columna en fase inversa Poros R1/H usando un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo entre 10 y 80%. Se analizaron alícuotas de las fracciones con absorbancia A280 en geles de SDS poliacrilamida y se combinaron las fracciones que contenían proteína replegada homogénea. Generalmente, las especies replegadas apropiadamente de la mayor parte de las proteínas se eluyeron a las concentraciones más bajas de acetonitrilo ya que aquellas especies son las más compactas con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina en fase inversa. Las especies agregadas se eluyeron usualmente a concentraciones mayores de acetonitrilo. Adicionalmente a la resolución de las formas incorrectamente plegadas de las proteínas de la forma deseada, la etapa en fase inversa elimina también la endotoxina de las muestras.

Se combinaron las fracciones que contenían la proteína o el anticuerpo plegado deseado y se eliminó el acetonitrilo usando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la disolución. Se formularon las proteínas en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro de sodio 0,14 M y manitol al 4% mediante diálisis o mediante filtración en gel usando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de la formulación y se filtraron estériles.

Ejemplo 10

Expresión de la proteína o del anticuerpo en células de mamíferos

- 5 Este ejemplo ilustra la preparación de formas potencialmente glicosiladas de la proteína o el anticuerpo deseado mediante expresión recombinante en células de mamíferos.

Se empleó el vector, pRK5 (véase documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989) como vector de expresión. Opcionalmente, se ligó el ADN que codificaba la proteína o el anticuerpo deseado en pRK5 con enzimas de restricción seleccionados para permitir la inserción de dicho ADN usando procedimientos de ligadura tales como los descritos en Sambrook y col., *más arriba*.

En una realización, las células hospedadoras seleccionadas pueden ser células 293. Se hicieron crecer células 293 (ATCC CCL 1573) hasta confluencia en placas de cultivo de tejido en medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutrientes y/o antibióticos. Se mezclaron aproximadamente 10 μg si el ADN codificaba la proteína o el anticuerpo deseado ligado en pRK5 con aproximadamente 1 μg de ADN que codificaba el ARN del gen VA [Thimmappaya y col., Cell, 31: 543 (1982)] y se disolvieron en 500 μl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl_2 0,227 M. Se añadieron a esta mezcla, gota a gota, 500 μl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO_4 1,5 mM, y se dejó formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. Se suspendió el precipitado y se añadió a las células 293 y se permitió sedimentar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. Se eliminó mediante aspiración el medio de cultivo y se añadieron 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación se lavaron las células 293 con medio exento de suero, se añadió medio reciente y se incubaron las células durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, se retiró el medio de cultivo y se substituyó con medio de cultivo (solo) o medio de cultivo conteniendo 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -cisteína y 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recogió el medio acondicionado, se concentró en un filtro roscado, y se introdujo en un gel SDS al 15%. Se puede secar el gel procesado y exponerse a una película durante un periodo de tiempo seleccionado para desvelar la presencia de la proteína o el anticuerpo deseado. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio exento de suero) y se ensayó el medio en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, se puede introducir de manera transitoria la proteína o el anticuerpo deseado en células 293 usando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Sompanyrac y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 7575 (1981). Se hicieron crecer células 293 hasta densidad máxima en un matraz de agitación giratoria y se añadieron 700 μg de ADN que codificaba la proteína o el anticuerpo deseado ligado en pRK5. Se concentraron las células en primer lugar procedentes del matraz de agitación giratoria mediante centrifugación y se lavaron con PBS. Se incubó el precipitado de ADN-dextrano en el aglomerado celular durante cuatro horas. Se trataron las células con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavaron con medio de cultivo de tejido, y de reintrodujeron en el matraz de agitación giratoria que contenía el medio de cultivo de tejido, 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina bovina y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina bovina. Tras aproximadamente cuatro días, se centrifugó el medio acondicionado y se filtró para eliminar las células y los desechos. A continuación se puede concentrar la muestra que contiene la proteína o el anticuerpo expresado y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, se puede expresar la proteína o el anticuerpo deseado en células CHO. Se puede transfectar el ADN que codifica la proteína o el anticuerpo deseado ligado en pRK5 en células CHO usando reactivos conocidos tales como CaPO_4 o DEAE-dextrano. Según se ha descrito anteriormente, se pueden incubar los cultivos celulares, y substituirse el medio con medio de cultivo (solo) o medio que contenga una radiomarca tal como ^{35}S -metionina. Tras determinar la presencia de la proteína o el anticuerpo deseado, se puede substituir el medio de cultivo con medio exento de suero. Preferiblemente, se incuban los cultivos durante aproximadamente 6 días, y se cosecha el medio acondicionado. A continuación se puede concentrar el medio que contiene la proteína o el anticuerpo expresado y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

Se pueden expresar también en células CHO hospedadoras las variantes etiquetadas con epítomos de la proteína o el anticuerpo deseado. Se puede subclonar el ADN que codifica la proteína o el anticuerpo deseado ligado en pRK5 en el vector pRK55. El subclon inserto puede experimentar la PCR para fusionarse en marco con una etiqueta de epítopo seleccionada tal como una etiqueta poli-his en un vector de expresión de Baculovirus. A continuación se puede subclonar el ADN etiquetado con poli-his que codifica la proteína o el anticuerpo deseado inserto en un vector de impulsión de SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para la selección de clones estables. Finalmente, se pueden transfectar las células CHO (según se ha descrito anteriormente) con el vector de impulsión de SV40. Se puede llevar a cabo el marcado, según se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. A continuación se puede concentrar el medio de cultivo que contiene la proteína o el anticuerpo deseado expresado etiquetado con poli-His y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad quelada con Ni^{2+} .

Se puede expresar también la proteína o el anticuerpo deseado en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

Se llevó a cabo la expresión estable en células CHO usando el siguiente procedimiento. Se expresaron las proteínas como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias de codificación de las formas solubles (*por ejemplo*, las regiones extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionaron a una secuencia de la región constante de IgG1 que contenía la bisagra, las regiones CH2 y CH2 y/o es una forma etiquetada con poli-His.

Tras la amplificación mediante la PCR, se subclonaron los ADN respectivos en un vector de expresión de CHO usando las técnicas normalizadas según se describe en Ausubel y col., *Current Protocols of Molecular Biology*, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). Se construyeron los vectores de expresión de CHO para tener sitios 5' y 3' de restricción compatibles con el ADN de interés para permitir el transporte conveniente de los ADNc. La expresión del vector usado en células CHO se según se describe en Lucas y col., *Nucl. Acids Res.* 24: 9 (1774-1779 (1996), y usa el promotor/potenciador temprano del SV40 para impulsar la expresión del ADNc de interés y de la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

Se introdujeron doce microgramos del ADN plásmido deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección Superfect® (Quiagen), Dosper® o Eugene® (Boehringer Mannheim) comercialmente disponibles. Se hicieron crecer las células según se describe en Lucas y col., *más arriba*. Se congelaron aproximadamente 3×10^{-7} células en una ampolla para crecimiento y producción adicional según se describe a continuación.

Se descongelaron las ampollas que contenían el ADN plásmido mediante colocación en baño de agua y se mezclaron mediante vortización. Se pipetearon los contenidos en un tubo de centrifuga que contenía 10 ml de medios y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se volvieron a suspender las células en 10 ml de medios selectivos (0,2 μ m de PS20 filtrado con 0,2 μ m de suero bovino fetal diafiltrado al 5%). A continuación se distribuyeron en alícuotas en un agitador giratorio de 100 ml que contenía 90 ml de medios selectivos. Después de 1-2 días, se transfirieron las células en un agitador giratorio de 250 ml relleno con 150 ml de medio de crecimiento selectivo y se incubaron a 37°C. Después de otros 2-3 días, se sembraron agitadores giratorios de 250 ml, 500 ml y 2000 ml con 3×10^5 células/ml. Se intercambiaron los medios celulares con medios recientes mediante centrifugación y resuspensión en un medio de producción. Aunque se puede emplear cualquier medio de CHO adecuado, se puede usar actualmente un medio de producción descrito en la Patente de los Estados Unidos N° 5.122,469, otorgada el 16 de junio de 1992. Se sembró un agitador giratorio de 3l de producción a $1,2 \times 10^6$ células/ml. En el día 0 se determinó el número de células y el pH. En el día 1, se muestreó el agitador giratorio y se comenzó el burbujeo con aire filtrado. En el día 2, se muestreó el agitador giratorio, la temperatura se desplazó a 33°C, y se tomaron 30 ml de 500 g/l de glucosa y 0,6 ml de antiespumante al 10% (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35%, Dow Corning 365 Emulsión de Calidad Médica). Durante la producción, se ajustó el pH según fue necesario para mantener éste alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad disminuyó por debajo del 70%, se cosechó el cultivo celular mediante centrifugación y se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m. Se almacenó el filtrado a 4°C o se introdujo inmediatamente en columnas para la purificación.

Para las construcciones etiquetadas con poli-His, se purificaron las proteínas usando una columna Ni-NTA (Quiagen). Antes de la purificación, se añadió imidazol a los medios acondicionados hasta una concentración de 5 mM. Se bombearon los medios condicionado en una columna Ni-NTA de 6 ml equilibrada a 4°C, en Hepes 20 mM, pH 7,4, conteniendo el tampón NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un caudal de 4-5 ml/min. Tras la introducción, se lavó la columna con un tampón de equilibrio adicional y se eluyó la proteína con tampón de equilibrio que contenía imidazol 0,25 M. La proteína muy purificada se desaló posteriormente en un tampón de almacenamiento que contenía Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se almacenó a -80°C.

Se purificaron las construcciones de inmunoadhesina (que contenían Fc) a partir de los medios acondicionados como sigue. Se bombeó el medio acondicionado en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8. Tras la introducción, se lavó la columna extensivamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. Se neutralizó inmediatamente la proteína eluida recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contenían 275 μ l de tampón Tris 1 M, pH 9. Se desaló posteriormente la proteína muy purificada en tampón de almacenamiento según se ha descrito anteriormente por las proteínas etiquetadas con poli-His. Se evaluó la homogeneidad con geles de SDS poliacrilamida y con la secuenciación de aminoácidos N terminales mediante la degradación de Edman.

Ejemplo 11

Expresión de proteínas o anticuerpos en levaduras

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de la proteína o el anticuerpo deseado en levaduras.

En primer lugar, se construyeron vectores de expresión para la producción o secreción intracelular de la proteína o el anticuerpo deseado a partir del promotor ADH2/GAPDH. Se insertó el ADN que codificaba la proteína o el anticuerpo deseado y el promotor en los sitios adecuados del enzima de restricción en el plásmido seleccionado con el fin de dirigir la expresión intracelular. Para la secreción, se puede clonar el ADN que codifica la proteína o el anticuerpo deseado en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal

ES 2 349 779 T3

natural u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, un factor alfa de levadura o secuencia señal secretora/líder de la invertasa, y las secuencias enlazantes (si es necesario) para la expresión de la proteína o del anticuerpo deseado.

A continuación se pueden transformar las células de levaduras, tales como las de la cepa AB 110 de levadura, con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Se pueden analizar los sobrenadantes de las levaduras transformadas mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante SDS-PAGE, seguida por tinción de los geles con tinción de Azul de Coomassie.

Se puede aislar posteriormente la proteína o el anticuerpo recombinante y purificarse eliminando las células de levadura procedentes del medio de fermentación mediante centrifugación y a continuación concentrando el medio usando filtros de cartucho seleccionados. Se puede purificar adicionalmente el concentrado que contiene la proteína o el anticuerpo recombinante usando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

Ejemplo 12

Expresión de la proteína o el anticuerpo en células de insecto infectadas con baculovirus

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de la proteína o el anticuerpo deseado en células de insecto infectadas con Baculovirus.

Se fusionó en la dirección 5' la secuencia de codificación de la proteína o el anticuerpo deseado de una etiqueta de epítipo contenida en el interior de un vector de expresión de baculovirus. Dichas etiquetas de epítipo incluyen etiquetas poli-his y etiquetas de inmunoglobulina (regiones de tipo Fc de IgG). Se puede emplear una variedad de plásmidos, incluyendo los plásmidos derivados de plásmidos comercialmente disponibles tales como PVL1393 (Novagen). De manera breve, se amplificó mediante la PCR la secuencia que codificaba la porción de la proteína o el anticuerpo deseado, tal como la secuencia que codificaba la región extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular con los cebadores complementarios con las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios que flanquean el enzima de restricción (seleccionado). A continuación se digirió el producto con los enzimas de restricción seleccionado y se subclonó en el vector de expresión.

Se generó baculovirus recombinante transfectando simultáneamente el plásmido anterior y ADN vírico de BaculoGold™ (Pharmigen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando lipofectina (comercialmente disponible de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, se cosecharon los virus liberados y se usaron para las amplificaciones adicionales. Se llevaron a cabo la infección vírica y la expresión de la proteína según se describe por O'Reilley y col., *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

A continuación se purificó la proteína o el anticuerpo expresado etiquetado con poli-his, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad quelada con Ni²⁺. Se prepararon los extractos a partir de células Sf9 infectadas con virus recombinante según se describe por Rupert y col., *Nature*, 362: 175-179 (1993). Se lavaron células Sf9, se volvieron a suspender en tampón de sonicación (25 ml de Hepes, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; KCl 0,4 M), y se sonicaron dos veces durante 20 segundos en hielo. Se aclararon los sonicados mediante centrifugación, y se diluyó el sobrenadante 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm. Se preparó una columna de Ni²⁺-NTA agarosa (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen del lecho de 5 ml, se lavó con 265 ml de agua y se equilibró con 25 ml de tampón de carga. Se introdujo el extracto celular filtrado en la columna a 0,5 ml por minuto. Se lavó la columna hasta un valor inicial A₂₈₀ con tampón de carga, en el que en ese momento se inició la recogida de la fracción puntual. A continuación, se lavó la columna con tampón secundario de lavado (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 6,0, que eluye la proteína no específicamente unida. Tas alcanzar de nuevo el valor inicial A₂₈₀, se desarrolló la columna con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón secundario de lavado. Se recogieron fracciones de un ml y se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción de plata o transferencia Western con Ni²⁺-NTA conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Se combinaron las fracciones que contenían la proteína o el anticuerpo eluido etiquetado con His₁₀ y se dializaron frente al tampón de carga.

Alternativamente, se puede llevar a cabo la purificación de la proteína o el anticuerpo etiquetado con IgG (o etiquetado con Fc) usando técnicas de cromatografía conocidas, que incluyen, por ejemplo, cromatografía en columna de Proteína A o proteína G.

Ejemplo 13

Preparación de anticuerpos

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que se pueden unir específicamente a la proteína de interés del antígeno deseado.

Se conocen en la técnica las técnicas para producir anticuerpos monoclonales y se describen, por ejemplo, en Goding, *más arriba*. Los inmunógenos que se pueden emplear incluyen la proteína o el anticuerpo diana purificado deseado, las proteínas de condensación que contienen la proteína deseada o el antígeno diana, y las células que expresan dicha proteína o antígeno recombinante en la superficie de la célula. El técnico experto puede llevar a cabo la selección del inmunógeno sin experimentación innecesaria.

Se inmunizaron ratones, tal como Balb/c, con la proteína o el antígeno diana inmunógeno deseado emulsificado en adyuvante completo de Freund y se inyectó subcutánea o intraperitonealmente en una cantidad entre 1-100 microgramos. Alternativamente, se emulsificó el inmunógeno en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyectó en las almohadillas de las patas traseras. A continuación se estimularon los ratones inmunizados 10 a 12 días después con más inmunógeno emulsificado en el adyuvante seleccionado. A partir de entonces, durante algunas semanas, se pueden estimular también los ratones con inyecciones de inmunización adicionales. Se pueden obtener periódicamente muestras de suero obtenidas de los ratones mediante sangrado retroorbital para ensayar en pruebas ELISA a objeto de detectar los anticuerpos dirigidos a la proteína o antígeno deseado.

Después que se ha detectado el título del anticuerpo, se pueden inyectar los animales “positivos” por los anticuerpos con una inyección intravenosa final de la proteína o antígeno diana deseado. Tres a cuatro días después, se sacrificaron los ratones y se cosecharon las células de bazo. A continuación se fusionaron las células de bazo (usando polietilenglicol al 35%) con una línea celular seleccionada de mieloma de murino tal como P3X63AgU.1, disponible de la ATCC, N° CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden plaquear a continuación en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina, y timidina).

Las células de hibridoma se cribaron en un ELISA para la reactividad contra la proteína o el antígeno diana deseado. Esta comprendida dentro del conocimiento del técnico experto la determinación de las células de hibridoma “positivas” que segregan dichos anticuerpos monoclonales.

Se pueden inyectar intraperitonealmente las células de hibridoma positivas en ratones Balb/c singénicos para producir ascites que contienen dichos anticuerpos monoclonales. Alternativamente, se pueden hacer crecer células de hibridoma en matraces de cultivo de tejido o botellas de cultivo rotatorias. Se puede llevar a cabo la purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en los ascites usando la precipitación con sulfato de amonio, seguida por la cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, se puede emplear la cromatografía de afinidad basándose en la unión del anticuerpo a la proteína A o a la proteína G.

Ejemplo 14

Purificación de la proteína deseada usando anticuerpos específicos

Se puede purificar la proteína deseada tanto en forma natural como recombinante, mediante una variedad de técnicas normalizadas en la técnica de la purificación de proteínas. Por ejemplo, se pueden purificar formas de polipéptidos, polipéptidos maduros, o prepolipéptidos de la proteína deseada mediante cromatografía de inmuoafinidad usando anticuerpos específicos de la proteína deseada. En general, se construye la columna de inmuoafinidad acoplado covalentemente el anticuerpo que se une específicamente a la proteína deseada con una resina cromatográfica activada.

Se prepararon inmunoglobulinas policlonales a partir de inmunosueros tanto mediante precipitación con sulfato de amonio como mediante purificación en Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Igualmente, se prepararon anticuerpos monoclonales procedentes de fluido de ascites de ratón mediante precipitación con sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se unió covalentemente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). Se acopló el anticuerpo a la resina, se bloqueó la resina, y la resina derivada se lavó según las instrucciones del fabricante.

Se utilizó dicha columna de inmuoafinidad en la purificación de la proteína deseada preparando una fracción de células que expresaban ésta en forma soluble. Se derivó esta preparación mediante solubilización de las células completas de una fracción subcelular obtenida a través de centrifugación diferencial mediante la adición de detergente o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, se puede segregar proteína soluble conteniendo una secuencia señal en una cantidad útil en el medio en el que se hacen crecer las células.

Se pasó la preparación solubilizada que contenía la proteína deseada sobre la columna de inmuoafinidad, y se lavó la columna en condiciones que permitían la absorbancia preferente de la proteína deseada (*por ejemplo*, tampones con elevada fuerza iónica en presencia de detergente. A continuación, se eluyó la columna en condiciones que perturbaban la unión del anticuerpo con la proteína (*por ejemplo*, un tampón a pH bajo tal como aproximadamente pH 2-3, o una elevada concentración de un caótropro tal como urea o un ión tiocianato) y a continuación se recogió la proteína deseada.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- | | | |
|----|------------------------------|------------------------------|
| 10 | • WO 9704801 A [0006] | • US 5661016 A [0125] |
| | • WO 0230463 A [0007] | • US 5567610 A [0126] |
| | • US P6329509B [0012] | • US 5229275 A [0126] |
| 15 | • WO 9901556 A [0012] | • US 5869046 A [0128] |
| | • US 4816567 A [0026] [0027] | • WO 9316185 A [0128] |
| 20 | [0104][0113][0115][0119] | • US 5571894 A [0128] |
| | • US 5641870 A [0029] [0128] | • US 5587458 A [0128] |
| | • EP 404097 A [0034] | • WO 8101145 A [0129] |
| 25 | • WO 9311161 A [0034] | • WO 8807378 A [0129] |
| | • US 4275149 A [0036] | • US 4975278 A [0129] |
| | • US 5500362 A [0040] | • WO 9616673 A [0134] |
| 30 | • US 5821337 A [0040] | • US P5837234 A [0134] |
| | • US 5428130 A [0049] | • US P5821337 A [0134] |
| 35 | • WO 8905859 A [0081] | • WO 9308829 A [0135] |
| | • US 4399216 A [0081] | • WO 9404690 A [0137] |
| 40 | • DD 266710 [0082] | • WO 9627011 A [0138] |
| | • US 4946783 A [0082] | • US P5731168 A [0138] |
| | • EP 139383 A [0083] | • US P4676980 A [0145] |
| 45 | • US 4943529 A [0083] | • WO 9100360 A [0145] |
| | • EP 402226 A [0083] | • WO 92200373 A [0145] |
| | • EP 183070 A [0083] | • EP 0308936 A [0145] |
| 50 | • EP 244234 A [0083] | • US 4676980 A [0145] |
| | • EP 394538 A [0083] | • WO 9411026 A [0150] |
| 55 | • WO 9100357 A [0083] | • US P5208020 A [0151] |
| | • US 5010182 A [0085] | • US 5208020 A [0151] |
| | • EP 362179 A [0085] | • US 3896111 A [0151] |
| 60 | • WO 9013646 A [0085] | • US 4151042 A [0151] |
| | • EP 36776 A [0089] | • US 4485045 A [0159] |
| 65 | • EP 73657 A [0091] | • US 4544545 A [0159] |
| | • GB 2211504 A [0092] | • US 5013556 A [0159] [0189] |

ES 2 349 779 T3

- EP 117060 A [0095]
- EP 117058 A [0095]
- 5 • US 5591669 A [0123]
- WO 9717852 A [0123]
- US 5565332 A [0124]
- 10 • US 5573905 A [0124]
- US 5545807 A [0125]
- 15 • US 5545806 A [0125]
- 5 • US 5569825 A [0125]
- US 5625126 A [0125]
- 20 • US 5633425 A [0125]
- US 3773919 A [0186]
- WO 9703692 A [0186]
- WO 9640072 A [0186]
- WO 9607399 A [0186]
- US 5654010 A [0186]
- US 4925673 A [0189]
- US 4657760 A [0219]
- US 5206344 A [0219]
- US 5225212 A [0219]
- EP 307247 A [0253]
- US 5122469 A [0263]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- 25 • Basic and Clinical Immunology. *Appleton & Lange*, 1994, 71 [0022]
- **Kabat et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. Public Health Service, *National Institutes of Health*, 1991 [0024]
- 30 • **Kabat et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. *National Institute of Health*, 1991 [0025]
- **Chothia, C. et al.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0025]
- **Kohler et al.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0026] [0104]
- 35 • **Clackson et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0026] [0114] [0124]
- **Marks et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0026] [0114] [0124]
- 40 • **Morrison et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0027]
- **Zapata et al.** *Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0029]
- **Pluckthun.** The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. *Springer-Verlag*, 1994, vol. 113, 269-315 [0033]
- 45 • **Hollinger et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0034] [0141]
- **Jones et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0037] [0118] [0119]
- 50 • **Reichmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0037]
- **Presta.** *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0037]
- **Ravetch; Kinet.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-92 [0040]
- 55 • **Clynes et al.** *PNAS USA*, 1998, vol. 95, 652-656 [0040]
- **M. Daëron.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0041]
- 60 • **Ravetch; Kinet.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-92 [0041]
- **Capel et al.** *Immunometlzods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0041]
- **de Haas et al.** *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-41 [0041]
- 65 • **Guyer et al.** *J. Immunol.*, 1976, vol. 117, 587 [0041]

ES 2 349 779 T3

- **Kim et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 249 [0041]
- **Gazzano-Santoro et al.** *J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 202, 163 [0043]
- 5 • **Peptide and Protein Drug Delivery.** *Marcel Dekker, Inc.*, 1991, 247-301 [0050]
- **Jones, A.** *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1993, vol. 10, 29-90 [0050]
- **Stewart et al.** *Solid-Phase Peptide Synthesis.* W.H. Freeman Co, 1969 [0074]
- 10 • **Merrifield.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0074]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0076]
- 15 • **Dieffenbach et al.** *PCR Primer: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995 [0076]
- **Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach.** IRL Press, 1991 [0080]
- **Shaw et al.** *Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0081]
- 20 • **Graham; van der Eb.** *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0081]
- **Van Solingen et al.** *J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0081]
- 25 • **Hsiao et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1979, vol. 76, 3829 [0081]
- **Keown et al.** *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0081]
- **Mansour et al.** *Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0081]
- 30 • **Beach; Nurse.** *Nature*, 1981, vol. 290, 140 [0083]
- **Fleer et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0083]
- 35 • **Louvencourt et al.** *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154 (2), 737-42 [0083]
- **Van den Berg et al.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0083]
- **Sreekrishna et al.** *J. Basic Microbiol.*, 1988, vol. 28, 265-278 [0083]
- 40 • **Case et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 5259-5263 [0083]
- **Ballance et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 112, 284-289 [0083]
- 45 • **Tilburn et al.** *Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0083]
- **Yelton et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0083]
- **Kelly; Hynes.** *EMBOJ*, 1985, vol. 4, 475-479 [0083]
- 50 • **C. Anthony.** *The Biochemistry of Methylophs*, 1982, 269 [0083]
- **Graham et al.** *J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0083]
- 55 • **Urlaub; Chasin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0083]
- **Mather.** *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0083]
- **Urlaub et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0088]
- 60 • **Stinchcomb et al.** *Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0088]
- **Kingsman et al.** *Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0088]
- 65 • **Tschemper et al.** *Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0088]
- **Jones.** *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0088]

ES 2 349 779 T3

- **Chang et al.** *Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0089]
- **Goeddel et al.** *Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0089]
- 5 • **Goeddel.** *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0089]
- **deBoer et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0089]
- **Hitzeman et al.** *J. Biol. Chem*, 1980, vol. 255, 2073 [0090]
- 10 • **Hess et al.** *J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0090]
- **Holland.** *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0090]
- 15 • **Gething et al.** *Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0095]
- **Mantei et al.** *Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0095]
- **Thomas.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0096]
- 20 • **Deutscher.** *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 182 [0099]
- **Scopes.** *Protein Purification: Principles and Practice. Springer-Verlag*, 1982 [0099]
- 25 • **Goding.** *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press*, 1986, 59-103 [0105]
- **Goding.** *Monoclonal Aratibodies: Principles and Practice. Academic Press*, 1986, 59-103 [0106]
- **Kozbor.** *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0108]
- 30 • **Brodeur et al.** *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc.*, 1987, 51-63 [0108]
- **Munson et al.** *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0110]
- 35 • **Skerra et al.** *Curr. Opinion in Immunol.*, 1991, vol. 5, 256-262 [0113]
- **Plückthun.** *Immunol. Revs.*, 1991, vol. 130, 151-188 [0113]
- 40 • **McCafferty et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0114]
- **Marks et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 10, 779-783 [0114] [0125]
- **Waterhouse et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1991, vol. 21, 2265-2266 [0114]
- 45 • **Morrison et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0115]
- **Riechmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0118]
- 50 • **Presta.** *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1991, vol. 2, 593-596 [0118]
- **Riechmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0119]
- **Verhoeven et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0119]
- 55 • **Sims et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 151, 2296 [0120]
- **Chothia et al.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0120]
- 60 • **Carter et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 89, 4285 [0120]
- **Presta et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 151, 2623 [0120]
- **Jakobovits et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 90, 2551 [0123]
- 65 • **Jakobovits et al.** *Nature*, 1991, vol. 362, 255-258 [0123]
- **Bruggermann et al.** *Year in Immuno.*, 1991, vol. 7, 33 [0123]

- **McCafferty** *et al.* *Nature*, 1990, vol. 348, 552-553[0124]
- **Hoogenboom; Winter.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0124]
- 5 • **Johnson, Kevin S.; Chiswell, David J.** *Curr. Opin Struct. Biol.*, 1991, vol. 3, 564-571 [0124]
- **Griffith** *et al.* *EMBOJ.*, 1991, vol. 12, 725-734 [0124]
- **Cole** *et al.* *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss*, 1985, 77 [0125]
- 10 • **Boerner** *et al.* *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0125]
- **Lonberg** *et al.* *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0125]
- 15 • **Morrison.** *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0125]
- **Fishwild** *et al.* *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0125]
- **Neuberger.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0125]
- 20 • **Lonberg; Huszar.** *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0125]
- **Morimoto** *et al.* *J Biochem Biophys. Method.*, 1991, vol. 24, 107-117 [0128]
- 25 • **Brennan** *et al.* *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0128] [0139]
- **Carter** *et al.* *Bio/Technology*, 1991, vol. 10, 163-167 [0128]
- **Massey.** *Nature*, 1987, vol. 328, 457-458 [0131]
- 30 • **Neuberger** *et al.* *Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0132]
- **Millstein** *et al.* *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0135]
- 35 • **Traunecker** *et al.* *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0135]
- **Suresh** *et al.* *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0137]
- **Shalaby** *et al.* *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 175, 217-225 [0140]
- 40 • **Kostelny** *et al.* *J. Immunol.*, 1991, vol. 148 (5), 1547-1553 [0141]
- **Gruber** *et al.* *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0141]
- 45 • **Tutt** *et al.* *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0142]
- **Caron** *et al.* *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 176, 1191-1195 [0146]
- **Shopes.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 148, 2918-2922 [0146]
- 50 • **Wolff** *et al.* *Cancer Research*, 1991, vol. 53, 2560-2565 [0146]
- **Stevenson** *et al.* *Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0146]
- 55 • **Vitetta** *et al.* *Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0150]
- **Chari** *et al.* *Cancer Res.*, 1991, vol. 52, 127-131 [0150] [0151]
- **Hinman** *et al.* *Cancer Res.*, 1991, vol. 53, 3336-3342 [0152]
- 60 • **Lode** *et al.* *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, 2925-2928 [0152]
- **Fraker** *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, vol. 80, 49-57 [0155]
- 65 • **Chatal.** *Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy. CRC Press*, 1989 [0155]
- **Epstein** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0159]

ES 2 349 779 T3

- **Hwang** *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0159]
- **Martin** *et al. J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0160]
- 5 • **Gabizon** *et al. J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0160]
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy. *Philadelphia College of Pharmacy and Science*, 2000 [0161]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 1980 [0167]
- 10 • *Remington's Pharmaceutical Sciences*. *Mack Publishing Co*, 1990 [0174]
- **Marasco** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 90, 7889-7893 [0175]
- 15 • *Remington's Pharmaceutical Sciences* [0185]
- **Johnson** *et al. Nat. Med.*, 1996, vol. 2, 795-799 [0186]
- **Yasuda** *et al. Biomed. Ther.*, 1991, vol. 27, 1221-1223 [0186]
- 20 • **Hora** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 755-758 [0186]
- Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems. **Cleland**. Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. *Plenum Press*, 1995, 439-462 [0186]
- 25 • Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer. **Lewis**. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. *Marcel Dekker*, 1990, 1-41 [0187]
- The Atopic Diseases. A.I. Terr *et al. Medical Immunology*. 1997 [0200]
- 30 • The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics. **Mordenti, J.; Chappell, W. et al.** Toxicokinetics and New Drug Development. *Pergamon Press*, 1989, 42-46 [0218]
- **Bolivar** *et al. Gene*, 1977, vol. 2, 95 [0244]
- 35 • **Thimmappaya** *et al. Cell*, 1982, vol. 31, 543 [0254]
- **Somparyrac** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 12, 7575 [0256]
- 40 • **Ausubel** *et al. Current Protocols of Molecular Biology*. *John Wiley and Sons*, 1997 [0261]
- **Lucas** *et al. Nucl. Acids Res.*, 1996, vol. 24 (9), 1774-1779 [0261]
- **O'Reilley** *et al. Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*. *Oxford University Press*, 1994 [0272]
- 45 • **Rupert** *et al. Nature*, 1991, vol. 362, 175-179 [0273]

REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida estable de turbidez baja que comprende (a) un anticuerpo dirigido contra IgE en una cantidad de aproximadamente 150 a 260 mg/ml, en la que el anticuerpo dirigido contra IgE comprende la secuencia de aminoácidos identificada como E25 en la Figura 10A y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos identificada como E25 en la figura 10B (b) arginina-HCl en una cantidad de 100 a 200 mM, (c) histidina en una cantidad de 10 a 100 mM, (d) polisorbato en una cantidad de 0,01 a 0,1%, en la que la formulación tiene además un pH que varía entre 5,5 y 7,0, una viscosidad cinemática de aproximadamente 50 cs o menos y una osmolaridad que varía entre 200 mOsm/kg y 450 mOsm/kg.
2. La formulación de la reivindicación 1, en la que la concentración de arginina-HCl varía entre 150 mM y 200 mM.
3. La formulación de la reivindicación 1, en la que la concentración de arginina-HCl varía entre 180 mM y 200 mM.
4. La formulación de la reivindicación 1, en la que la concentración de arginina-HCl es de 200 mM.
5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que
 - (a) la concentración del anticuerpo varía entre 180 mg/ml y 260 mg/ml; o
 - (b) la concentración del anticuerpo varía entre 200 mg/ml y 260 mg/ml.
6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la concentración del anticuerpo es aproximadamente de 150 mg/ml.
7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la osmolaridad varía entre 250 mOsm/kg y 350 mOsm/kg.
8. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el anticuerpo dirigido contra IgE comprende dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.
9. Una formulación líquida estable de turbidez baja que comprende (a) un anticuerpo dirigido contra IgE en una cantidad de aproximadamente 150 mg/ml, en la que el anticuerpo dirigido contra IgE comprende dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas, comprendiendo cada cadena ligera la secuencia de aminoácidos identificada como E25 en la figura 10A y comprendiendo cada cadena pesada la secuencia de aminoácidos identificada como E25 en la figura 10B (b) arginina-HCl en una cantidad de 200 mM, (c) histidina en una cantidad de 20 mM, (d) polisorbato en una cantidad de 0,01 a 0,1% en la que la formulación tiene además un pH de 6,0.
10. La formulación de la reivindicación 9, en la que el polisorbato está en una cantidad de 0,02%.
11. Un artículo de fabricación que comprende un envase que encierra la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
12. El artículo de fabricación de la reivindicación 11, en el que el envase es una jeringuilla.
13. El artículo de fabricación de la reivindicación 12, en el que la jeringuilla está contenida además en el interior de un dispositivo de inyección.
14. El artículo de fabricación de la reivindicación 13, en el que el dispositivo de inyección es un autoinyector.
15. Uso de una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por IgE.
16. Una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en un procedimiento para el tratamiento de un trastorno mediado por IgE.
17. El uso de la reivindicación 15 o de la formulación para uso según la reivindicación 16, en la que el trastorno mediado por IgE se selecciona entre el grupo constituido por rinitis alérgica, asma, asma alérgica, asma no alérgica, dermatitis atópica y gastroenteropatía.

18. El uso de la reivindicación 15 o de la formulación para uso según la reivindicación 16, en el que el trastorno mediado por IgE es rinitis alérgica, asma alérgica, o dermatitis atópica.

5 19. El uso de la reivindicación 15 o de la formulación para uso según la reivindicación 16, en el que el trastorno mediado por IgE se selecciona entre el grupo constituido por hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasíticas, cistitis intersticial, síndrome de hiper-IgE, ataxia telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, alinfoflasia tímica, mieloma de IgE y reacción de hospedador frente a injerto.

10 20. El uso de la reivindicación 15 o de la formulación para uso según la reivindicación 16, en el que el trastorno mediado por IgE es hipersensibilidad.

21. El uso o la formulación para uso según la reivindicación 20, en el que el trastorno de hipersensibilidad se selecciona entre el grupo constituido por anafilaxis, urticaria y alergia alimentaria.

15 22. El uso o la formulación para uso según la reivindicación 21, en el que el trastorno de hipersensibilidad es alergia alimentaria.

20 23. El uso o la formulación para uso según la reivindicación 22, en el que la alergia alimentaria es el resultado de la exposición a una legumbre.

24. El uso o la formulación para uso según la reivindicación 23, en el que la legumbre es un cacahuete.

25 25. El uso de la reivindicación 15 o de la formulación para uso según la reivindicación 16, en el que la formulación está en combinación con una antihistamina, un broncodilatador, un glucocorticoide o un NSAID.

26. El uso de la reivindicación 15 o de la formulación para uso según la reivindicación 16, en el que el medicamento o formulación es para la administración en combinación con la administración de una antihistamina, un broncodilatador, un glucocorticoide o un NSAID.

30 27. El uso de la reivindicación 15 o de la formulación para uso según la reivindicación 16, en el que el medicamento o formulación es para la administración en combinación con la administración de desensibilización alérgica.

35

40

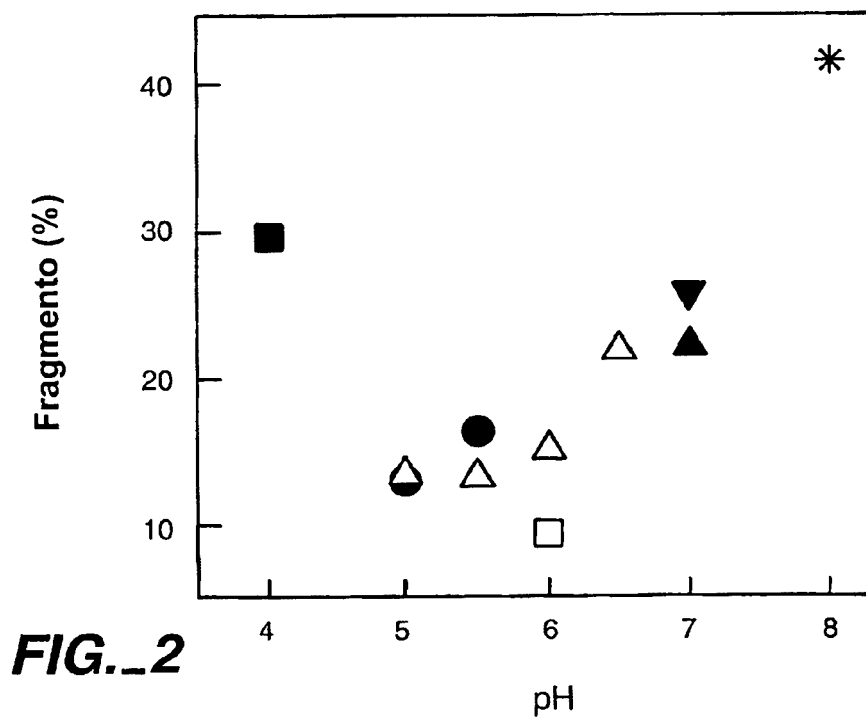
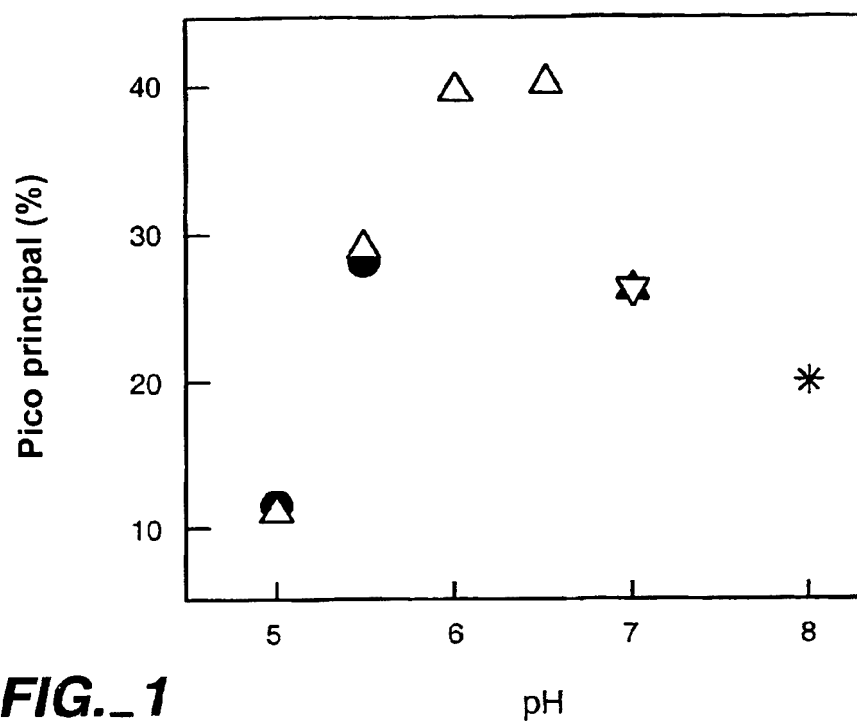
45

50

55

60

65



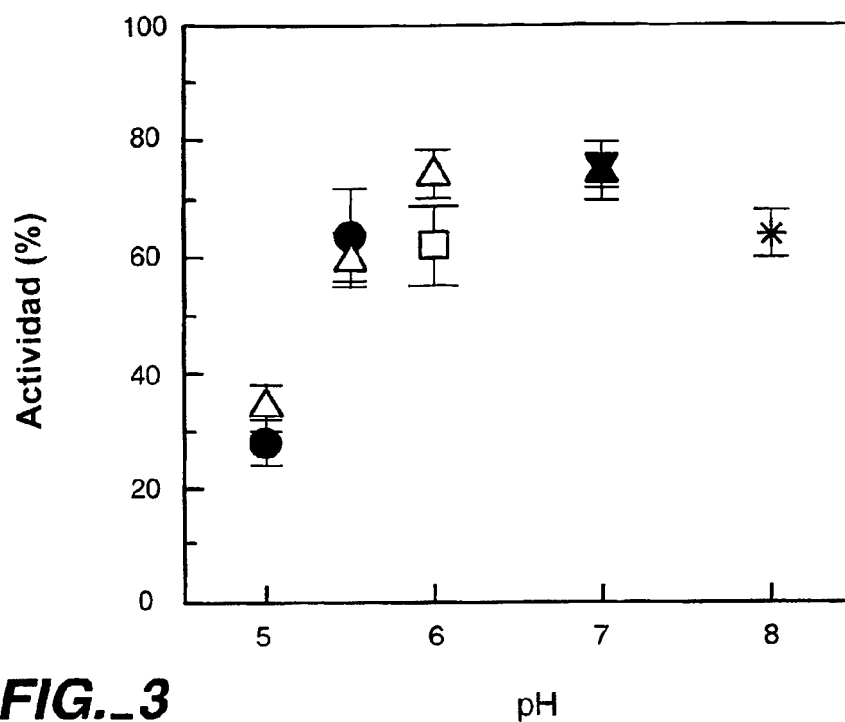
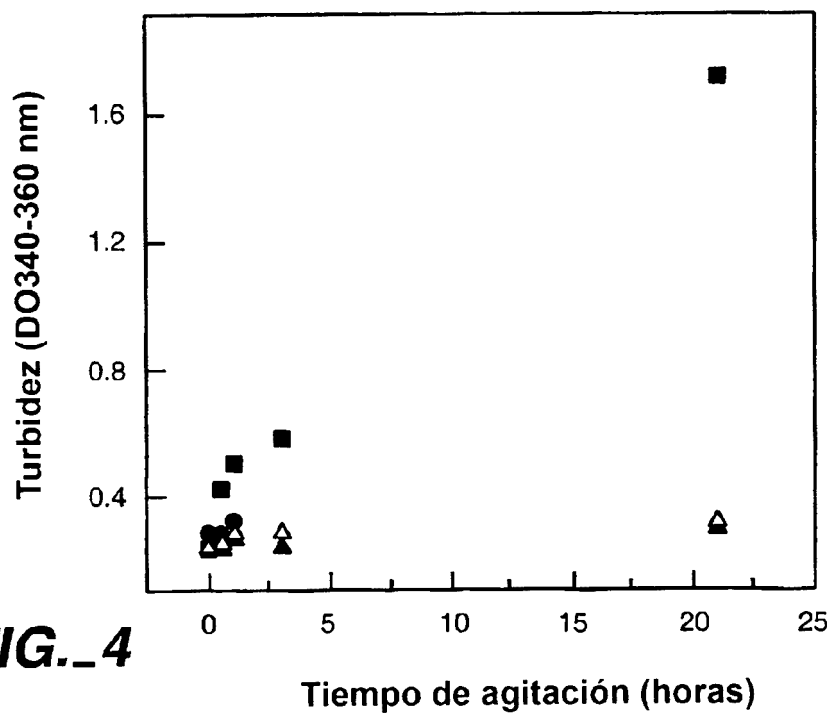
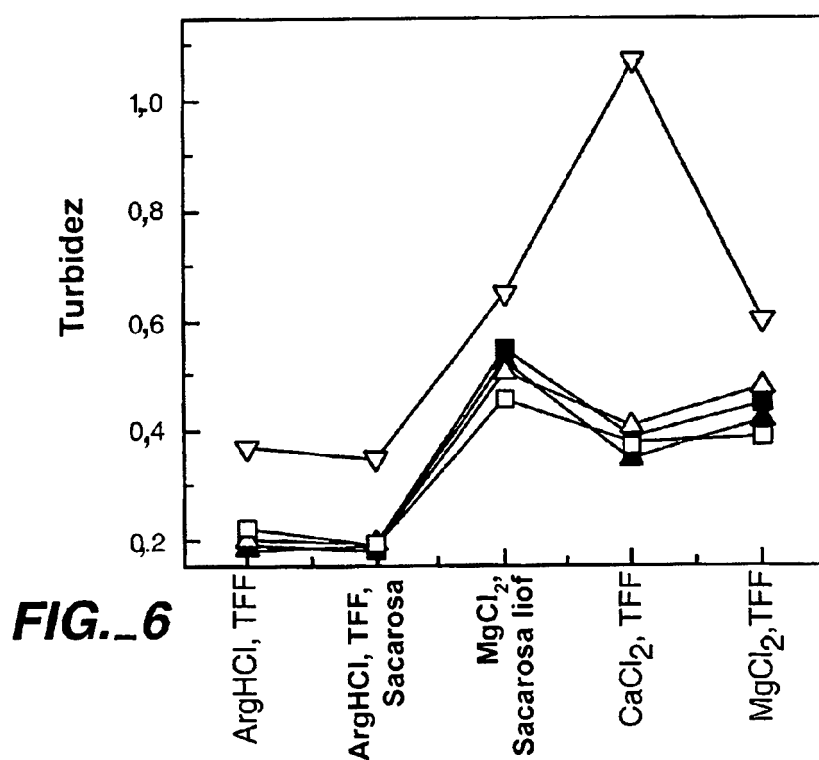
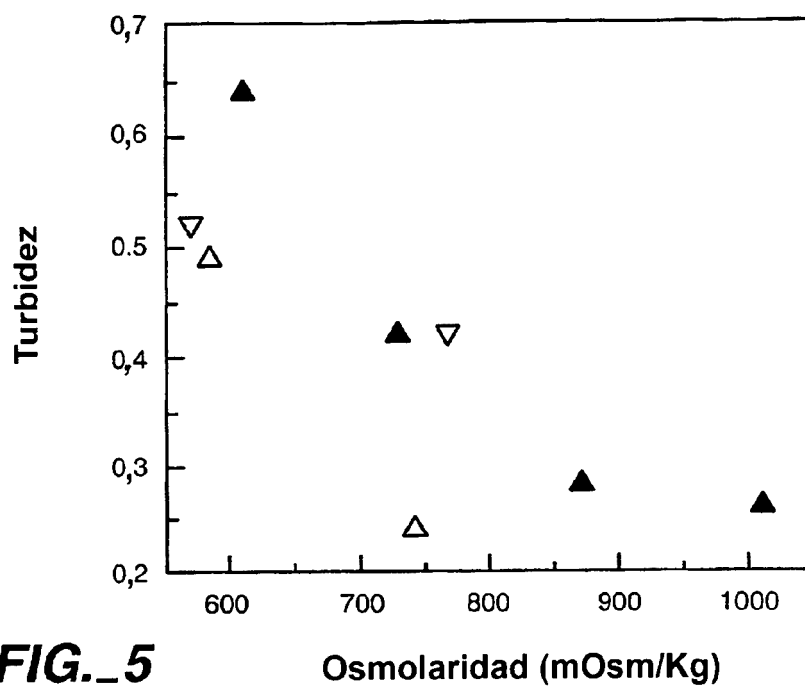
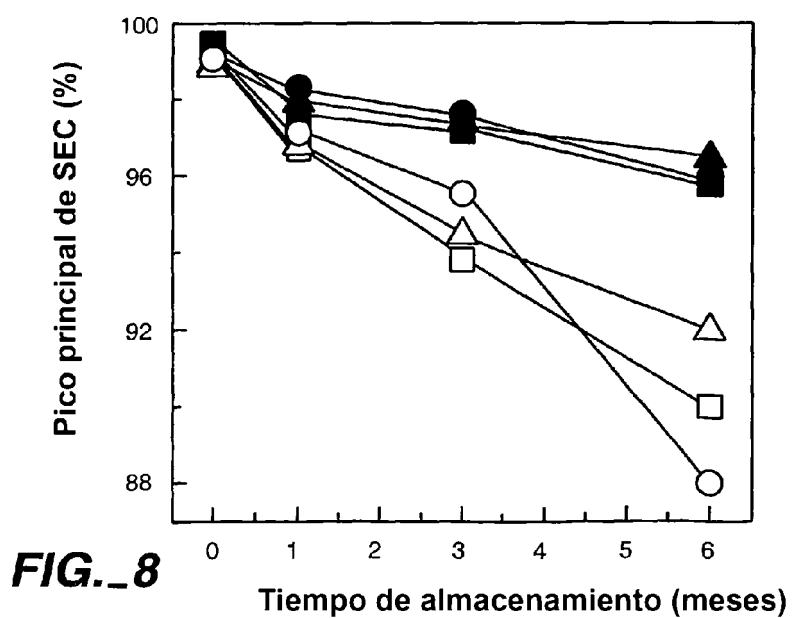
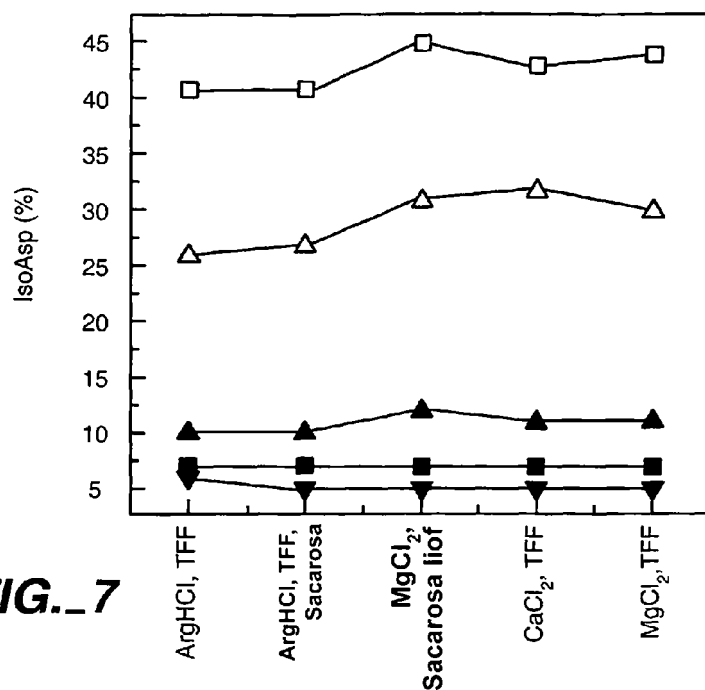


FIG._4







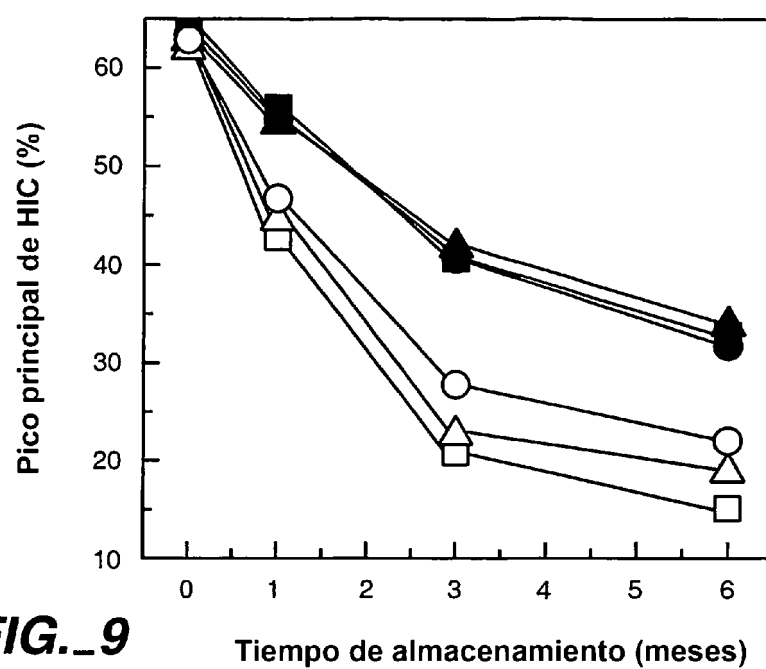


FIG._9

	10	20	30	40	50	60	70	80
E25	DIQLTQSPSS	LSASVGDRAVT	ITC[RASQSV	YDGDSYM]	WY QOKPGKAPKL	LIY[AASYLE]	GVPSPFSGSG	SGTDFTLTIS
E26	DIQLTQSPSS	LSASVGDRAVT	ITC[RASKEVD	GEDGSMAN]	WY QOKPGKAPKL	LIY[AASYLE]	GVPSPFSGSG	SGTDFTLTIS
Hu-901	DIQLTQSPGT	LSLSPERAT	LSC RASOSIG	TNIH----	WY QOKPGQAPRL	LIR VASESTIS	QIPSPFSGSG	SGTDFTLTIS
	90	100	110	C_L starts				
E25	SLOPEDFATY	YC[QOSHEDPY	T]FGQGT	KVEI KRT	VAAPSVFI	PPSDEQLKSGTASV	VCLLNNFY	PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
E26	SLOPEDFATY	YC[QOSHEDPY	T]FGQGT	KVEI KRT	VAAPSVFI	PPSDEQLKSGTASV	VCLLNNFY	PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
Hu-901	RIPEDFAMY	YC QQSDSWIFT	T	FGQGT	KVEI KRT	VAAPSVFI	PPSDEQLKSGTASV	VCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
E25	SKDSTYLSSTLT	LSKADYEKKHVY	ACEVTHQGL	SSPVT	KSFNRGEC			
E26	SKDSTYLSSTLT	LSKADYEKKHVY	ACEVTHQGL	SSPVT	KSFNRGEC			
Hu-901	SKDSTYLSSTLT	LSKADYEKKHVY	ACEVTHQGL	SSPVT	KSFNRGEC			

FIG. 10A

Anticuerpos dirigidos contra IgE: cadena pesada (Regiones V _H y C _H)									
	10	20	30	40	50 a	60	70	80	90
E25	EVQLVESGGG	LVQPFGSLRL	SCAVSGYSIT	S[GYSMNW]IRQ	APKGLEWVA	[SITYDGS	TNY NPSVKG]RITI	SRDDSKNTFY	LQMNSLRAED
E26	EVQLVESGGG	LVQPFGSLRL	SCAVSGYSIT	S[GYSMNW]IRQ	APKGLEWVA	[SITYDGS	TNY NPSVKG]RITI	SRDDSKNTFY	LQMNSLRAED
Hu-901	QVQLVQSGAE	VKKRPCHSVKV	SCKASGYTF	S [MVLLEW V]RQ	APQGLEWVG	EISPGTITNY	NEKFKA RAHF	TAPISNTIAY	MELSLRSED
	100	110ab	120 C _H starts						
E25	TAVYYCAR	[GS HYFGHMF	FAV] WGQGT	LVTVSS	ASTKGPSVFP	PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF	PEPVT	VSWMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS	
E26	TAVYYCAR	[GS HYFGHMF	FAV] WGQGT	LVTVSS	ASTKGPSVFP	PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF	PEPVT	VSWMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS	
Hu-901	TAVYYCAR	[FS HFSGSN	DIYFDY] WGQGT	LVTVSS	ASTKGPSVFP	PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF	PEPVT	VSWMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS	
E25	VVTVPSSSLG	TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK	THTCPCP	APPELLGGPSVFLFPPKPKDTILMI	SRTPEVT	CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE			
E26	VVTVPSSSLG	TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK	THTCPCP	APPELLGGPSVFLFPPKPKDTILMI	SRTPEVT	CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE			
Hu-901	VVTVPSSSLG	TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK	THTCPCP	APPELLGGPSVFLFPPKPKDTILMI	SRTPEVT	CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE			
E25	VHNAKTKPRE	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK	GFYPSDIAVEWE						
E26	VHNAKTKPRE	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK	GFYPSDIAVEWE						
Hu-901	VHNAKTKPRE	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK	GFYPSDIAVEWE						
E25	SNGQPENNYK	TPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV	FC	SCVMHEALHNHYTQKSLS	SPGK				
E26	SNGQPENNYK	TPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV	FC	SCVMHEALHNHYTQKSLS	SPGK				
Hu-901	SNGQPENNYK	TPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV	FC	SCVMHEALHNHYTQKSLS	SPGK				

FIG.-- 10B